

國內 競走馬에서의 Getah 바이러스 分離 同定

柳瑩銖 · 張正瑚 · 李在鎭 · 金英均* · 李始永*
家畜衛生究研所 · 韓國馬事會*
(1990. 9. 1 접수)

Isolation of Getah virus from racehorse in Korea

Young-soo Lyoo, Chung-ho Chang, Je-chin Rhee, Young-kyun Kim, Si-young Lee*
Veterinary Research Institute, RDA, Anyang, Korea
Korean Horse Affairs Association, Kwachun, Korea*
(Received Sept 1, 1990)

Abstract: Getah virus is known as a causative agent of recognized febrile illness of horses characterized by fever, rash and edema.

A serological survey indicated that hemagglutination inhibition antibody against Getah virus was detected in 34% of 464 racehorses from Korean Horse Affairs Association and 57% of 262 ponies from Cheju island, respectively.

Several field strains of Getah virus isolated were from the racehorse that have been shown fever and febrile signs in 1989. The field isolates produced cytopathic effect in Vero, MA-104, BHK-21 cell cultures. Especially, they multiplied to the highest titer(10^6 TCID₅₀/0.1ml) in Vero cell cultures.

When day-old mice were inoculated with field isolates by the intracerebral route, they showed a typical paralysis sign and died within seven days after inoculation. The guinea pig exhibited skin rash and edema, and died with neural signs after inoculation with the field isolates.

In the cross neutralization test and indirect immunofluorescent assay, the field isolates were proved to be closely related to the Sakai strain of Getah virus antigenically.

Key words: Getah virus, racehorse, isolation.

緒 論

Getah 바이러스는 Togaviridae, Alphavirus에 속하는 RNA 바이러스로 envelope와 papilomer를 가진 약 70nm 직徑의 작은 球型의 바이러스로 buoyant density는 1.22g/ml이다. 이 바이러스는 ether, chloroform, 50°C 30분의 加熱에 不活化 되며, 거위 赤血球를 凝集시키는 特性이 있는데 Getah 바이러스는 pH와 NaCl의 濃度에 매우 敏感하여 pH 6.0~6.4와, NaCl 0.35M의 條件에서만 血球凝集 反應을 일으킨다.^{1,2}

Getah 바이러스는 주로 말에 감염되어 發熱, 發疹, 浮腫 등의 症狀을 보이는 急性傳染性 疾病의 原因體로

1978년 日本의 競走馬에서 처음 發病이 報告된³ 以後 Australia, Malaysia 등에서 그 發生이 報告 되었다.^{1,4,5} Getah 바이러스는 모기 등 흡혈 곤충에 의해 傳染되며 돼지, 소 등의 家留들과 野生動物들에도 감염되는 것으로 알려져 있다.^{1,3,6}

國內에서는 1987년 처음으로 말에서 Getah 바이러스에 대한 抗體調查가 實施되었으며 그 結果 약 30%의 抗體養成率을 보였으나 疾病의 發生報告나 바이러스의 分離 同定 등은 이루어지지 않고 있다.

본 研究에서는 現在 國內 飼育 말들 중, 특히 競走馬에서 發生이 疑心되고 있는 Getah 바이러스 感染症의 發生을 確認하고자 韓國馬事會로 부터 Getah 바이

리스 感染症의 症狀을 보이는 말들로 부디 血液을 採取하여 바이러스를 分離하고 細胞內 增殖性, 마우스와 기니픽에서의 病原性, 標準株와의 血清學的 同定試驗 등을 實施하였다.

材料 및 方法

Getah 바이러스에 對한 抗體 分布 調査 : 韓國馬事會의 競走馬 200頭와 濟州道 조랑말 262頭의 血液을 採取하여 Kono 等의 HI 試驗法으로 Getah 바이러스에 對한 抗體價를 調査하였다. Getah 바이러스의 HI 試驗에는 0.33% 거위 赤血球를 利用하였으며, 바이러스와 血清의 稀釋은 hovine albumin borate saline을 使用하였다.

바이러스의 分離 및 病原性 試驗 : 馬事會로부터 Gatah 바이러스 感染症의 症狀을 보인 競走馬의 血液을 採取하여 바이러스 分離 材料로 使用하였다.

使賴된 血液을 2,500rpm에서 30分間 遠心分離하여 上層液을 약 80%程度 單層培養된 Vero, MA-104, BHK-21, HmLu-1 細胞에 接種하여 CPE 發生 有無를 觀察하였다. 細胞 分離된 바이러스는 3대 連續繼代한 後 1日齡 哺乳 마우스의 腦內와 300g 경도의 기니픽(guinea pig)에 接種하여 실험동물에서의 病原性을 觀察하였다.

抗血清의 生産 : BEI로 不活化시킨 分離 바이러스와 Getah 바이러스 Sakai株를 complete Freund's adjuvant와 混合하여 guinea pig에 接種하고 3週後 incomplete Freund's adjuvant와 混合유제한 抗原으로 2次 接種하고 3週後 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml의 野分 分離 바이러스를 攻擊 接種하였다. 攻擊 接種 2週後 血液을 採取하여 抗血清으로 使用하였다.

交叉中和試驗 : Getah 바이러스 Sakai株와 野分分離株 各各에 對한 抗血清을 37°C에서 60分間 感作 시킨 後, 70~80% 單層 培養된 Vero細胞에 接種하여 培養하였으며 培養 5日後 最終 血清中和價를 計算하였다.^{2,8} 中和試驗에 使用된 바이러스는 모두 200TCID₅₀/0.1ml의 力價를 使用하였다.

螢光抗體法 : 單層 培養된 Vero 細胞에 Sakai 바이러스와 分離 바이러스들을 接種하여 약 50% 程度의 CPE가 나타났을때 感染細胞를 acetone으로 固定시키고 各 바이러스에 對한 抗血清을 1次 抗體로 使用하여 室溫에서 30分間 反應시킨 後 polyvalent anti-guinea pig IgG FITC conjugate를 30分間 反應시켜 洗滌한 後 螢光顯微鏡으로 觀察하였다.

結 果

Getah 바이러스에 對한 抗體 分布 調査 : 韓國馬事會 競走馬들과 濟州道の 조랑말 等 總 464頭의 血液을 採取하여 Getah 바이러스에 對한 抗體價를 HI 試驗法으로 調査한 結果 馬事會 競走馬들은 34%, 濟州道 조랑말들은 57%의 抗體 陽性反應을 나타내었으며 (Table 1) 年齡이 增加함에 따라 抗體陽性率도 增加하는 傾向이 있다. 陽性反應을 보인 個體들의 抗體價 分布는 10倍에서 1,280倍까지 多樣하게 나타났다 (Table 2).

바이러스 分離 및 病原性 試驗 : 바이러스 分離 材料를 Vero, MA-104, BHK-21, HmLu-1 細胞들에 各各 3대씩 連續 繼代하여 cytopathic effect(CPE) 出現을 觀察한 結果 Vero, MA-104, BHK-21 細胞에서 CPE를 보였으며 그중 Vero 細胞에서 가장 뚜렷한 CPE를 나타내었다. Vero 細胞에서 分離 바이러스는 약 $10^4 \sim 10^6$ TCID₅₀/ml의 力價를 나타내었다 (Table 3, Fig 1~3).

Table 1. Distribution of antibody against Getahvirus in racehorse and Cheju-ponies

Age	Race horses		Cheju-ponies	
	No. of tested	No. of positives	No. of tested	No. of positives
< 3	22	6(27)	82	26(32)
3~ 6	153	47(31)	96	60(63)
7~10	23	14(61)	72	56(78)
>10	2	1(50)	12	8(67)
Total	200	68(34)	262	150(57)

Table 2. HA antibody titers to Getah virus in horse sera

Classification	No. of tested	No. of sera with HI titer							
		10	20	40	80	160	320	640	1280
Racehorse	68	7	9	11	8	11	13	8	1
Chejuponies	150	39	33	27	15	21	13	2	—
Total (%)	218 (100)	46 (21)	42 (19)	38 (17)	23 (10)	33 (15)	26 (12)	10 (4)	1 (0)

Table 3. Susceptibility of cells to the field isolate and Sakai strain of Getah virus

Virus	in Vero	in MA 104	in BHK-21
Sakai	8**	6	NT****
JRH*	6	wCPE***	wCPE
JDH	5	wCPE	wCPE
GNH	6	wCPE	wCPE
DJH	4	wCPE	wCPE
SGH	6	wCPE	wCPE
MMH	6	wCPE	wCPE
MJH	6	wCPE	wCPE

* Name of racehorse
 ** Log₁₀TCID₅₀/ml
 *** weak cytopathic effect
 **** Not tested.

Table 4. Pathogenicity of field isolates in day old suckling mice

Virus	No. of mice inoculated	No. of mice showing clinical signs	No. of died(%)
JRH	10	3	2(20)
JDH	8	3	2(25)
DJH	10	4	2(20)
SCH	11	10	10(90)
GNH	10	3	3(30)
MJH	12	5	5(42)

* 10^{6.0}TCID₅₀/ml of the field virus in 0.02ml/mice by intracerebral inoculation.

분리 바이러스들을 1日齡 마우스의 腦內 接種 3日부터 마우스들이 神經症狀 等の 臨床症狀을 보이며 20%~90%의 廢死率을 나타내었다(Table 4).

抗血清의 生産: 分離바이러스를 기니픽 筋肉내에 接種하여 分離 바이러스에 對한 抗血清을 生産하였으며, 이들 抗血清을 血清中和試驗, 間接免疫螢光抗體試驗 等に 使用하였다.

바이러스 接種 後 기니픽에서의 病原性이 觀察되었는데 寫眞 1에서 보는 것처럼 바이러스를 接種한 기니픽의 皮膚에 發赤, 膨脹이 發生하였고 神經症狀을 보이며 斃死한 個體도 있었다(Fig 4).

交叉中和試驗 및 間接免疫螢光抗體試驗: 生産된 抗血清을 Getah 바이러스 Sakai株와 野外分離바이러스들을 利用하여 血清中和試驗을 實施한 結果 分離바이러스와 Sakai株가 서로 비슷한 抗原性을 가지고 있음

Table 5. Antigenic relationship between the Sakai strain of Getah virus and two field isolates by cross neutralization test

	Sakai	JDH	MJH
Sakai	100*	70	100
JDH		100	50
MJH			100

* Percent(%) relationship was calculated from the Archetti-Horsfall formula¹² % relationship $R = \frac{\sqrt{r_1} \times \sqrt{r_2}}{\sqrt{r_1} + \sqrt{r_2}} \times 100$

r_1 & $r_2 = \frac{\text{SN titer of serum against heterologous strain}}{\text{SN titer of serum against homologous strain}}$

Table 6. Antigenic relationship between the Sakai strain of Getah virus and two field isolates by indirect immunofluorescent assay

Virus	Antiserum prepared against			
	Sakai	JDH	MJH	JBE
Sakai	卅	卅	卅	—
JDH	卅	+	+	—
MJH	卅	+	+	—
JEV*	—	—	—	卅

* Japanese encephalitis virus

을 알 수 있었고 交叉免疫 螢光抗體 試驗에서도 역시 分離 바이러스들과 Sakai株와 서로 FA 陽性 反應을 보였고 일본뇌염 바이러스(JEV)와는 分離株와 Sakai株 모두 陰性 反應을 보여 分離된 바이러스가 Getah 바이러스임을 알 수 있었다(Table 5, 6).

考 察

말, 특히 競走馬에서 Getah 바이러스가 感染된 경우 發熱, 皮膚 發赤, 浮腫 等の 症狀으로 인해 個體를 弱화시켜 競走에 出走할 수 없게 되며, 모기 等に 의해 傳播됨으로서 同時多發의인 發生이 되어 큰 被害를 입게 된다.

韓國馬事會 所屬의 競走馬들과 濟州道의 조랑말들을 採血하여 Getah 바이러스에 對한 抗體價를 調査한 結果 各各 34%와 57%의 抗體 陽性率을 나타내었는데 이 結果는 日本 競走馬에서의 陽性率과 거의 비슷한 結果로서 國內에서도 Getah 바이러스 感染症이 發生할 可能性이 있음을 알 수 있었다.^{6,9,10,11}

Getah 바이러스양 症狀을 보이는 말들의 血液을 細

胞培養法를 利用 마이리스를 分離 하였는데 Vero 細胞에서 가장 마이리스의 分離가 容易하였으며 $10^4 \sim 10^6$ TCID₅₀/0.1ml의 마이리ஸ் 力價를 얻을 수 있었고 MA 104, BHK-21 細胞에서도 細胞變性效果를 보였으나^{1,8} Vero 細胞에 비해 약한 CPE를 나타내어 Getah 마이리스의 力價測定에 다소 어려움이 있었다.

Getah 마이리스는 哺乳 마우스에 매우 敏感한 것으로 알려져 있고 guinea pig에서는 病原성이 아직 알려져 있지 않는데 分離된 마이리스들을 哺乳 마우스 腦內 接種하였을때 마우스에서 20~90%의 多樣한 廢死率을 나타내어 Kono¹가 報告한 Getah 마이리스의 感受성과 類似한 結果를 보였고 分離마이리스를 기니픽에 接種하였을때 기니픽의 皮膚가 發赤, 腫脹되었고 神經症狀를 보인 個體는 斃死하여 Getah 마이리스가 기니픽에도 病原성이 있는 것으로 觀察되었다.

分離 마이리스에 對한 抗血清을 Getah 마이리스 Sakai株와 交叉血清中和試驗을 實施한 結果 Sakai株의 抗血清과 分離 마이리스들의 抗血清이 높은 抗原 類似率(percent relationship)을 나타내어 分離 마이리스들과 Sakai 마이리스가 類似한 抗原 關係를 가진 것으로 생각된다. 같은 材料를 利用하여 間接免疫螢光抗體試驗을 實施한 結果 分離된 마이리스들과 Sakai株가 서로 陽性反應을 보여 매우 密接한 抗原 關係가 있음을 알 수 있었다.

앞으로 分離한 마이리스를 利用하여 Getah 마이리스에 對한 백신을 開發하여 Getah 마이리스 感染症의 發生을 豫防하고 Getah 마이리스가 소, 돼지 등의 家畜들에게도 感染이 可能하며 특히 돼지의 경우 Getah 마이리스가 感染이 되면 viremia 狀態가 되어 臨床症狀 없

이 마이리스의 量을 增幅 시키기 때문에^{1,6} 國內의 돼지, 소들의 Getah 마이리스에 對한 抗體價 調査를 實施하여 疾病發生에 對備해야 한다.

結 論

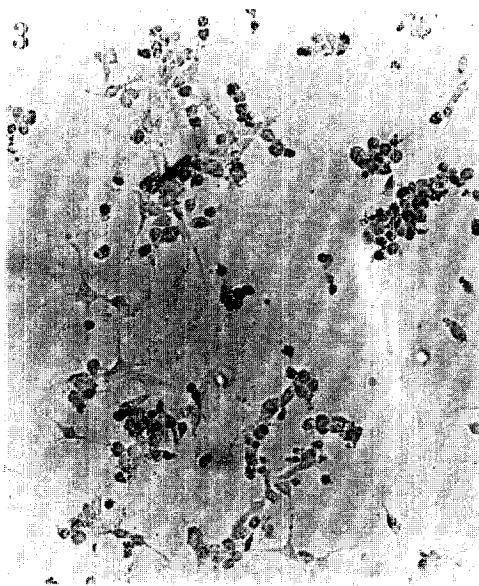
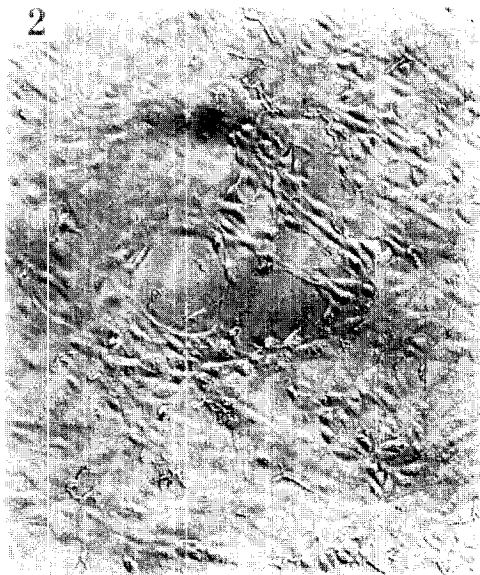
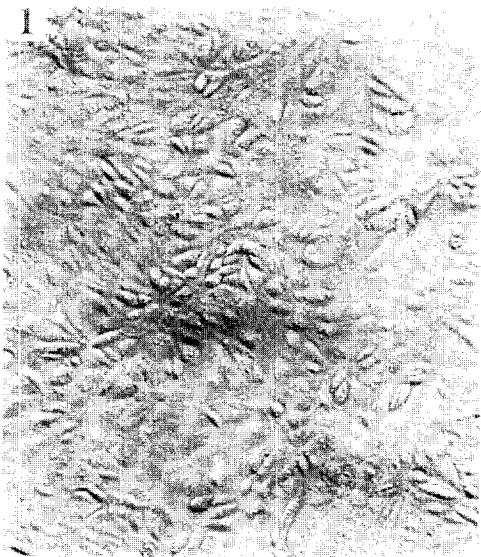
韓國馬事會 競走馬들과 濟州道の 조랑말들의 血液을 採取하여 Getah 마이리스에 對한 抗體를 HI 試驗法으로 調査하고, 發熱, 發赤 등의 Getah 마이리스 感染症의 症狀를 보인 競走馬로부터 Getah 마이리스를 分離, 同定한 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. HI 試驗으로 Getah 마이리스에 對한 抗體價를 調査한 바 馬事會 競走馬들은 平均 34%, 濟州道の 조랑말들은 平均 57%의 抗體 陽性率을 나타내었고 抗體의 力價는 10배에서 1,280배까지 넓게 分布하고 있는 것으로 나타났다.

2. 마이리스 分離 材料를 Vero, MA-104, BHK-21, HmLu-1 등의 細胞에 繼代培養하였을 때 Vere細胞에서 가장 分離가 잘 되었고 $10^4 \sim 10^6$ TCID₅₀程度的 높은 마이리스 力價를 얻을 수 있었으며 MA-104, BHK-21 細胞에서도 약한 CPE를 觀察할 수 있었다.

3. 分離 마이리스들은 1日齡의 哺乳 마우스에 腦內 接種時 20~90%의 斃死率을 보였고, 기니픽에 接種하였을때 皮膚에 發赤, 腫脹 등이 發生하였다.

4. 分離 마이리스들과 Sakai株에 對한 기니픽 抗血清을 利用 交叉血清中和試驗과 間接免疫螢光抗體法을 實施한 結果 分離 마이리스들과 Sakai株間에 매우 類似한 抗原關係를 나타내어 分離 마이리스들이 Getah 마이리스임을 알 수 있었다.



Legends for figures

Fig 1. Uninfected Vero cell(200×).

Fig 2. Cytophatic effect in Vero cell infected with field isolates 48 hour after infection(200×).

Fig 3. Cytophatic effect in Vero cell infected with field isolates 72 hour after infection(200×).

Fig 4. Clinical symptoms of Guinea pigs inoculated with field isolate of Getah.

C: Normal guinea pig, NS: Guinea pigs showing neural sign and skin rash.

参 考 文 献

1. Kono Y. Getah virus disease. The Arbovirus: Epidemiology and Ecology. *CRC press*, 1989: 21~36.
2. Kono Y, Sentsui H and Ito Y. An epidemis of Getah virus infection among racehorses: Properties of virus. *Res Vet Sci* 1980;29:162~167.
3. Imagawa H, et al. Sero-epizootiological survey on Getah virus infection in light horse in Japan. *Jpn J Vet Sci* 1981;43:797~802.
4. Wada H, et al. Equine Getah virus infection: Pathological study of horses experimental infected with the MI-110 strain. *Jap J Vet Sci* 1982;44:411~418.
5. Tesh RB, et al. The distribution and prevalence of group A arbovirus neutralizing antibodies among human population in southeast asia and pacific islands. *Am J Trop Med Hyg* 1975;24: 664~675.
6. Kumanimido T, et al. Ecological survey on Getah virus among swine in Japan. *Bull Equine Res Inst* 1982;19:89~92.
7. Sentsui H, Kono Y. An epidemic of Getah virus infection among racehorse: Isolation virus. *Res Vet Sci* 1980;20:39~43.
8. Kamada M, et al. Studies on Getah virus: Some biological, physicochemical and antigenic properties of the MI-110 strain. *Jpn J Vet Sci* 1982; 44:89~96.
9. Matsumura T, et al. Prevalence of antibodies against Getah virus in horse raised in Hokkaido. *Jpn J Vet Sci* 1981;43:783~786.
10. Sentsui H, Kono Y. Survey on antibody to Getah virus in horse in Japan. *Nat Inst Anim Health Q(Jpn)* 1980;20:39~43.
11. Sentsui H, Kono Y. Reappearance of Getah virus infection among horses in Japan. *Jpn J Vet Sci* 1985;47:333~335.
12. Archetti I, Horsfall FL. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterogenous immune serum. *J Exp Med* 1950;92:441~462.