

발간등록번호

11-1541000-001228-01

한국형 승용마 생산·육성을 위한 기술 개발과
실용화 체계 구축

(Development and Establishment of Technique for Riding
Horse Production and Breeding in Korea)

경북대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한국형 승용마 생산·육성을 위한 기술 개발과 실용화 체계 구축에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 12월 19일

주관연구기관명 : 경북대학교

주관연구책임자 : 조 길 재

세부연구책임자 : 조 길 재

연 구 원 : 권 오 덕

연 구 원 : 최 성 균

연 구 원 : 양 영 진

연 구 원 : 신 선 희

연 구 원 : 박 지 연

협동연구기관명 : 경북 축산기술연구소

협동연구책임자 : 박 용 수

연 구 원 : 조 광 현

연 구 원 : 최 수 호

협동연구기관명 : 평창종마영농법인

협동연구책임자 : 정 영 자

협동연구기관명 : 봉화 곰바위목장

협동연구책임자 : 홍 성 범

요 약 문

I. 제 목

한국형 승용마 생산·육성을 위한 기술 개발과 실용화 체계 구축

II. 연구개발의 목적 및 필요성

정부의 말산업육성법 시행과 FTA 이후 축산업의 대체산업으로 말 산업에 대해 정부 및 지자체의 관심이 집중되고 있는 실정이다. 그 동안 경주마의 경우 자연교배 만을 허용하는 국제기준에 따라서 국내에서 말의 생산은 지금까지는 주로 더러브렛종 경주마를 생산하였으나 FTA 이후 축산업의 대체산업으로 말 산업이 대두되고 있고, 국민소득 3만불 시대를 맞이하면서 생활승마에 대한 국민들의 관심이 고조되고 있다. 이에 정부 및 지자체에서는 승용마의 생산·육성을 통해 생활승마를 활성화하고 축산농가의 고부가 가치의 소득원을 창출하고자 승용마 산업에 대한 새로운 정책을 수립하고 있다.

그 동안 한국마사회는 더러브렛종 경주마 생산 및 육성에 주로 관여하였으나 최근에는 생활승마 활성화를 통해 위기에 처한 축산농가에 고부가 소득원을 제공하고자 2014년까지 승용마 전문 생산농가 100호를 육성하기 위해 씨암말을 구입하여 민간에 분양하고 씨수말은 한국마사회가 정액 및 백신을 지원하는 등 승용마 생산을 위한 정부 정책 변화에 능동적으로 대처하고 있다.

우리나라의 경우 지난 70년대는 주로 일본이나 호주 등지에서 수입된 더러브렛종 또는 앵글로아랍종 말을 가지고 경마에 활용하였으나 국적 있는 경마시행 및 개량을 통한 경마의 국제화와 축산 발전 및 농가 소득에 기여할 목적으로 80년대 초부터 국내에서도 말의 생산을 시작한 이래 현재는 제주를 포함하여 전국적으로 말을 생산하는 괄목할만한 발전을 이루었다.

현재 국내에서 사육되고 있는 말은 더러브렛종 말과 같은 개량마 혹은 경종마가 약 10,000여두, 제주마를 포함한 pony 계통이 약 19,000여두 등, 총 29,000여두로 추정하고 있다. 그 중에서 번식을 목적으로 사육되고 있는 더러브렛종 씨암말은 1,700여두, 씨수말은 70여두로서 이들 사이에서 태어나는 망아지는 연간 1,200여두 이상으로 계속해서 증가추세에 놓여있는 실정이다. 그러나 국내에서 생산되는 경주마 중에서 약 70% 정도만이 경주마로 활용되는 것으로 알려져 있어 생산농가가 많은 어려움에 직면하고 있다. 또한 FTA 이후 국내 축산 농가의 피해가 우려되고 있어 그에 대한 대안 산업으로 말 산업이 대두되고 있으며, 정부나 지방자치단체에서도 말 산업의 활성화에 많은 관심을 가지고 있다.

그래서 최근에는 생활체육의 하나로서 승마를 활성화시키고자 국내에서도 승용마를 생산하는 방향으로 정책을 추진하고 있다. 그러나 국내에서 활용 가능한 승용마는 거의 없으며 주로 경주마 중에서 퇴역마를 사용하고 있어 낙마로 인한 기승자의 사고, 승용마 전환에 있어 장기간의 교육 등 여러 가지 문제점이 대두되고 있다.

더러브렛종 말은 다른 동물에 비해 개체별 특이성이 높기 때문에 씨암말의 임신과 생산에 관련된 번식생리 역시 말 품종 간에 큰 차이가 있으며 가축 중에서 생산효율이 가장 낮은 것으로 알려져 있다. 대부분의 국가에서 번식을 목적으로 매년 교배하는 씨암말의 임신율은 약 85~90% 정도이나 다음 해 태어나는 망아지는 임신한 씨암말 대비 65~79% 정도에 불과한 것으로 알려져 있다.

자궁감염 또는 지속성 자궁염을 유발하는 원인들을 인지하고 처치하는 것은 번식장애마를 현저히 감소시키는데 많은 도움이 된다. 씨암말들이 하룻밤사이에 번식장애마가 되는 것은 아니다. 감염에 대한 민감도는 연령의 증가, 번식기관의 손상, 세균의 감염 등에 의해 주로 발생하고 있고, 특히 세균의 감염은 생식기의 외형적 구조, 번식기술, 검사과정, 해부학적 기형, 산후의 처리 등에 영향을 받는다. 감염에 대한 물리적 방어막으로는 외부의 음순, 전정의 괄약근 및 자궁경 등이 있다. 정상적인 씨암말에서 세균을 고립시키는 능력은 음핵와 (clitoral fossa, 94%), 전정(69%), 질의 앞쪽(42%), 자궁(31%)의 순으로 점차 감소하는 것으로 알려져 있다. 교배, 분만전후, 검사과정 중에 감염이나 물리적 방어막의 손상에 의해 잠복중인 미생물들이 침투할 수 있다. 자궁의 방어 기전들이 정상적으로 작용하고 있을 때는 많은 양의 미생물들에 노출(자연적 또는 실험적)되더라도 번식을 방해할 정도의 장기간의 염증은 잘 발생하지 않는다. 배아의 생존을 위해 배란 5~6일후 교배의 결과로 인해 자궁강으로 배아가 내려오는 시기에 자궁에는 염증유발물질 및 세균이 존재하지 않아야 한다. 자궁의 방어기전은 기계적 및 세포생물학적 측면을 가진다. 기계적 측면에서 자궁을 방어하는 수단은 발정기동안 자궁 내용물을 추출하고 자궁경을 이완시키는데 도움을 주는 자궁근 수축이다. 세포학적 반응은 주로 식작용(phagocytosis)에 의해 이루어진다. 효율적인 호식작용은 1)적당한 수의 호중구(neutrophils)들이 일반적 순환상태로부터 이동하여 자궁내막을 통해 자궁강으로 신속한 이동, 2)감염을 유발시킨 세균에 대한 호중구의 적절한 주화성(chemotaxis), 3)식세포(phagocyte)를 위한 세균의 세포표면에 대한 옵소닌화(opsonization) 및 4)세균들에 대한 호중구들의 성공적인 섭취(ingestion) 및 세포내로 함입된 세균들의 제거(killing) 등에 의존한다. 비록 자궁방어 기전의 실패에 대한 모든 원인들은 확인되지 않았으나 영향을 미치는 몇 가지 중요한 요인들은 잘 알려져 있다. 회음의 기형 및 기질(pneumovagina)과 같은 병에 잘 걸리게 하는 요소와 더불어 반복적으로 과다한 감염이나 오염은 씨암말의 방어기전의 효율저하를 유발함이 확실한 것으로 알려져 있다. 호중구의 세균을 식균하는 효율감소 및 항체와 보체에 의한 옵소닌화(opsonization)의 결핍현상이 자궁염 감수성이 높은 씨암말들로부터 확인된 바 있다. 그리고 이러한 현상은 백혈구수가 부적절하거나 감소되는 것과는 관계가 없다. 또한 자궁으로부터의 염증물질과 오염물질의 기계적 배출 실패도 중요한 것으로 사료된다. 다산의 고령인 씨암말에서 자궁근의 활성화는 현저히 감소하며, 병에 감수성이 높은 씨암말의 자궁으로부터는 질병 저항성이 있는 씨암말과 비교하여 비항원성 표지인자의 물리적 제거가 늦게 이루어진다. 만일 불충분한 이완, 유착 또는 해부학적인 기능결함으로 문제가 발생하면 자궁내의 오염물질을 배출하는 작용이 작동하지 않을 수도 있다.

씨암말의 생식기 질환과 관련된 주요 병원체는 *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* 등이 있으며, 종종 *Corynebacterium* spp, *Proteus* spp, *Klebsiella oxytoca*, *Bacteroides fragilis*, *Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Staphylococcus* spp. 등도 관여하고 있다. 말 전염성 자궁내막염(CEM)은

*Taylorella equigenitalis*에 의해 유발되는 생식기 질병으로서 교배 후 1-14일간의 잠복기를 거쳐 자궁내막염, 자궁경관염, 질염 등을 유발한다. 그 증상으로는 음분부에서 삼출액이 배출되며 꼬리 부위가 오염되어 있다. 불수태, 조기발정의 반복 등을 야기하며 감염된 씨암말은 대부분 임상증상이 미약하여 다른 원인에 의한 자궁내막염과 구별이 쉽지 않아 본 병을 진단하기에 많은 어려움이 있는 것으로 알려져 있다.

국내에서 양 등(2004)은 2000년 2월부터 2001년 7월 사이 제주 동부 지역에서 사육중인 더러브렛종 씨암말 301두와 자마 103두를 대상으로 번식특성을 조사한 결과, 2000년 교배한 씨암말 143두의 임신율은 93.0%(133두/143두), 망아지 생산율은 72.0%(103두/143두)로 확인하였다. 평균 임신기간은 339.3일이었고 2001년 씨암말 158두의 교배횟수는 315회로서 씨암말당 평균 교배횟수는 1.99회였으며 임신율은 86.7%(137두/158두)로서 출산경력이 있는 경산마들이 공태마나 처녀마보다 수태율 및 임신율이 높은 것으로 보고한 바 있다.

또한 최 등(2007)은 국내에서 활용중인 100두의 씨암말을 대상으로 생식기내 세균을 조사한 결과, 많은 종류의 세균이 분리되었으나 전염성 자궁염의 원인체인 *Taylorella equigenitalis*와 화농성 자궁염의 원인체인 *Klebsiella pneumoniae*는 분리되지 않았다고 보고한 바 있다.

국내에서 사육중인 씨암말의 생식기 질환을 예방하고 생산성 향상을 도모하기 위해서는 가능한 한 자궁의 감염기회를 줄이는 것이 중요하며 씨암말의 자궁 면역학적 연구, 특히 자궁내의 세포반응이나 항균 물질의 분비 및 방어기전 등의 연구와 동시에 만약 발병 시 치료 효율을 극대화하는 방안으로 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

국내에서 생산되는 더러브렛종 말이 사람의 족보와도 같은 혈통서(Stud book)에 등재되기 위해서는 축산법 및 더러브렛종 등록규정에 근거하여 유전자(혈액형 포함) 감정 및 모색유전의 법칙에 의해서 친자관계가 확인되어야만 한다.

단백질의 다형은 유전자 상에 코드되어 있지만 유전자내에서 단백질의 정보를 담당하고 있지 않는 인트론부위나 유전자이외의 비코드 영역에는 반복배열의 반복수가 다른 다형이 존재하는 것으로 알려진 이래 현재 이용되고 있는 대표적인 유전자 감정 기법은 microsatellite DNA typing 혹은 short tandem repeats(STRs)이다. 말에 있어서는 1986년 개최된 더러브렛 국제혈통서위원회에서 DNA 감정에 관해 처음으로 거론된 이래 국제간의 긴밀한 협조하에 진행된 결과 현재는 각국의 공통적인 DNA 검사항목 사용 및 검사법의 표준화가 이루어져 친자확인에 채택하고 있는 실정이다. 말의 개체식별이나 친자판정을 목적으로 한 DNA locus(좌위)는 allele(대립유전자)의 수가 많고 heterozygosity(이형접합율)가 높으며 다형성을 보이는 염기수가 적은 것, 즉 PCR 증폭이 가능하며 정확한 염기수나 반복배열수가 용이하게 산출되는 범위의 것으로서 돌연변이율이 낮은 것이어야 하고 또한, 더러브렛종 말의 혈통등록은 초봄에 집중되어 단시일내에 많은 검사를 수행해야 하므로 경제적이며 방법이 단순하고 시간이 절약될 수 있는 marker가 좋은 것으로 알려져 있다. 그래서 각국에서는 말의 DNA다형 marker를 지금까지 핵 DNA의 유전자 비코드부위에서의 반복배열수의 차이를 지표로 한 microsatellite DNA로서 2~4염기의 반복되는 배열로서 heterozygosity가 높고 allele의 수가 많은 marker중에서 국제간 comparison test(비교시험)를 통해 검사방법을 표준화 시킨 후 1998년과 2000년 국제동물유전학회 말 분과위원회에서 9개의 microsatellite DNA marker를 국제최소검사항목으로 지정하였다. 현재 대부분의 감정기관에서는 실제로 혈액형 감정을 시행하지 않고 유전자 감정으로 개체식별이나 친자판정을

시행하고 있다. 더러브렛종 말의 혈통등록을 위한 각국의 친자감정기관은 국제혈통서위원회(International Stud Book Committee: ISBC)의 엄격한 조건을 준수하여야 한다. 그래서 혈통서 등록기관으로부터 지정받은 각국의 친자감정기관은 국제동물유전학회(International Society of Animal Genetics: ISAG)에 가입하여 ISBC와 ISAG가 공동으로 결정한 더러브렛종 유전자(혈액형 포함) 최소검사항목을 검사해야 하고 ISBC와 ISAG가 공동 주최하는 말(더러브렛종 포함) 유전자 국제비교동정시험에 참가해야 하는 의무를 준수하여야 한다.

근래에 들어 국내 말 생산 산업의 괄목할 만한 성장으로 생산 및 사육농가의 증가, 경주마의 생산두수 증가, 인기 있는 씨수말과의 교배 집중화, 혈통과 유전형질이 뛰어난 외국산 씨수말 및 씨암말의 구입 등 경마의 국제화에 따른 말의 국제간 이동 증가, 목장내 생산마의 친자감정을 둘러싼 분쟁 등 종래에 비해서 말의 개체식별이나 친자감정의 중요성이 대두됨에 따라 신속하고 정확하며 경제적인 감정방법을 요구하고 있다. 그러나 승용마의 경우 특별한 국제기준이 없어 더러브렛종 말에 준해서 실시하고 있는 실정이다. 자연교배뿐 아니라 인공수정이나 수정란이식에 의해 태어난 승용마의 경우 특히 등록의 중요성이 대두되고 있다. 그래서 승용마의 등록에 가장 효율성이 높은 horse microsatellite marker에 대한 감정 기술을 정립함이 시급히 요구되고 있다.

전 세계적으로 더러브렛종 말은 자연교배에 의해 생산된 망아지만이 경주마로 활용할 수 있도록 규정하고 있으나 승용마의 경우 자연교배나 인공수정에 의해 생산되어도 아무런 문제가 없다. 국내에서 말의 생산은 주로 자연교배에 의해 이루어지고 있으며 말에서 인공수정이 이루어진 경우는 아직까지 없는 실정이다. 그래서 말에서 인공수정 시 요구되는 인공수정관련 기술(정액의 냉장 및 동결 완충액, 동결 완충액의 buffer system, 인공수정용 정액의 품질 개선, 액상정액 제조·보관 및 주입전 가온 방법, 말 번식 성적 향상을 위한 씨암말의 발정동기화, 말 인공수정 시 정액 내 호르몬제 첨가로 번식효율 향상 등) 및 수정란이식 기술의 개발 및 확립이 시급히 요구되고 있다.

국민소득 3만불 시대를 맞이하면서 승용마에 대한 수요가 급증하고 있으나 주로 경주마나 외국으로부터 수입에 의존하고 있는 실정이다. 국내에서 말 생산에 있어서 국내 승용마의 기술개발은 전무한 상태이고 단지 경주마의 경우 한국마사회에서 주축이 되어 많은 생산농가가 동참하고 있는 실정이다. 그러나 경주마의 경우는 자연교배만을 적용하고 있기 때문에 승용마의 생산에 따른 기술 개발이 요구되고 있다. 또한 승용마 생산업의 안정적인 발전과 국내 생산 말의 활용률 제고를 위해 승용마 생산 후 안정적으로 판매되어 생산농가의 고소득 창출로 이어지는 경영의 안정화에 기여할 수 있는 말 유통체제의 양성화와 선진화가 시급히 요구되고 있다.

이러한 배경 하에서 본 연구는 정부의 말산업육성법 시행과 FTA 이후 예상되는 대체산업으로서 승용마 생산업이 국내 주요 축산산업으로의 자리매김과 생활승마 활성화에 따른 승용마 저변 확대를 위한 생산기술의 안정화를 도모함과 동시에 승용마 생산을 위한 번식장에 씨암말의 병인학적 특성 및 생산성 향상 기술을 개발하고 승용마 생산기반 및 실용화 체계를 구축하여 향후 승용마를 생산코자 하는 축산농가에 기술을 전수함으로써 축산농가의 고소득 창출에 기여하고자 일련의 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 승용말의 생산성 향상을 도모하고자 국내에서 사육중인 번식마를 대상으로 번식장애 씨암(수)말의 병인학적 특성을 파악하여 생산성 향상을 위한 기술 개발과 인공수정 및 수정란 이식에 의한 승용마 생산 기술을 확립한 후 향후 이들 기술에 의해 태어난 망아지를 육성하여 전문 승용마로서 활용할 수 있는 기반을 마련하기 위해 다음과 같은 내용의 연구를 수행하였다.

1. 말 번식장애 유발 세균, 바이러스 병원체의 신속 검출과 동정을 위한 진단법 및 예방법을 개발하였고 이들 병원체의 숙주내 작용기전 및 유전학적 특성을 규명하였다.

가. 번식장애 유발 세균 병원체(*S. zooepidemicus*, *S. equi*, *E. coli*)에 대한 유전학적 특성 분석 및 예방법 연구

나. 인공수정에 의한 망아지의 생산성 향상 기술개발과 관련 *Clostridium perfringens*의 진단법 및 예방법 연구, 신생자마 용혈성 질환 진단법 및 예방법 연구

다. 씨수말의 생식기질환 원인체인 EHV와 EVA의 동정을 위한 진단법 및 예방법 개발

2. 말 인공수정 및 수정란 이식에 의한 승용마 생산기술 개발을 위해 국내 환경에 적합한 씨수말로부터 정액 채취 및 동결정액 제조 기술을 개발하였고 이들 기술을 이용하여 망아지 생산에 적용하였다.

가. 정액 채취(콘돔, 인공질) 및 정액 회석 기술, 액상정액 제조·보관 및 동결정액 제조 기술 개발

나. 냉장정액(13두), 동결정액(7두) 인공수정 실시하였고 태어난 망아지를 대상으로 망아지 태반무게, 체중 및 체고, 기타 이상 연구

다. 말 수정란이식을 위한 발정동기화를 유도하여 말 수정란 이식 기법 개발 : 국내 최초 말 수정란 회수 및 이식 시험 및 성공(5두 채란, 3두 회수), 수정란 이식 : 2두 이식(1두 임신)

3. 승용마 생산·육성 기반 및 실용화 체계 구축을 위해 최적 교배적기 기준 정립 및 씨암말의 임신기간별 모니터링, 망아지의 초기 육성 기법 정립, 승용마 육성 기반 구축 등을 수행하였다.

가. 수정 후 15일 및 40일, 임신확인 후 30일 간격 임신 모니터링 기술 확립 및 임신말에 대한 최적의 사양관리 프로그램 확립

나. 이유 전 망아지 육성 및 초기육성 기법 연구, 생산된 망아지의 면역증강 효과평가

다. 최적 수정란 이식 기준 설정 및 씨암말의 모니터링

라. 동결정액 활용 인공수정으로 태어난 망아지의 육성 시험(1두) 및 관련기술의 실용화 체계 구축 및 농가 전수

4. 한국형 승용마의 친자감정 기법 정립 및 등록시스템을 구축하기 위해 유전자(DNA) 분석 기법(ISAG Horse Ms panel 및 SNP) 개발 및 등록시스템을 구축하였고 SNP를 통한 승용마 특이 유전형질 탐색 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발결과

본 연구는 승용말의 생산성 향상을 도모하고자 국내에서 사육중인 번식마를 대상으로 번식장애 씨암(수)말의 병인학적 특성을 파악하여 생산성 향상을 위한 기술 개발과 인공수정 및 수정란 이식에 의한 승용마 생산 기술을 확립한 후 향후 이들 기술에 의해 태어난 망아지를 육성하여 전문 승용마로서 활용할 수 있는 기반을 마련하기 위해 연구를 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 번식장애 씨암(수)말의 병인학적 특성 및 생산성 향상 기술 개발

가. *Streptococcus zooepidemicus*에 대한 진단법 및 예방법 개발

번식장애 씨암말 68두(질점액 66개, 유산태아 1개, 자궁내용물 1개)로부터 17주(25%)의 *Streptococcus zooepidemicus*를 생화학적 특성 및 PCR로 동정하였고, 분리균에 대한 특성은 *sodA - seeI*, *SzP*, *CNE encoding gene*을 분석하였으며, 유전학 및 역학적 특성을 조사하고자 RAPD로 분석하였고 또한 20개의 약제에 대해 디스크 확산법으로 항생제 감수성 시험을 실시하였다. 그 결과 국내 생식기 유래 *Streptococcus zooepidemicus*는 Ampicillin, Cefoxitin, Ceftiofur, Cephalothin, Florfenicol, Gentamycin, Nalidixic acid, Oxacillin, Penicillin, Tiamulin, Tylosin, Vancomycin에 높은 감수성을 나타내었다.

나. *Streptococcus zooepidemicus*의 작용기전, 유전학적 특성 및 예방법 연구

국내(제주와 장수)로부터 유산, 자궁내막염, 지속적인 번식의 실패를 보이는 더러브렛말 374두로부터 79주의 *S. zooepidemicus*균주를 분리하였다. 분리한 *S. zooepidemicus*의 역학적인 발생 분석과 국내에서 분리된 *S. zooepidemicus*에 대해 생물학적 및 분자생물학적 기법을 이용하여 역학적 특성에 대해 조사한 결과 전체 분리율은 21.12%로 국외의 연구에 비해 유사하거나 다소 높게 관찰되었다. 지역적인 분리율을 비교하였을 때 제주지역 32.23%, 장수지역 10.11%로 장수지역에 비해 제주지역이 3배 이상 높은 분리율을 나타내었다.

PCR 기법 및 fragment analysis 기법을 이용하여 분리된 79주의 *S. zooepidemicus*에 대한 16S-23S rRNA intergenic space region (ISR)의 특성 및 *SzP*, *cne* 병원성인자를 검사한 결과 분리된 모든 균주에서 698 bp의 ISR PCR product size를 관찰 할 수 있었으며, 모든 분리균주가 *SzP*, *cne* 병원성 인자를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 특히 분리 균주의 기초적인 역학적 분석 기법으로 활용되고 있는 *SzP* products size의 다양성에서는 1198 bp (n=3), 1154 bp (n=56), 1139 bp (n=14), 1118 bp (n=2), 1116 bp (n=4)가 관찰되었다.

SmaI 제한효소를 처리하여 분리된 79주의 *S. zooepidemicus*의 PFGE 패턴을 분석한 결과 모든 균주에서 20.5 kb~1135 kb 범위에서 7~18개의 band를 나타내었다. 79주의 분리주에서 32개의 서로 다른 PFGE 패턴을 관찰 할 수 있었으며 32개의 각 PFGE group은 최소 1주에서 최대 10주까지 동일한 패턴의 균주가 관찰되었으나 2006년 국내 사육중인 Thoroughbred 말에서 발생한 유·사산 case에서 분리된 *S. zooepidemicus* 균주와 유전학적으로 동일한 PFGE pattern을 나타내는 균주는 관찰되지 않았다.

PFGE 기법을 이용한 국내 *S. zooepidemicus* 감염증 발생의 역학적 특성을 분석한 결과 제주와 장수 지역의 일부 균주에서 유사한 pattern이 관찰되었지만 지역별, 년도별 분리균주는 유전학적으로 매우 낮은 유전학적 상동성을 나타내었다.

다. *Escherichia coli*에 대한 특성 및 예방법 개발

생식기 질병이 의심되는 씨암말 105두의 vaginal swab로부터 96주(91.4%)의 *Escherichia coli*를 동정한 후 O group serotype 및 verotoxin을 응집반응 및 PCR을 통해 분석하였다. 분리된 96주의 *E. coli*중 53주(55.2%)는 총 21가지 O 혈청형으로 동정되었고, 43주(44.8%)는 51가지 유형의 O 항혈청 검사에서 동정되지 않았다. PCR 기법을 이용하여 verotoxin 1 (VT 1)과 verotoxin 2 (VT 2)를 분석한 결과 96주중 1주가 VT 1 (130bp)으로 동정되었다. 분리된 96주의 *E. coli*에 대한 약제 감수성 양상을 조사한 결과 Ciprofloxacin (100%), Enrofloxacin (100%), Norfloxacin (100%), Cefoxitin (96.9%), Gentamicin (96.9%), Sulphamethoxazole (96.9%), Nitrofurantoin (94.8%), Amikacin (93.8%), Nalidixic acid (92.7%), Tetracycline (90.6%) 등의 약제에 높은 감수성을 나타내었다.

라. *Taylorella equigenitalis*를 동정을 위한 PCR 진단법 개발

생식기 질병이 의심되는 씨암말 65두에서 Equi-Vet uterine culture swab를 이용하여 채취한 시료로부터 분리한 결과 일반적인 세균배양을 통해서도 한주도 분리되지 않았다. 그러나 PCR을 통해 1주(1.5%)의 *Taylorella equigenitalis*를 동정하였다.

마. 세포학적 방법을 통해 자궁내의 염증상태를 신속히 확인하고 음문의 Caslick 수술을 통해 번식장애 예방 및 임신율과의 관계 조사

씨암말 65두의 자궁내막의 세포학적 검사를 실시한 결과, 호중구수가 0-2개로 정상인 말은 49두(75.3%)이고, 호중구의 수가 2-5개인 중등도 염증을 나타내는 말과 5개 이상인 심한 염증을 보이는 말은 각각 7두(10.8%)와 9두(13.9%)로 나타났다. 또한 음문 형태를 검사한 결과, Caslick을 시행하지 않은 말 (그룹 A)과 Caslick을 시행했으나 분만 후 다시 Caslick을 한 경우 (그룹 B), 그리고 Caslick을 시행했으나 분만 후 Caslick를 바로 하지 않고 교배 후 Caslick을 한 경우 (그룹 C)는 각각 11두 (16.9%), 36두 (55.3%), 18두 (27.7%)였다. 이 중 자궁내막의 세포학적 검사를 실시한 결과 Caslick을 시행하지 않은 말(그룹 A)은 정상, 중등도 염증, 심한 염증이 각각 8두 (12.3%), 1두 (1.6%), 2두 (3.1%)였고 Caslick을 한번이라도 시행한 말 (그룹 B와 C)은 정상, 중등도 염증, 심한 염증이 각각 41두 (63.1%), 6두 (9.2%), 7두 (10.8%)로 분포하였다.

바. 씨(암)수말의 생식기질환 원인체인 EHV-1, 3, 4의 동정을 위한 진단법 및 예방법 개발

말에서 유산이나 전염성 질환 등 번식장애를 유발하는 바이러스중에 하나인 Equine Herpes Virus를 신속하게 진단할 수 있는 PCR법을 개발한 후 실제로 임상에 적용하였다. 씨암말 65두의 질 내용물과 3두의 정액으로부터 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 통해 EHV를 분석한 결과 한주도 분리되지 않았다.

사. 말에서 분리한 β -hemolytic *E. coli*의 작용기전 및 유전학적 특성

934두의 말로부터 채취한 시료는 MacConkey agar에서 pink색 colony를 선택하여 blood agar 상에서 용혈성을 확인하였으며, Vitek 2 system, GN card를 이용하여 최종 동정한 결과 22주의 β -hemolytic *E. coli* (2.36%)가 분리되었다. 또한 대부분 말에서 분리되는 세균의 경우 약제에 대한 감수성이 높은 편이지만 본 연구에서 분리한 용혈성 대장균의 약제 내성은 비교적 높은 것으로 관찰되었다.

아. 망아지로부터 *Clostridium perfringens* 감염증 진단 및 예방법 연구

국내 말 생산목장에서 사육중인 10두의 망아지로부터 심한 설사와 높은 폐사율(거의 70%)을 나타내어 병원체를 조사한 결과 *Clostridium perfringens* type A로 동정한 후 치명적인 *Clostridium perfringens* toxin α , β , β_2 , ϵ , enterotoxin의 유전자에 대한 PCR 진단기법을 정립하였다.

자. 신생자마 용혈성 질환 진단법 및 예방법 연구

태어난 지 4일령된 2두의 망아지가 침울, 호흡수 및 심박수 증가, 빈혈 등의 증상을 발현하여 혈액학 및 혈액화학치를 검사한 후 Jaundice foal agglutination 검사 및 호주에서 수입한 표준항혈청 23종에 대해 혈액형(blood groups) 검사를 실시한 결과 본 병으로 확진하였다. 본 병은 교배에 따른 부모마의 혈액형 차이로 본 병이 유발되기 때문에 향후 국내 말 생산 농가에 적극적으로 검사를 권장하여 망아지가 태어난 후 폐사되는 것을 최소화하는데 크게 기여할 것으로 생각된다.

차. *Streptococcus equi* subsp. *equi*의 유전학적 특성 및 약제감수성 양성

말 선역의 원인체인 8주의 *S. equi*에 대해 약제감수성 양상을 조사한 결과 Sparfloxacin과 Tetracycline을 제외한 모든 약제에 높은 감수성을 나타내었으며, PFGE와 MLST 기법을 이용한 분자역학적 특성을 조사한 결과 분리 주 모두 동일한 패턴이 관찰되어 유전학적으로 동일한 원인체에 의해 질병이 발생되고 있는 것으로 관찰되었다. 본 연구에 얻은 결과는 향후 말 생산 현장에서 적용함으로써 망아지의 생산 효율 향상에 크게 기여할 것으로 기대된다.

카. 말 바이러스성 동맥염(Equine Viral Arteritis)의 동정을 위한 진단법 및 예방법 개발

RT-PCR 기법을 이용하여 진단한 결과 국내에서 채취한 정액 5두에 대해 RT-PCR을 이용하여 진단한 결과 모두가 음성이었다.

타. 승용마 친자감정 기법 정립

말에서 개체식별 및 친자확인을 위한 ISAG microsatellite marker의 유용성 및 표준화를 분석하였다. PCR은 95°C 10분 반응 후 95°C 30초, 60°C 30초, 그리고 72°C 60초의 반응을 30회 반복 수행한 후 72°C에서 60분간 반응하였다. 그리고 LEX33, TKY279, TKY287, TKY297, TKY321은 56°C에서 annealing을 수행하였다. 더러브렛종 말 6두를 포함한 다양한 품종의 20두를 대상으로 22개의 ISAG microsatellite marker를 분석한 결과 대립유전자의 수는 4개에서 8개로 분포하였고 더러브렛종 말에서 출현하는 대립유전자의 대부분이 비더러브렛종 말에서도 출현하였다.

파. 승용마 특이 유전형질 연구

한국마사회 장수목장과 부산경남 경마공원, 민간승마장에서 사육중인 말 중 성격이 사나운 말 30두와 온순한 말 113두, 전체 143두를 대상으로 Heparin tube (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 경정맥으로부터 채취한 혈액을 원심분리한 후 buffy coat를 공시재료로 사용하였다. DRD4 유전자의 VNTR과 DRD4 유전자의 염기서열(SNP)은 143두 전체에 대해 분석하였고, DRD3와 HTR2A 유전자의 염기서열(SNP)은 50두에 대해서 분석한 결과

DRD4 유전자의 SNP를 분석한 결과 143두의 말 중 15두에서 -147염기의 C → T

substitution과 -292염기의 A → G substitution SNP가 관찰되었다. C → T substitution의 경우 SNP가 7두에서 관찰되었는데 7두 중 5두가 마필관리사 및 수의사 등에 의해 일반적으로 사나운 기질을 가진 것으로 평가되었으며, A → G substitution이 관찰된 8두 중 2두의 말이 일반적으로 사나운 기질을 가지는 것으로 평가되었다. 하지만 C → T, A → G substitution이 관찰된 두 개의 SNP 모두가 동시에 관찰된 개체는 없었다.

향후 DRD4 유전자의 SNP와 말의 기질간의 상관관계를 비교 분석하여 국내산 승용말 생산 계획 수립 시 번식 전 분석을 통해 사나운 말을 배제하는 수단으로 유용할 것으로 사료된다.

2. 인공수정 및 수정란 이식에 의한 승용마 생산기술 개발

가. 정액 채취

씨수말의 정액을 콘돔, 미조리식 및 콜로라도식 인공질을 이용하여 채취한 결과, 아랍종의 씨수말에서 콘돔 40-50 ml, 미조리식 50-60 ml, CSU식 50-60 ml로서 콘돔에 비하여 인공질의 활용이 효과적이었다. 말의 품종별 정액량은 교잡종 말은 평균 138.3 ml이었고, 아랍종 말은 평균 56.5 ml이었다. 정자수는 교잡종 말이 평균 175×10^6 /ml로서 아랍종 말의 평균 86×10^6 /ml에 비하여 많았다. 씨수말의 자원이 부족한 국내 현실을 감안한다면 인공질을 활용하는 방법이 효과적일 것으로 판단된다.

나. 정자의 활력 검사

품종에 따른 정자의 활력검사 결과, Total motility(TM)와 Progressive motility(PM)는 교잡종 말이 평균 75.9% 및 58.4%, 아랍종은 평균 48.8% 및 23.2%로서 교잡종 말이 유의하게 높은 경향이었다($p < 0.05$). TM 비율은 채취-직후, 냉장-회석 및 동결과정을 거치면서 평균 75.3%에서 14.4%로 낮아졌다($p < 0.05$). PM 비율은 채취-직후 및 냉장-회석은 평균 58.2-59.6%로 비슷하였으며, 냉장-운반 단계에서는 낮아졌으나, 동결-융해 단계에서는 71.7%로 높아졌다($p < 0.05$).

다. 정액 동결 체계

정액 채취 직후 회석된 정액은 55°C 상태로 이동한다. 동결은 50 ml 원심분리관에 냉장된 정액 40 ml씩을 넣고 400 g×10분간 원심분리하여 seminal plasma 및 부유액을 제거하고, 하층의 정자괴를 회수하였다. 정자수는 hemacytometer를 이용하여 최종 농도 40×10^6 /mL로 조정된 후 동결용 egg yolk extender(EYE) 또는 skim-milk extender(SME)에 회석하였다. 회석된 정액은 5°C에서 90분간 냉각하여 냉장 상태를 유지하면서 정액을 0.5 mL 스트로우에 충전한 다음 $-165 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 10분간 예비동결한 후 마지막으로 액체질소에 침지하였다.

라. 동결융해 정액의 보존성 향상 연구

동결융해 정자의 TM 비율은 교잡종 씨수말의 것이 동결융해 직후 20.1%로서 아랍종의 1.42%에 비하여 유의하게 높았고, 배양시간 30분, 1시간 및 2시간째에도 높은 경향이었다. 한편 PM 비율도 교잡종 씨수말의 것이 높은 경향이었다. 아랍 및 교잡종 씨수말의 동결융해 정자의 체외배양 시간에 따른 TM 및 PM을 조사한 결과, 아랍종은 동결융해 직후에는 EYE가 SME에 비하여 높은 경향이었으나 배양시간의 경과에 따라 유사한 경향이었다. 한

편 교잡종 씨수말에서 동결완충액 및 배양시간에 따른 TM과 PM의 차이는 없었다.

마. 인공수정 임신율

말의 정액은 희석, 냉장, 동결 정액의 형태로 사용이 가능하다. 인공수정은 발정 징후를 나타내는 씨암말을 12시간 간격으로 난소의 크기를 측정하여 난소가 5cm 이상에 도달하였거나 배란이 확인된 개체에 한하여 동결정액(40×10^6 / mL) 4개 스트로우를 용해하여 씨암말의 자궁각 중간부분에 주입한다. 인공수정 임신율이 냉장-희석, 냉장-운반 및 동결-용해 정액에서 각각 60%, 50% 및 37.5%였다. 동결-용해 정액의 인공수정에서 희석제의 미첨가 및 첨가는 임신율이 각각 10% 및 40%였고, 자연 배란 및 배란유도 임신율은 각각 25% 및 50%로 나타났다.

바. 발정동기화

말의 인공수정 및 수정란이식의 효율성 향상을 위해서는 발정동기화 기술의 개발과 안정화가 반드시 필요하다. 특히 말은 발정주기가 4-7일로서 배란시기의 예측이 무엇보다 중요하다. 배란유도 시점의 난포 크기는 4cm 이상, 인공수정 시점의 난포크기는 5cm 이상이어야 임신이 가능하였다. Cidr-plus 삽입부터 혈중 프로제스테론 농도가 상승하여 7일째 PGF2a를 투여 황체 퇴행을 유도한 이후 프로제스테론 농도가 급격히 감소하였다. 발정증상은 미약하게 발현되는 경향으로 외부적인 징후를 관찰하기 어려웠다. PGF2a는 황체 퇴행을 유도하는 호르몬으로 발정이 발현되는 시기는 난포의 크기가 3cm 이상에서는 3-4일이었으나, 난포의 크기가 2 cm미만에서는 7일정도 소요되었다. 경구용 프로제스테론인 Regumate는 투여 전, 투여 후 3일, 6일 9일 및 PGF2a 투여 후 3일째에 각각 평균 0.04 ng/ml, 0.03 ng/ml, 1.59 ng/ml, 8/84 ng/ml 및 0.93 ng/ml이었다. 발정동기화 처리는 말의 발정주기 조절이 가능하지만, 질내에 삽입하는 기구는 인력과 사용이 간편하였으나 질의 염증과 오염의 원인이 되고, 경구용 프로제스테론은 매일 일정한 시간에 일정량을 급여해야하는 문제점이 있었다.

사. 수정란 이식

우수 승용말의 대량번식과 번식장애 치료에 이용할 수 있는 수정란 이식을 체계화하였다. 공란말 8두에 발정동기화를 유도하여 6두(87.5%)가 발정이 유도되었고, 6두가 배란유도 및 인공수정에 성공하였다. 인공수정 공란말 중 5두가 채란에 이용되어 3두(60%)가 채란에 성공하였다. 채란된 수정란은 수정 후 배양 5일째 150 μ m, 6일째 409 μ m, 7일째 814 μ m 및 8일째 1.2 mm로 발달한 후 부화하였다. 한편 채란된 7일째 수정란 2개를 수란말 2두에 이식하여 1두가 임신에 성공하였다. 공란마와 수란마의 에스트로젠 농도는 각각 평균 59.20 pg/ml, 48.5 pg/ml, 및 41.07 pg/ml로서 차이가 없었다.

아. 분만 및 번식장애

국내 최초로 동결정액 및 냉장운반정액을 이용하여 망아지 생산에 성공하였고, 동결정액으로 태어난 망아지 중 1두는 생후 1일령에 폐사한 망아지의 폐사의 원인은 선천적 수뇨관 기형에 의한 뇨독증으로 추정된다. 국내에서 사육되고 있는 암말의 번식장애에 관한 보고는 거의 없었으나, 본 연구과정에서 확인된 암말의 이상에는 자궁내 이물질 존재, 미배란성 난포 및 조기유산 등이 발생하는 것을 확인하였다. 향후 이 부분에 대한 추가적인 연구가 필

요할 것으로 생각된다.

3. 승용마 생산·육성 기반 및 실용화 체계 구축

가. 인공수정 후 씨암말 생산성 향상을 위한 관리기법

임신말의 관리는 통상 3단계(임신초기, 임신중기, 임신말기)로 나눌 수 있다. 첫 2개월 동안에는 태아를 유산시킬 수 있는 모든 환경조건에 노출되지 않도록 하는 것이 중요하다. 임신말의 사료급여 권장량은 체중 100 kg 당 농후사료 0.6-1.5 kg, 건초 0.6-1.5 kg 수준으로 급여하되 전체 섭취량은 2.5 kg/100 kg 이내에서 급여하도록 한다. 임신 8개월까지는 조사료 위주의 유지 요구량 수준에서 급여하고 임신 9개월부터는 농후사료 급여수준을 점차 높여 태아의 발달에 필요한 에너지와 영양소 공급을 증가시킨다. 임신말기의 에너지 요구량은 유지 요구량에 비해 2-50% 정도 증가한다. 양질의 초지에 방목하는 경우 임신말기를 제외하고는 농후사료나 알팔파 건초 등을 추가로 급여할 필요가 없다. 임신기간 중 알팔파 건초 또는 칼슘제 등을 다량 급여할 경우 칼슘과다로 인한 태아의 골격 이상을 가져올 수 있기 때문에 요구량 이상의 칼슘 공급은 주의해야 한다. 곰팡이 발생 등 부패한 사료는 다양한 질병과 유산의 원인이 되기 때문에 절대 주의가 필요하다. 일반적으로 임신말은 분만전에 보통 체중보다 18% 정도 높이는 것이 분만 후 번식률을 증가시키는 것으로 알려져 있으며 규칙적이고 충분한 운동을 시키며 분만 전 후 몇 일 동안은 사료급여량을 줄여야 한다.

나. 망아지의 초기 육성 기법 정립

(1) 각인 순치

망아지 취급은 승용마로서의 장래에 대한 영향이 극히 큰 점에서 그 중요성은 매우 크다. 생후 가능한 한 빠른 시기에 망아지에 접하도록 함으로서 망아지는 비교적 용이하게 사람에게 익숙하게 된다고 하여 이른바 “각인”이 중요하다고 여겨지고 있다.

(2) 출생 직후부터 2주일까지의 끌기 운동

출생 직후부터 2주일 령까지의 끌기 운동은 왼 손으로 모마의 고삐를 잡고 망아지는 고삐를 사용하지 않고 오른 팔로 망아지의 목을 가볍게 감싸서 견도록 시킨다.

(3) 2주일 이후의 망아지 끌기 운동

고삐를 사용한 끌기 운동은 망아지 사지가 제대로 역할을 할 수 있는 2주일 이후부터 개시한다. 오른손으로 망아지에 장착한 고삐를 쥔다. 기본적으로는 망아지를 자발적으로 사람의 어깨 위치에서 견게 시키고, 망아지가 멈춰 서려고 했을 경우에는 오른쪽 다리로 망아지의 엉덩이를 가볍게 밀어 앞으로 나아가도록 촉구한다.

어린 말의 순치 교육 첫 단계는 태어나 얼마되지 않아서 시작되기 때문에 반복적인 교육이 필요하다.

다. 전기육성

이 시기에는 말 세우기, 재갈 씌우기, 굴레 씌우기, 끌기운동 등을 실시한다.

라. 생산된 망아지의 면역증강 효과 평가

감염증은 망아지에게 있어서 질병을 일으키거나 폐사를 일으키는 가장 흔한 원인 중의 하나이다. 보통 전신적인 감염증(Septicemia)이든 국소적인 감염증이든 모두 합쳐서 질환 망아지의 35-40% 정도를 차지하는 것으로 알려져 있다. 망아지 감염증인 경우에는 흔히 감염이 되어 증상이 나타난 후에 치료하는 예가 많지만, 발병 후에 치료하는 것보다는 출생 후 관리, 특히 초유 섭취를 철저히 함으로써 면역증강을 통해 예방하는 것이 훨씬 더 효과적이다.

마. 망아지에서 흔히 감염을 일으키는 원인체

망아지에서 흔히 감염을 일으키는 병원성 원인체의 종류는 사육되는 지역이나 장소에 따라 조금씩 차이가 있다. 그러나 임상적으로 *E. coli*는 어느 지역에서도 가장 흔하게 검출되고 있고, 비교적 흔하게 검출되는 세균으로는 *Actinobacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* 등이 있으며, *Salmonella*는 약간 나이가 든 망아지에게서 감염이 일어나며 좀 드문 편이다.

바. 망아지 패혈증의 진단 기준

침울(가장 흔한 증상이지만, 특이 증상은 아님), 발열 (>39°C), 백혈구 수. Fibrinoge 수치, Hypoglycemia, 호흡 수, 요, 혈액 배양, 패혈증 지표 등이 판단 기준이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 말 번식장애 유발 세균, 바이러스 병원체의 신속 검출과 동정을 위한 진단법 및 예방법을 개발하였고 이들 병원체의 숙주내 작용기전 및 유전학적 특성을 규명하였다.

나. 말 번식분야의 불모지인 국내 환경에서 국내산 씨수말로부터 정액채취, 희석, 동결에 성공하였고, 이를 이용한 인공수정과 수정란 이식을 성공하므로 말 번식을 체계화하였다는 데 의미 있는 결과이다.

다. 동결정액으로 생산된 망아지를 체계적으로 육성하므로 국산 승용마의 육성 프로그램도 체계화 하였다.

라. 말 정액의 종류별 희석정액의 임신율 70%, 희석-냉장 정액 60%, 동결정액 50%의 임신율을 기록하므로 국내 환경에서 승용말 생산에 필요한 기초적인 결과를 얻었다는 것은 매우 의미 있는 일이라고 생각된다.

마. 본 연구의 최종 목적인 인공수정 또는 수정란 이식에 의하여 국내산 승용마 생산에 성공하였고, 이를 말 생산 목장에 적용하여 육성하는데 기틀을 마련하였다.

바. 승용마 생산·육성 기반 및 실용화 체계 구축을 위해 최적 교배적기 기준 정립 및 씨암말의 임신기간별 모니터링, 망아지의 초기 육성 기법 정립, 승용마 육성 기반 등을 구축하였다.

사. 한국형 승용마의 친자감정 기법 정립 및 등록시스템을 구축하기 위해 유전자(DNA) 분석기법(ISAG Horse Ms panel 및 SNP) 개발 및 등록시스템을 구축하였고, SNP를 통한 승용마 특이 유전형질을 탐색하였다.

아. 수정란 동결보관 스트로우용 플러그(출원번호 10-2010-0094184)에 관해 특허 출원하여 진행중에 있다.

2. 성과활용 계획

가. 본 연구를 통해 얻은 결과를 바탕으로 경상북도 농민사관학교 말산업 전문인력양성과정과 농림수산물식품부의 한국마사회 특별적립금 사업인 말 생산농가 육성 및 인공수정 양성과정 사업에 적극적으로 활용할 것이고 정부와 한국마사회로부터 가칭)한국 말 번식센터로 지정 받을 수 있도록 노력할 것이다.

나. 본 연구 결과는 국내 관련 학회 및 세미나, 신문 등을 통해 지속적으로 홍보할 것이고 정부의 승용말 생산 활성화 방안의 일환으로 한국마사회에서 수입한 정액을 본 연구진이 위탁받아 한국형 승용마 생산을 위한 인공수정 시행 및 번식효율 극대화에 적극적으로 기여할 것이다.

다. 국내에서 승용말 생산을 희망하는 말 생산자에게 본 연구 결과가 실용화될 수 있도록 맞춤형(주문식) 인공수정을 실시할 계획이다.

라. 생산된 승용마를 체계적으로 육성·조련하여 국내 각종 승마대회에 참가할 예정이다.

마. 국내 승용마의 혈통등록 및 개체확인에 유용한 유전자 감정 kit 개발 및 실용화 등 국내 말의 생산성 효율 향상에 활용할 계획이다.

SUMMARY

I. Subject

Development and Establishment of Technique for Riding Horse Production and Breeding in Korea

II. Objectives and Significance of the Project

Government's horse industry foster policy enforcement and expected substitute industry after FTA will be riding horse productivity as becoming major stockbreeding industry within the country, stability of production technique and to expand vital ordinary horse as well as developing considering bloodmares' characteristics in etiology to increase technology; build riding horse production base to pass on to farms that would like to produce riding horses in order to contribute creation of high profits conducted this research.

III. Contents and Ranges of the Project

1. Developing diagnosis and prevention to identify and detect speedy virus and pathogens causing breed obstacle and investigated genetic characteristics within host of pathogens.

A. Research on analysis and prevention of pathogens(*S. zooepidemicus*, *S. equi*, *E. coli*) that cause breed obstacle.

B. Research on analysis and prevention on *Clostridium perfringens* to develop increase in foal's productivity from artificial insemination, and research on analysis and prevention of neonatal isoerythrolysis in horses.

C. Research on analysis and prevention of EHV and EVA that causes reproductive disease in stallion.

2. Application of foal production in horse artificial insemination and embryo transfer for developing technique that is most suitable in local environment from collected semen and production of semen freezing.

A. Collecting semen(condom, artificial vagina) and technique of dilution in semen, developing technique of creating semen freezing, producing and storage of liquid semen.

B. Cooled-diluted (13 horses), frozen-thawed (7 horses) accomplished artificial insemination and to research on weight of placenta, weight and depth of body from born foal.

C. Induce synchronization of estrus to embryo transfer in order to develop embryo

transfer technique : successful in collecting and transplant for the first time in the country (5 horses of embryo collection, 3 horses of withdraw), embryo transfer : transplant 2 horses (1 pregnant).

3. Conducting on building riding horse production and fostering system for optimum mating phase to monitor bloodmares' pregnant cycles, establishing early foster in foal, and to build riding horse fostering.

A. Establishing optimum monitoring program feeding and management of pregnant horses that were fertilized; after 15 and 40 days of fertilization and 30 days after confirmation of pregnancy.

B. Evaluation on the effect of produced foals' reinforcement of immune system, nurturing and technique study.

C. Monitoring bloodmare and to set standard of embryo transfer.

D. Usage of frozen-thawed; foals that were born from artificial insemination's foster tests as well as systematic practical in related methods to pass onto farms.

4. In order to build registration system and reference of parentage testing in Korean riding horses, DNA analytic technique (ISAG Horse Ms panel and SNP) have built and performed research on unusual genetic riding horses through SNP.

IV. Results and Application of the Research

This research was to promote riding horse productivity to target breeding horses within the country to understand etiology; establishing techniques of riding horse from artificial insemination and embryo transfer to develop technology that increase productivity in order to exploit foals in professional riding horse. Summary of the results are just like the following.

1. Developing technique to increase characteristics of etiology and productivity in bloodmares contains breed obstacle.

A. Developing prevention and diagnosis on *Streptococcus zooepidemicus*

(1) From targeting 68 female breed horses contains breed obstacles of 17 strains (25%) *Streptococcus zooepidemicus* to examine antibiotic by disk diffusion method, Ampicillin, Cefoxitin, Ceftiofur, Cephalothin, Florfenicol, Gentamycin, Nalidixic acid, Oxacillin, Penicillin, Tiamulin, Tylosin, Vancomycin showed high sensibility.

(2) Researching on strains of *S. zooepidemicus*' unyoked characteristics from 374 female breeding horses of 79 strains, over all rate was 21.12% observing fairly high than foreign research. To compare in regional separation ratio, Jeju had 3 times higher as was 32.23%, and Jangsu region of 10.11%.

Analyzing dynamic infection of *S. zooepidemicus* using PFGE method, Jeju and Jangsu

regions observed similar patterns, but showed low genetic homogeneity in regional and yearly divided culture.

B. Developing prevention of *Escherichia coli* in horse

(1) It was analyzed from vaginal mucosa and clitoral fossa of 105 Thoroughbred mares suspicious of the genital disease in Korea. Ninety six *E. coli* isolates were identified as standard biochemical properties and using BIOLOG system.

Fifty three isolates (55.2%) could be classified into a total of 21 O serotypes and forty three isolates (44.8%) were non-typeable with 51 O antisera used in this study.

The verotoxin 1 (VT 1) and verotoxin 2 (VT 2) genes were analyzed by multiplex PCR. Among them, one isolate was detected VT 1 gene (130bp).

Most of isolates showed a high susceptibility in ciprofloxacin (100%), enrofloxacin (100%), norfloxacin (100%), cefoxitin (96.9%), gentamicin (96.9%), sulphamethoxazole (96.9%), nitrofurantoin (94.8%), amikacin (93.8%), nalidixic acid (92.7%) and tetracycline (90.6%).

(2) From the 934 horses, 22 strains of β -hemolytic *E. coli* (2.36%) were isolated. Also, horses tend to have high sensibility in drugs that are isolated in most cases, yet observed hemolytic *E. coli* have relatively high in this research.

C. Developing PCR diagnostic for *Taylorella equigenitalis*

No identification occurred from analysis of 65 breeding horses that seemed suspicious about generative disease. However, *Taylorella equigenitalis* strains occurred through PCR in 1 strain (1.5%).

D. Effect of uterine bacteriology and cytology on fertility in Thoroughbred mares

Ninety one strains were isolated from uterine culture swabs from 65 mares. The most common isolate was *Escherichia coli* (35 isolates, 38.5%), followed by *Klebsiella pneumoniae* (7 isolates, 7.7%), *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (6 isolates, 6.6%), and organisms considered to be non-pathogens, other (43 isolates, 47.3%).

Of the 65 cytological samples, 16 (24.6%) were positive for inflammation. The rate of pregnancy for normal, moderate, and severe inflammation was 85.7%, 42.9% and 22.2%, respectively. However, there are no significant relationship between bacteria and inflammation.

E. Developing diagnosis and prevention of causes in EVA and EHV-1, 3, 4 in breeding horse's generative disease.

Analyzing 65 breeding horses' contents of vagina using DNA of 3 horses' semen to find EHV through PCR, no identification have occurred. Also, all semen collected from 5 horses had negative result using RT-PCR.

F. Research on *Clostridium perfringens* diagnosis and prevention from foal

Result of research on pathogen from 10 foals with serious diarrhea and mortality rate (70%) that are raised in domestic producing farm, *Clostridium perfringens* type A isolated to fatal *Clostridium perfringens* toxin α , β , β_2 , ϵ , enterotoxin's genetic PCR diagnosis technique was established.

G. Research on prevention and diagnosis of neonatal isoerythrolysis in Thoroughbred

Two 4-day-old Thoroughbred foals with acute clinical signs of depression, elevated pulse and respiratory rates, anemia, and jaundice were referred to the equine hospital of Korea Racing Authority. The foals were seemingly normal at birth, but showed clinical signs such as abnormal behavior, jaundice and anemia suddenly after ingestion of the mare's colostrum, followed by death at 4 days after birth. According to the results of the hematology, serum chemistry analysis, jaundice foal agglutination test, and blood groups test, the foals were diagnosed as neonatal isoerythrolysis (NI) caused by the mare's antibodies.

H. Genetic characteristics and drug sensitivity patterns of *Streptococcus equi* subsp. *equi*

As researching drug sensitivity patterns of eight *S. equi* that causes main strangles in horse sensitivity, all drugs showed high sensitivity except Sparfloxacin and Tetracycline, and observed similar causes of patterns to create disease in genetic value while researching characteristics of dynamic molecule using PFGE and MLST methods.

I. Establishing parentage testing technique in riding horse

In the analysis of applying ISAG microsatellite marker to horse in recognize and to perform parentage testing for utility and standardization, number of allelic genes distributed from 4 to 8 from varieties of targeted breeds over 20 including Thorough bred; most of allelic genes occurred in thorough bred also occurred in non-Thorough bred.

J. Research of genetic traits in riding horse

Targeting domestic raised horses of 143 in total, 30 horses were violent and 113 were gentle, to analyze SNP from DRD4 genetics. Only 15 horses observed -147base C \rightarrow T substitution and -292base A \rightarrow G substitution of SNP from overall in 143 horses.

2. Developing production technology under artificial insemination and embryo transfer

A. Semen collection

As a result of collecting stallion's semen by using condom, mizori and colorado type vagina, artificial vagina tend to have higher amount as mizori 50-60 ml, and CSU 50-60

ml compare to 40-50 ml in condom from Arabian breed. Average amount of semen of crossbreed horses were 138.3 ml and 56.5 ml of Arabian breed. Crossbreed horses had higher average of $175 \times 10^6/\text{ml}$ compare to arabian breed which was $86 \times 10^6/\text{ml}$ in number of sperms. To consider domestic reality of short breeding male horse, application of artificial vagina seem the most efficient method.

B. Vitality test of sperm

As a result of vitality examination based on breed, average disordered crossbreed male horse's total motility (TM) and progressive motility (PM) rate were 75.9% and 58.4%, Arabian breed of 48.8% and 23.2%; crossbreed horses attentively had higher tendency ($p < 0.05$). TM ratio became 75.3% to 14.4% as to go through refrigeration, dilution, and freezing ($p < 0.05$). PM ratio was similar in average of 58.2 - 59.6%, yet decreased in refrigerated-transported process, and increased in free-thaw process of 71.7% ($p < 0.05$).

C. Frozen-thawed system

Semen that diluted right after collection will be transported in the temperature of 55°C . Freeze can be done when 40 ml of refrigerated sperm is inserted in 50 ml centrifugal separation tube to process centrifugal filtration of $400g \times 10$ minutes to displace seminal plasma and suspension, and collecting lower class sperms. Number of sperms were adjusted using hemacytometer in the concentration of $40 \times 10^6/\text{mL}$ and to dilute egg yolk extender (EYE) or skim-milk extender (SME). Diluted sperm will be freeze 90 minutes in 5°C to maintain refrigerated condition fill in straws and to pre-freeze $-165 \pm 5^\circ\text{C}$ to acupuncture in liquefied nitrogen gas.

D. Research in reservability of freeze-thaw semen

Disordered crossbreed male horses' ratio of TM in freeze-thaw sperm was 20.1% where arabian horses were 1.42% less; 30 minutes of incubation, one hour and two hours still had fairly high tendency. PM ratio was also high in disordered crossbreed male horses'. TM and PM ratio from arabian and disordered crossbreed male horse's freeze-thaw sperm in external incubation time, arabian horse tend to have higher EYE compare to SME, yet became similar as time went by. Meanwhile, disordered crossbreed male horses' TM and PM were not different from the beginning.

E. Pregnancy rate of artificial insemination

Horse's semen can be used in diluent, refrigerated, and frozen form. Artificial insemination can occur when measure female horse every 12 hours to wait until reach 5cm of uterus or confirmation of ovulation to insert in the center of uterine horn of 4 straws of dissolution frozen sperms ($40 \times 10^6/\text{mL}$). Pregnancy rate of artificial insemination of sperms that refrigerated-diluents were 60%, refrigerated-transported was 50% and freeze-thaw was 37.5%. Artificial insemination of freeze-thaw sperm that added

diluents had pregnancy rate of 10% and ones didn't had 40%; natural ovulation rate was 25% and induction of ovulation pregnancy rate was 50%.

F. Estrus synchronization

Development of technology in synchronization of estrus is necessary for stability as to increase efficiency in artificial fertilization and fertilized egg trans-plantation. Prediction of ovulation is very important as horse's estrous cycle is usually 4 to 7 days. During the induction of ovulation time, size of uterus must reach 4 cm or above, and 5 cm or above for artificial fertilization in order to be pregnant. From the insertion of Cidr-plus, progesterone blood concentration have increased until PGF2a injection on 7th day to regression, then progesterone have decreased rapidly. Symptom of estrus were hard to observe as it manifested very weakly in external. It took 3-4 days to estrus with PGF2a of regression of corpus luteum when uterus size were over 3 cm, yet it took about 7 days when the size were 2 cm or less. Oral progesterone, regumate, was in average amount of 0.04 ng/ml before injection, 0.03 ng/ml after 3 days of first injection, 1.59 ng/ml after 6 days, 8/84 ng/ml after 9 days and 0.93 ng/m after injection of PGF2a. It was able to control horse's estrus cycle, yet oral progesterone were difficult to use as necessary to inject on certain amount in same time every day; equipment that can be inserted in vagina seemed easy to use, yet caused vaginitis and contaminations.

G. Embryo transfer

Systemized embryo transfer to reproduce large amount of excellent riding horses and to use in treatment of breeding obstacles. Inducement of estrus toward 8 blank horses and 6 (87.5%) were successful, and 6 horses were successful in induction of ovulation and artificial fertilization. Among the blank horses that were artificially fertilized, 5 were used to collect embryo and 3 (60%) were successful in embryo collection. Embryo transfer were adjusted and incubated after being developed in following: 5th day of incubation of 150 μ m, 6th 409 μ m, 7th 814 μ m and 8th in 1.2 mm. Meanwhile, 1 horse was successful in pregnancy when two embryo transfer that were incubated for 7days to transplant in two horses. Blank space horse and poached egg horse's estrogen concentration rate was 59.20 pg/ml, 48.5 pg/ml, and 41.07 pg/ml in average, not much of difference in over all.

H. Birth and breed obstacle

It was first to be successful in producing colt using frozen thawed and cooled diluted in Korea; colt that collapsed and died on the 1st day of birth can be putative due to innate ureter malformation of uremia. There are not much of domestic female horse's breed obstacles that were reported in the past, yet we have confirmed causes: existence of foreign substance in uterus, non-fertility cells, and early abortions. Additory research will be necessary in the future.

3. Base of riding horse production and nurture as well as constructing commercialization system

In order to use colts that were born by wind pollination or produced by artificial insemination, nurture in proper usage along with communion with human to use effectively. For the base of riding horse production and nurture as well as constructing commercialization system, establishing standard of optimum mating phase, monitoring pregnancy periods of breeding female horse, correcting technique of early nurturing process for colts and placing base of nurturing riding horse were applied.

After producing colts, systematic management of disease to reinforce immunity will be performed to add higher-value and to allow contribution in industrialization of riding horse by constructing Korean style of nurture and training system.

A. Cause factor that usually raise infection to foal

Pathogen caused factors usually raise infection to foal are distinguishable depending on areas of breed or location. However, from the clinical result, *E. coli* is the most common in any areas and others can be defined as *Actinobacillus*, *Klebsiella*, and *Psuedomonas*; *Salmonella* usually occurs from old foal and is unusual compare to other ones.

B. Diagnosis standard of septicemia in foal

Depression(usually common, but not bizarre), heat ($>39^{\circ}\text{C}$), number of white blood cells. Fibrinoge value, Hypoglycemia, breathe, urine, blood culture, septicemia index and others are the judgment standard.

As a results, we have created diagnosis and prevention of bacteria and virus that cause breeding barrier, and investigated genetic characteristics of functional groups within pathogens. It was successful in producing domestic riding horse by artificial insemination or embryo transfer which was the final goal of the research and provided basic application in horse producing farms.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the Research Project	25
Section 1. Object or range of research project	25
Section 2. Contents and scope of the project	28
Chapter 2. Current status of technical development at home and abroad	30
Section 1. Status and prospects of development in Korea and foreign countries	30
Chapter 3. Research contents and results	33
Section 1. Development of technique for reproduction efficiency in bloodmare and stallion	33
1. Introduction	33
2. Methods and results	35
Section 2. Development of reproduction technique by artificial insemination and embro transfer in equine	77
1. Introduction	77
2. Methods and results	78
Section 3. Establishment and application of fields for Korean riding horse	115
1. Introduction	115
2. Methods and results	116
Chapter 4. Achievement and contribution to related fields	139
1. Achievement	139
2. Contribution to related research fields	141
Chapter 5. Application of the results	143
Chapter 6. Technical information corrected from abroad during carrying out the project	146
Chapter 7. References	147

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	25
제1절 연구개발의 목적 및 필요성	25
제2절 연구개발의 내용 및 범위	28
제2장 국내외 기술개발 현황	30
제1절 국내외 기술개발 현황	30
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	33
제1절 번식장애 씨암(수)말의 병인학적 특성 및 생산성 향상 기술 개발	33
1. 서론	33
2. 연구개발의 내용 및 결과	35
제2절 인공수정 및 수정란 이식에 의한 승용마 생산기술 개발	77
1. 서론	77
2. 연구개발의 내용 및 결과	78
제3절 승용마 생산·육성 기반 및 실용화 체계 구축	115
1. 서론	115
2. 연구개발의 내용 및 결과	116
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	139
제1절 연구 목표달성도	139
제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도	141
제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	143
제1절 실용화·산업화 계획	143
제2절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획	144
제3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획	144
제4절 추가연구, 타연구에 활용 계획	145
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	146
제7장 참고문헌	147

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구의 목적 및 필요성

가. 연구의 목적

정부의 말산업육성법 시행과 FTA 이후 축산업의 대체산업으로 말 산업에 대해 정부 및 지자체의 관심이 집중되고 있는 실정이다. 그 동안 경주마의 경우 자연교배 만을 허용하는 국제기준에 따라서 국내에서 말의 생산은 지금까지는 주로 더러브렛종 경주마를 생산하였으나 FTA 이후 축산업의 대체산업으로 말 산업이 대두되고 있고, 국민소득 3만불 시대를 맞이하면서 생활승마에 대한 국민들의 관심이 고조되고 있다. 이에 정부 및 지자체에서는 승용마의 생산·육성을 통해 생활승마를 활성화하고 축산농가의 고부가 가치의 소득원을 창출하고자 승용마 산업에 대한 새로운 정책을 수립하고 있다.

그 동안 한국마사회는 더러브렛종 경주마 생산 및 육성에 주로 관여하였으나 최근에는 생활승마 활성화를 통해 위기에 처한 축산농가에 고부가 소득원을 제공하고자 2014년까지 승용마 전문 생산농가 100호를 육성하기 위해 씨암말을 구입하여 민간에 분양하고 씨수말은 한국마사회가 정액 및 백신을 지원하는 등 승용마 생산을 위한 정부 정책 변화에 능동적으로 대처하고 있다.

이러한 배경 하에서 본 연구는 FTA 이후 예상되는 대체산업으로서 승용마 생산업이 국내 주요 축산산업으로의 자리매김과 생활승마 활성화에 따른 승용마 저변 확대를 위한 생산기술의 안정화를 도모함과 동시에 승용마 생산을 위한 번식장애 씨암말의 병인학적 특성 및 생산성 향상 기술을 개발하고 인공수정 및 수정란 이식을 통한 승용마 생산기반 및 실용화 체계를 구축하여 향후 승용마를 생산코자 하는 축산농가에 기술을 전수함으로써 축산농가의 고소득 창출에 기여하고자 일련의 연구를 수행하였다.

나. 연구의 필요성

우리나라의 경우 지난 70년대는 주로 일본이나 호주 등지에서 수입된 더러브렛종 또는 앵글로아랍종 말을 가지고 경마에 활용하였으나 국적 있는 경마시행 및 개량을 통한 경마의 국제화와 축산 발전 및 농가 소득에 기여할 목적으로 80년대 초부터 국내에서도 말의 생산을 시작한 이래 현재는 제주를 포함하여 전국적으로 말을 생산하는 괄목할만한 발전을 이루었다.

현재 국내에서 사육되고 있는 말은 더러브렛종 말과 같은 개량마 혹은 경종마가 약 10,000여두, 제주마를 포함한 pony 계통이 약 19,000여두 등, 총 29,000여두로 추정하고 있다. 그 중에서 번식을 목적으로 사육되고 있는 더러브렛종 씨암말은 1,700여두, 씨수말은 70여두로서 이들 사이에서 태어나는 망아지는 연간 1,200여두 이상으로 계속해서 증가추세에 놓여있는 실정이다(양 등, 2004). 그러나 국내에서 생산되는 경주마 중에서 약 70% 정도만

이 경주마로 활용되는 것으로 알려져 있어 생산농가가 많은 어려움에 직면하고 있다. 또한 FTA 이후 국내 축산 농가의 피해가 우려되고 있어 그에 대한 대안 산업으로 말 산업이 대두되고 있으며, 정부나 지방자치단체에서도 말 산업의 활성화에 많은 관심을 가지고 있다. 그래서 최근에는 생활체육의 하나로서 승마를 활성화시키고자 국내에서도 승용마를 생산하는 방향으로 정책을 추진하고 있다. 그러나 국내에서 활용 가능한 승용마는 거의 없으며 주로 경주마 중에서 퇴역마를 사용하고 있어 낙마로 인한 기승자의 사고, 승용마 전환에 장기간의 교육 등 여러 가지 문제점이 대두되고 있다.

더러브렛종 말은 다른 동물에 비해 개체별 특이성이 높기 때문에 씨암말의 임신과 생산에 관련된 번식생리 역시 말 품종 간에 큰 차이가 있으며 가축 중에서 생산효율이 가장 낮은 것으로 알려져 있다. 대부분의 국가에서 번식을 목적으로 매년 교배하는 씨암말의 임신율은 약 85~90% 정도이나 다음해 태어나는 망아지는 임신한 씨암말 대비 65~79% 정도에 불과한 것으로 알려져 있다(Morel 등 1999; Rose와 Hodgson, 1993; 양 등, 2004).

자궁감염 또는 지속성 자궁염을 유발하는 원인들을 인지하고 처치하는 것은 번식장애를 현저히 감소시키는데 많은 도움이 된다. 씨암말들이 하룻밤사이에 번식장애마가 되는 것은 아니다. 감염에 대한 민감도는 연령의 증가, 번식기관의 손상, 세균의 감염 등에 의해 주로 발생하고 있고 특히 세균의 감염은 생식기의 외형적 구조, 번식기술, 검사과정, 해부학적 기형, 산후의 처리 등에 영향을 받는다. 감염에 대한 물리적 방어막으로는 외부의 음순, 전정의 괄약근 및 자궁경 등이 있다. 정상적인 씨암말에서 세균을 고립시키는 능력은 음핵와(clitoral fossa, 94%), 전정(69%), 질의 앞쪽(42%), 자궁(31%)의 순으로 점차 감소하는 것으로 알려져 있다. 교배, 분만전후, 검사과정 중에 감염이나 물리적 방어막의 손상에 의해 잠복중인 미생물들이 침투할 수 있다. 자궁의 방어 기전들이 정상적으로 작용하고 있을 때는 많은 양의 미생물들에 노출(자연적 또는 실험적) 되더라도 번식을 방해할 정도의 장기간의 염증은 잘 발생하지 않는다. 배아의 생존을 위해 배란 5~6일후 교배의 결과로 인해 자궁강으로 배아가 내려오는 시기에 자궁에는 염증유발물질 및 세균이 존재하지 않아야 한다. 자궁의 방어기전은 기계적 및 세포생물학적 측면을 가진다. 기계적 측면에서 자궁을 방어하는 수단은 발정기동안 자궁 내용물을 추출하고 자궁경을 이완시키는데 도움을 주는 자궁근 수축이다. 세포학적 반응은 주로 식작용(phagocytosis)에 의해 이루어진다. 효율적인 호식작용은 1)적당한 수의 호중구(neutrophils)들이 일반적 순환상태로부터 이동하여 자궁내막을 통해 자궁강으로 신속한 이동, 2)감염을 유발시킨 세균에 대한 호중구의 적절한 주화성(chemotaxis), 3)식세포(phagocyte)를 위한 세균의 세포표면에 대한 옵소닌화(opsonization) 및 4)세균들에 대한 호중구들의 성공적인 섭취(ingestion) 및 세포내로 함입된 세균들의 제거(killing) 등에 의존한다. 비록 자궁방어 기전의 실패에 대한 모든 원인들은 확인되지 않았으나 영향을 미치는 몇 가지 중요한 요인들은 잘 알려져 있다. 회음의 기형 및 기질(pneumovagina)과 같은 병에 잘 걸리게 하는 요소와 더불어 반복적으로 과다한 감염이나 오염은 씨암말의 방어기전의 효율저하를 유발함이 확실한 것으로 알려져 있다. 호중구의 세균을 식균하는 효율감소 및 항체와 보체에 의한 옵소닌화(opsonization)의 결핍현상이 자궁염에 감수성이 높은 씨암말들로부터 확인된 바 있다. 그리고 이러한 현상은 백혈구수가 부적절하거나 감소되는 것과는 관계가 없다. 또한 자궁으로부터의 염증물질과 오염물질의 기계적 배출 실패는 중요한 것으로 사료된다. 다산의 고령인 씨암말에서 자궁근의 활성화는 현저히 감소하며, 병에 감수성이 높은 씨암말의 자궁으로부터는 질병 저항성이 있는 씨암말과

비교하여 비항원성 표지인자의 물리적 제거가 늦게 이루어진다. 만일 불충분한 이완, 유착 또는 해부학적인 기능결함으로 문제가 발생하면 자궁내의 오염물질을 배출하는 작용이 작동하지 않을 수도 있다.

국내에서 생산되는 더러브렛종 말은 사람의 족보와도 같은 혈통서(Stud book)에 등재되기 위해서는 축산법 및 더러브렛종 등록규정에 근거하여 유전자(혈액형 포함) 감정 및 모색유전의 법칙에 의해서 친자관계가 확인되어야만 한다(Cho and Kim, 2000).

단백질의 다형은 유전자 상에 코드되어 있지만 유전자내에서 단백질의 정보를 담당하고 있지 않는 인트론부위나 유전자이외의 비코드 영역에는 반복배열의 반복수가 다른 다형이 존재하는 것이 알려진 이래 현재 이용되고 있는 대표적인 유전자 감정 기법은 microsatellite DNA typing 혹은 short tandem repeats(STRs)이다. 말에 있어서는 1986년 개최된 더러브렛 국제혈통서위원회에서 DNA 감정에 관해서 처음으로 거론된 이래 국제간의 긴밀한 협조하에 진행된 결과 현재는 각국의 공통적인 DNA 검사항목 사용 및 검사법의 표준화가 이루어져 친자확인에 채택하고 있는 실정이다. 말의 개체식별이나 친자판정을 목적으로 한 DNA locus(좌위)는 allele(대립유전자)의 수가 많고 heterozygosity(이형접합율)가 높으며 다형성을 보이는 염기수가 적은 것, 즉 PCR 증폭이 가능하며 정확한 염기수나 반복배열수가 용이하게 산출되는 범위의 것으로서 돌연변이율이 낮은 것이어야 하고 또한, 더러브렛 말의 혈통등록은 초봄에 집중되어 단시일내에 많은 검사를 수행해야 하므로 경제적이며 방법이 단순하고 시간이 절약될 수 있는 marker가 좋은 것으로 알려져 있다. 그래서 각국에서는 말의 DNA다형 marker를 지금까지 핵 DNA의 유전자 비코드부위에서의 반복배열수의 차이를 지표로 한 microsatellite DNA로서 2~4염기의 반복되는 배열로서 heterozygosity가 높고 allele의 수가 많은 marker중에서 국제간 comparison test(비교시험)를 통해 검사방법을 표준화 시킨 후 1998년과 2000년 국제동물유전학회 말 분과위원회에서 9개의 microsatellite DNA marker를 국제최소검사항목으로 지정하였다. 현재 대부분의 감정기관에서는 실제로 혈액형 감정을 시행하지 않고 유전자 감정으로 개체식별이나 친자판정을 시행하고 있다. 더러브렛 말의 혈통등록을 위한 각국의 친자감정기관은 국제혈통서위원회(International Stud Book Committee: ISBC)의 엄격한 조건을 준수하여야 한다. 그래서 혈통서 등록기관으로부터 지정받은 각국의 친자감정기관은 국제동물유전학회(International Society of Animal Genetics: ISAG)에 가입하여 ISBC와 ISAG가 공동으로 결정한 더러브렛 유전자(혈액형 포함) 최소검사항목을 검사해야 하고 ISBC와 ISAG가 공동 주최하는 말(더러브렛 포함) 유전자 국제비교동정시험에 참가해야 하는 의무를 준수하여야 한다(조, 2007; Cho와 Cho, 2004).

근래에 들어 국내 말 생산 산업의 괄목할 만한 성장으로 생산 및 사육농가의 증가, 경주마의 생산두수 증가, 인기있는 씨수말과의 교배 집중화, 혈통과 유전형질이 뛰어난 외국산 씨수말 및 씨암말의 구입 등 경마의 국제화에 따른 말의 국제간 이동 증가, 목장내 생산마의 친자감정을 둘러싼 분쟁 등 종래에 비해서 말의 개체식별이나 친자감정의 중요성이 대두됨에 따라 신속하고 정확하며 경제적인 감정방법을 요구하고 있다. 그러나 승용마의 경우 특별한 국제기준이 없어 더러브렛종 말에 준해서 실시하고 있는 실정이다. 자연교배뿐 아니라 인공수정이나 수정란이식에 의해 태어난 승용마의 경우 특히 등록의 중요성이 대두되고 있다. 그래서 승용마의 등록에 가장 효율성이 높은 horse microsatellite marker에 대한 감정 기술의 정립이 요구되고 있다.

전 세계적으로 더러브렛종 말은 자연교배에 의해 생산된 망아지만이 경주마로 활용할 수 있도록 규정하고 있으나 승용마의 경우 자연교배나 인공수정에 의해 생산되어도 아무런 문제가 없다. 국내에서 말의 생산은 주로 자연교배에 의해 이루어지고 있으며 말에서 인공수정이 이루어진 경우는 아직까지 없는 실정이다. 그래서 말에서 인공수정 시 요구되는 인공수정관련 기술(정액의 냉장 및 동결 완충액, 동결 완충액의 buffer system, 인공수정용 정액의 품질 개선, 액상정액 제조·보관 및 주입전 가온 방법, 말 번식 성적 향상을 위한 씨암말의 발정동기화, 말 인공수정 시 정액 내 호르몬제 첨가로 번식효율 향상 등) 및 수정란 이식 기술의 개발 및 확립 또한 시급히 요구되고 있다. 세계적으로 말 정액의 동결 및 인공수정이 증가하고 있으며, 인공수정으로 태어난 말의 등록도 증가하고 있다. 말에서 인공수정은 씨수말 운반비용의 감소, 정액의 장기보관, 적기 인공수정, 생식기 질병 전파 차단 등의 장점이 있으나, 낮은 임신율, 노동력 증가 및 정형화된 프로토콜의 부재 등의 문제점이다(Samper, 2008). 인공수정을 위한 정액은 냉장 또는 동결정액의 형태로 이용되고 있다. 정액 채취시 원정액의 품질과 채취 방법, 원심분리 방법, 냉각 속도와 시간, 포장재료 및 씨수말 등이 정자의 품질에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있고(Amann와 Pickett, 1987; Ecot 등, 2000), 정액의 동결보존을 위한 희석액 조성 및 동결체계에 대한 연구도 보고되었다(Martin 등, 1979; Cristanelli 등, 1984). 동결정액의 품질 기준, 인공수정에 대한 정형화된 프로토콜 및 암말의 번식관리에 대한 연구가 필요하다(Loomis, 2001; Samper, 2009). 한편 국내에서는 말의 인공수정에 대한 시도는 있었으나 정자의 동결 및 인공수정에 관한 기본 자료 및 기술의 확립이 미흡한 상태이다(Park 등, 2008).

국민소득 3만불 시대를 맞이하면서 승용마에 대한 수요가 급증하고 있으나 주로 경주마나 외국으로부터 수입에 의존하고 있는 실정이다. 국내에서 말 생산에 있어서 국내 승용마의 기술개발은 전무한 상태이고 단지 경주마의 경우 한국마사회에서 주축이 되어 많은 생산농가가 동참하고 있는 실정이다. 그러나 경주마의 경우는 자연교배만을 적용하고 있기 때문에 승용마의 생산에 따른 기술 개발이 요구되고 있다. 또한 승용마 생산업의 안정적인 발전과 국내 생산 말의 활용률 제고를 위해 승용마 생산 후 체계적인 육성을 통해 안정적으로 판매되어 생산농가의 고소득 창출로 이어지는 경영의 안정화에 기여할 수 있는 말 유통체제의 양성화와 선진화도 시급히 요구되고 있다.

제2절 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 현재 걸음마 단계인 국내 승용마 생산의 질적인 수준을 향상시키기 위해 국내에서 사육중인 번식마를 대상으로 번식장애 씨암(수)말의 병인학적 특성을 파악하여 생산성 향상을 위한 기술 개발과 인공수정 및 수정란 이식에 의한 승용마 생산 기술을 확립한 후 향후 이들 기술에 의해 태어난 망아지를 육성하여 전문 승용마로서 활용할 수 있는 기반을 마련하기 위해 다음과 같은 내용의 연구를 수행하였다.

1. 말 번식장애 유발 세균, 바이러스 병원체의 신속 검출과 동정을 위한 진단법 및 예방법을 개발하였고 이들 병원체의 숙주내 작용기전 및 유전학적 특성을 규명하였다.

가. 번식장애 유발 세균 병원체(*S. zooepidemicus*, *S. equi*, *E. coli*)에 대한 유전학적 특성 분석 및 예방법 연구

나. 인공수정에 의한 망아지의 생산성 향상 기술개발과 관련 *Clostridium perfringens*의 진단법 및 예방법 연구, 신생자마 용혈성 질환 진단법 및 예방법 연구

다. 씨수말의 생식기질환 원인체인 EHV와 EVA의 동정을 위한 진단법 및 예방법 개발

2. 말 인공수정 및 수정란 이식에 의한 승용마 생산기술 개발을 위해 국내 환경에 적합한 씨수말로부터 정액 채취 및 동결정액 제조 기술을 개발하였고 이들 기술을 이용하여 망아지 생산에 적용하였다.

가. 정액 채취(콘돔, 인공질) 및 정액 희석 기술, 액상정액 제조·보관 및 동결정액 제조 기술 개발

나. 냉장정액(13두), 동결정액(7두) 인공수정 실시하였고 태어난 망아지를 대상으로 망아지 태반무게, 체중 및 체고, 기타 이상 연구

다. 말 수정란이식을 위한 발정동기화를 유도하여 말 수정란 이식 기법 개발 : 국내 최초 말 수정란 회수 및 이식 시험 및 성공(5두 채란, 3두 회수), 수정란 이식 : 2두 이식(1두 임신)

3. 승용마 생산·육성 기반 및 실용화 체계 구축을 위해 최적 교배적기 기준 정립 및 씨암말의 임신기간별 모니터링, 망아지의 초기 육성 기법 정립, 승용마 육성 기반 구축 등을 수행하였다.

가. 수정 후 15일 및 40일, 임신확인 후 30일 간격 임신 모니터링 기술 확립 및 임신말에 대한 최적의 사양관리 프로그램 확립

나. 이유 전 망아지 육성 및 초기육성 기법 연구, 생산된 망아지의 면역증강 효과평가

다. 최적 수정란 이식 기준 설정 및 씨암말의 모니터링

라. 동결정액 활용 인공수정으로 태어난 망아지의 육성 시험(1두) 및 관련기술의 실용화 체계 구축 및 농가 전수

4. 한국형 승용마의 친자감정 기법 정립 및 등록시스템을 구축하기 위해 유전자(DNA) 분석 기법(ISAG Horse Ms panel 및 SNP) 개발 및 등록시스템을 구축하였고 SNP를 통한 승용마 특이 유전형질 탐색 연구를 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내외 관련기술의 현황

1. 국내 기술동향 및 수준

가. 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계		기술 안정화 단계	○
---------	--	--------	--	-----------	---

승용마를 생산하는 선진국에서는 관련 기술을 개발한 후 현장에 접목시킬 수 있는 기술 안정화 단계이나 경주마 생산과 마찬가지로 우수한 승용마를 생산하기 위해 씨암말 및 씨수말의 생식기 질환과 정액을 이용한 인공수정 및 수정란 이식 등 번식효율 향상을 위한 연구가 끊임없이 지속되고 있다.

나. 국내 수준

개념정립 단계		기업화 단계	○	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

국내에서 우수한 말을 확보하기 위해서는 혈통이 우수한 씨수(암)말의 선정은 물론, 말 번식기술의 정립 및 향상이 무엇보다 요구되고 있다. 그러나 말에 관한 전반적인 연구를 포함하여 말의 번식(특히 승용마)과 관련된 연구결과는 외국에서는 많이 보고되어 있으나 국내에서는 초보단계에 놓여 있다.

2. 국내 연구현황

가. 말 번식 관련 연구 현황

국내에서 질 좋은 말을 확보하기 위해서는 혈통이 우수한 씨수(암)말의 선정은 물론, 말 번식기술의 정립 및 향상이 무엇보다 요구되어지고 있다. 그러나 말에 관한 전반적인 연구를 포함하여 말의 번식과 관련된 연구결과는 외국에서는 많이 보고되어 있으나 국내에서는 거의 없는 실정이다.

현재까지 말의 번식과 관련되어 연구된 것은 1)제주에서 사육중인 더러브렛종 씨암말 301두와 자마 103두를 대상으로 번식특성 조사, 2)국내에서 사육중인 더러브렛종 씨암말 100두를 대상으로 생식기내 세균의 분포와 그 분리균에 대한 항생제 감수성 양상 조사, 3)씨암말의 clitoris와 유산 태아로부터 말의 생식기 질환의 주요 원인체 중 하나인 *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*가 분리되어 유전적 특성 연구, 4)초음파와 호르몬치를 이용한 임신진단 연구 등이 주로 보고된 바 있다(양 등, 2004; 최 등, 2007; Choi 등, 2011).

국내에서 번식장애 씨암말의 병인학적 특성 및 생산성 향상 기술 개발과 관련된 연구는 상당히 미흡한 실정으로서 질 좋은 말의 생산과 축산농가의 생산성 효율 향상을 위해서는

연구가 시급히 진행되어야 할 것으로 사료된다.

국내에서 말을 대상으로 인공수정이나 수정란 이식에 관한 연구 또한 상당히 미흡한 실정이다. 본 연구를 통해 인공수정 관련 기술은 정립이 되어 말 생산 현장에서 활용이 가능할 것으로 생각된다. 그러나 말에서의 수정란 이식 관련 기술은 초보단계로서 향후 더 많은 연구를 통해 실용화 체계의 구축이 시급히 요구되고 있는 실정이다.

더러브렛종 말과 제주마 중심으로 말의 혈통 및 번식등록을 위한 유전자(DNA) 검사가 이루어지고 있다(Lee와 Cho, 2006; Cho,2006). 그러나 승용마에 대한 유전적 다형성에 관한 연구는 없으므로 향후 국내에서 승용마 혈통 및 번식등록을 위한 유전자(DNA) 검사의 기법도 본 연구를 통해 얻은 결과를 토대로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

나. 국내 승용마 생산 및 번식 연구 현황

국내에서 활용중인 승용마는 대부분이 경주 퇴역마를 순치하여 활용하거나 일부에서 수입 승용마를 이용하고 있으나, 수입비용이 고가이고, 국내에서 관리상의 어려운 문제점이 발생하고 있다.

말의 번식효율 향상과 관련된 기술개발 및 연구는 주로 본 연구진에 의해 진행되고 있다. 승용마 생산에 필수적인 말의 생식기내 질병의 진단 및 예방법에 관한 연구나 말 번식기술(정액 채취 및 동결, 인공수정, 수정란이식)에 대한 연구가 전반적으로 미흡하나 최근 본 연구진에 의해 말의 정액 채취 및 동결정액 생산기술 확립 및 발표(한국수정란이식학회지 2008:23:161~166), 다양한 종류의 정액을 활용한 말의 인공수정 임신율 및 망아지 생산 결과 발표(한국수정란이식학회지 2011:26:15~19) 등 국내에서 말의 인공수정에 대한 기반을 확보하였다.

3. 국외 연구현황

가. 번식장애 씨암(수)말의 병인학적 특성 연구

*Taylorella equigenitalis*는 1977년에 영국과 아일랜드에서 처음 알려진 이후 말 전염성 자궁염을 일으키는 주요한 세균으로서 비뇨생식기 표면에 샘플을 채취하여 분리하기에는 분리 동정이 너무 어려워 분자생물학적 방법을 이용하고자 현재 기법을 개발 중에 있다(Erdman 등, 2011). *Klebsiella pneumoniae*는 *E. coli* 등과 함께 생식기에 유행하는 균으로 질과 자궁 점액으로부터 균이 분리 동정 가능하며, 분리된 균은 항혈청을 이용하여 분류되고 있으며, 현재 PCR이나 Spectrum을 통한 검출도 이용되고 있다. 그러나 아직 효과적인 백신은 없는 실정이다(Ike 등, 1987).

*Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*는 드물게 유산을 일으키는 세균으로서 분자생물학적 방법을 이용하여 검출 및 다른 균주와의 감별도 가능하다. 또한 말의 번식장애를 유발하고 있는 세균성 병원체(*Streptococcus equisimilis*, *Escherichia coli*, *Leptospira* species, *Pantoea agglomerans*, *Cellulosimicrobium cellulans*)에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 말은 계절번식동물이라는 점으로 생리적인 비발정기에는 자연적으로 발정유도가

쉽지 않다. 그래서 다른 산업동물에서와 같이 호르몬제를 이용한 발정동기화 및 말 인공수정 시 정액 내 호르몬제를 첨가함으로써 말의 번식 효율 향상을 위한 연구를 시도하고 있다. 말의 생산성 향상과 관련하여 자연교배뿐 아니라 인공수정 및 수정란 이식 관련 연구도 말 산업이 발전한 정도와 비례하여 정액과 항생제의 혼합, 정액 내 감염세균의 배제와 관련된 연구 등 말 번식관련 연구가 많이 진행되고 있다.

승마 선진국에서는 고객으로부터 맞춤형 주문에 의해 우수한 혈통의 자마를 생산·공급하는 등 말 전문 불임 클리닉을 운영하고 있으며, 생산된 자마의 혈통등록을 위한 유전자(DNA) 검사와 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다. 승용마의 등록은 각국의 실정에 따라 시행하고 있으나 더러브렛종 경주마처럼 국제기준은 없다. 그러나 국제동물유전학회(International Society of Animal Genetics: ISAG)에서 정한 ISAG microsatellite marker중에서 선택하여 더러브렛종 말에 준해서 실시하고 있는 실정이다(Binns 등, 1995; Breen 등, 1997; Bowling 등, 1997; Coogle 등, 1996; Dimsoski, 2003; Eggleston-Stott 등, 1997; Ellegren 등, 1992; Guerin 등, 1994; Irvin 등, 1998; Marklund 등, 1994; Tozaki 등, 2001; Tozaki 등, 2000; Van Haeringen 등, 1994).

나. 말의 번식 및 생산 연구 분야

말의 정액 동결 프로그램, 인공수정, 수정란이식의 활용에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 특히 말은 계절번식동물이라는 점으로 생리적인 비발정기에는 자연적으로 발정유도가 쉽지 않다. 그래서 다른 산업동물에서와 같이 호르몬제를 이용한 발정동기화 및 말 인공수정 시 정액 내 호르몬제를 첨가함으로써 말의 번식 효율 향상을 위한 연구를 시도하고 있다.

정액 채취시 원정액의 품질과 채취 방법, 원심분리 방법, 희석액의 조성, 냉각 속도 및 시간, 포장재료 및 씨수말 등이 정자의 품질에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있고(Amann와 Pickett, 1987; Ecot 등, 2000), 정액의 동결보존을 위한 희석액 조성 및 동결체계에 대한 연구도 보고되었다(Martin 등, 1979; Cristanelli 등, 1984; Palmar, 1984).

말 인공수정 임신율에는 정자 보존용 희석액의 조성, 인공수정 시간, 주입 위치와 방법, 씨수말의 선발, 배란시기, 정자수, 암말의 관리, 전진운동성 정자의 농도 등이 영향을 미친다(Loomis, 2001; Colenbrander 등, 2003; Vidament, 2005; Metcalf, 2007).

우수 혈통의 승용마의 수정란과 정액은 전 세계로 냉장 및 동결 정액의 형태로 수출·수입되고 있고, 이들 수정란과 정액의 동결기술, 이식후 안정적인 수태율 확보 및 자마의 생산성 향상에 관련한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 또한 번식장애를 해결하기 위하여 난관내 수정법(GIFT), 난자내 정자 직접주입법(ICSI) 및 수술적인 난자 이식법도 개발되었다.

하지만 국외에서도 말의 인공수정 임신율 향상에 관한 문제점은 동결정액의 품질 기준과 인공수정에 대한 정형화된 프로토콜의 부재와 암말에 대한 번식관리의 미흡이 문제점으로 제시되고 있다(Loomis, 2001; Samper, 2009).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 번식장애 씨암(수)말의 병인학적 특성 및 생산성 향상 기술 개발

1. 서 론

국내 말 시장의 수요를 충족시키고 보다 질 좋은 경주마 및 승용마를 확보하기 위해서는 혈통이 우수한 씨수(암)말의 선정은 물론, 말 번식기술의 정립 및 향상이 무엇보다 요구되어지고 있다. 그러나 말의 번식과 관련된 연구는 외국에서는 많이 보고되어 있으나 국내에서는 상당히 미흡한 실정이다.

말 생식기 내에 존재하는 세균은 반드시 해로운 것만은 아니지만 병원성 세균으로서 발전될 잠재적인 특성을 가지고 있다. 자궁감염의 진행정도는 자궁상태, 저항력 등과 병원체의 종류, 숫자, 독성 등에 의해 좌우되며 그 말의 감수성에 따라 감염의 진행여부가 결정된다. 감염원과 싸우는 자궁의 생리기전에 대해서는 정확히 알려진 것이 없으나 감염이 발생할 때마다 암말의 저항력은 계속해서 감소하는 것으로 알려져 있다. 현재 씨암말의 생식기 감염을 유발하는 여러 가지 환경적, 물리적 요인들이 밝혀지고 있기 때문에 씨암말의 수태능력을 연구할 때는 이러한 요인들과 함께 교배 시 씨수말의 생식기와 관련된 질환도 평가해야 할 것이다.

씨암말의 생식기 질환과 관련된 주요 병원체는 *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* 등이 있으며, 종종 *Corynebacterium* spp, *Proteus* spp, *Klebsiella oxytoca*, *Bacteroides fragilis*, *Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Staphylococcus* spp. 등도 관여하고 있다. 말 전염성 자궁내막염(CEM)은 *Taylorella equigenitalis*에 의해 유발되는 생식기 질병으로서 교배 후 1-14일간의 잠복기를 거쳐 자궁내막염, 자궁경관염, 질염 등을 나타낸다. 음문부에서 삼출액이 배출되며 꼬리 부위가 오염되어 있다. 불수태, 조기발정의 반복 등을 야기하며 감염된 씨암말은 대부분 임상 증상이 미약하여 다른 원인에 의한 자궁내막염과 구별이 쉽지 않아 본 병을 진단하기에 어려움이 많은 것으로 알려져 있다.

말에서의 *E. coli*는 주로 망아지 설사와 패혈증, 비뇨생식기 관련 질병을 유발하는 것으로 알려져 있으나(Ike 등, 1987; 윤 등, 2010) 다른 동물에 비해 연구가 미진한 상태이다. 특히 경주마는 물론 승용마 생산과 보급에 있어 말 생식기 계통의 질병이 매우 중요한 사안으로 부각되고 있다.

국내에서 양 등(2004)은 2000년 2월부터 2001년 7월 사이 제주 동부 지역에서 사육중인 더러브렛 종 씨암말 301두와 자마 103두를 대상으로 번식특성을 조사한 결과, 2000년 교배한 씨암말 143두의 임신율은 93.0%(133두/143두), 망아지 생산율은 72.0%(103두/143두)로 확인하였다. 평균 임신기간은 339.3일이었고 2001년 씨암말 158두의 교배횟수는 315회로서 씨암말당 평균 교배횟수는 1.99회였으며 임신율은 86.7%(137두/158두)로서 출산경력이 있는 경산마들이 공태마나 처녀마보다 수태율 및 임신율이 높은 것으로 보고한 바 있다.

또한 최 등(2007)은 국내에서 활용중인 100두의 씨암말을 대상으로 생식기내 세균을 조사한 결과, 많은 종류의 세균이 분리되었으나 전염성 자궁염의 원인체인 *Taylorella equigenitalis*와 화농성 자궁염의 원인체인 *Klebsiella pneumoniae*는 분리되지 않았다고 보고한 바 있다.

Baranski 등은 foal heat 동안 75마리의 암말로부터 직장검사 및 초음파 검사를 통하여 검진하여 자궁으로부터 얻어진 시료에서 세균 검사 결과 총 49마리(65.3%)에서 양성 반응을 나타내었으며, β -haemolytic *Streptococcus* (25.3%) 및 *E. coli* (24%)가 가장 빈번히 검출되는 세균이라고 보고한 바 있다.

지금까지 국내에서 씨암말의 생식기 유래 세균의 분리에 관한 연구에서 김 등(1991)은 19두의 건강한 씨암말을 대상으로 생식기내 세균을 조사한 결과 *Streptococcus* spp. (37.3%), *Staphylococcus* spp. (23.9%), *Bacillus* spp. (16.4%), *Corynebacterium* spp. (7.5%), *Enterobacter cloacae* (7.5%), *E. coli* (5.9%), *Bacteroides* spp. (1.5%) 등을 분리 보고한 바 있고, Lee 등(1999)은 *E. coli* (30%), *Clostridium* spp. (20%), *Streptococcus* spp. (20%), *Bacillus* spp. (18%), *Bacteroides* spp. (16%), *Pasteurella* spp. (14%), *Pseudomonas aeruginosa* 등을 분리 보고한 바 있다. 또한 최 등(2007)은 국내에서 사육중인 더러브렛종 씨암말 100두를 대상으로 생식기내 세균의 분포와 그 분리균에 대한 항생제 감수성 양상을 연구한 결과, 분리된 세균은 *E. coli* (19.8%), *Proteus mirabilis* (14.9%), *Staphylococcus aureus* (14.9%), *Staphylococcus epidermidis* (11.2%), Coagulase-negative *Staphylococcus* spp (10.0%), *Enterococcus faecalis* (9.2%), *Enterobacter nimipressuralis* (7.4%), *Actinomyces viscosus* (7.2%), *Enterobacter mobilis* (4.7%), *Aeromonas encheleia* (4.3%), *Proteus vulgaris* (3.6%) 등의 순으로 높은 분리율을 나타내었고, Gram 음성균의 분리율 (65.36%)이 Gram 양성균의 분리율 (34.64%)보다 높게 나타났다.

Clark 등(2008)은 말의 trachea (10.8%), uterine (46.3%), wound (18.9%), postprocedural soft tissue (34.5%), urine (36%), septic foal (35.7%), umbilicus (50%) 등에서 높은 *E. coli*의 분리율을 보고하였다.

Ike 등(1987)은 1982년에서 1986년에 걸쳐 설사를 보이는 463마리의 망아지로부터 세균학적 연구를 수행한 결과, 용혈성 *E. coli*가 만성 설사를 나타내는 자마에서 빈번하게 검출되었으나 정상 자마에서는 거의 검출되지 않았으며, 다른 달보다도 5월에 5배나 더 높게 분리되었다. 그리고 이러한 사실로부터 hemolytic *E. coli*는 교배기인 특히 5월 동안에 역학적으로 자마에서의 만성적 설사와 매우 연관성이 높을 것으로 보인다. 설사를 보이는 자마 및 자궁염을 보이는 암말에서 분리된 hemolytic *E. coli*의 많은 종들은 혈청형 O101으로 분류되었다. 이는 hemolytic *E. coli*가 암말에서 자마로의 전파가 이루어질 수 있음을 강력히 뒷받침해 준다.

국내에서 사육중인 씨암말의 생식기 질환을 예방하고 생산성 향상을 도모하기 위해서는 가능한 한 자궁의 감염기회를 줄이는 것이 중요하며 씨암말의 자궁 면역학적 연구, 특히 자궁내의 세포반응이나 항균 물질의 분비 및 방어기전 등의 연구와 동시에 만약 발병 시 치료 효율을 극대화하는 방안으로 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

2. 연구의 내용 및 결과

가. 번식장애 씨암말의 생식기로부터 시료채취

번식장애의 생식기로부터 Equi-Vet uterine culture swab와 BBL culture swab를 이용하여 시료를 채취하였다. 시료채취 방법은 채취전 꼬리를 붕대로 묶어 옆으로 재친 다음 외음부를 소독액으로 깨끗이 닦아낸 후 최소 30초간 swab를 생식기내로 삽입하여 시료를 채취한 후 채취한 swab는 Thioglycolate broth에 넣어 48시간내에 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다(최 등, 2007).

나. 번식장애 유발 세균 병원체의 신속 검출과 동정을 위한 진단법 및 예방법 개발

(1) *Streptococcus zooepidemicus*에 대한 연구

(가) 정의

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*)는 말에서 주로 분리되는 기회감염 세균으로 개, 고양이, 소, 양, 돼지, 원숭이, 사람 등에 다양한 감염증을 유발하는 광범위한 숙주역을 가지고 있는 인수공통 전염병의 원인체로 작용하며, 말에서는 주로 호흡기 감염, 암말의 생식기 질병 및 케양성 각막염 등을 유발하는 원인체로 알려져 있다. 특히 암말 생식기 내 *S. zooepidemicus*감염은 임신 중·후기에 유사산을 유발하며 감염된 개체는 자궁 내 환경의 손상으로 인해 지속적인 번식의 실패를 유발하여 국내 말 생산 및 육성 산업에 경제적으로 큰 피해를 초래하고 있다.

(나) *Streptococcus zooepidemicus*에 대한 진단법 및 예방법 개발

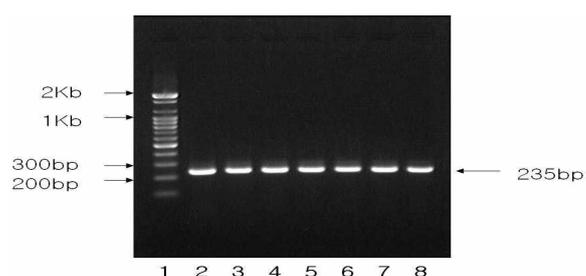
번식장애 씨암말 68두(질점액 66개, 유산태아 1개, 자궁내용물 1개)로부터 17주(25%)의 *Streptococcus zooepidemicus*를 생화학적 특성 및 PCR로 동정하였고, 분리균에 대한 특성은 *sodA - seeI*, *SzP*, *CNE encoding gene*을 분석하였으며(Anzai 등, 2002), 유전학 및 역학적 특성을 조사하고자 RAPD로 분석하였고(Younan 등, 2005) 또한 20개의 약제에 대해 디스크 확산법(Bauer 등, 1996)으로 항생제 감수성 시험을 실시하였다. 그 결과 국내 생식기 유래 *Streptococcus zooepidemicus*는 Ampicillin, Cefoxitin, Ceftiofur, Cephalothin, Florfenicol, Gentamycin, Nalidixic acid, Oxacillin, Penicillin, Tiamulin, Tylosin, Vancomycin에 높은 감수성을 나타내었다(Table 1~2, Figure 1~3).

Table 1. Frequencies of *S. equi* subsp. *zoepidemicus* isolated from horse

Sources	No.of horse	No.of <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> (%)
Fetus and uterine contents	2	2 (100.00)
Vaginal mucosa	66	15 (22.72)
Total	68	17 (25.00)

Table 2. Results of antimicrobial susceptibility tests of 17 *S. equi* subsp. *zoepidemicus* isolates

Drugs	Susceptible (%)	Drugs	Susceptible (%)
Amikacin	13 (76.47)	Ampicillin	17 (100.00)
Cefoxitin	17 (100.00)	Ceftiofur	17 (100.00)
Cephalothin	17 (100.00)	Ciprofloxacin	11 (64.71)
Doxycycline	16 (94.12)	Enrofloxacin	13 (76.47)
Florfenicol	17 (100.00)	Gentamycin	17 (100.00)
Kanamycin	14 (82.36)	Nalidixic acid	17 (100.00)
Nitrofurantoin	16 (94.12)	Oxacillin	17 (100.00)
Penicillin	17 (100.00)	Tetracycline	9 (52.94)
Tiamulin	17 (100.00)	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	12 (70.59)
Tylosin	17 (100.00)	Vancomycin	17 (100.00)

**Fig. 1.** Gel electrophoresis of PCR products of *S. equi* subsp. *zoepidemicus* with sizes of approximately 235 bp using *sodA* - *seeI* specific multiplex PCR. Lane 1: 100 bp ladder marker (Bioneer, Korea), Lane 2-7: vaginal mucosa, Lane 8: aborted equine fetus.

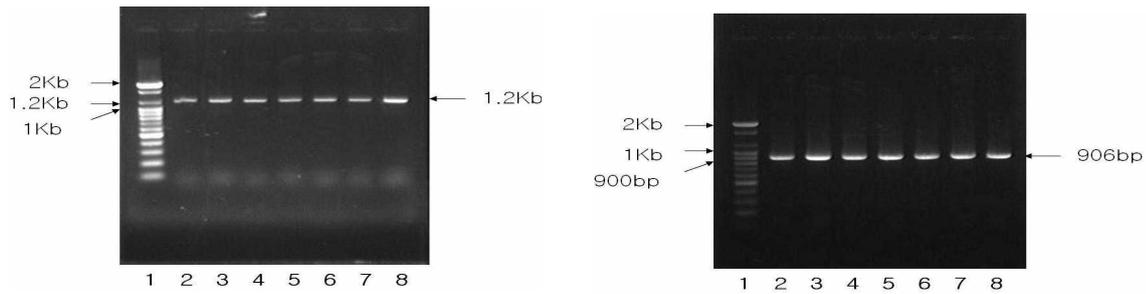


Fig. 2. PCR products of 1200 bp (left) and 906 bp (right) fragments of SzP and CNE encoding gene of *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, respectively. Lane 1: 100 bp ladder marker (Bioneer, Korea), Lane 2-7: vaginal mucosa, Lane 8: aborted equine fetus.

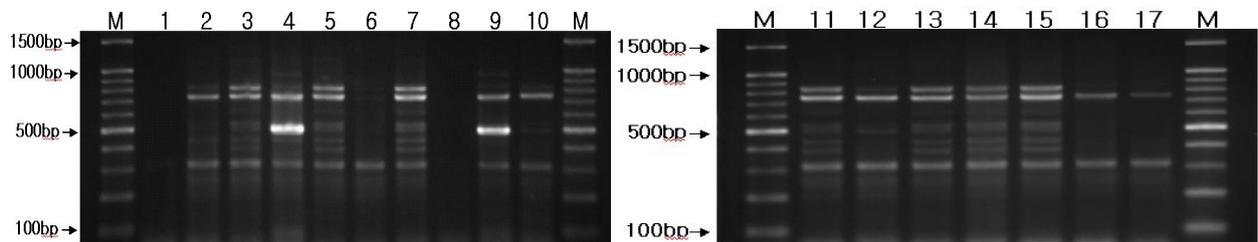


Fig. 3. Random amplified polymorphic DNA-PCR banding patterns of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from horses. Lane M: 100 bp ladder marker (Elpisbiotech, Korea), Lane 1-15: vaginal mucosa, Lane 16: uterine contents, Lane 17: aborted equine fetus.

(다) *Streptococcus zooepidemicus*의 작용기전, 유전학적 특성 및 예방법 연구

국내(제주와 장수)로부터 유산, 자궁내막염, 지속적인 번식의 실패를 보이는 더러브렛종 말 374두로부터 79주의 *S. zooepidemicus* 균주를 분리하였다. 분리한 *S. zooepidemicus*의 역학적인 발생 분석과 국내에서 분리된 *S. zooepidemicus*에 대해 생물학적 및 분자생물학적 기법을 이용하여 역학적 특성에 대해 조사하였다(Table 3).

전체 분리율은 21.12%로 국외의 연구에 비해 유사하거나 다소 높게 관찰되었다. 지역적인 분리율을 비교하였을 때 제주지역 32.23%, 장수지역 10.11%로 장수지역에 비해 제주지역이 3배 이상 높은 분리율을 나타내었다. 79주의 *S. zooepidemicus* 분리균에 대한 생화학 성상 검사결과 대부분의 성상에 있어 *S. zooepidemicus* 표준 생화학적 성상과 일치한 결과를 나타내었으나 sorbitol 분해능에 있어서는 대부분의 균주에서 비분능이 관찰되어 표준성상과 상반되는 결과를 확인할 수 있었다(Table 4).

분리된 79주의 *S. zooepidemicus*에 대한 약제감수성 양상을 조사한 결과 Benzylpenicillin (100.00%), amoxicillin (100.00%), cefotaxime (100.00%), ceftriaxone (100.00%), imipenem (100.00%), levofloxacin (100.00%), moxifloxacin (100.00%), erythromycin (100.00%),

pristinamycin(100.00%), quinupristin/dalfopristin (100.00%), telithromycin (100.00%), linezolid (100.00%), vancomycin (100.00%), chloramphenicol (100.00%), rifampicin (100.00%), trimethoprim/sulfamethoxazole (92.41%), ofloxacin (91.14%) 등의 약제에 매우 높은 감수성을 나타내었으며, tetracycline (70.88%), sparfloxacin (59.49%)에 대해서는 비교적 높은 내성을 나타내었다(Table 5~6).

PCR 기법 및 fragment analysis 기법을 이용하여 분리된 *S. zooepidemicus*에 대한 16S-23S rRNA intergenic space region (ISR)의 특성 및 SzP, cne 병원성인자를 검사한 결과 분리된 모든 균주에서 698 bp의 ISR PCR product size를 관찰 할 수 있었으며, 모든 분리균주가 SzP, cne 병원성 인자를 가지고 있는 것으로 확인되었다(Figure 4~7). 특히 분리균주의 기초적인 역학적 분석 기법으로 활용되고 있는 SzP products size의 다양성에서는 1198 bp (n=3), 1154 bp (n=56), 1139 bp (n=14), 1118 bp (n=2), 1116 bp (n=4)가 관찰되었다.

SmaI 제한효소를 처리하여 분리된 79주의 *S. zooepidemicus*의 PFGE 패턴을 분석한 결과 모든 균주에서 20.5 kb~1135 kb 범위에서 7~18개의 band를 나타내었다. 79주의 분리주에서 32개의 서로 다른 PFGE 패턴을 관찰 할 수 있었으며 32개의 각 PFGE group은 최소 1주에서 최대 10주까지 동일한 패턴의 균주가 관찰되었으나 2006년 국내 사육중인 Thoroughbred 말에서 발생한 유·사산 case에서 분리된 *S. zooepidemicus* 균주와 유전학적으로 동일한 PFGE pattern을 나타내는 균주는 관찰되지 않았다. Dendrogram을 이용한 국내에서 분리된 79주의 *S. zooepidemicus*에 유전학적 상관관계를 분석한 결과 36% 상동성 범위에서 5개(S1, S2, S3, S4, S5)의 PFGE group으로 분류되었으며, 각 PFGE group은 42% 상동성 범위에서 9개(a, b, c, d, e, f, g, h, i)의 subgroup으로 분류되었다.

제주지역에서 분리한 60주의 *S. zooepidemicus*에 대한 PFGE 패턴을 분석한 결과 28개의 서로 다른 PFGE 패턴이 관찰되었으며 각 PFGE 패턴별로 최소 1개에서 최대 10개까지 동일한 패턴을 나타내는 분리주를 관찰 할 수 있었다. Dendrogram을 이용한 제주지역에서 분리한 *S. zooepidemicus*의 유전학적 상관관계를 분석한 결과 35% 상동성 범위에서 4개(J1, J2, J3, J4)의 PFGE group으로 분류되었으며, 각 PFGE group은 50% 상동성 범위에서 14개(j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w)의 subgroup으로 분류되었다.

장수지역에서 분리한 19주의 *S. zooepidemicus*에 대한 PFGE 패턴을 분석한 결과 15개의 서로 다른 PFGE 패턴이 관찰되었으며, Dendrogram을 이용한 분리주의 유전학적 상관관계를 분석한 결과 40% 상동성 범위에서 2개(JS1, JS2)의 PFGE group으로 분류되었으며, 각 PFGE group은 50% 상동성 범위에서 4개(x, y, z, aa)의 subgroup으로 분류되었다(Figure .

PFGE 기법을 이용한 국내 *S. zooepidemicus* 감염증 발생의 역학적 특성을 분석한 결과 제주와 장수 지역의 일부 균주에서 유사한 pattern이 관찰되었지만 지역별, 년도별 분리균주는 유전학적으로 매우 낮은 유전학적 상동성을 나타내었다(Figure 8~16).

본 연구를 통해 얻은 결과는 향후 *S. zooepidemicus*에 의한 생식기 질환 발생에 대비하여 효과적인 치료와 예방 및 국외에서 유입되는 본 균의 진단에도 유용하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3. Details of samples used in this study

Specimen	Region		Total
	Jeju	Jangsu	
Abortion fetus	1		1
Abortion mare	1		1
Vaginal discharge	82	148	230
Uterine washing	102	40	142
Total	186	188	374

Table 4. Isolation rate of *S.zooepidemicus* from Thoroughbred horses

Specimen	Region		Total
	Jeju	Jangsu	
Abortion fetus	1/1 (100.00)		1/1 (100.00)
Abortion mare	1/1 (100.00)		1/1(100.00)
Vaginal discharge	16/82 (19.5)	4/148 (2.7)	20/230 (8.7)
Uterine washing	42/102 (41.76)	15/40 (37.5)	57/142 (40.14)
Total	60/186 (32.26)	19/188 (10.11)	79/374 (21.12)

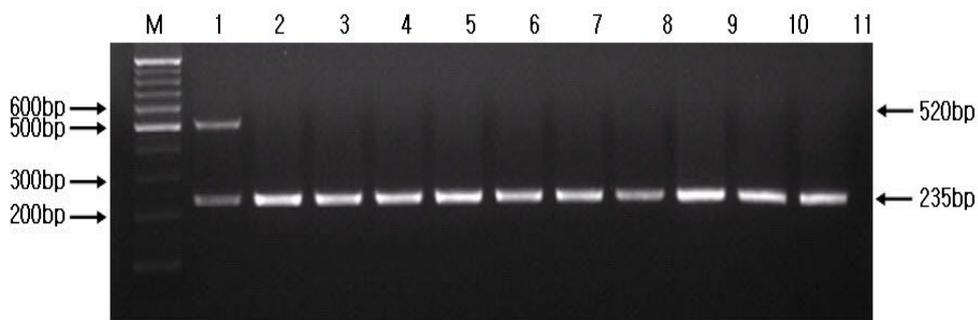
**Fig 4.** PCR amplification of *sodA-seeI* for identification of *S. zooepidemicus*. Lane M, molecular size marker(100 bp DNA ladder, Elpis, Korea); Lane 1, *S. equi* isolates; Lane 2 to 11 : *S. zooepidemicus* isolates.

Table 5. Biochemical characteristics of 79 *S. zooepidemicus*

Substrates	No.(%) of positive isolates	Substrates	No.(%) of positive isolates
AMY	0(0.00)	ADH1	75(94.94)
APPA	79(100.00)	BGAR	0(0.00)
LeuA	79(100.00)	AGAL	0(0.00)
AlaA	79(100.00)	URE	0(0.00)
dRIB	16(20.25)	NAG	79(100.00)
NOVO	67(84.81)	dMNE	79(100.00)
dRAF	0(0.00)	SAC	72(91.14)
OPTO	79(100.00)	BGAL	29(36.71)
PIPLC	0(0.00)	AMAN	0(0.00)
CDEX	58(73.42)	PyrA	0(0.00)
ProA	3(3.797)	POLYB	56(70.89)
TyrA	79(100.00)	dMAL	79(100.00)
ILATk	0(0.00)	MBdG	70(88.61)
NC6.5	0(0.00)	dTRE	0(0.00)
O129R	11(13.92)	AGLU	79(100.00)
dXYL	0(0.00)	PHOS	79(100.00)
AspA	0(0.00)	BGUR	1(1.266)
BGURr	31(39.24)	dGAL	79(100.00)
dSOR	13(16.46)	BACI	53(67.09)
LAC	76(96.20)	PUL	79(100.00)
dMAN	52(65.82)	ADH2s	75(94.94)
SAL	71(89.87)		

Table 6. In vitro antimicrobial activities of 79 *S. zooepidemicus* isolated from Thoroughbred horses

Antimicrobial	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			S (%)	I (%)	R (%)
	Range	MIC50	MIC90			
Benzylpenicillin	0.06 - 2.0	0.06	0.06	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Amoxicillin	0.06 - 8.0	0.06	0.06	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Cefotaxime	0.06 - 4.0	0.06	0.06	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Ceftriaxone	0.06 - 4.0	0.06	0.06	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Imipenem	0.03 - 4.0	0.03	0.03	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Levofloxacin	0.5 - 8.0	1.0	2.0	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Moxifloxacin	0.25 - 4.0	0.25	0.25	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Ofloxacin	1.0 - 8.0	0.25	0.5	72(91.14)	5(6.33)	2(2.53)
Sparfloxacin	0.125 - 4.0	0.5	1.0	47(59.49)	29(36.71)	3(3.80)
Erythromycin	0.25 - 1.0	0.25	0.25	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Pristinamycin	2.0 - 4.0	2.0	2.0	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Quinupristin/ Dalfopristin	0.25 - 4.0	0.25	0.25	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)

Table 6. In vitro antimicrobial activities of 79 *S. zooepidemicus* isolated from Thoroughbred horses (*Continued*)

Antimicrobial	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			S (%)	I (%)	R (%)
	Range	MIC50	MIC90			
Telithromycin	0.25 - 4.0	0.25	0.25	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Linezolid	2.0 - 4.0	2.0	2.0	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Vacomycin	1.0 - 2.0	1.0	1.0	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Tetracycline	1.0 - 16.0	4.0	≥ 16	9(16.46)	13(16.46)	53(70.88)
Chloramphenicol	2.0 - 32.0	4.0	4.0	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Rifampicin	0.25 - 4.0	0.25	0.25	79(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	2/38 - 32/608	0.5/9.5	1.0/19.0	73(92.41)	6(7.59)	0(0.00)

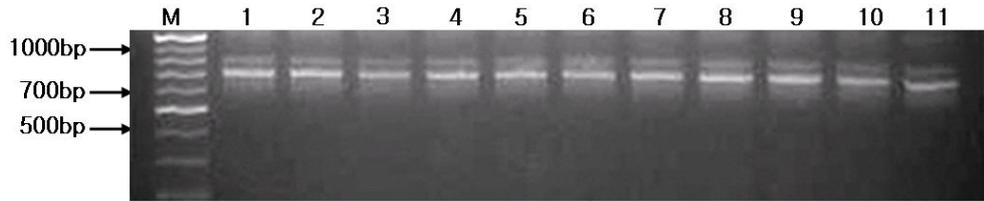


Fig 5. PCR amplification of the ISR (16S-23S rRNA intergenic spacer region) from *S. zooepidemicus*. Lane M, molecular size marker (100 bp DNA ladder, Elpis, Korea); Lane 1 to 11 : *S. zooepidemicus* isolates.

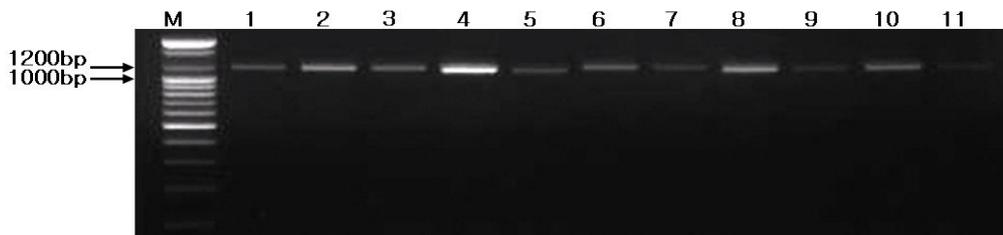


Fig 6. PCR amplification of the SzP gene from *S. zooepidemicus* strains Lane M, molecular size marker (100 bp DNA ladder, Bioneer, Korea); Lane 1 to 11 : *S. zooepidemicus* isolates.

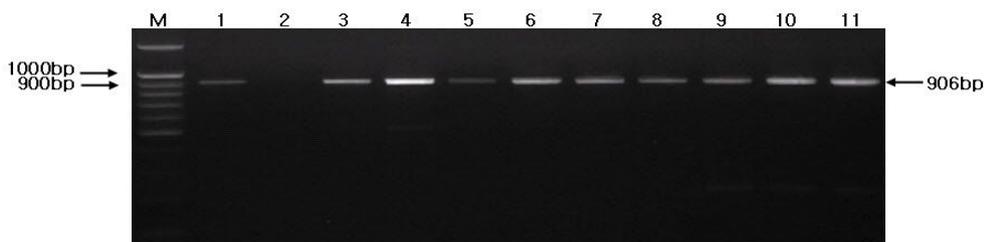


Fig 7. PCR amplification of 906 bp fragments of *cne* gene from *S. zooepidemicus*. Lane M, molecular size marker (100 bp ladder, Elpis ,Korea); Lane 1, *S. zooepidemicus* isolated from aborted fetus; Lane 2, Negative control; Lane 3 to 11 : *S. zooepidemicus* isolates.

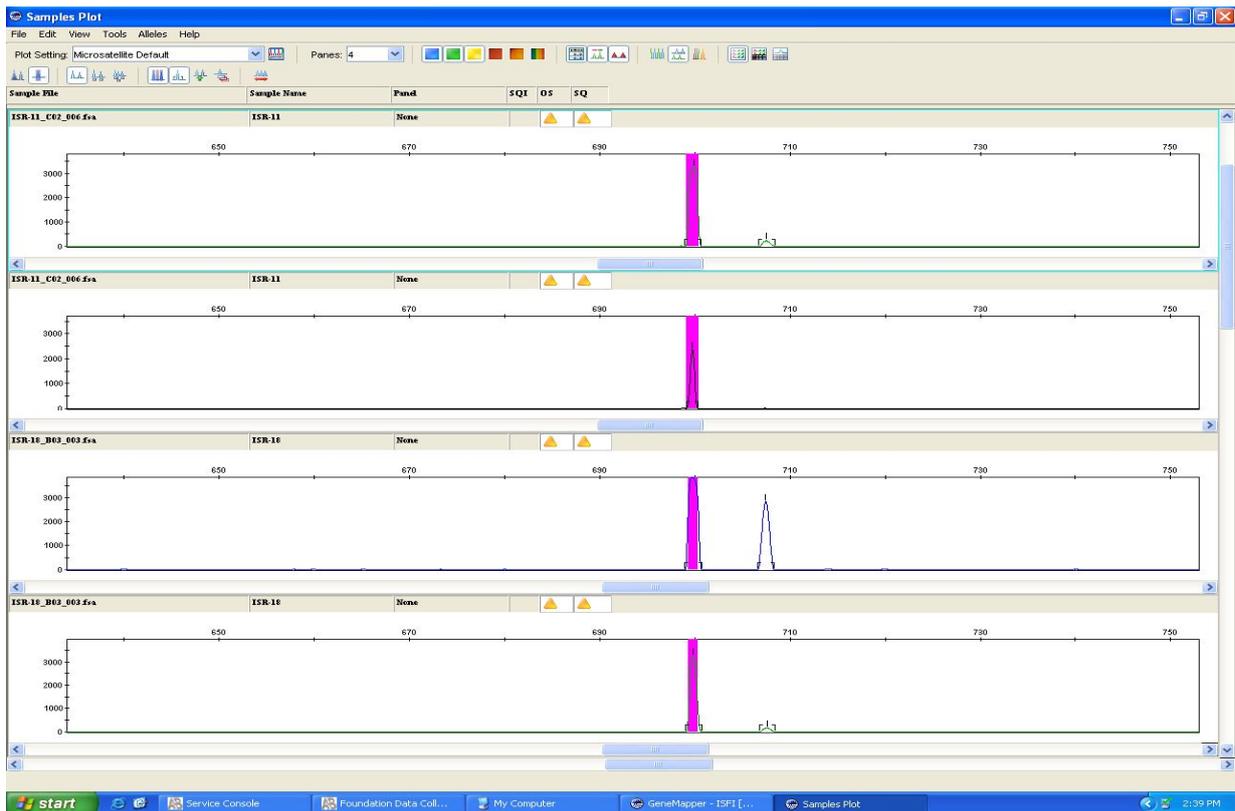


Fig. 8. Peak data of ISR fragment analysis. After fragment analysis, ISR peak data were examined by using GeneMapper Ver. 4.0 software (Applied Biosystems, USA). All 79 strains showed a single amplicon with a size of approximately 698 bp.

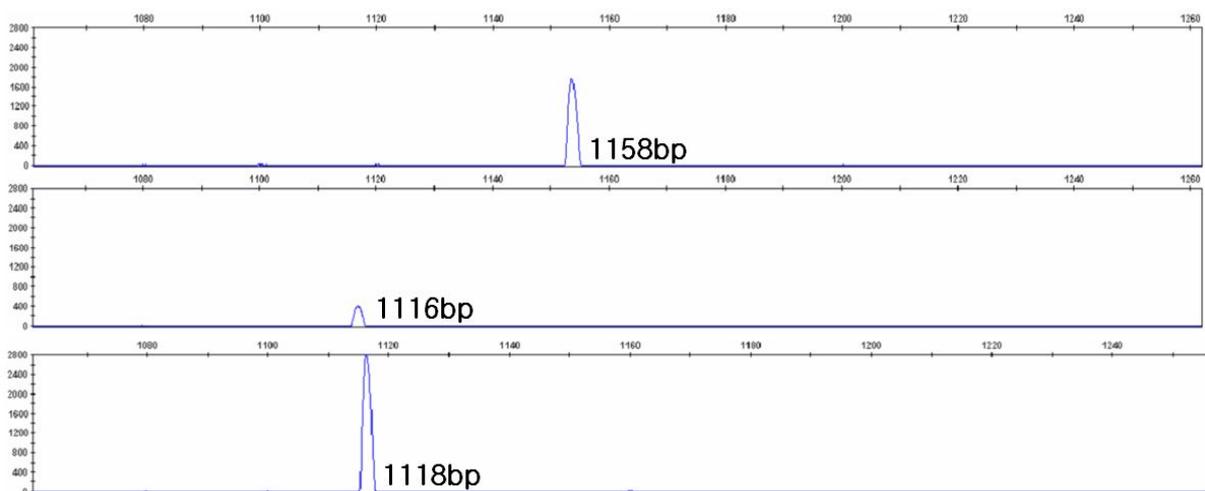


Fig. 9. Peak data of SzP fragment analysis. After fragment analysis, SzP peak data were examined by using GeneMapper Ver. 4.0 software (Applied Biosystems, USA). *S. zooepidemicus* strain with sizes of 1158 bp, 1116 bp, 1118 bp.

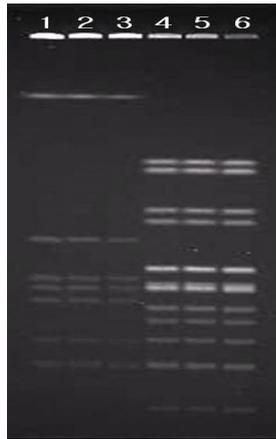


Fig 10. PFGE patterns of Sma I digested genomic DNA of *S. equi* and *S. zooepidemicus* for reproducibility and stability test. Reproducible results were observed because a similar pattern was shown for each same strains. Lane 1-3 : *S. equi* (ATCC 9528), Lane 4-6 *S. zooepidemicus* (ATCC 700400).

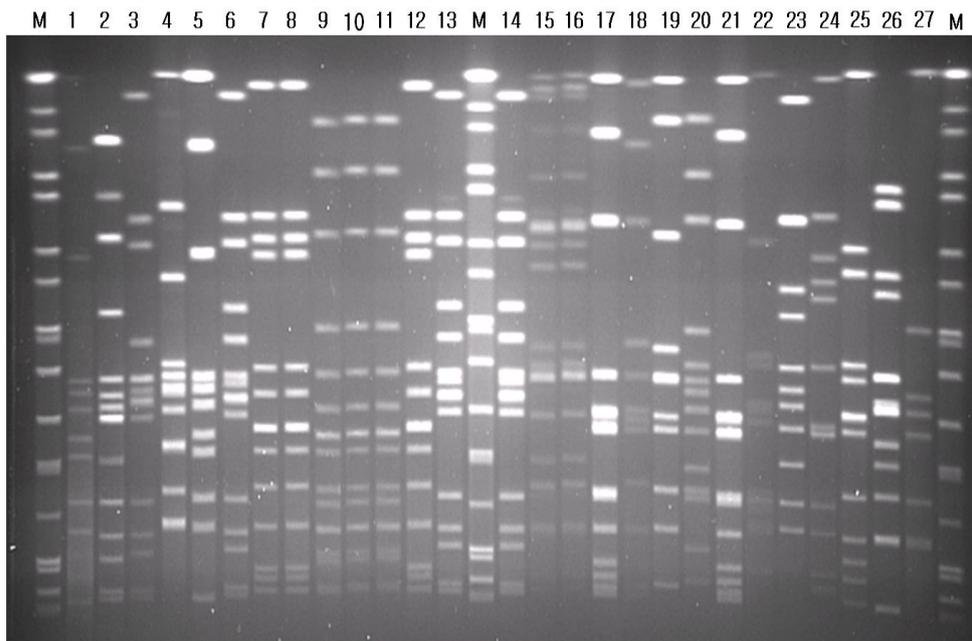


Fig 11. PFGE pattern of Sma I digested genomic DNA of *S. zooepidemicus*. Lane M : Molecular DNA size marker (Xba I macrorestriction of Salmonella Braenderup), Lane 1-14 : *S. zooepidemicus* isolated from Thoroughbred horse in Jangsu, Lane 15 : *S. zooepidemicus* isolated from Abortion fetus, Lane 16 : *S. zooepidemicus* isolated from Abortion mare, Lane 17-24 : *S. zooepidemicus* isolated from Thoroughbred horse in Jeju, Lane 26 *S. zooepidemicus* (ATCC 700400), Lane 27 : *S. equi* (ATCC 9528).

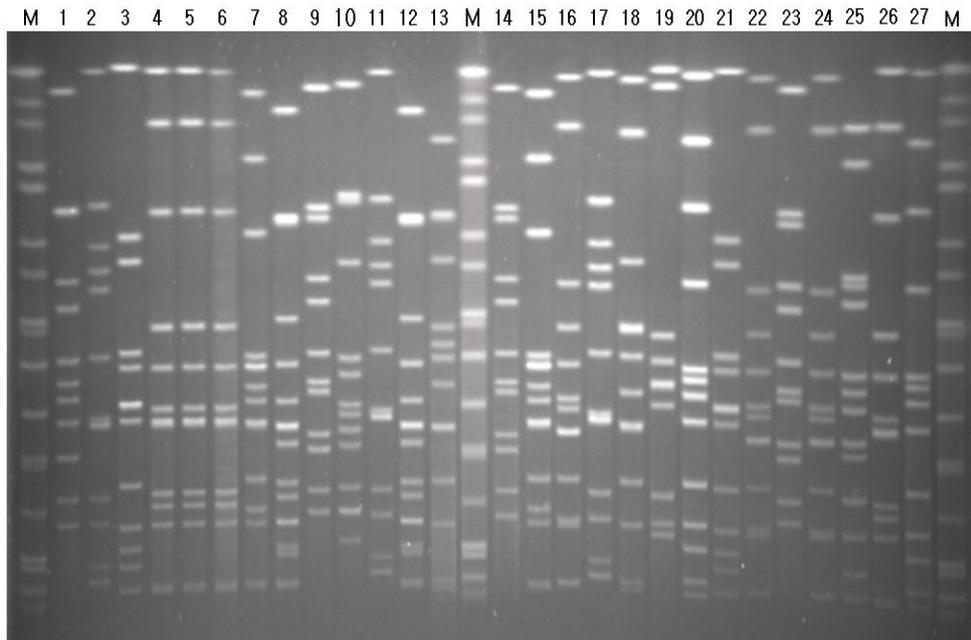


Fig 12. PFGE pattern of Sma I digested genomic DNA of *S. zooepidemicus*. Lane M : Molecular DNA size marker (Xba I macrorestriction of *Salmonella* Braenderup), Lane 1-27 : *S. zooepidemicus* isolated from Thoroughbred horse in Jeju.

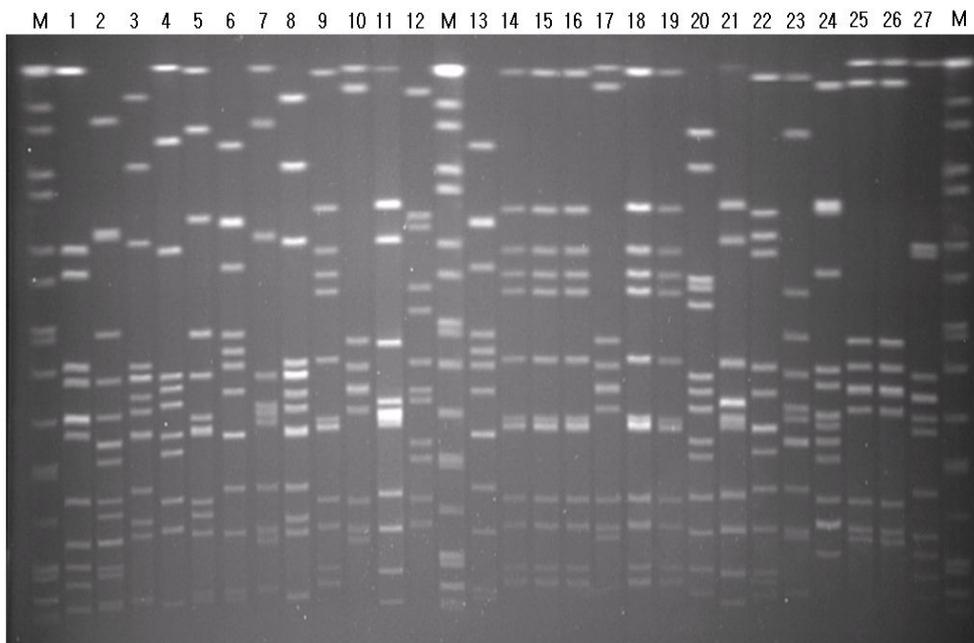


Fig 13. PFGE pattern of Sma I digested genomic DNA of *S. zooepidemicus*. Lane M : Molecular DNA size marker (Xba I macrorestriction of *Salmonella* Braenderup), Lane 1-27 : *S. zooepidemicus* isolated from Thoroughbred horse in Jeju.

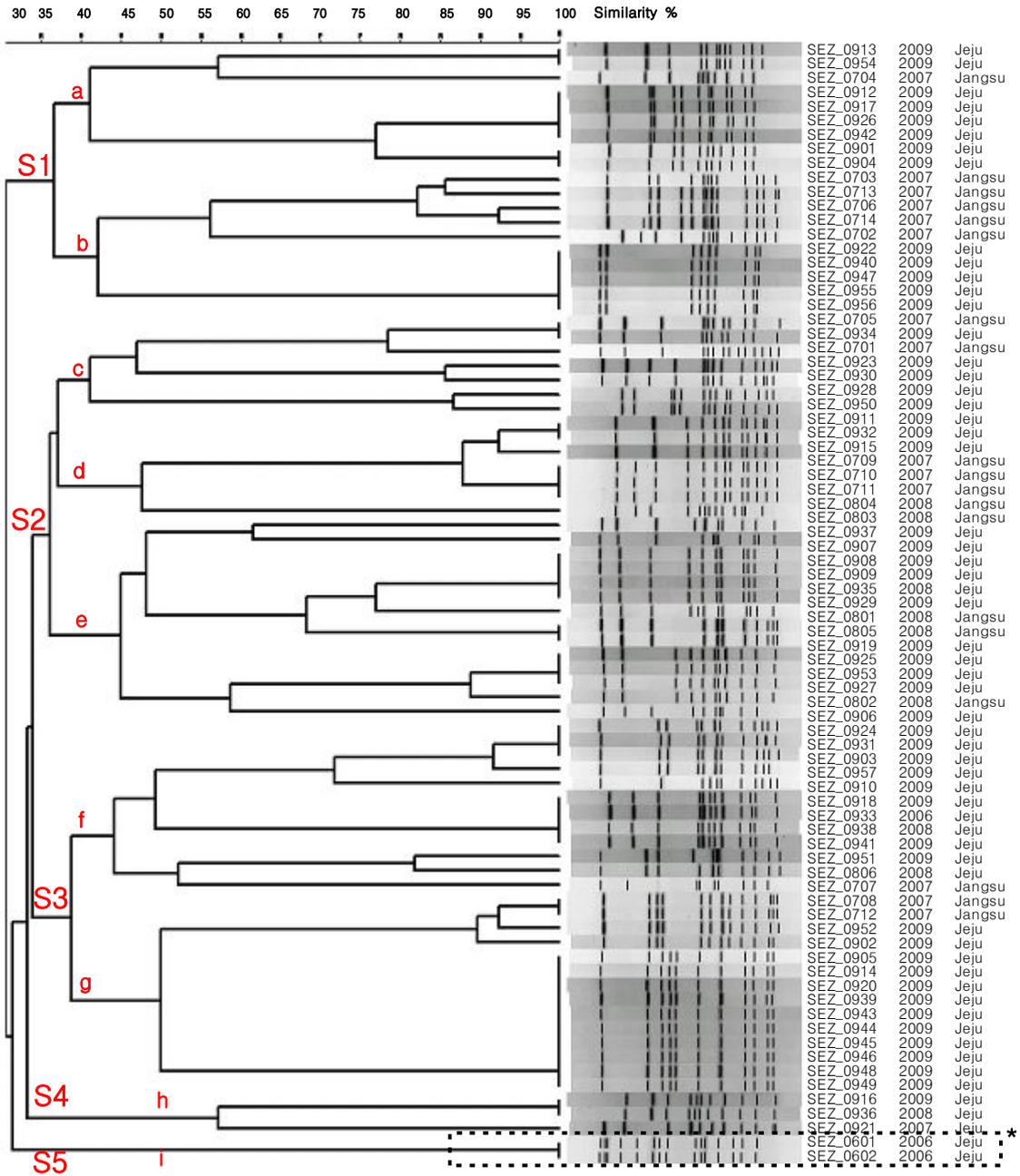


Fig 14. Dendrogram of 79 *S. zooepidemicus* isolated in Jeju and Jangsu region. The dendrogram was constructed with InfoQuest software Ver. 4.5 (Bio-Rad) with 1% optimization and 5% position tolerance by using the UPGMA algorithm with Dice similarity coefficient. *: Dash line box : Abortion case.

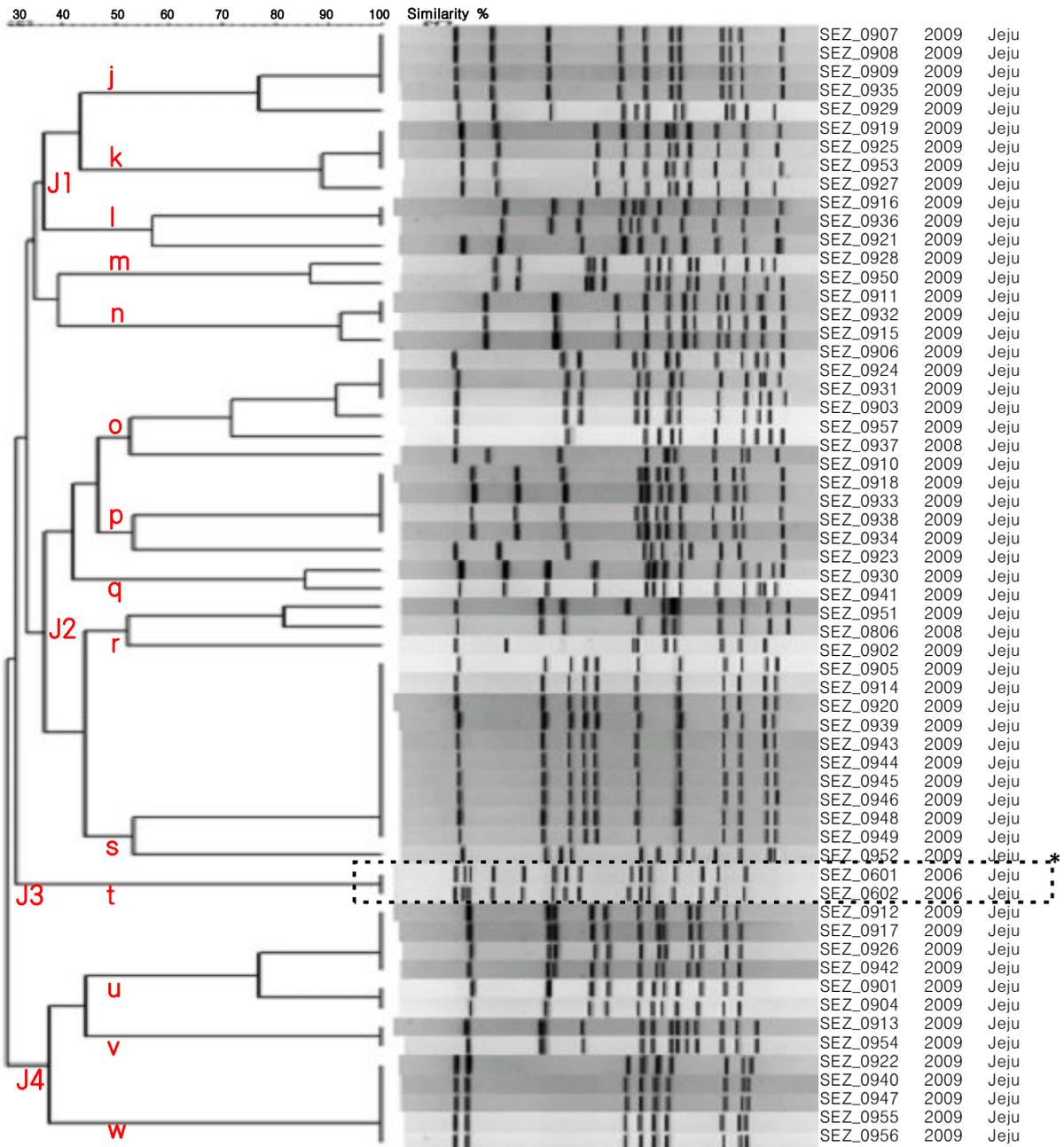


Fig 15. Dendrogram of 60 *S. zooepidemicus* isolated in Jeju region. The dendrogram was constructed with InfoQuest software Ver. 4.5 (Bio-Rad) with 1% optimization and 5% position tolerance by using the UPGMA algorithm with Dice similarity coefficient.

*: Dash line box : Abortion case.

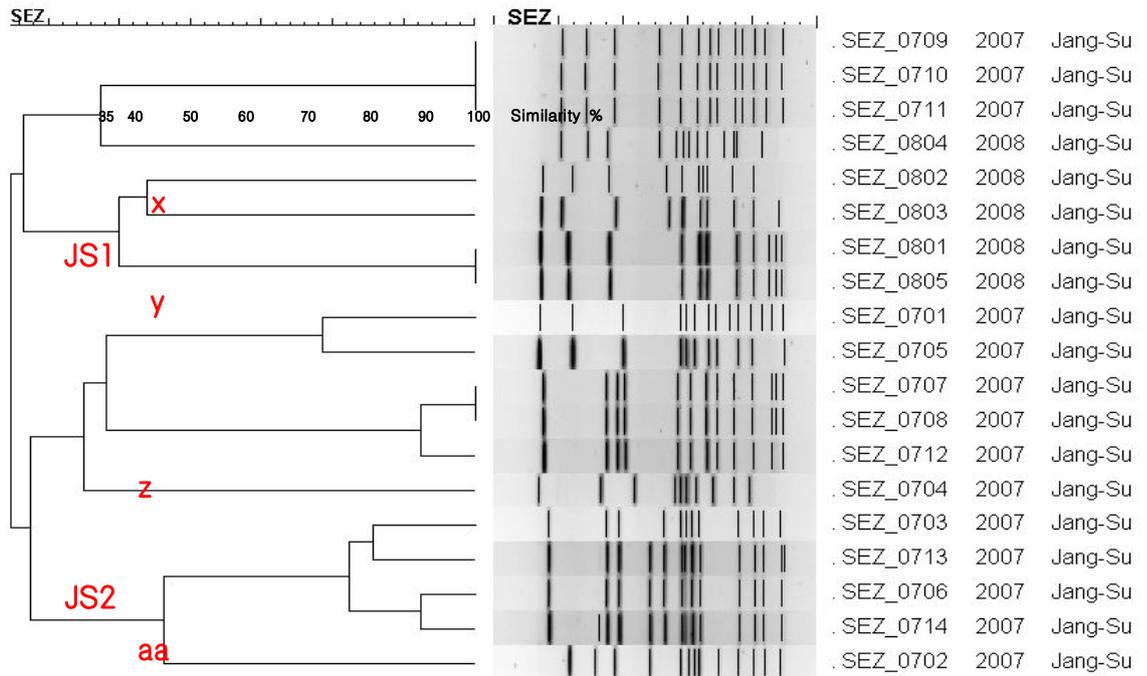


Fig 16. Dendrogram of 19 *S. zooepidemicus* isolated in Jangsu region. The dendrogram was constructed with InfoQuest software Ver. 4.5 (Bio-Rad) with 1% optimization and 5% position tolerance by using the UPGMA algorithm with Dice similarity coefficient.

(2) *Escherichia coli*에 대한 특성 및 예방법 개발

생식기 질병이 의심되는 씨암말 105두의 vaginal swab로부터 96주(91.4%)의 *Escherichia coli*를 동정한 후 O group serotype 및 verotoxin을 응집반응 및 PCR을 통해 분석하였다(Zoetendal 등, 2006). 분리된 96주의 *E. coli*중 53주(55.2%)는 총 21가지 O 혈청형으로 동정되었고, 43주(44.8%)는 51가지 유형의 O 항혈청 검사에서 동정되지 않았다. PCR 기법을 이용하여 verotoxin 1 (VT 1)과 verotoxin 2 (VT 2)를 분석한 결과 96주중 1주가 VT 1 (130bp)으로 동정되었다. 분리된 96주의 *E. coli*에 대한 약제 감수성 양상 (Bauer 등, 1996)을 조사한 결과 Ciprofloxacin (100%), Enrofloxacin (100%), Norfloxacin (100%), Cefoxitin (96.9%), Gentamicin (96.9%), Sulphamethoxazole (96.9%), Nitrofurantoin (94.8%), Amikacin (93.8%), Nalidixic acid (92.7%), Tetracycline (90.6%) 등의 약제에 높은 감수성을 나타내었다(Table 7~9, Figure 17).

Table 7. O serotypes of 96 *E. coli* isolates

O serotypes	No. (%) of isolates
O1	14 (14.6)
O44	5 (5.2)
O55	4 (4.2)
O26	3 (3.1)
O28ac	3 (3.1)
O8	2 (2.1)
O6	2 (2.1)
O114	2 (2.1)
O18	2 (2.1)
O166	2 (2.1)
O153	2 (2.1)
O20	2 (2.1)
O25	2 (2.1)
O111	1 (1.1)
O128	1 (1.1)
O125	1 (1.1)
O146	1 (1.1)
O142	1 (1.1)
O158	1 (1.1)
O159	1 (1.1)
O148	1 (1.1)
NT	43 (44.8)
Total	96 (100)

Table 8. Detection of verotoxin from 96 *E. coli* isolates

Toxins	No. (%) of isolates	Results of PCR products (bp)
Verotoxin 1	1 (1.1)	130
Verotoxin 2	0 (0)	346

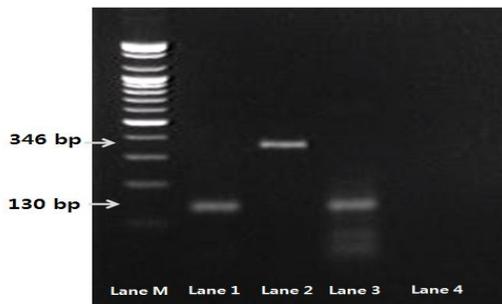


Fig 17. Gel electrophoresis of verotoxin 1 by PCR. Predicted 130 bp amplicons observed from *E. coli* suspected isolate. Lane M: molecular size marker (Bioneer, Korea); Lane 1 : verotoxin 1 of *E. coli*; Lane 2: verotoxin 2 of *E. coli*; Lane 3: verotoxin 1 of *E. coli* isolated from horse genital tract; Lane 4: negative control strain.

Table 9. Antimicrobial susceptibility of 96 *E. coli* isolates isolated from Thoroughbred horse genital tract

Antimicrobial drugs	No. (%) of susceptible isolates	No. (%) of resistant isolates
Amikacin	90 (93.8)	6 (6.2)
Ampicillin	77 (80.2)	19 (19.8)
Amoxycillin	81 (84.4)	15 (15.6)
Apramycin	17 (17.7)	79 (82.3)
Cephalothin	3 (3.1)	93 (96.9)
Cefoxitin	93 (96.9)	3 (3.1)
Ceftiofur	95 (98.9)	1 (1.1)
Ciprofloxacin	96 (100)	0 (0)
Clindamycin	85 (88.5)	11 (11.5)
Colistin sulphate	76 (79.2)	20 (20.8)
Enrofloxacin	96 (100)	0 (0)
Erythromycin	13 (13.5)	83 (86.5)
Gentamicin	93 (96.9)	3 (3.1)
Kanamycin	75 (78.1)	21 (21.9)
Mecillinam	36 (37.5)	60 (62.5)
Nitrofurantoin	90 (94.8)	6 (5.2)
Norfloxacin	96 (100)	0 (0)
Nalidixic acid	89 (92.7)	7 (7.3)
Neomycin	70 (72.9)	26 (27.1)
Ofloxacin	82 (85.4)	14 (14.6)
Spectinomycin	8 (8.3)	88 (91.7)
Streptomycin	10 (10.4)	86 (89.6)
Sulfonamides	29 (30.2)	67 (29.2)
Sulphamethoxazole	93 (96.9)	3 (3.1)
Tetracycline	87 (90.6)	9 (9.4)

(3) *Taylorella equigenitalis*를 동정을 위한 PCR 진단법 개발

생식기 질병이 의심되는 씨암말 65두에서 Equi-Vet uterine culture swab를 이용하여 채취한 시료로부터 분리(Kamada 등, 1987)한 결과 일반적인 세균배양을 통해서는 한주도 분리되지 않았다. 그러나 PCR를 통해 1주(1.5%)의 *Taylorella equigenitalis*를 동정하였다. 사용한 Primer 염기서열은 Forward (CCATTAGAGGCTGTTAATCAATCGGGAAACC), Reverse (GTGTCATTAAGGTGTGTATTTGGTCTGGTG)로서 PCR은 1회 denaturation step at 95°C for 3 min, 35회(denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min, and extension at 72°C for 30sec), 1회 reaction at 72°C for 10 min의 과정을 수행하였다. 국내 말에서 *Taylorella equigenitalis*의 분리 동정은 전염성 질환으로서 매우 중요하므로 향후 더 많은 시료를 대상으로 연구를 계속할 것이다(Table 10과 Figure 18).

Table 10. Comparison of culture and PCR for detection of *Taylorella equigenitalis* from uterine swabs

Detection Methods	No. of samples	No. of <i>Taylorella equigenitalis</i> isolated (%)
Culture	65	0 (0.0)
PCR	65	1 (1.5)
Total	65	1 (1.5)

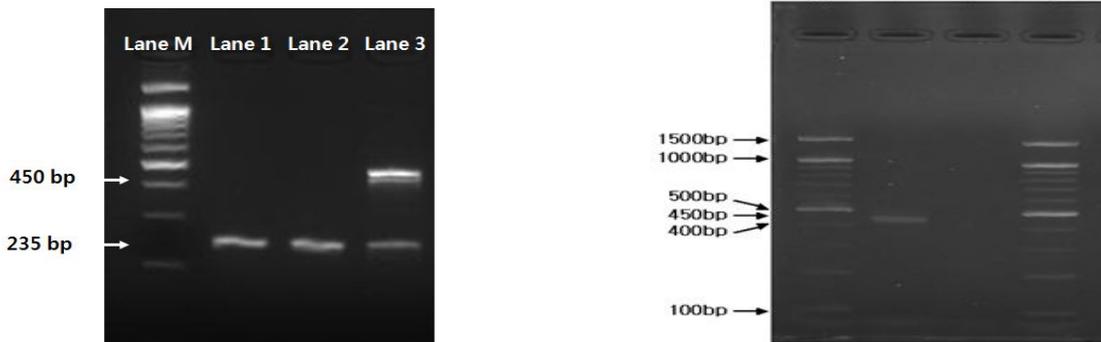


Fig 18. Multiplex PCR amplification of *Taylorella equigenitalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (A). Lane M: molecular size marker (Bioneer, Korea); Lane 1-2 : *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (235 bp); Lane 3: *Taylorella equigenitalis* (450 bp) and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Single PCR amplification of *Taylorella equigenitalis*(B). Lane 1: *Taylorella equigenitalis*; Lane 2: negative control.

(4) 세포학적 방법을 통해 자궁내의 염증상태를 신속히 확인하고 음문의 Caslick수술을 통해 번식장애 예방 및 임신율과의 관계 조사

씨암말 65두의 자궁내막의 세포학적 검사(Asbury 등, 1986)를 실시한 결과, 호중구수가 0-2개로 정상인 말은 49두(75.3%)이고, 호중구의 수가 2-5개인 중등도 염증을 나타내는 말과 5개 이상인 심한 염증을 보이는 말은 각각 7두(10.8%)와 9두(13.9%)두로 나타났다. 또한 음문 형태를 검사(Hembery 등, 2005)한 결과, Caslick을 시행하지 않은 말(그룹 A)과 Caslick을 시행했으나 분만 후 다시 Caslick을 한 경우(그룹 B), 그리고 Caslick을 시행했으나 분만 후 Caslick을 바로 하지 않고 교배 후 Caslick을 한 경우(그룹 C)는 각각 11두(16.9%), 36두(55.3%), 18두(27.7%)였다. 이 중 자궁내막의 세포학적 검사를 실시한 결과 Caslick을 시행하지 않은 말(그룹 A)은 정상, 중등도 염증, 심한 염증이 각각 8두(12.3%), 1두(1.6%), 2두(3.1%)였고 Caslick을 한번이라도 시행한 말(그룹 B와 C)은 정상, 중등도 염증, 심한 염증이 각각 41두(63.1%), 6두(9.2%), 7두(10.8%)로 분포하였다. 65두의 암말의 자궁 내 세균 분포 및 세포학적 검사와 임신율과의 관계를 조사한 결과, 전체 65두 중 46두(70.8%)에서 세균이 분리되었다. 세포학적 검사에서 전체 세포에서 호중구의 수가 5개 이상을 보이는 염증이 심한 말과 전체 세포에서 호중구의 수가 2-5개인 중등도 염증을 보이는 말은 각각 9두(13.8%)와 7두(10.8%)로 그들 각각의 임신율은 2두(22.2%)와 3두(42.9%)로 매우 낮았으나, 세포학적 검사에서 전체 세포에서 호중구의 수가 0-2개인 정상인 말은 49두(75.4%)로 임신율은 42두(85.7%)로 나타났다. 씨암말 65두의 지난해 교배성적 과 세포학적 검사를 조사한 결과, 지난해 수태하지 못한 말은 정상 3두(21.4%), 중등도 염증 4두(28.6%), 심한 염증 7두(50%)로 나타난 반면, 망아지를 생산한 말은 정상 42두(89.3%), 중등도 염증 3두(6.4%), 심한 염증 2두(4.3%) 로서 수태하지 않은 말의 경우 주로 심한 염증을 보였으나 망아지를 생산한 말은 대체로 경미한 염증을 보였다. 그리고 처녀마의 경우 4두(100%) 모두에서 경미한 염증을 나타내었다(Table 11~12, Figure 19).

Table 11. Relationship with vulvar status and cytology status in 65 Thoroughbred mares

Vulvar status groups	Cytology status (%)			No. of mares (%)
	Normal	Moderate inflammation	Severe inflammation	
A	8 (12.3)	1 (1.6)	2 (3.1)	11 (16.9)
B	30 (46.2)	3 (4.6)	3 (4.6)	36 (55.3)
C	11 (16.9)	3 (4.6)	4 (6.2)	18 (27.7)
Total	49 (75.4)	7 (10.8)	9 (13.9)	65 (100)

* : A, not previous Caslick-operated and at present no indication; B, previously Caslick-operated and resutured after the last parturition; C, previously Caslick-operated and not resutured after the last parturition, but resutured after mating at the stud farm.

Table 12. Relationship between cytological findings and mare status

Cytology status*	No. of barren mares (%)	No. of foaling mares (%)	No. of maiden mares (%)
Normal	3 (21.4)	42 (89.3)	4 (100)
Moderate inflammation	4 (28.6)	3 (6.4)	0 (0.0)
Severe inflammation	7 (50.0)	2 (4.3)	0 (0.0)
Total	14 (100)	47 (100)	4 (100)

* : Normal < 2 neutrophils; Moderate inflammation, 2-5 neutrophils; Severe inflammation, > 5 neutrophils.

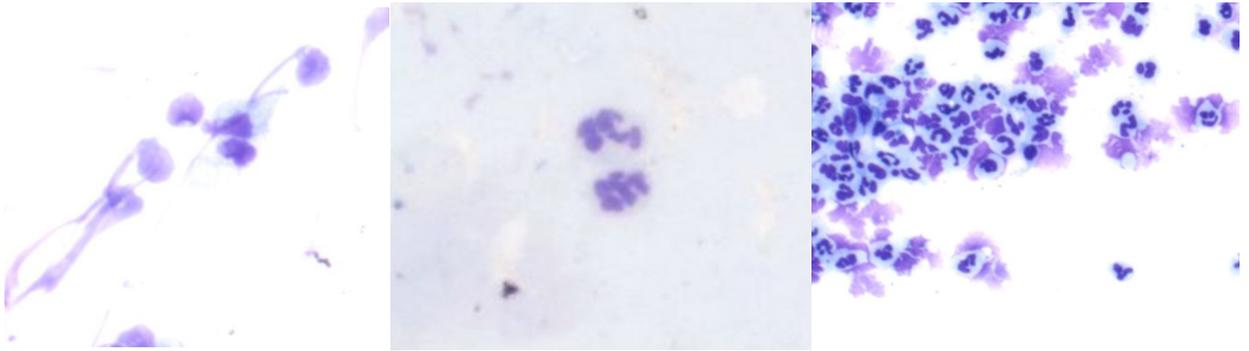


Fig 19. Microscopic photographs of a cytology obtained from the endometrium. < 2 neutrophils, mild inflammation (left), 2-5 neutrophils, moderate inflammation (middle), and > 5 neutrophils, severe inflammation (right). Diff-Quick stain method. A, B and C, ×400.

(5) 씨(암)수말의 생식기질환 원인체인 EHV의 동정을 위한 진단법 및 예방법 개발

(가) EHV-1, EHV-4와 EHV-3표준주에 대한 PCR 진단법 개발

말에서 유산이나 전염성 질환 등 번식장애를 유발하는 바이러스중의 하나인 Equine Herpes Virus를 신속하게 진단할 수 있는 PCR법을 개발한 후 실제로 임상에 적용하였다. PCR을 위한 Primer의 염기서열은 EHV-1(F-TCTACCCCTACGACTACTTC, R - A C G C T G T C G A T G T C G T A A A A C C T G A G A G) , EHV-4(F-TCTATTGAGTTTGCTATGCT, R-TCCTGGTTGTTATTGGGTAT)이며, PCR은 94℃ 4분 반응 후 94℃ 30초, 60℃ 30초, 그리고 72℃ 92초의 반응을 40회 반복 수행한 후 72℃에서 10분간 반응하였다. 그리고 EHV-3에 대한 Primer 염기서열은 F-GCGCTCTCTCGGVVTTGCCAG, R-GCGTCTCGAAAAGCGAGAG로서 PCR은 95℃ 10분 반응 후 95℃ 60초, 60℃ 60초, 그리고 72℃ 60초의 반응을 40회 반복 수행한 후 72℃에서 10분간 반응하였다. 씨암말 65두의 질 내용물과 3두의 정액으로부터 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 통해 EHV를 분석한 결과 한주도 분리되지 않았다. 그러나 말의 정액에서 EHV-4는 거의 분리보고가 없으나 EHV-1은 약 13%정도로 분리보고된 바 있어 말의 전염성 질환에 매우 중요하므로 향후 더 많은 시료를 대상으로 연구할 계획이다. 또한 EHV-3는 국내에서 사육중인 말에서 분리 보고된 적이 있어 국내에서 사용할 씨암말의 경우 인공수정 전에 필히 EHV-3에 대한 사전검사가 이루어져야 할 것이다.

다. 인공수정에 의한 망아지의 생산성 향상 기술 개발

(1) 말에서 분리한 β -hemolytic *E. coli*의 작용기전 및 유전학적 특성

934두의 말로부터 채취한 시료는 MacConkey agar에서 pink색 colony 선택하여 blood agar 상에서 용혈성 확인하였으며, Vitek 2 system, GN card를 이용하여 최종 동정하였다. 그리고 Rapigen Cat. No. RDN_1101, Pathogenic *E. coli* detection kit를 사용하여 병원성을 조사하였다.

최종적으로 22주의 β -hemolytic *E. coli* (2.36%)가 분리되었는데 이는 돼지, 닭, 소에 비해서 매우 낮은 분리율이 관찰되었다. 그리고 병원성 유무를 확인한 결과 EHEC + ETEC가 12주(54.55%), ETEC가 6주(27.27%), EHEC가 1주(4.55%), 병원성이 없는 것이 3주(13.64%)로 확인되었다. 또한 대부분 말에서 분리되는 세균의 경우 약제에 대한 감수성이 높은 편이지만 본 연구에서 분리한 용혈성 대장균의 약제 내성은 비교적 높은 것으로 관찰되었다.

말에서 분리된 대장균에 대한 역학적 분석 연구는 처음으로써 모마의 자궁내막염 및 설사 분변으로부터 분리한 균주가 신생자마의 감염을 유발할 가능성이 있는 부분은 본 연구의 가장 의미 있는 결과로 판단된다. F농장과 G농장의 경우 모체에서 분리된 *E. coli*와 동일한 유전형의 *E. coli*가 신생자마 설사에서 분리되어 씨암말과 망아지의 상관관계가 있는 것으로 사료된다(Figure 20).

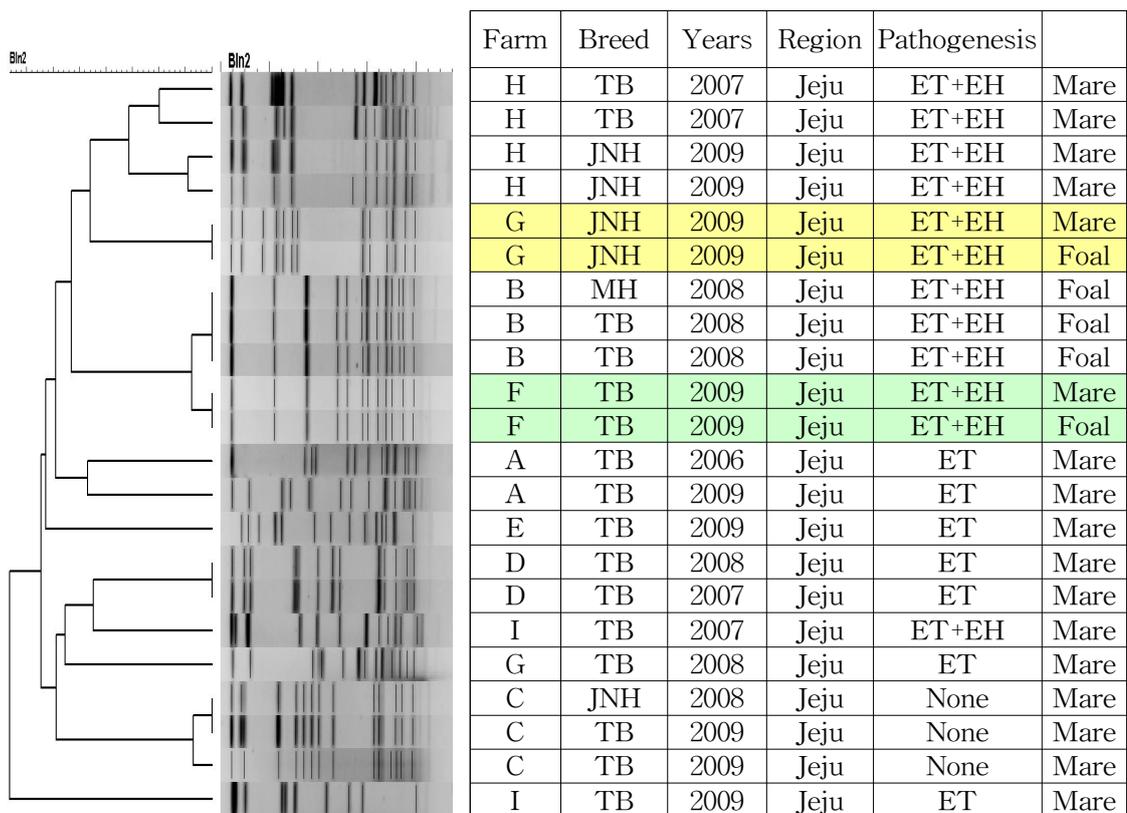


Fig 20. Dendrogram of 22 β -hemolytic *E. coli* isolated in Jeju region.

(2) 망아지로부터 *Clostridium perfringens* 감염증 진단 및 예방법 연구

망아지 생산 후 중요한 질병 중 하나가 설사이다. 망아지 설사의 원인으로서는 망아지 발정 설사(fola heat diarrhea) : 대부분의 망아지는 생후 6~14일령 사이(통상 9일령)에 설사 유발, 영양적인 원인에 의한 설사 : 모유 과다 섭취 시 설사 유발, 기생충성 감염에 의한 설사 : 모유에 들어있는 *Strongyloides westeri*의 감염기 유충을 섭취하였을 때 설사 유발, 원충(Cryptosporidiosis)성 감염에 의한 설사, 세균성 장염 : 망아지 장염의 원인은 주로 *Salmonella*, *Clostridium*, *E. coli*에 의해 설사 유발 등이 있다.

*Clostridium perfringens*는 그람양성, 혐기성, 아포형성 균으로써 망아지에서 심한 설사와 높은 폐사율을 특징으로 하는 전염성 질환으로서 망아지의 생산성 향상을 위해 매우 중요한 연구 분야이다. 본 균은 일반적인 자연환경과 거름에 존재하며, 정상 세균총으로 알려져 있지만 스트레스, 입원, 수술, 항생제의 투여, 갑작스런 식이요법 변화, 기생충이 많이 감염된 말에 대한 구충 등으로 인해 장내 세균총이 붕괴되면 장내에서 독소를 생산하는 본 균의 과증식을 유발하여 설사를 나타낸다(Figure 20). *C. difficile*와 장독소 발생성 *C. perfringens*을 제외하고는 본 균으로 인한 장염의 확진은 어렵다. 왜냐하면 정상적인 동물의 장내에 *Clostridium*이 종종 존재하기 때문이다. 본 연구는 국내 말 생산목장에서 사육중인 망아지로부터 심한 설사와 높은 폐사율(거의 70%)을 나타내어 병원체를 조사한 결과 *Clostridium perfringens* type A로 동정한 후 치명적인 *Clostridium perfringens* toxin α , β , β_2 , ϵ , enterotoxin의 유전자에 대한 PCR 진단기법(Herholz 등, 1999)을 정립하였으나(Table 13) ELISA 검사로 본 균의 독소를 분변으로부터 찾는 것이 유용한 것으로 알려지고 있어 본 균에 의한 설사 발생 시 ELISA 진단기법을 정립할 계획이다.

동정된 원인균에 대해 항생제감수성 검사 결과 Doxycycline, Spectinomycin, Lincomycin 등에 감수성이 있는 것으로 나타났고, Amoxicillin, Ampicillin, Apramycin, Cefotaxime, Collistine, Enrofloxacin, Erythromycin, Fluorfenicol, Gentamicin, Kanamycin, Oxytetracycline, Penicillin, Sulfathiazole, Tiamulin, Tylosin 등의 항생제에 대해서는 내성양상을 나타내었다. 본 병이 발생된 원인은 아마도 씨암말의 산통을 치료하는 과정에서 다량의 tetracycline을 장기간 사용한 결과 장염이 발생한 것으로 추정하였다. 그 후 생산목장이 오염된 후 망아지에 감염된 것으로 추정하고 있다. 이와 같은 추정을 확인하고자 마방 및 농장 내에서 시료를 채취하여 본 균의 분리를 시도하였으나 분리에는 실패하였다. 아마도 과량의 항생제 투여에 기인된 것으로 생각된다. 또한 *Clostridium* 설사 증상을 보이는 말은 분변 내에서 세균 배출과 독소 수준이 증가되어 있어 깔집과 거름 등은 확실하게 폐기하여야 한다.

본 병이 발생되면 신속히 격리한 후 항생제(과량의 penicillin) 및 Banamine(항외독소 효과 있음) 투여, 수액처치 등의 치료가 요구된다. 본 연구를 통해 얻은 결과는 향후 국내에서 망아지 생산 후 사양관리에 대한 하나의 지침으로서 매우 유용할 것으로 사료된다.

Table 13. Specific oligonucleotide primers for PCR amplification of the genes for *C. perfringens* toxins

Toxin/gene	Oligonucleotide sequence	Products size (bp)	Annealing temp (°C)
α/cpa	5'-AAGATTTGTAAGGCGCTT-3'	1,170	46
	5'-ATTCCTGAAATCCACTA-3'		
β/cpa	5'-AGGAGGTTTTTTTATGAAG-3'	1,030	39
	5'-TCTAAATAGCTGTTACTTTGTG-3'		
β2/cpb2	5'-GAAAGGTAATGGAGAATTATCTTAATGC-3'	570	48
	5'-GCAGAATCAGGATTTTGACCATATAACC-3'		
ε/etx	5'-AAGTTTAGCAATCGCATC-3'	960	46
	5'-TATTCCTGGTGCCTTAAT-3'		
Enterotoxin/cpe	5'-TAACAATTTAAATCCAATGG-3'	930	46
	5'-ATTGAATAAGGGTAATTTCC-3'		



Fig 21. Postmortem finding in small intestine after *C. perfringens*.

(3) 신생자마 용혈성 질환 진단법 및 예방법 연구

Neonatal Isoerythrolysis(NI)는 말, 돼지, 소, 개 등에서 용혈성 질환(Hemolytic disease of the new born)으로 불리는 일종의 면역성 질환으로 이들 중에서 태반으로 항체가 이행되지 못하므로 초유의 항체를 섭취하여 발생되는 질병이다. 말에서는 씨암말로부터 생산된 특이한 동종항체가 초유를 통해서 정상적으로 태어난 망아지의 적혈구 항원과 반응하므로서 포유개시 후 수 시간내 수 일내에 빈혈이나 황달을 일으킨다. 이 질병에 이환된 망아지는 주로 심박 수 및 호흡 수가 증가하고 턱을 지면에 기대거나 적혈구 파괴로 인해 헤모글로빈이 요에 유입되어 암적색을 나타낸다(Figure 21). 또 빈호흡, 빈맥, 창백, 황달, 경련, 혼수 등의 임상증상을 나타내거나 심한 경우 폐사되는 질병으로 말 번식 산업에 경제적인 손실을 초래할 수 있다. 이 질병의 발생기전은 씨수말과 씨암말의 적혈구 항원형이 일치하지 않은데에 기인된다. 적혈구 항원을 씨수말을 가지고 있으나 씨암말에는 가지고 있지 않은 경우에 태어나는 망아지가 씨수말로부터 유전 받은 적혈구 항원을 가지고 있을 때 씨암말이 임신이나 분만 시 태반 내 출혈이나 수혈로 인해 망아지의 적혈구 항원에 노출되어 생산된 항체를 씨암말이 가지고 있다가 다음 임신 후 태어나는 망아지가 초유를 섭취하므로 발생되는데 주로 적혈구 항원형 Aa와 Qa가 가장 밀접한 관계가 있는 혈액인자로 알려져 있고 드물게는 Ca, Dc, Ua 혈액인자도 관여하는 것으로 알려져 있다. 대개 Thoroughbred, Standardbred, Arabian, Morgan Quarter horse, Paso Fino, Appaloosa 등의 품종에서 이 질병의 발생보고가 있다.

이 질병을 예방하기 위해서는 씨수말과 씨암말의 선택시 혈액형검사를 통해 항체가 생산될 가능성이 있는지를 판단하여 적합한 씨수말을 선택하거나 분만 후 씨암말의 초유를 망아지에게 먹이지 않음으로서 이 질병의 발생을 예방할 수 있는데 그 방법은 임신말기 씨암말의 혈청(초유)과 망아지의 혈구를 이용하여 항체 유무를 확인하는 Direct Coomb's test 혹은 jaundiced foal agglutination(JFA) test 로서 이들 검사는 이전에 이 질병에 걸린 망아지를 생산한 경험이 있거나 동일한 씨수말과의 교배 혹은 적혈구 항원형을 모르는 말에서 이용할 수 있으며 씨수말의 혈구와 씨암말의 혈청으로도 항체의 생산 유무를 검사할 수 있다. 또 항원과의 결합능력이 불완전한 비정형항체의 존재를 검사하는 Indirect Coomb's test 방법도 알려져 있다.

주요 임상증상은 둔감, 억압, 호흡수·심계항진, 점막 창백 및 밝은 노란색으로 변색, 근경련, 우견부 장운동 상실, 미약한 장음 유지, 심박 수 130회/분, 호흡 수 65회/분, 체온 38.7℃, CRT 측정 불가, 마방벽에 머리를 기대고 서있으며 비틀거림 등 이상행동을 관찰하였다.

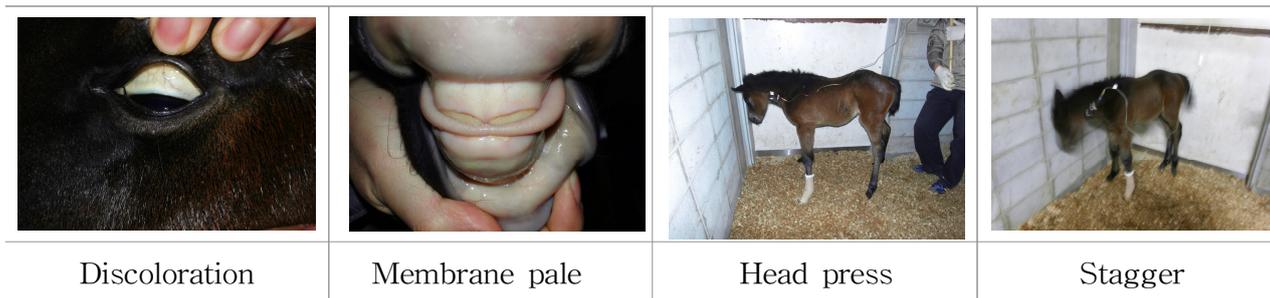


Fig 21. Clinical symptoms of neonatal isoerythrolysis in foals.

진단은 4일령된 2두의 망아지가 침울, 호흡수 및 심박수 증가, 빈혈 등의 증상을 발현하여 혈액학 및 혈액화학치를 검사한 후 Jaundice foal agglutination 검사 및 호주에서 수입한 표준항혈청 23종에 대해 혈액형(blood groups) 검사(Cho 등, 2002; Stormont 등, 1964)를 실시하였다.

혈액학 및 혈액화학치, Jaundice foal agglutination, 혈액형(Blood groups) 검사 결과는 다음과 같다(Table 14~15, Figure 22~23).

Table 14. Hematology and serum chemistry of a foal with NI

Item	Affected foal	Reference values (ISIS)
White blood cells ($\times 10^3/\mu\ell$)	41.41	5.40~14.30
Red blood cells ($\times 10^6/\mu\ell$)	1.49	6.80~12.90
Packed cell volume (%)	6.5	32.0~53.0
Hemoglobin (g/dL)	5.1	11.0~19.0
Mean corpuscular volume (fl)	43.3	37.0~58.0
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	34.19	12.30~19.90
Neutrophils ($\times 10^3/\mu\ell$)	35.02	2.26~8.50
Monocytes ($\times 10^3/\mu\ell$)	1.49	0.10~1.00
Sodium (mEq/L)	132	126~146
Potassium (mg/dL)	5.4	2.5~5.2
Creatinine kinase (U/L)	720	120~470
Glucose (mg/dL)	122	65~110
Aspartate aminotransferase (U/L)	984	175~340
Total bilirubin (mg/dL)	9.5	0.5~2.3
Gamma glutamyltransferase (U/L)	42	5~24
Total protein (g/dL)	4.7	5.7~8.0

Jaundice foal agglutination 검사 결과 모마의 혈장 희석정도에 따라 자마혈액의 용혈정도가 다르게 반응, 1: 2~1: 8 희석배율까지는 자마의 혈액이 흘러내리나(좌) 1: 16이상 희석한 모마 혈장의 자마 혈액 clot은 선명하게 유지(우)하고 있다.



Fig 22. Results of neonatal isoerythrolysis by using Jaundice foal agglutination.

Table 15. Blood type and predictable antibodies in this study

	Red cell types	Predictable antibody in mare
Sire 1-1	Aaf, Ca, Dcgm/dk, Qb	-
Sire 1-2	Aaf, Ca, Dcegmn/dk, Qb/c	-
Dam	Aaf, Ca, Dcegmn/dk, Qc	Qb
Foal 1	Aaf, Ca, Dcegmn/dk, Qb/c	-
Sire 2-1	Aaf, Ca, Dcegmn/dk, Qb/c	-
Sire 2-2	Aaf, Ca, Dcgm/dk, Qb	-
Dam	Aaf, Ca, Ddk, Qb	Dc, Dg, Dm
Foal 2	Aaf, Ca, Dcgm/dk, Qb	-



Fig 23. Postmortem findings in neonatal isoerythrolysis.

본 연구는 국내에서 처음 보고된 케이스이다. 본 병은 교배에 따른 부모마의 혈액형 차이로 본 병이 유발되기 때문에 향후 국내 말 생산 농가에 적극적으로 검사를 권장하여 망아지가 태어난 후 폐사되는 것을 최소화하는데 크게 기여할 것으로 생각된다.

(4) *Streptococcus equi* subsp. *equi*의 유전학적 특성 및 약제감수성 양성

Streptococcus equi subsp. *equi*(*S. equi*)는 말에서 주로 상부 호흡기 질병을 일으키는 원인균이며, 드물게는 복강과 흉강 내 림프절에 감염을 일으키는 전이성 선역(metastatic strangles)으로 알려진 증후군을 일으키는 세균이다(Timoney, 1993, 2007; Timoney 등, 1997).

임상증상은 고열, 임파절 종대, 농양, 점액농성 비루, 인두염, 연하곤란, 상부기도 잡음 등을 발현한다. 본 병의 치료 및 예방은 만약 선역의 임상증상이 나타나면 말은 격리수용한 후 항생제와 생리식염수를 투여한다. *S. equi*의 유전학적 기법을 이용한 역학적 특성 분석과 약제감수성 양상에 대한 조사는 말 선역의 효과적인 예방 및 치료를 위해 필수적이다.

본 연구에서는 말 선역의 원인체인 8주의 *S. equi*에 대해 약제감수성 양상을 조사한 결과, Sparfloxacin과 Tetracycline을 제외한 모든 약제(benzylpenicillin, amoxicillin, cefotaxime, ceftriaxone, imipenem, levofloxacin, moxifloxacin, erythromycin, pristinamycin, quinupristin/dalfopristin, telithromycin, linezolid, vacomycin, chloramphenicol, rifampicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ofloxacin)에 높은 감수성을 나타내었으며, PFGE와 MLST 기법을 이용한 분자역학적 특성을 조사(Tenover 등, 1995)한 결과 분리 주 모두 동일한 패턴이 관찰되어 유전학적으로 동일한 원인체에 의해 질병이 발생되고 있는 것으로 관찰되었다(Figure 24~26). 본 연구에 얻은 결과는 향후 말 생산 현장에서 적용함으로써 망아지의 생산 효율 향상에 크게 기여할 것으로 기대된다.

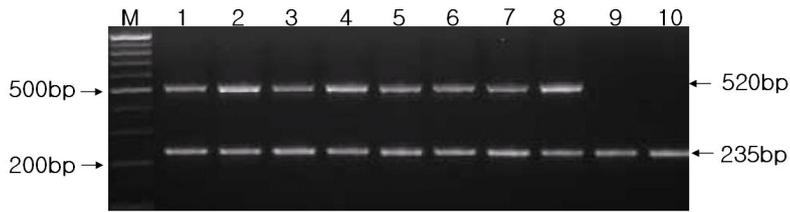


Fig 24. PCR amplification of *sodA-seeI* for identification of *S. equi*. Lane M, molecular size marker (100bp DNA ladder, Takara, Japan); Lane 1 to 8, *S. equi* isolates; Lane 9: *S. zooepidemicus* isolates, Lane 10: ATCC700400 *S. zooepidemicus*.

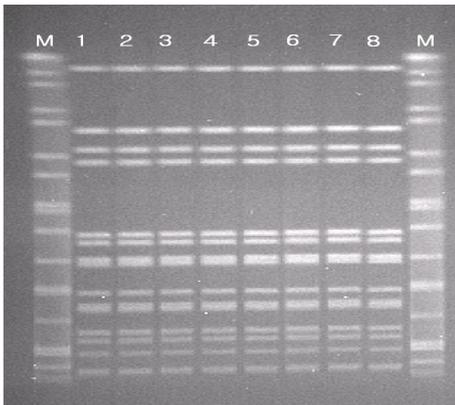


Fig 25. PFGE pattern of *SmaI* digested genomic DNA of *S. equi*. Lane M: Molecular DNA size marker (XbaI macrorestriction of *Salmonella* Braenderup), Lane 1-8: *S. equi* isolated from Thoroughbred horse in Jeju.

Subgroup	Region	Farm	Years	PFGE	MLST							
					arcC	nrdE	proS	spi	tdk	tpi	yqiL	ST
SE1	Jeju	A	2009	P1	1	3	46	46	17	46	54	238
	Jeju	A	2009	P1	1	3	46	46	17	46	54	238
	Jeju	B	2009	P1	1	3	46	46	17	46	54	238
	Jeju	C	2009	P1	1	3	46	46	17	46	54	238
	Jeju	D	2008	P1	1	3	46	46	17	46	54	238
SE2	Jeju	E	2009	P1	1	3	46	46	17	46	55	239
	Jeju	F	2009	P1	1	3	46	46	17	46	55	239
	Jeju	F	2009	P1	1	3	46	46	17	46	55	239

Fig 26. Dendrogram of the MLST profiles *S. equi* clinical strangles isolates collected at 6 Jeju horse raiding farm, novel sequence types(ST) and clonal complex, region, farm, years are also represented in the dendrogram. The dendrogram was produced by using Dice coefficients and an unweighted pair group method using arithmetic averages(UPGMA). The interrupted line represents the previously known alleles (arcC:1; nrdE:3; tdk:17).

다. 말 바이러스성 동맥염(Equine Viral Arteritis)의 동정을 위한 진단법 및 예방법 개발

세동맥 근육 벽의 급성의 특이한 감염으로 인해 이 바이러스는 말 동맥염 바이러스라 불리고, 이런 이유로 이 질병은 EVA라 부린다. 말 바이러스성 동맥염은 말 동맥염 바이러스(Arterivirus)에 의해 말속(말, 당나귀)에만 감염되고 실험동물을 포함한 다른 동물에는 감염되지 않는다. 우리나라는 청정국이며 1995년과 1996년에 수입된 말 중 2두가 적발되어 반송 또는 소각조치 된 바 있다.

감염된 씨수말의 정액 중에 배출된 바이러스가 교배 또는 인공수정에 의해 씨암말에 감염되고, 발병한 씨암말의 비즙 중에 배출된 바이러스가 기도감염에 의해 주위의 말에게 전파한다. 감염말의 뇨와 유산태반이나 태아도 감염원이 된다. 본 병의 주요 증상은 발열을 수반한 감기양 증상, 결막염, 부종, 발진, 고환종대, 어린 망아지의 폐사, 임신말에는 높은 유산을 일으키는 등 다양한 증상을 나타낸다. 본 병의 일반적인 증상이 동일 말에서 동시에 발현하는 경우는 더물고 또한 불현성 감염도 많다.

본 병의 발생은 EVA 양성마 중 암말, 어린말, 거세마는 보균마라고 볼 수 없고 그냥 예

방접종을 받은 말, 즉 항체만 있고 바이러스는 없는 말이라고 볼 수 있다. 그러나 양성마가 성숙한 씨수말이라면 보균마일 수도 있다는 것을 염두에 두어야 한다. 또한 EVA는 혈청학적 검사를 통해 양성마와 감염마의 구분이 곤란하다. 타 바이러스 감염 시 항체역가가 매우 높게 나오고 백신에 의한 항체역가는 안정적으로 나오지만 EVA는 둘 다 비슷해서 구분이 안된다. 이런 경우 추가적인 검사 기법 중 가장 유용한 기법이 PCR기법이다.

진단은 말에서 EVA 감염은 다양한 감염성, 비감염성 질환과 비슷하기 때문에 EVA를 가진단할 때에 오로지 임상증상만 보고 판단할 수는 없다. 따라서 EVA는 말허피스바이러스1형, 4형, 말인플루엔자 바이러스, 말비염바이러스, 말아데노바이러스, Getah바이러스 등과 같은 바이러스성 호흡기감염증과의 감별진단이 필요하다. 또한 말전염성빈혈, 아프리카 말전염병, 출혈성자반병, hoary alyssum(식물명)로 인한 두드러기와 중독증과도 감별이 필요하다. 유산의 감별진단에는 많은 비감염성 원인과 감염성 원인을 포함시켜야 하는데, 특히 그중에서도 말 허피스바이러스 1형(드물게 4형)과의 감별이 중요하다. EHV-1형으로 인한 유산의 경우에는 태아가 전형적으로 어떠한 전구증상 없이 배출되지만 육안적, 현미경적 병변을 가지고 있는 반면, EAV 감염으로 유산된 태아는 부분적으로 이미 자가소화되거나, 특징적인 병변을 보이지 않는다. 현재 이용되고 있는 EVA의 실험실 진단에는 바이러스 분리, 바이러스 핵산 또는 항원 검출, 혈청학적 검사 등이 있다.

살아있는 말에서 바이러스 분리재료로 가장 적당한 것은 비인두 swab 또는 세척액, 결막 swab, citrate와 EDTA로 항응고처리한 혈액으로부터의 buffy coat층 세포이다. Heparin으로 처리한 항응고 혈액은 바이러스의 세포배양에 있어 heparin이 억제효과를 나타내기 때문에 바이러스 분리에는 적절하지 못하다. 정액으로부터 바이러스를 분리 할 때에는 사정액 중에 정자가 풍부한 구획을 포함하는 정액이 가장 최적의 재료이다. 태반, 태아의 체액, 폐, 비장, 림프조직은 EAV감염으로 인한 유산을 확진하기 위해서 반드시 필요하다. 신생마에서 EVA로 인한 폐, 장질환이 의심되는 경우 소화기, 호흡기관과 관련된 다양한 내장기관과 림프절은 바이러스 분리를 위해 보관하여야 한다. 검사시료는 임상증상이 나타나거나 EVA 감염이 의심되는 직후에 최대한 빨리 채취하여야 하며 비인두나 결막 swab은 즉시 배지에 옮겨 심거나 냉장보관 또는 -20도이하에서 동결해 두어야 한다. 반드시 냉장보관해야 하는 혈액시료를 제외한 바이러스 분리를 위한 모든 검사시료는 포장하여 얼음과 함께 실험실로 보내어 검사를 의뢰한다.

면역조직학적 검사법은 EVA 감염을 진단하는데 빠르고, 믿을만하며 그 결과에 영향력이 있는 방법이며 보통 조직과 피부생검 시료를 사용한다. EAV에 존재하는 각각의 단백질에 대한 단일클론 항체를 이용한 ABC immunoperoxidase 염색법은 조직샘플(포르말린 고정, 파라핀 고정, 동결 조직샘플)에서 바이러스 항원을 감지하는데 매우 유용하게 사용

되고 있다.

역전사효소를 이용한 RT-PCR, nested RT-PCR, real-time RT-PCR 법은 세포배양의 상층액과 시료에 있는 바이러스의 핵산을 검출하는데 상당히 이용되고 있다. RT-PCR을 통한 분석시험은 현재의 바이러스 분리 과정에 비해 많은 이점을 가지고 있다.

급성 EAV 감염의 혈청학적인 진단을 위해서 감염 초기와 회복기의 혈청을 3-4주 간격을 두고 채취하여 검사한 후 4배이상의 항체역가 차이를 보이는 것으로 감염여부를 확인할 수 있다.

본 연구에서 RT-PCR 기법(Table 16~17)을 이용하여 진단한 결과 국내에서 채취한 정액 5두에 대해 모두가 음성이었다.

예방법은 전염 경로(① 호흡: 경마장, 공연장, 판매 시 급성으로 감염되는 첫 번째 경로, ② 생식: 보균 종마의 정액에서 나온 바이러스, 냉장 혹은 냉동 정액도 감염될 수 있음, ③ 다른 신체 분비물 : 배뇨, 대변 등, ④ 자궁 내: 급성으로 감염된 암말에서 태반을 통해 바이러스가 태아에게 전달, ⑤ 간접적인 오염: 말 사이에서 공유된 마구 또는 장비 등)를 철저히 차단하고 실험실에서 수정 또는 운송을 준비하기 전에 정액 취급 시 특별한 관리가 수반되어야 한다.

본 병에 감염된 정액을 발견하고 적절히 손을 씻서 번식 집단 내에 EAV 확산을 최대한 제한하는 것이다. 이는 6~12개월 사이에 수망아지를 백신 접종하여 종마와 사춘기 이후 수망아지의 보균 상태를 방지하고, 인공수정을 위해 냉동 운반되고 저온 저장된 정액을 기증한 모든 종마의 혈청학적, 바이러스학적 상태를 결정하여 조절할 수 있다.

또한 약독 생백신과 불활화 백신의 접종과 번식계절 전의 씨수말의 감염여부를 확인하여야 한다. 만약 씨수말에서 발병되면 교미를 중단하여야 한다.

Table 16. Specific oligonucleotide primers for PCR amplification of the EVA

	Oligonucleotide sequence	Products size (bp)
RT-PCR	5'-TGGTAGGTGCTTCATTGGCT-3'	437
	5'-GCGGCACAAGAACAACACTTCTG-3'	
Nested PCR	5'-CCTGAGACACTGAGTCGCGT-3'	186
	5'-CCTGATGCCACATGGAATGA-3'	

Table 17. The reaction condition of PCR amplification of the EVA

	PCR condition				
	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Elongation
Time/Temp	94°C, 15min	94°C, 45sec	55°C, 45sec	72°C, 1min	72°C, 10min
Cycle	1	35			1

라. 승용마 친자감정 기법 정립

(1) 유전자(Microsatellite DNA) 분석 기법 정립

말에서 개체식별 및 친자확인을 위한 ISAG microsatellite marker의 유용성 및 표준화를 분석(Kwon과 Cho, 2009)하였다. PCR은 95°C 10분 반응 후 95°C 30초, 60°C 30초, 그리고 72°C 60초의 반응을 30회 반복 수행한 후 72°C에서 60분간 반응하였다. 그리고 LEX33, TKY279, TKY287, TKY297, TKY321은 56°C에서 annealing을 수행하였다. 더러브렛종 6두를 포함한 다양한 품종의 20두를 대상으로 22개의 ISAG microsatellite marker를 분석한 결과 대립유전자의 수는 4개에서 8개로 분포하였고 더러브렛종 말에서 출현하는 대립유전자의 대부분이 비더러브렛종 말에서도 출현하였다(Table 18~19).

Table 18. The primer sequences of the microsatellite loci used in this study

Loci	Primer sequence (5'→3')
AHT4	(FAM)-AACCGCCTGAGCAAGGAAGT, GCTCCCAGAGAGTTTACCCCT
AHT5	(JOE)-ACGGACACATCCCTGCCTGC, GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC
ASB2	(JOE)-CCACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG, CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG
ASB17	(NED)-GAGGGCGGTACCTTTGTACC, ACCAGTCAGGATCTCCACCG
ASB23	(VIC)-GCAAGGATGAAGAGGGCAGC, CTGGTGGGTTAGATGAGAAGTC
CA425	(NED)-AGCTGCCTCGTTAATTCA, CTCATGTCCGCTTGTCTC
HMS1	(PET)-CATCACTCTTCATGTCTGCTTGG, TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC
HMS2	(TAM)-CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAAT, ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG
HMS3	(TAM)-CCAACCTCTTTGTACATAACAAGA, CCATCCTCACTTTTTTCACTTTGT
HMS6	(JOE)-GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG, CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCTCA
HMS7	(FAM)-CAGGAAACTCATGTTGATACCATC, TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT
HTG4	(FAM)-CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC, CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC
HTG6	(JOE)-GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG, CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCTCA
HTG7	(TAM)-CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG, ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT
HTG10	(TAM)-CAATTCCTGCCCCACCCCGGCA, TTTTATTCTGATCTGTCACATTT
LEX3	(PET)-ACACTCTAACCCAGTGCTGAGACT, GAAGGAAAAAAGGAGGAAGAC
LEX33	(HEX)-TTTAATCAAAGGATTCAGTTG, GGGACACTTTCTTTACTTTC
TKY279	(FAM)-GCCACTCCGGTAACAAAATC, AATGAATGAGACTTGAACCC
TKY287	(FAM) -ATCAGAGAACACCAAGAAGG, TCTCTGCTATAGGTAAGGTC
TKY297	(HEX)-GTCTTTTTGTGCCTCTGGTG, TCAGGGGACAGTGGCAGCAG
TKY321	(HEX)-TAGTGTATCCGTCAGAGTTCAAAG, GCAAGGAAGTCAGACTCCTGGA
VHL20	(FAM)-CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG, AACTCAGGGAGAATCTTCCCTCAG

Table 19. Number of allele and allele distribution of microsatellite DNA polymorphisms in 20 horse breeds

Locus	Allele of TB	Allele of non-TB	Allele of all horse breeds	No. of allele
AHT4	H, J, O	H, I, J, K, L, O, P	H, I, J, K, L, O, P	7
AHT5	J, K, M, N, O	J, K, L, M, N, O	J, K, L, M, N, O	6
ASB2	B, K, N, O, Q, R	I, K, M, N, O, Q, R	B, I, K, M, N, O, Q, R	8
ASB17	G, N, O	F, G, K, M, N, O, R, S	F, G, K, M, N, O, R, S	8
ASB23	I, J, K, S	I, J, K, L, S, Q, U	I, J, K, L, S, Q, U	7
CA425	J, N	F, G, I, J, M, N, O	F, G, I, J, M, N, O	7
HMS1	I, J, M	I, J, K, M, N	I, J, K, M, N	5
HMS2	J, K, L	H, J, K, L, M, R	H, J, K, L, M, R	6
HMS3	I, M, O, P	I, M, N, P, Q, R	I, M, N, O, P, Q, R	7
HMS6	M, P	K, L, M, N, O, P	K, L, M, N, O, P	6
HMS7	J, L, M, O	J, L, M, N, O, Q	J, L, M, N, O, Q	6
HTG4	K, M	K, L, M, O	K, L, M, O	4
HTG6	G, I, J	G, I, J, M, O, R	G, I, J, M, O, R	6
HTG7	K, N, O	K, M, N, O	K, M, N, O	4
HTG10	I, K, L, M, O	I, K, L, M, N, O, P, R	I, K, L, M, N, O, P, R	8
LEX3	H, L, M, P	F, H, L, M, N, O, P	F, H, L, M, N, O, P	7
LEX33	L, M, Q	K, L, M, N, O, P, Q, R	K, L, M, N, O, P, Q, R	8
TKY279	J, M, N, O	J, M, N, O, P, Q	J, M, N, O, P, Q	6
TKY287	K, N, R	K, N, O, P, Q, R, S	K, N, O, P, Q, R, S	7
TKY297	L, M, N, O	J, L, M, N, O, P, R, S	J, L, M, N, O, P, R, S	8
TKY321	I, L, M, R, S	H, I, L, M, O, R, S	H, I, L, M, O, R, S	7
VHL20	I, L, M, N, O	I, L, M, N, O, P, R	I, L, M, N, O, P, R	7
Total	80	143	145	145

* Alphabetical allele codes for all loci are identical to the assignment on 2005/2006 ISAG horse comparison test.

마. 승용마 특이 유전형질 연구

Ebstein 등(1996)과 Benjamin 등(1996)은 도파민 수용체의 변이가 탐색 추구 성향(Novelty seeking)과 관련이 있다는 논문을 발표하였으며, 그 후 많은 사람들에 의해 연구되었다. 탐색 추구 성향은 사람의 성격 특성을 측정하기 위한 검사 도구의 한 항목으로 이 성향이 높을수록 충동에 적극적으로 반응하고, 새로운 자극에 대하여 보다 탐색적이고 신속히 반응하며 안정적인 행동이 결여된 특성을 보이게 된다.

사람에서는 DRD3, DRD4, HTR2A 유전자 영역의 유전적 다양성과 성격 및 개인 성향의 상관관계를 바탕으로 지속적인 연구가 현재까지 계속해서 연구되고 있다. 한편, 사람에서의 연구 결과를 바탕으로 원숭이, 침팬지 등의 영장류, 개, 고양이, 말 등의 동물에서도 고유의 기질 또는 성격과 DRD4 유전자의 상관관계에 대한 연구도 지속적으로 이루어지고 있는 실정이다. 특히 말의 경우 다른 동물과 비교하였을 때, 활용도의 측면에 있어 성격이 가장 중요시 되는 동물로 개체별 유전적 특징과 성격과의 비교 연구가 가장 필요한 축종이다. 하지만 말의 기질과 DRD3, DRD4, HTR2A 유전자 영역과 다양성 상호간의 상관관계에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 DRD3, DRD4, HTR2A 유전자 분석을 통해 승용마로 적합한 성격을 가질 것으로 추정되는 말의 특이 유전 형질의 발굴은 DRD4 유전자 영역의 48bp 염기서열의 반복지수(VNTR)의 검색과 DRD3, HTR2A 유전자 영역의 염기서열 분석을 통한 단일염기다형성(SNP)을 동시에 분석하는 것이 가장 효과적이며 보편타당한 분석의 기준이 될 것으로 판단된다.

이와 같은 배경하에서 본 연구에서는 국내에서 사육중인 온순한 기질의 말 113두와 사나운 기질의 말 30두를 대상으로 말의 성격과 관련된 DRD3, DRD4, HTR2A 유전자 영역의 특이 유전형질을 탐색하여 개체별 유전적 특성을 파악하고, 특이 유전형질을 가진 승용마를 대상으로 관리자 및 수의사 등을 통해 해당 말의 성격 및 기질에 대한 평가를 동시에 실시하여 온순한 기질의 승용마를 선별할 목적으로 연구를 수행하였다.

한국마사회 장수목장과 부산경남 경마공원, 민간승마장에서 사육중인 말 중 성격이 사나운 말 30두와 온순한 말 113두, 전체 143두를 대상으로 Heparin tube (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 경정맥으로부터 채취한 혈액을 원심분리한 후 buffy coat를 공시재료로 사용하였다. DRD4 유전자의 VNTR과 DRD4 유전자의 염기서열(SNP)은 143두 전체에 대해 분석하였고, DRD3와 HTR2A 유전자의 염기서열(SNP)은 50두에 대해서 분석하였다 (Table 20).

Table 20. Oligonucleotide primers used in present study

Gene	Amplification	Primer	Sequence (5'-3')
DRD4	PCR & VNTR	F1	CCGCTCATGCTGCTGCTCTACTGG
		R1	TGCGTCCCGGCCGGTGATCTT
	Sequence cycling	F2	CTCATGCTGCTGCTCTAC
		R2	GGTGATCTTGGCGCGCCT
DRD3	PCR	F3	TATGGCGTCTCTGAGCCAGCTGA
		R3	CAAAGCCTTCCTCAAGATCCTGTC
	Sequence cycling	F4	CTGAGCCAGCTGAG
		R4	TCCGCAAAGCCTTCCT
HTR2A	PCR	F5	ATGGATATTCTTTGTGAAGAAAACAC
		R5	AATGAAAAGGTTAGCTGTGTGTGA
	Sequence cycling	F6	TTTGTGAAGAAAACAC
		R6	AAAATCAACACAGTG

DRD4 유전자의 SNP를 분석한 결과 143두의 말 중 15두에서 -147염기의 C → T substitution과 -292염기의 A → G substitution SNP가 관찰되었다 (Table 21). C → T substitution의 경우 SNP가 7두에서 관찰되었는데 7두 중 5두가 마필관리사 및 수의사 등에 의해 일반적으로 사나운 기질을 가진 것으로 평가되었으며, A → G substitution이 관찰된 8두 중 2두의 말이 일반적으로 사나운 기질을 가지는 것으로 평가되었다. 하지만 C → T, A → G substitution이 관찰된 두 개의 SNP 모두가 동시에 관찰된 개체는 없었다 (Figure 27~28). DRD4 유전자의 SNP와 말의 기질의 상관관계를 보고한 Momozawa 등의 결과에 따르면 C → T substitution의 경우 말의 기질과 유의적인 상관관계가 관찰되지 않았다고 보고하였으나 A → G substitution의 경우 SNP가 관찰된 개체에서 SNP가 관찰되지 않은 개체에 비해 말의 호기심 정도가 비교적 높게 관찰되었으며 경계심 정도는 오히려 비교적 낮은 것으로 관찰되었다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 입체적인 말의 기질에 대한 조사가 수행되지 않아 기존의 연구와 단순 비교는 어렵지만 SNP가 관찰된 개체가 일반적으로 사나운 기질을 가지는 것으로 분석되어 일부 차이가 관찰되었다. 하지만 Momozawa 등의 연구에서도 DRD4 유전자의 SNP에 따른 말의 기질에 대한 단순 평가가 어려운 것으로 보고하였으나 본 연구 결과에서는 일부 개체에서 SNP가 관찰되었지만 온순한 기질을 가진 대부분의 개체에서 SNP가 관찰되지 않았다. 향후 DRD4 유전자의 SNP와 말의 기질간의 상관관계를 비교 분석하여 국내산 승용말 생산 계획 수립 시 번식 전 분석을 통해 사나운 말을 배제하는 수단으로 유용할 것으로 사료된다.

Table 21. SNPs of the equine DRD4 gene

SNPs	No. of sample
C → T substitution	26, 33, 40, 50, 80, 88, 108
A → G substitution	1, 13, 30, 44, 57, 66, 100, 139

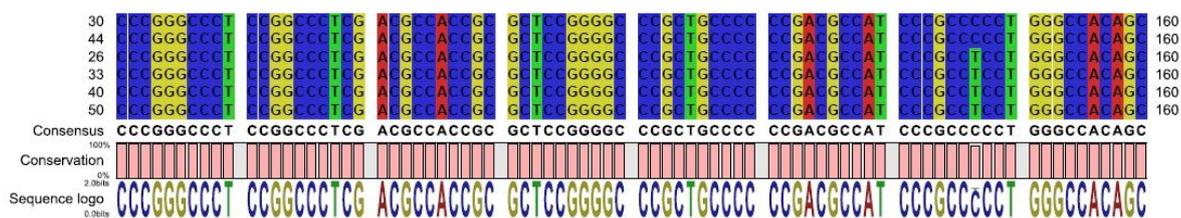


Fig 27. Multiple alignment of the equine DRD4 gene. The identified SNP on -147 genomic position (C → T substitution).

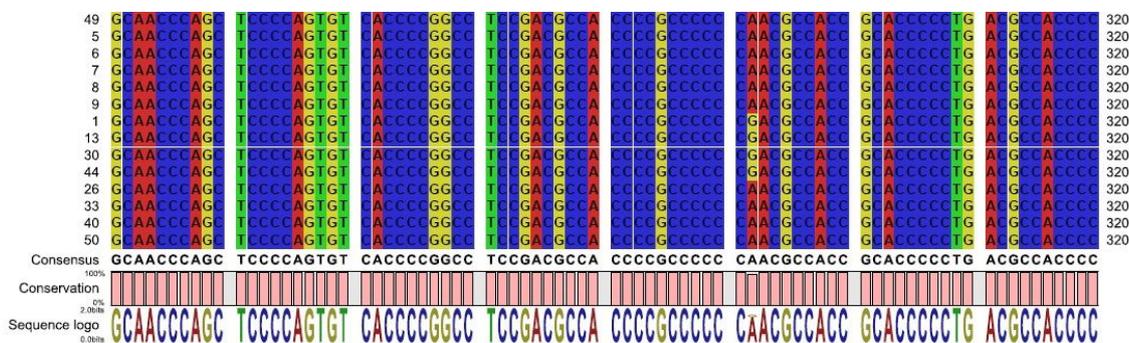


Fig 28. Multiple alignment of the equine DRD4 gene. The identified SNP on -292 genomic position (A → G substitution).

DRD3 유전자의 SNP를 분석한 결과 50두의 말 중 22두에서 -55 G → C, -89 T → C, -92 T → A, -1030 G → C, -1039 C → A, -1055 A → G substitution의 6개의 SNP 가 관찰되었으며, 55 G → C 2% (n=1), -89 T → C 2% (n=1), -92 T → A 22% (n=11), -1030 G → C 2% (n=1), -1039 C → A 2% (n=2), -1055 A → G 18% (n=9)의 빈도를 나타내었다. 검사 관찰된 SNP중 -92 T → A와 -1055 A → G 가 가장 비교적 높은 빈도로 발생하는 것을 관찰할 수 있었으나 사나운 기질을 가진 개체간 구분 없이 관찰되어 DRD3 유전자의 SNP와 말의 기질 상호간의 유의성이 있는 결과에는 미흡함을 확인할 수 있었다. 또한 Phylogenetic tree를 분석해 본 결과 SNP가 관찰되지 않은 group보다 SNP가 관찰된 21두 중 11두가 사나운 기질을 가지며 10두가 온순한 기질을 가지는 것으로 분석되었으나 1,000회의 Bootstrap 결과 통계적인 유의성이 관찰되지 않았다. 따라서 DRD3 유전자 분석을 통한 말의 기질 및 성격과의 상관관계를 판단하는 것은 쉽지 않을 것으로 판단되지만, 향후 다양한 품종과 더 많은 두수를 대상으로 검사하거나 순치정도 등의 다양한 요인을 감안하여 활용할 경우 승용말로서 부적합한 기질의 말을 배제하는데 유용한 방법이 될 것으로 판단된다.

HTR2A 유전자의 SNP를 분석한 결과 50두의 말 중 30두 말에서 200여개가 넘는 매우 많은 수의 SNP가 관찰되었다. 이러한 결과를 바탕으로 말의 HTR2A 유전자의 경우 단일 염기서열 변이를 통한 말의 기질 분석에는 부적합한 marker인 것으로 판단된다. 하지만 분석된 염기서열을 바탕으로 Phylogenetic tree를 분석한 결과 특이적으로 염기서열 변이가 관찰되지 않은 20두 중 12두(60%)가 온순한 기질을 가지며, 8두(40%)는 사나운 기질을 가지는 것으로 분석되었다. 염기서열 변이 없는 group 내에서 1000회의 Bootstrap 결과 유의성 있는 차이가 관찰되었으며 염기서열의 변이가 없을수록 온순한 성격을 가지는 경향이 높은 것으로 판단된다. 한편 다수의 유전적 변이가 관찰된 30두 24개의 group에 대한 말의 기질 및 성격과의 상관관계를 분석한 결과 전체 30두 중 온순한 기질을 가지는 말은 5두(16.6%) 뿐이었으며, 사나운 기질을 가지는 말은 총 25두(83.7%)로 1,000회의 bootstrap결과 높은 통계적 유의성이 관찰되었다. 따라서 HTR2A의 유전자 분석을 통한 말의 성격 및 기질의 상호 비교분석의 경우 특정 단일 염기서열 변이 (SNP) 분석에 따른 비교 보다는 유전변이의 발생빈도에 따른 비교 분석이 유효할 것으로 판단되어 유전변이가 많은 개체일수록 사나운 성격을 가지는 경향을 보이는 것으로 분석되어 향후 승용말 생산에 응용이 가능하리라 판단된다.

제2절 인공수정 및 수정란 이식에 의한 승용마 생산기술 개발

1. 서론

세계적으로 말 정액의 동결 및 인공수정이 증가하고 있으며, 인공수정으로 태어난 말의 등록도 증가하고 있다. 말에서 인공수정은 씨수말 운반비용의 감소, 정액의 장기보관, 적기 인공수정, 생식기 질병 전파 차단 등의 장점이 있으나, 낮은 임신율, 노동력 증가 및 정형화된 프로토콜의 부재 등의 문제점이 있으나(Samper, 2008), 말의 정액 동결 프로그램, 인공수정, 수정란 이식의 활용에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 말은 계절번식 동물이라서 생리적인 비발정기에는 자연적으로 발정유도가 쉽지 않다. 그래서 다른 산업동물에서와 같이 호르몬제를 이용한 발정동기화 및 말 인공수정 시 정액 내 호르몬제를 첨가함으로써 말의 번식 효율 향상을 위한 연구도 시도하고 있다.

인공수정을 위한 정액은 냉장 또는 동결정액의 형태로 이용되고 있다. 정액 채취시 원정액의 품질과 채취 방법, 원심분리 방법, 냉각 속도와 시간, 포장재료 및 씨수말 등이 정자의 품질에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있고(Amann와 Pickett, 1987; Ecot 등, 2000), 정액의 동결보존을 위한 희석액 조성 및 동결체계에 대한 연구도 보고되었다(Martin 등, 1979; Cristanelli 등, 1984).

냉장정액은 4°C에서 24-48시간 동안 사용이 가능하고, 동결정액은 동결융해 후 정자의 활력이 낮아지지만 편리성 때문에 사용이 증가되고 있다(Backman 등, 2004). 하지만 인공수정에서 발정주기 1회의 임신율이 냉장정액은 39-65%이고 동결정액은 32-73%로서 조건에 따라 변이가 심하고 자연종부보다 낮은 경향이다(Loomis, 2001; Vidament, 2005). 말 인공수정 임신율에는 정자 보존용 희석액의 조성, 인공수정 시간, 주입 위치와 방법, 씨수말의 선발, 배란시기, 정자수, 암말의 관리, 전진운동성 정자의 농도 등이 영향을 미치며(Loomis, 2001; Colenbrander 등, 2003; Vidament, 2005; Metcalf, 2007), 특히 동결정액의 품질 기준, 인공수정에 대한 정형화된 프로토콜 및 암말의 번식관리에 대한 연구가 필요하다(Loomis, 2001; Samper, 2009). 한편 국내에서는 말의 인공수정에 대한 시도는 있었으나 정자의 동결 및 인공수정에 관한 기본 자료 및 기술의 확립이 미흡한 상태이다(Park 등, 2008).

말의 수정란 이식은 최근 승용마, 폴로 시합말 등 특수한 용도로 이용하는 말에 대하여 운동, 시합, 쇼 등에 영향을 받지 않으면서 많은 숫자의 우수한 자마를 생산하기 위한 용도로 연구와 활용이 증가되고 있다. 하지만 국내에서는 이에 대한 연구가 전무한 상태이다.

우수 혈통 승용마의 수정란과 정액은 전 세계로 냉장 및 동결 정액의 형태로 수출·수입되고 있고, 이들 수정란과 정액의 동결기술, 이식후 안정적인 수태율 확보 및 자마의 생산성 향상에 관련한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 또한 번식장애를 해결하기 위하여 난관내 수정법(GIFT), 난자내 정자 직접주입법(ICSI) 및 수술적인 난자 이식법도 개발되었다.

한편 2004년에 미국에서는 번식기의 암말 440천두 중에서 88%인 387천두가 인공수정을 이용하여 번식하였다(Loomis and Graham, 2008). 그러나 국내에서 사육되고 있는 대부분의 말이 경주용(더러브렛종)으로 이들의 번식은 자연종부에 의존하고 있어, 인공번식에 필요한 정액채취, 정자 냉장과 동결 및 인공수정에 관한 기본 자료 및 기술의 확립이 미흡한 상태이다. 하지만 최근 레저 산업의 성장과 함께 승용마에 대한 요구가 증가하고 있어, 국외의 우수한 승용마의 도입이 요구되고 있다. 따라서 인공수정과 수정란이식 기술을 활용하면 우수한 승용마를 단기간에 생산이 가능하므로 말의 번식생리에 대한 이해와 더불어 다양한 번식기술의 활용에도 관심이 필요하다.

2. 연구개발의 내용 및 결과

가. 정액채취 및 동결

(1) 재료 및 방법

(가) 정액 채취

정액채취방법에는 종래의 채취법(정소상체정액 채취법, 누관법, 해면채법, 질내채취법, 콘돔법, 페서리법)과 마사아지법(음경마사아지법, 정관팽대 부마사아지법), 전기자극법과 인공질법이 있는데 소와 말에서는 주로 인공질법을 이용하고 있다. 인공질법이란 암소의 질을 모방하여 만든 인공질내에 사정시켜 정액을 채취하는 방법으로써 가장 이상적인 방법이며 세계도처에서 널리 사용되고 있다.

정액 채취는 한국마사회 장수육성마목장 및 마굿간 승마장에서 사육중인 씨수말(아랍종 및 교잡종) 2두를 대상으로 하였다. 먼저 씨수말은 충분히 시정한 후 발정기 씨암말에 승가를 허용하였다. 정액은 콘돔, Missouri식 인공질 또는 Colorado state university(CSU)식 인공질에 필터가 장착된 채취병을 부착하여 채취하였다. 채취한 정액은 즉시 EZ 희석액으

로 상온에서 정액과 1:1(v:v)로 희석한 후 Equitainer (Hamilton Research, MA, USA)에 옮겨 5℃를 유지하였다(Figure 29~31).

인공질에는 40~42℃(소), 45~48℃(말)의 온수를 넣어 적당히 압력을 있게 한 다음에, 인공질 입구에는 반드시 윤활제를 발라서 준비한다. 이러한 준비가 끝나면 고정시킨 발정 말에 여러번 수말을 접근시켜 “teasing”을 유도하고, 펜텀 또는 암말의 후미에서 승가를 허용한다. 승가하면 음경부를 인공질로 유도한다. 말의 1회 채취시 평균 정액량은 50-120 ml이고 정자수는 100-350×10⁶/ ml 이다. 정자수는 계절별, 관리형태 및 채취간격에 따라 차이가 있다.

※ 정액채취시 일반적 주의사항

- ① 위생관념에 투철할 것
- ② 온도충격을 피할 것
- ③ 채취전에 종모축의 성적흥분을 앙등시킬 것
- ④ 정액은 오전중에 채취할 것
- ⑤ 사출된 정액의 손실을 줄일 것

① 육안적 검사

육안적 검사는 정액량, 색채, 냄새, 농도, pH 등으로 구분하여 실시한다. 이때 주의할 점은 30-35℃의 보온이 유지되어야 하며, 직사광선이나 한냉한 장소는 피하는 것이 좋다.

② 현미경 검사

정자의 활력, 생존률, 정자의 형태 및 정자수 등을 측정 검사한다. 전기가온장치가 장착된 현미경으로 약 400배율로 확인한다. 정자의 운동성은 직선적 직진운동, 선회운동, 진자운동으로 구분하여 조사하였다. 현미경 검사 후 정자의 농도와 운동성의 검사는 sperm vision 3.5(minitube, 독일)를 이용하였다.



Fig 29. Phantom and stallion using semen collection.



인공질



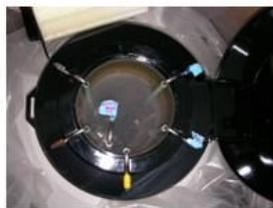
Teasing



채취



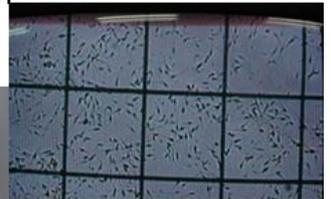
인공수정



보관(-196℃)



동결



정자 검사

Fig 30. Procedures of semen collection.

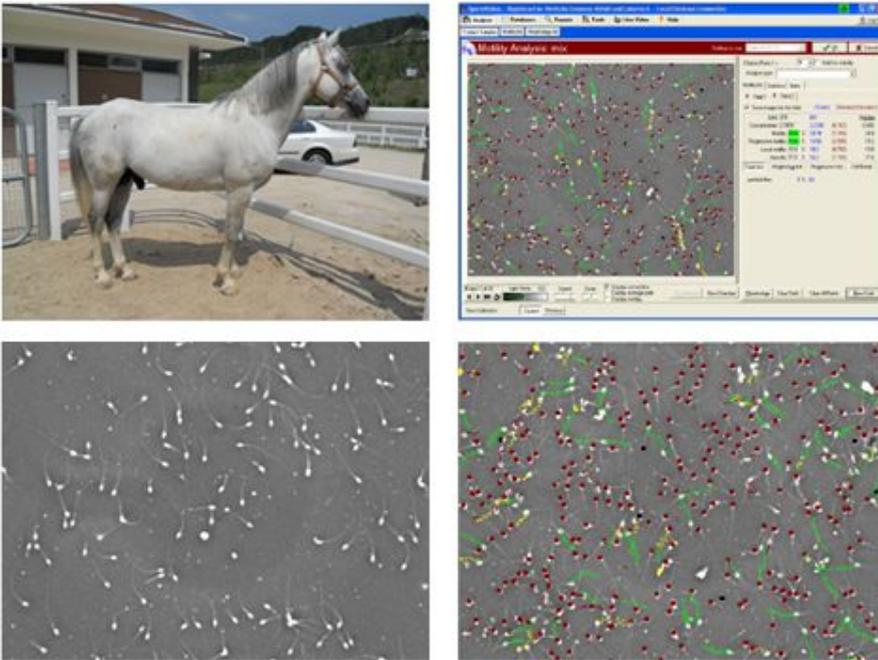


Fig 31. Spermatozoa analysis using CASA (Minitube, De). spermatozoa (below, left) spermatozoa in CASA (below, Right; green color sperm are live and motile, yellow.

(나) 정액의 희석 및 동결 완충액

정액의 희석액은 glucose, non-fat dry milk solids 및 amikacin sulfate를 함유한 skim milk buffer(Chino, CA, USA)을 사용하였다. 정자의 동결에는 glycerol, egg yolk, non-fat dry milk solids, glucose, lactose, sodium citrate dihydrate, potassium citrate monohydrate 및 ticarcilin disodium이 함유된 egg yolk extender(MFR5, Chino, CA, USA) 또는 skim milk, lactose, glucose, equex STM, sodium citrate dihydrate, disodium EDTA, sodium bicarbonate, glycerol 및 ticarcilin disodium이 함유된 skim milk extender(LE, Chino, CA, USA)을 실험목적에 따라 이용하였다.

(다) 정자 처리 단계에 따른 Total motile (TM)과 Progressive motile (PM) 조사

희석한 정액을 5°C에서 각각 1시간과 4시간동안 보관한 후 말 정자의 냉장보관 시간에 따른 Total motile (TM)과 Progressive motile (PM)을 측정하였고, 동결 희석액에 따른

동결-융해정자의 TM과 PM에 미치는 효과를 검토하기 위하여 LE 와 MFR5 희석액을 각각 이용하여 정자를 동결하였다. TM 및 PM은 sperm vision 3.5(minitube, 독일)를 이용하였다.

(라) 정액 동결

1차 희석된 정액은 5°C 상태로 경상북도축산기술연구소(영주, 경북)로 운반하여 3회 부드럽게 흔들어서 정자와 희석액을 재혼합 하였다. 동결과정은 먼저 50 ml 원심분리관에 냉장된 정액 40 ml씩을 넣고 400 g × 10분간 원심분리하여 seminal plasma 및 부유액을 제거하고, 하층의 정자괴를 회수하였다. 정자수는 hemacytometer를 이용하여 최종 농도 40×10^6 / mL로 조정한 후 동결용 LE와 MFR5 희석액으로 희석하였다. 희석된 정액은 5°C 에서 90분간 냉장하여 냉장 상태를 유지하면서 정액을 0.5 mL 스트로우(FHK, Japan)에 충전한 다음 $-165 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 10분간 예비동결한 후 액체질소에 침지하였다(Figure 32). 동결 융해 정자의 생존력과 활력은 37°C 수조에서 30초간 융해하여 측정하였다.

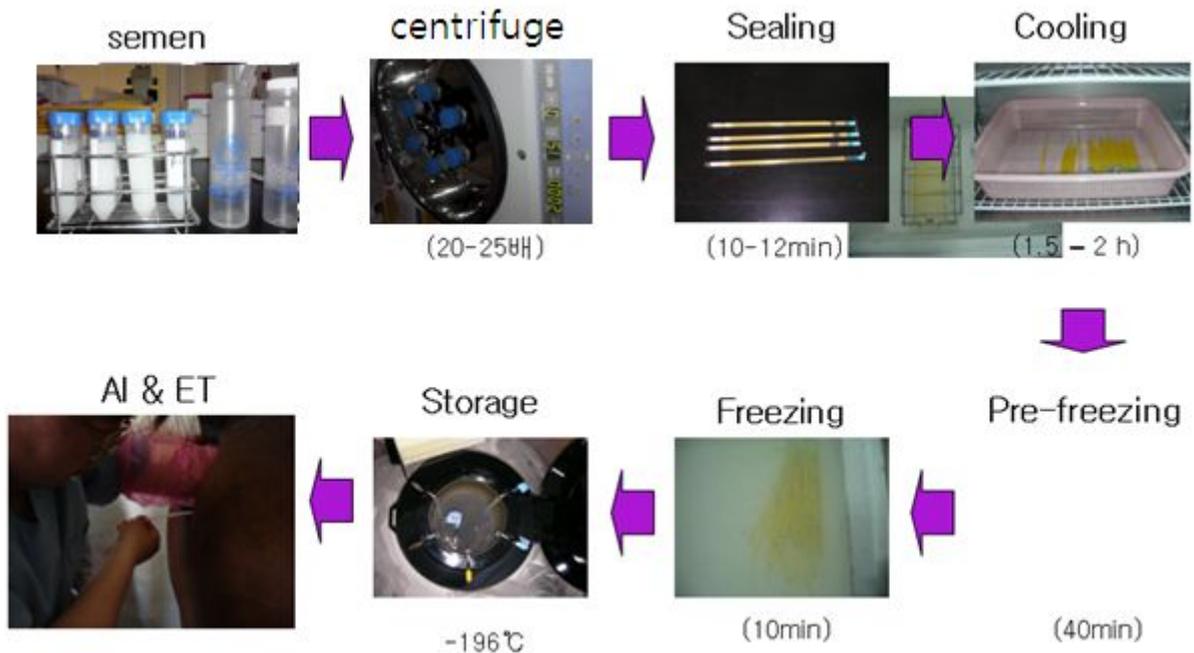


Fig 32. Procedure for semen freezing.

(2) 결과

(가) 정액 채취 방법에 따른 회수 정액량

씨수말의 정액을 콘돔, 미조리식 및 CSU식 인공질을 이용하여 채취한 결과, 아랍종의 씨수말에서 콘돔 40-50 ml, 미조리식 50-60 ml, CSU식 50-60 ml로서 콘돔에 비하여 인공질을 활용하였을때 채취한 정액량이 많았다. 씨수말의 자원이 부족한 국내 현실을 감안한다면 인공질을 활용하는 방법이 효과적이었다. 말의 자연중부시 1회 사정량이 30-150 ml이지만, 냉장-운반 정액의 주입량은 20 ml, 동결-용해 정액의 주입량은 2 ml 정도로 자연중부에 비하여 인공수정에는 소량의 정액이 주입된다. 인공수정시 총 200×10^6 - 400×10^6 개의 정자가 주입되면 임신율을 안정적으로 유지할 수 있지만, 동결정액은 25×10^6 - 100×10^6 개의 정자를 주입하고 있다(Palmer와 Magistrini, 1992; Vidament 등, 1997; Woods 등, 2000).

(나) 정액량 및 Total motile (TM)과 Progressive motile (PM) 측정

씨수말 2두 각각 3회씩 채취한 정액량, 정자수 및 TM과 PM은 Table 22와 같다. 교잡종말의 정액량은 평균 138.3ml이었고, 아랍종은 평균 56.5ml이었다. 정자수는 교잡종말이 평균 175×10^6 /ml로서 아랍종의 평균 86×10^6 /ml에 비하여 많았다. 한편 TM과 PM은 교잡종말이 평균 75.9% 및 58.4%, 아랍종은 평균 48.8% 및 23.2%로서 교잡종말이 유의하게 높은 경향이였다($p < 0.05$)(Table 22).

Table 22. Volume, number of spermatozoa, total motile(TM) and progressively motile(PM) of equine semen

Breed	Total semen (ml)	Number of spermatozoa($\times 10^6$ /ml)	TM*,%	PM**,%
Mixed breed	138.3 \pm 9	175 \pm 9	75.9 \pm 3.7 ^a	58.4 \pm 4.6 ^a
Arab	56.5 \pm 4	86 \pm 3	48.8 \pm 7.8 ^b	23.2 \pm 4.2 ^b

* TM; Live spermatozoa / Number of spermatozoa

** PM; Progressive spermatozoa / Number of spermatozoa

(다) 년도별 말 정자의 TM과 PM 조사

아랍종 씨수말에서 채취한 정액량, 정자수 및 TM과 PM은 Table 23과 같다. '09년도에

는 정액량이 평균 56.4 ml이었으나 '10년도에는 평균 20 ml로 낮은 경향이였다. 하지만 총 정자수는 '09년도에 평균 $86 \times 10^6 / \text{ml}$ 에 비하여 '10년에는 평균 $116.9-363.5 \times 10^6 / \text{ml}$ 로 증가하였다. 특히 1회째 채취 보다 2-3시간 간격을 두고 2회째 채취에 정자수가 유의하게 증가하는 경향이였다. 한편 TM은 평균 50-61.4%로 차이가 없었으나, PM은 1회째에 비하여 2회째에 유의하게 증가하는 경향이였다(Table 23).

Table 23. Volume, number of spermatozoa, total motile(TM) and progressively motile(PM) of equine semen

Year	Total volume (ml)	No. of spermatozoa ($\times 10^6 / \text{ml}$)	TM*, %	PM**, %
'09	56.5 \pm 4	86 \pm 3	48.8 \pm 7.8	23.2 \pm 4.2
'10 1st	20 \pm 2.0	116.9 \pm 8	50.0 \pm 1.7	21.6 \pm 1.2
'10 2nd	20 \pm 3.0	363.5 \pm 10.4	61.4 \pm 1.8	36.6 \pm 1.2
'11	89 \pm 16.2	246.7 \pm 20.1	75.3 \pm 0.9	58.2 \pm 1.2

* TM; Live spermatozoa / Number of spermatozoa

** PM; Progressive spermatozoa / Number of spermatozoa

(라) 정자 처리 단계에 따른 TM 및 PM

채취한 정자의 처리 단계에 따른 TM과 PM은 Table 24와 같다. 채취 직후 TM과 PM은 각각 평균 61.4% 및 36.6%였다. 정장을 제거하기 위하여 원심분리 직후의 TM과 PM은 각각 평균 75.3% 및 43.9%로 증가하였으나, 냉장 시작 2시간째에는 각각 평균 54.6% 및 28.4%로 낮아지는 경향이였다. 인공수정을 위한 정액의 품질에는 씨수말, 채취 방법, 희석액의 조성, 냉장 속도, 포장 재료 및 seminal plasma제거를 위한 원심분리 등이 영향을 미치고(Amann와 Pickett, 1987; Ecot 등, 2000), 정상 형태 60% 이상과 PM 60% 이상의 정액이 효과적이지만 동결정액에 대한 기준은 없다(Hafez와 Hafez, 2000; Metcalf, 2007; Samper, 2009). Vidament (2005)는 씨수말에서 동결-융해 정자의 평균 운동성과 전진운동성에 대하여, Crockett 등(2001)은 냉장-보관 시간의 경과와 동결-융해 정자의 TM과 PM 경향을 보고하였고, 국내에서도 Park 등(2008)이 냉장-희석 시간의 경과에 따른

정자의 TM과 PM의 경향을 보고하였다.

Table 24. Number of spermatozoa, total motile and progressively motile of different types in equine semen

Semen types	Number of spermatozoa($\times 10^6$ /ml)	TM*, %	PM**, %
After collection	216.9 \pm 8.0	75.3 \pm 0.9 ^a	58.2 \pm 1.2 ^b
Cooled-diluted	106.4 \pm 4.0	61.4 \pm 1.8 ^b	59.6 \pm 1.2 ^b
Cooled-transported	104.6 \pm 3.9	54.6 \pm 1.3 ^c	52.0 \pm 1.1 ^c
Frozen-thawed	105.3 \pm 4.6	14.4 \pm 1.5 ^d	71.7 \pm 2.2 ^a

^{a,b} Values with different superscript were significantly different ($p < 0.05$)

* Total Motility; Live spermatozoa / Total spermatozoa

** Progressive Motility; Progressive spermatozoa / Number of TM spermatozoa.

(마) 품종에 따른 정자의 TM 및 PM 운동성

TM 비율은 교잡종 씨수말의 것이 동결융해 직후 20.1%로서 아랍종의 1.42%에 비하여 유의하게 높았고, 배양시간 30분, 1시간 및 2시간째에도 높은 경향이였다. 한편 PM 비율도 교잡종 씨수말의 것이 높은 경향이였다(Figure 33).

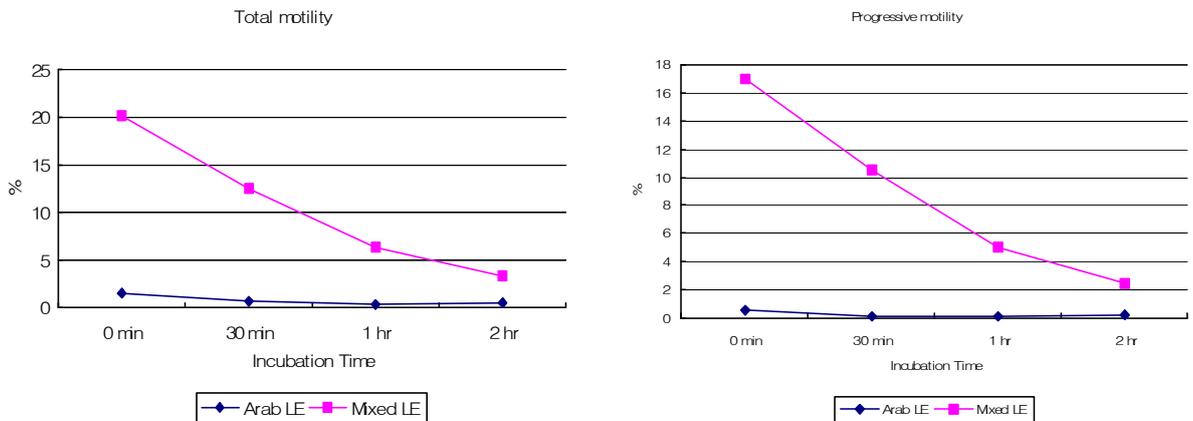


Fig 33. 품종에 따른 정자의 TM 및 PM 운동성.

(바) 희석액(egg yolk 또는 skim milk)이 TM 및 PM에 미치는 효과

아랍 및 교잡종 씨수말의 동결융해 정자의 체외배양 시간에 따른 TM 및 PM을 조사한 결과, 아랍종은 동결융해 직후에는 egg yolk extender(MFR)가 skim milk extender(LE)에 비하여 높은 경향이였으나 배양시간의 경과에 따라 유사한 경향이였다. 한편 교잡종 씨수말은 동결완충액 및 배양시간에 따른 TM과 PM의 차이가 없었다(Figure 34~35).

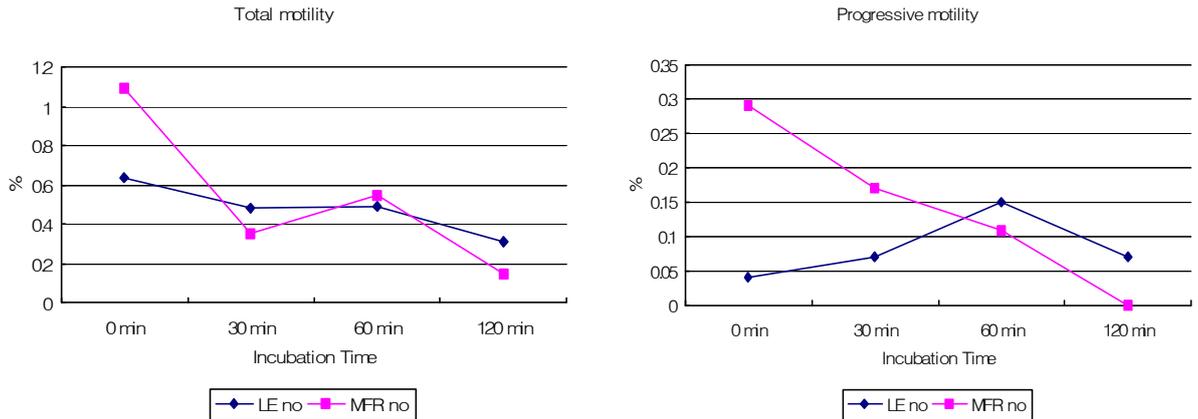


Fig 34. 아랍종 씨수말 동결융해정자의 TM 및 PM.

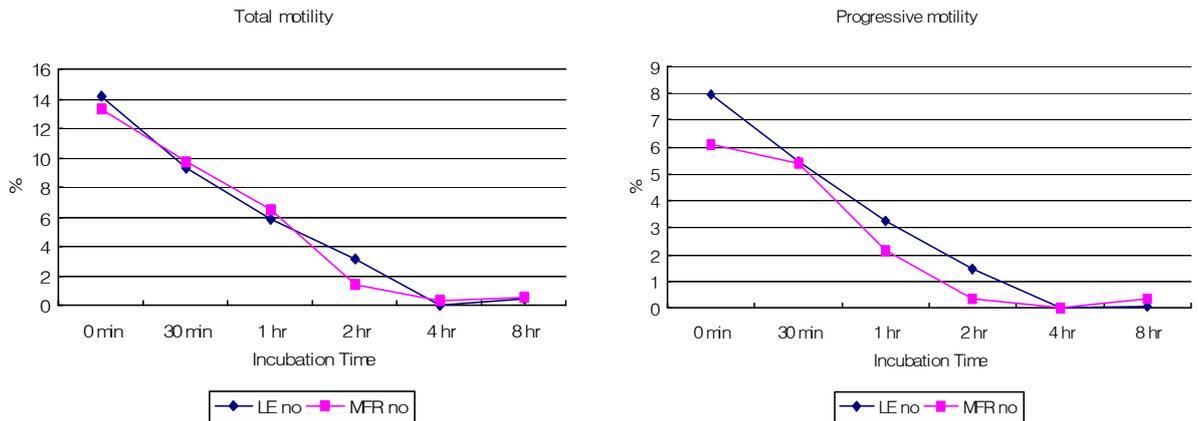


Fig 35. 교잡종 씨수말 동결융해정자의 TM 및 PM.

(사) 희석액(egg yolk 또는 skim milk)에 보존용 buffer 첨가가 TM 및 PM에 미치는 효과

아랍 및 교잡종 씨수말의 동결융해 정자에 보존용 buffer의 첨가가 체외배양 시간에 따른 TM 및 PM을 조사한 결과, 아랍종 씨수말은 skim milk extender(LE)의 TM 및 PM이 egg yolk extender(MFR)에 비하여 높은 경향이었으나 유의차는 없었다. 한편 교잡종 씨수말은 skim milk extender(LE)의 TM 및 PM이 egg yolk extender(MFR)에 비하여 30분 및 1시간까지는 유의하게 높은 경향이었으나, 2시간이후는 유사한 경향이였다(Figure 36~37).

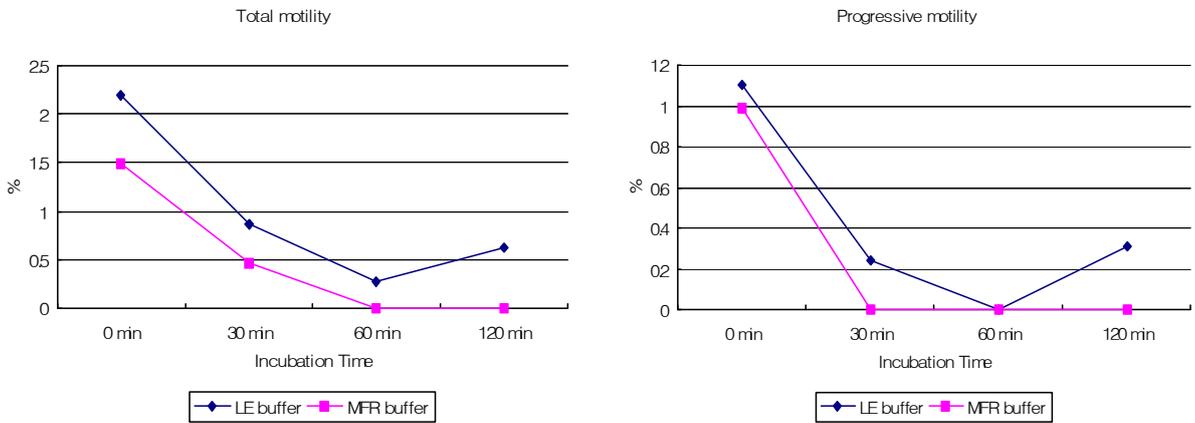


Fig 36. 아랍종 씨수말 동결융해 정자의 TM 및 PM.

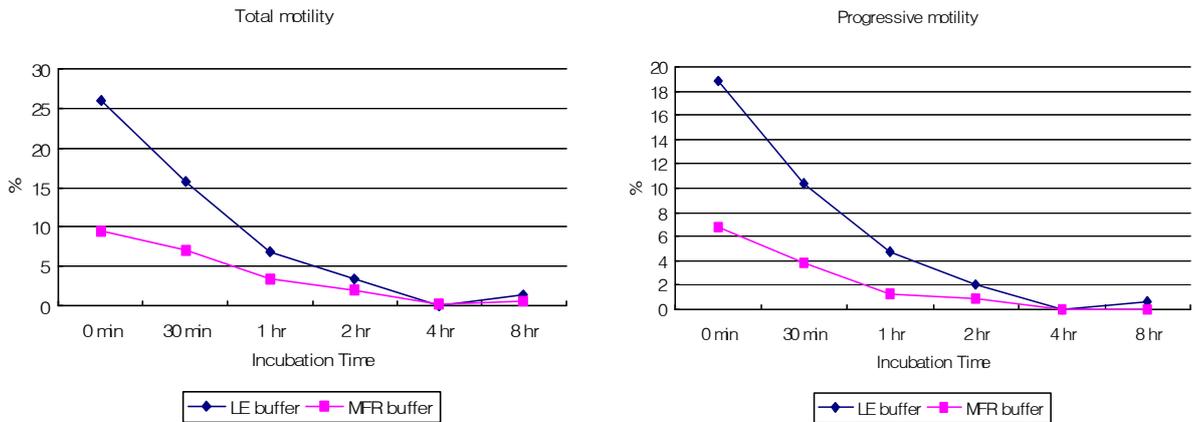


Fig 37. 교잡종 씨수말 동결융해 정자의 TM 및 PM.

(아) Skim milk extender에 보존용 buffer 첨가의 유무가 TM 및 PM에 미치는 효과

아랍 및 교잡종 씨수말의 skim milk extender에 동결한 정자의 용해 후 보존용 buffer의 첨가유무가 체외배양 시간에 따른 TM 및 PM을 조사한 결과, 아랍종 씨수말은 buffer 첨가 직후에는 TM 및 PM이 유의하게 높았으나 배양시간의 경과(30분 이후)에는 유사한 경향이었다. 한편 교잡종 씨수말도 buffer 첨가직후에는 TM 및 PM이 높은 경향이었으나 배양 1시간 이후에는 차이가 없었다(Figure 38~39).

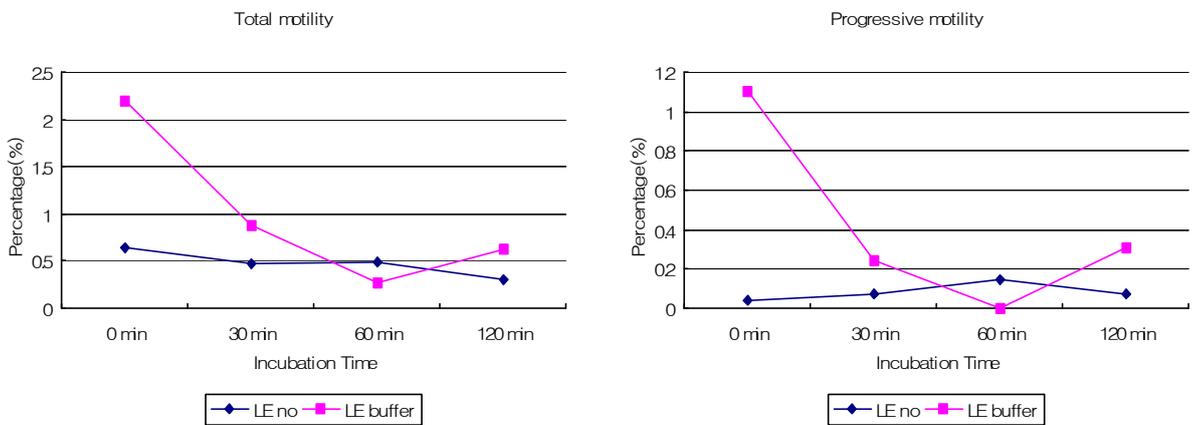


Fig 38. 아랍종 씨수말 동결용해 정자의 TM 및 PM.

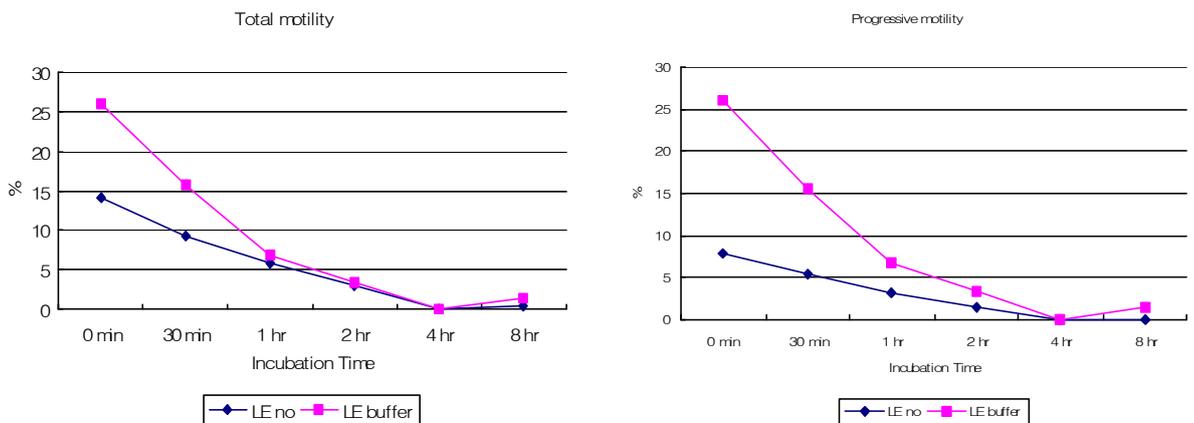


Fig 39. 교잡종 씨수말 동결용해 정자의 TM 및 PM.

(자) Egg yolk extender에 보존용 buffer 첨가의 유무가 TM 및 PM에 미치는 효과

아랍 및 교잡종 씨수말의 egg yolk extender에 동결한 정자의 용해 후 보존용 buffer의 첨가유무가 체외배양 시간에 따른 TM 및 PM을 조사한 결과, 아랍종 씨수말의 TM 비율은 buffer 첨가 및 배양시간에 따른 차이가 없었으나, PM 비율은 첨가직후에는 높았으나 배양 30분이후에는 비슷하였다. 한편 교잡종 씨수말은 buffer 첨가 및 배양시간에 따른 TM 및 PM이 차이가 없었다(Figure 40~41).

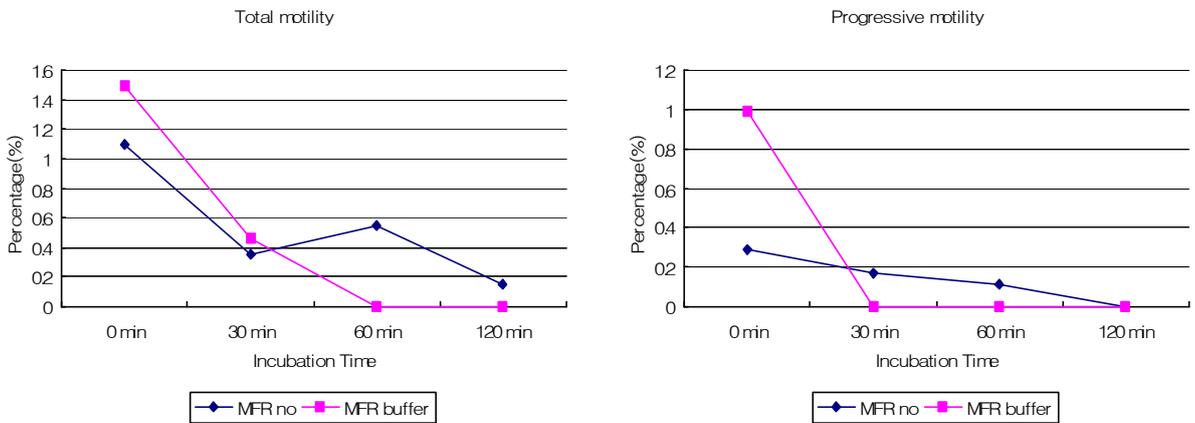


Fig 40. 아랍종 씨수말 동결용해 정자의 TM 및 PM.

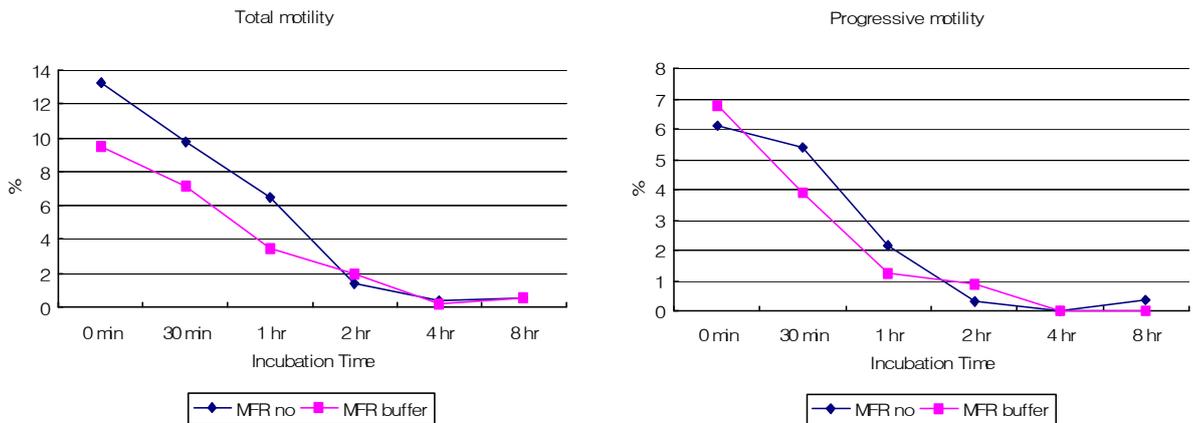


Fig 41. 교잡종 씨수말 동결용해 정자의 TM 및 PM.

(차) 동결 희석에 따른 TM 및 PM

동결완충액의 종류에 따른 TM과 PM 비율을 조사한 결과는 Figure 42와 같다. TM은 SME 및 EYE에서 채취 직후는 각각 평균 61% 및 49%, 원심분리 직후는 각각 평균 74% 및 53%, 냉장후에는 평균 58% 및 34%로 낮아졌다. 한편 PM 비율은 채취 직후 각각 평균 36% 및 28%, 원심분리 직후 평균 44% 및 37%, 냉장후에는 평균 38% 및 39%였다.

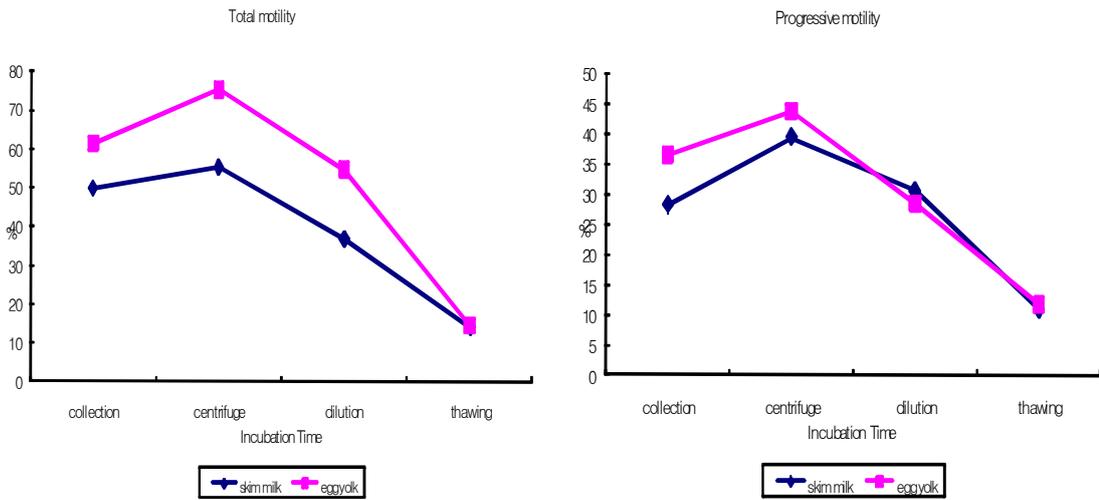


Fig 42. Total motility and progressive motility in different freezing extender.

(카) 희석액이 동결용해 정자의 TM 및 PM에 미치는 효과

아랍 및 교잡종 씨수말의 동결용해 정자의 체외배양 시간에 따른 TM 및 PM을 조사한 결과, 아랍종은 동결용해 직후에는 egg yolk extender(MFR)가 skim milk extender(LE)에 비하여 높은 경향이었으나 배양시간의 경과에 따라 유사한 경향이였다. 한편 교잡종 씨수말은 동결완충액 및 배양시간에 따른 TM과 PM의 차이가 없었다(Table 25).

Table 25. Effect of freezing extender on total motility and progressive motility after thawing in equine frozen semen

Buffer	year	No. of spermatozoa ($\times 10^6/\text{ml}$)	TM*,%	PM**,%
Egg-yolk	'09	93.5 \pm 6.0	3.3 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1
	'10	105.3 \pm 4.6	14.2 \pm 1.2	11.0 \pm 1.2
Skim-milk	'09	96.3 \pm 3.6	4.2 \pm 0.6	1.4 \pm 0.3
	'10	116.9 \pm 8	14.4 \pm 1.5	11.7 \pm 0.8

* TM; Live spermatozoa / Number of spermatozoa

** PM; Progressive spermatozoa / Number of spermatozoa.

나. 인공 수정

(1) 재료 및 방법

(가) 발정 발현

발정한 암말은 흥분하고 사료를 거부한다. 수말에 대하여 관심을 보이며 따라다니지만 교미허용 이전에는 수말의 접근을 허용하지 않는다. 시간이 경과함에 따라 수말에게 접근하여 승가를 유도하기도 하며, 꼬리를 들어올리고 배뇨자세를 취하며 오줌을 빈번하게 눈다. 동시에 외음부가 개폐하면서 윙킹(winking)을 2~3초 주기로 반복하다가 수말의 승가를 허용하게 된다(Figure 43). 발정 지속시간은 개체, 계절, 영양 등 여러 조건에 따라 차이가 많다. 대부분은 말은 발정기간이 4~8일이고 배란은 발정종료 전 1~2일에 일어난다.



Fig 43. Pictures of estrus in mare.

발정기간별 초음파 검사의 예는 Figure 44와 같다. 정상적인 발정주기 상에는 다양한 크기의 난포가 존재하게 된다. 발정기가 다가오면서 1-2개의 우세난포가 발달하게 되고 그 중 1개가 배란하게 된다. 2개 배란도 약 10-20% 발생하지만, 본 연구과정에서는 발견할 수 없었다.

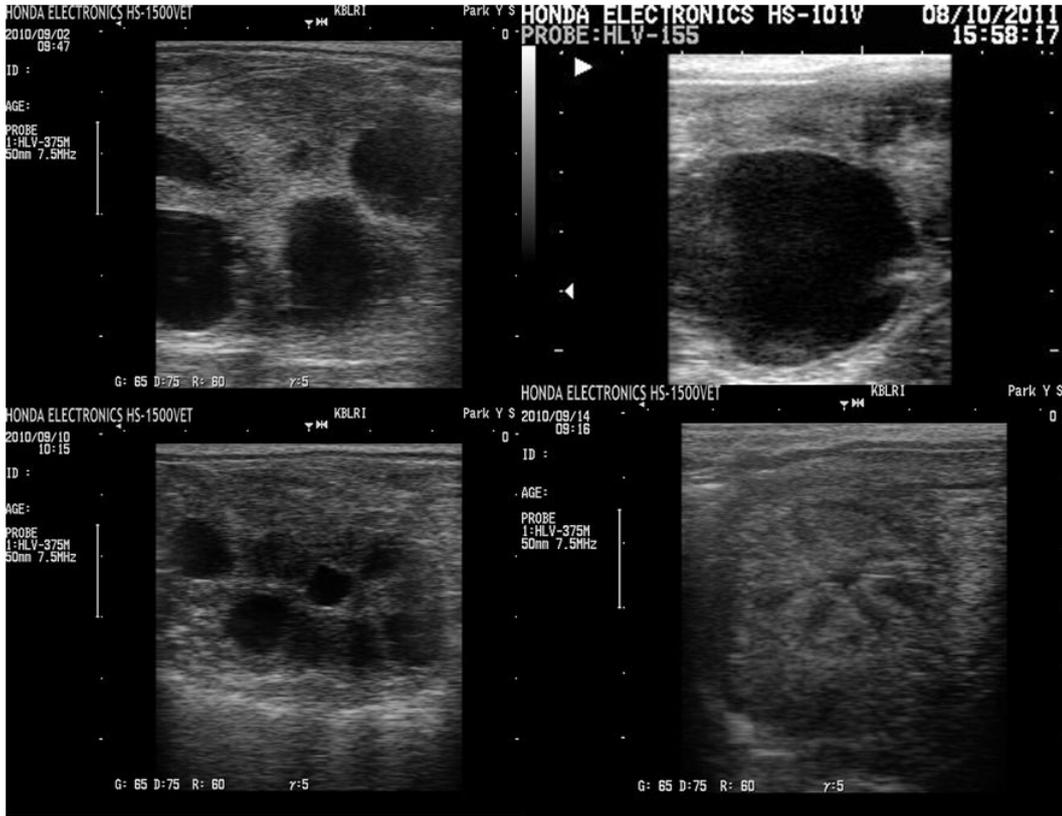


Fig 44. 발정 휴지기부터 발정기 자궁(Wheel shape), 발정기 난포(배란직전의 5cm follicle).

(나) 배란

말의 배란 시기는 말은 발정종료 전 24-48시간에 배란이 일어나며(Figure 45), 배란된 난자는 6-8시간 동안 수정능을 보유한다. 교배 후 5시간이 지나면 수정에 필요한 충분한 수의 정자가 난관팽대부에 도달하지만, 말 정자의 수정능획득에 관한 보고는 없다. 암말의 생식도관내에 주입된 정자는 72-120시간 동안 수정능을 보유한다. 교배적기는 자연교배의 경우 배란이 일어나기 1-2일전이다.

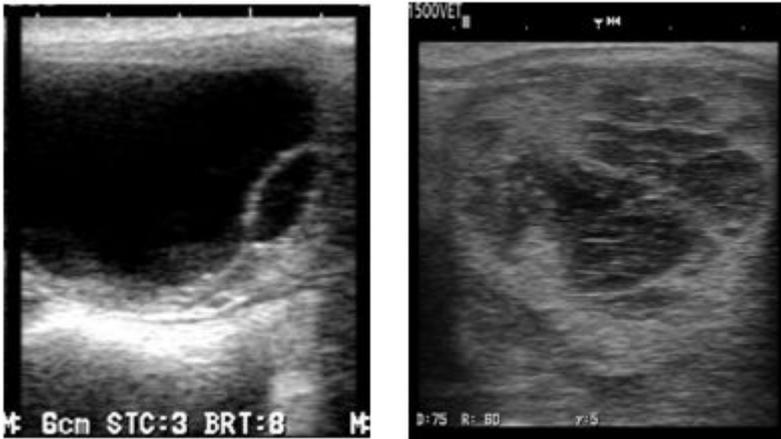


Fig 45. 발정기의 배란 직전 우세난포(좌), 배란직후 난소(우).

(다) 인공수정

인공 수정은 발정 징후를 나타내는 씨암말을 12시간 간격으로 난소의 크기를 측정하여 난소가 5 cm 이상에 도달하였거나 배란이 확인된 개체에 한하여 동결정액(40×10^6 / mL) 4 개 스트로우를 용해하여 씨암말의 자궁각 중간부분에 주입하였다. 임신 진단은 초음파 (Honda, Japan)를 이용하여 수정 후 15일과 40일에 수정 및 임신을 확인하였다(Figure 46).



Fig 46. Examination procedure of estrus, follicular development and artificial insemination in mare.

(라) 임신검사

말에서 수정은 난관에서 배란 후 30시간 이내에 이루어진다(Woods 등, 1990). 난자는 난관을 통해서 자궁으로 이동되며 약 6일이 소요된다. 자궁에 도착하게 되면, 말의 수정란은 둥근 형태로 존재하며 자궁 내강을 배란 후 17일째까지 자유롭게 유주한다. 이시기가 임신에 대한 초기 모체 인식이 발생하는 시기이다. 즉, 말 수정란의 수정 후 7일째부터 17일째까지 자궁 내에서 지속적인 움직임이 모체가 임신을 자궁의 모든 부분에서 인지하는데 반드시 필요하다(McDowell 등, 1985; Allen, 2001). 따라서 내막의 적당한 상태와 자궁 내강에 수정란의 자유로운 움직임을 방해하는 어떠한 물리적 장벽이 없는 상태가 말에서 초기 임신 유지의 선행조건이다. 자궁내막의 병인학적 변화뿐만 아니라 자궁내막 낭포와 격벽이 수정란과 모체간의 불완전한 인지와 임신유지의 실패에 원인이 된다.

인공수정한 암말은 수정후 15일에 1차 검사를 하여 쌍태유무를 판정하였다. 30-40일경에 2차 검사를 하여 임신확정 하였다. 임신검사는 HS-1500(Honda, Japan) 초음파 기기를 이용하였다. 인공수정후 단계별 초음파 검사결과는 Figure 47과 같다.

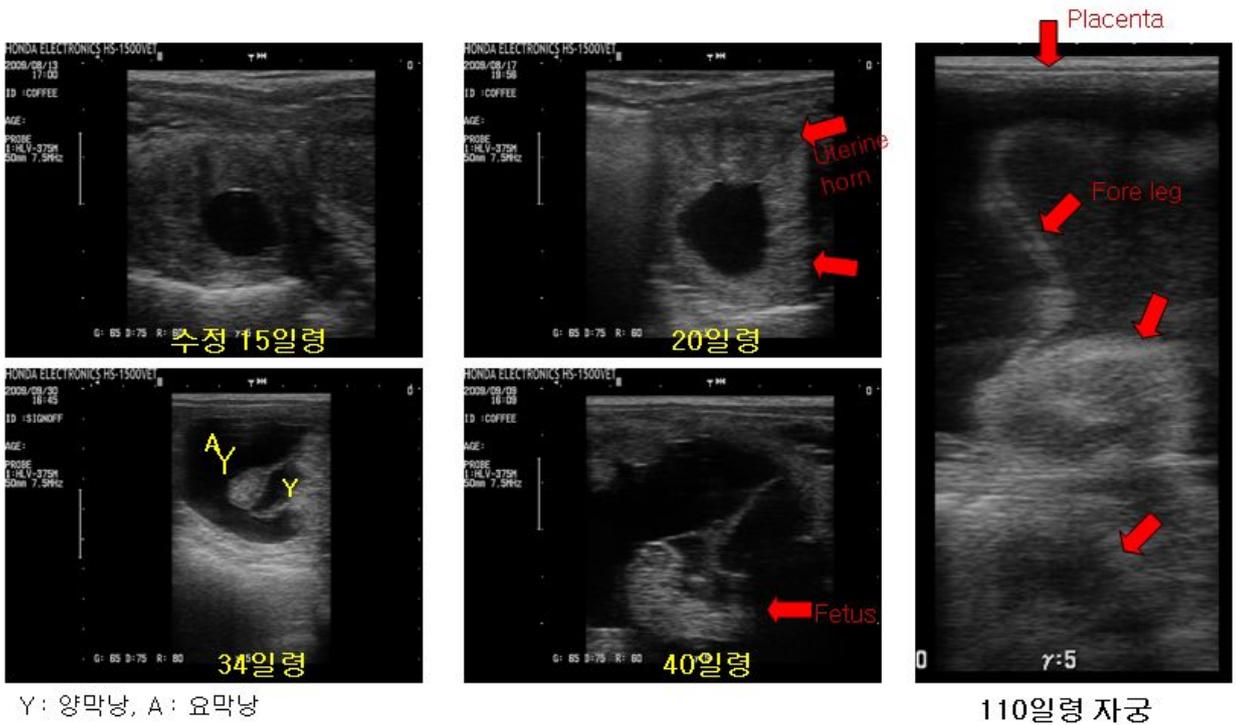


Fig 47. Examination of pregnancy and embryo development at different day during pregnancy.

(마) 임신말의 분만 및 망아지 체중 측정

임신말(’09년도 임신 4두)의 분만은 특별한 유도없이 자연적으로 유지하였다. 분만 후 망아지의 체중은 분만 직후 측정하였고, 만출된 태반은 형태와 무게를 측정하여 후산정제 여부를 판정하였다.

(바) 인공수정 대상 암말의 질병검사

인공수정을 위한 암말의 건강상태를 조사하기 위하여 분변에 대한 질병검사를 실시하였다. 분변은 시험농장 3개소에서 채취하였다. 분변검사는 경북대학교 수의학과 기생충학교실에서 하였다.

(1) 결과

(가) 인공수정을 위한 기생충 검사

인공수정을 위한 암말의 건강상태를 조사한 결과는 Table 25와 같다. 총 24두에 대하여 조사한 결과 외관상 특이 증상은 없었으나, 분변의 기생충 검사를 실시한 결과 총 10두에서 말 산통의 원인이 되는 원선충란(*Strongylus* spp.)이 발견되었다. 감염 등급에 따라 저감염 3두, 중감염 5두 및 고감염이 2두로 조사되었다. 조사된 농장에 대하여는 구충을 선행 한 후에 인공수정을 실시하였다.

Table 25. Analysis parasite in mare feces

Total heads	infected heads. (%)	Kind of parasite	Head (%)
24	10 (41.7)	<i>Strongylus</i> spp. +	3 (30)
		<i>Strongylus</i> spp. ++	5 (50)
		<i>Strongylus</i> spp. +++	2 (20)

* +: low, EPG<1,000; ++: moderate, $1,000 \leq \text{EPG} < 10,000$; +++: high, $\text{EPG} \geq 10,000$. EPG, eggs per gram of feces.

(나) 냉장 및 동결정액 활용 인공 수정

채취한 정액을 이용하여 인공수정을 실시한 결과 채취 직후(1시간) 희석정액에서는 60%, 냉장 운반(4시간) 후 희석정액에서는 50%의 임신율을 나타내었다. 한편 동결정액을 이용하여 인공수정한 결과 8두에서 4두가 임신하여 50%의 임신율을 나타내었다(Table 26~27, Figure 48~50).

암말의 인공수정에 사용한 정액의 제조방법에 따른 임신율을 조사한 결과는 Table 26과 같다. 냉장정액(Cooled-diluted)은 채취-희석 후 1시간 이내, 냉장운반정액(Cooled-transported)은 채취-희석-4℃냉장-6시간 운반, 동결정액(Frozen-thawed)은 채취-동결한 것을 각각 사용하였다. Cooled-diluted, cooled-transported 및 frozen-thawed 정

액을 이용하여 인공수정한 결과 암말의 임신율은 각각 60%, 50% 및 37.5%로서 cooled-diluted 정액의 것이 높은 경향이었으나 유의차는 인정되지 않았다.

말의 임신율이 자연종부는 80% - 90%이고, 인공수정은 임신율의 차이가 심하여 냉장-회석 정액(cooled-diluted)은 70% - 80%, 냉장-운반 정액(cooled-transported)은 60% - 70% 및 동결-용해 정액은 32% - 73%로 보고 되고 있다(Loomis, 2001; Vidament, 2005; Nielsen 등, 2008). 한편 인공수정 임신율에는 씨암말의 나이, 분만회수, 사양관리, 자궁내막 검사, 발정 유도, 발정 상태, 주입하는 정자수 및 수정 전 자궁상태 등이 영향을 미치고 (Vidament 등, 1997; Nielsen 등, 2008), 씨수말은 동결정액의 품질뿐만 아니라 임신율에도 영향을 미친다고 하였다(Müller, 1987; Vidament, 2005).

Table 26. Pregnancy rates of mares inseminated with cooled, cooled-transported or frozen-thawed semen

Semen types	Heads	Pregnancy	%
Cooled-diluted	10	6	60
Cooled-transported	8	4	50
Frozen-thawed	8	3	37.5

배란유도 및 Timed insemination 처리가 암말의 임신율에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 27과 같다. 자연발정의 임신율이 25% 였으나, 배란유도 및 timed insemination으로 임신율이 50%로 상승하였다(Table 27). 발정중기에 5cm의 난포크기가 hCG 투여 후 24시간 까지 유지되었고, 24시간째부터는 난포막이 분리되기 시작하는 것을 확인할 수 있었다. 42시간째에 corpus hemorrhagicum을 확인하였다. 임신율에 영향을 미치는 요인들 중에서 배란과 인공수정 시간의 관계가 매우 중요하다(Metcalf, 2007). 정자의 생존 시간을 고려하여 냉장정액은 배란전 48시간이내, 동결정액은 배란 전후 6 또는 12시간에 인공수정을 권장하고 있다(Sieme 등, 2003; Bedford-Guaus, 2007). 정확한 배란시점을 판단하기 위하여 6-12시간 간격으로 직장검사 또는 초음파검사를 하여 난포의 크기를 측정해야 하지만, 많은 노동력과 시간이 소요되므로 호르몬에 의한 배란시기 조절법의 활용이 증가 되고 있다(Metcalf, 2007). 발정기 암말은 난포의 성장주기에 따라서 hCG 또는 deslorelin 투여 후 36-42시간에 배란되는 비율이 94%이다(Samper, 2008). 한편 동결정액의 인공수정에는 정자수, 수정 회수 및 시간에 따른 차이는 있으나 배란유도를 이용하여 46% - 67%의 임신

율이 보고되었다(Morris 등, 2003; Barbacini 등, 2005; Metcalf, 2005; Hemberg 등, 2006). 본 연구에서 배란유도를 통하여 임신율이 향상되어(Table 27) 향후 동결정액을 이용한 말의 인공수정에 활용도가 높을 것으로 생각된다.

Table 27. Effect of natural ovulation or induced ovulation and timed insemination on pregnancy rate of mare inseminated with frozen-thawed semen

Ovulation	Heads	Pregnancy	%
Natural	8	2	25
Induced	8	4	50

동결정액의 인공수정시 희석액의 추가 투여가 임신율에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 28과 같다. 희석액은 skim milk extender로서 정자 냉장에서 사용하는 것과 동일하게 제조하였다. 미첨가 임신율이 10%였으나 공동첨가로 임신율이 40%로 높아졌다. 유의차는 없었다.

Table 28. Pregnancy rates of mare inseminated using frozen-thawed semen supplemented with or without preservation buffer into uterus

Buffer	Heads	Pregnancy	%
Without	10	1	10
With	10	4	40

말 인공수정에서 월별 임신율을 조사한 결과는 Figure 48과 같다. 5월부터 8월까지 인공수정을 실시하였다. 임신율이 5, 6, 7 및 8월에 각각 25%, 33%, 33% 및 50%로서 8월이 가장 높았으나 유의차는 없었다.



Fig 48. Effect of month performed insemination on pregnancy of mare.

(다) 분만결과

'09년도에 인공수정한 결과 및 '10년도 분만 및 망아지 생존 결과는 Table 29와 같다. 임신율은 냉장희석정액이 60%, 냉장운반정액이 50% 및 동결융해 정액이 37.5%였다. 분만은 총 9두를 하였으나 생후 60일까지 생존한 망아지는 8두였다. 국내 최초로 냉장운반정액을 이용하여 1두 및 동결정액을 이용하여 3두의 망아지가 태어났다 (Figure 49~50). 3두는 건강하게 성장하고 있지만, 동결정액으로 태어난 1두는 생후 1일째에 폐사하였다.

Table 29. Pregnancy and parturition results

Types	Insemination (head)	Fertility (%)	Pregnancy (%)	Parturition	Live at day 60
Cooled-diluted	10	6 (60.0)	6 (60.0)	6	6
Cooled-transported	2	1 (50.0)	1 (50.0)	1	1
Frozen-thawed	8	4 (50.0)	3 (37.5)	2	1
Total	20	11 (55.0)	10 (50.0)	9	8



Fig 49. Picture of placenta and weight measurement.



Fig 50. The first foal produced by cooled-transported semen (Left) and frozen-thawed semen (center and right).

(라) 동결정액 유래 망아지 폐사 및 원인

폐사한 망아지는 마명 signoff에서 태어난 망아지로서, 인공수정은 '09.8.26일에 실시하였고, 분만은 '10.7.15일에 34kg으로 태어났다. 출생직후 맹안 증상으로 어미 젖을 찾지 못하여 초유섭취가 불완전 하였다. 익일인 7.16일에 쇼크에 의한 기립불능으로 폐사하였다. 부

검결과는 Figure 51과 같다. 폐사의 원인은 선천적 수뇨관 기형에 의한 뇨독증으로 추정되며, 부검에서 수뇨관 기형, 신장의 종대 및 수종, 소장의 중첩 및 맹장의 협착이 확인되었다. 병리조직검사 결과 사구체 주위의 급성신우신염, 간의 농양 및 혈관주위의 염증세포 침윤이 확인되었다(Figure 52). 상기의 결과를 종합하면 본 망아지는 하생성 급성신우신염에 기인한 뇨독증 및 쇼크로 폐사한 것으로 추정된다.

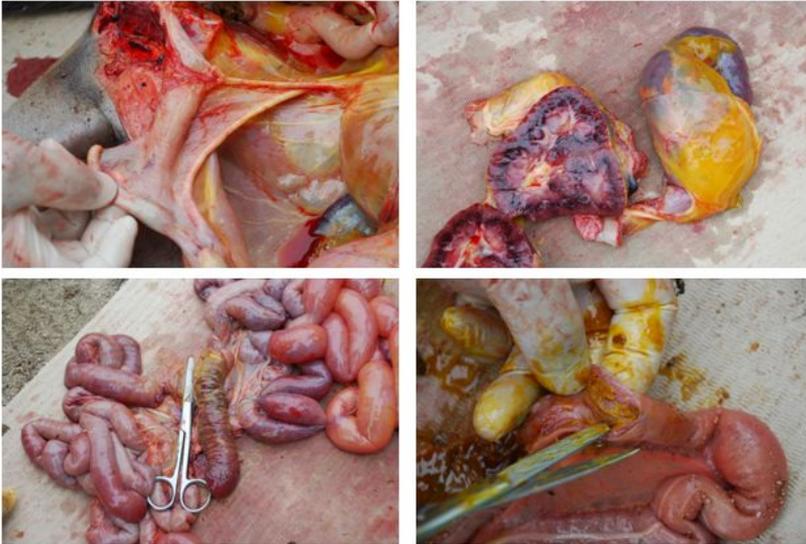


Fig 51. Pictures of internal organs from dead foal.

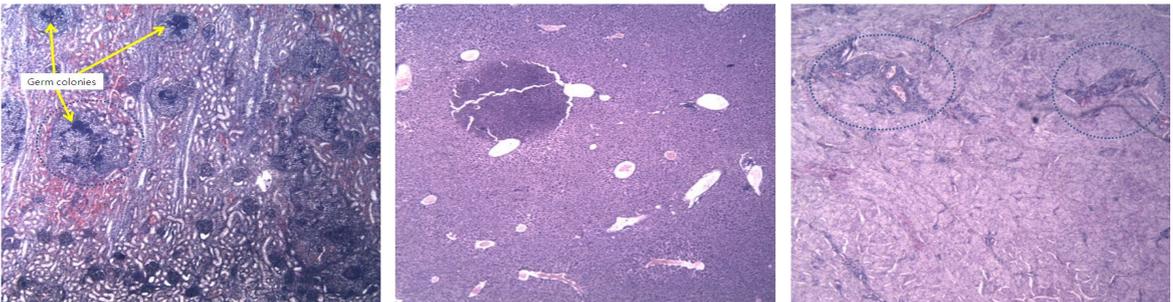


Fig 52. Pictures of kidney(left; acute pyelonephritis), liver(center; liver absces) and urachus(right; infiltration of inflammatory cells around blood vessel) of deal foal.

(마) 난포크기와 임신율

배란유도 시점의 난포 크기가 임신율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Figure 53과 같다. 난포 크기가 4cm 미만에서는 임신율이 0% 였으나, 4cm 이상에서는 60%였다.

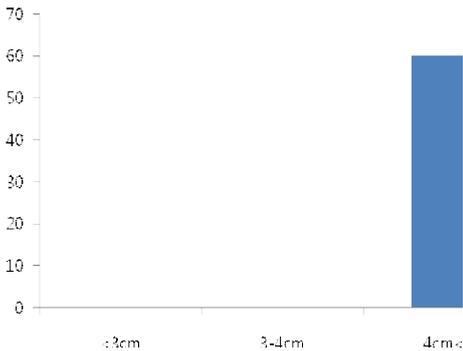


Fig 53. Effect of follicular size at induced ovulation on pregnancy rate during equine frozen-thawed semen artificial insemination.

인공수정 시점의 난포크기가 임신율에 미치는 효과를 조사한 결과는 Figure 54와 같다. 인공수정 시점에 난포 크기가 5cm 미만은 임신에 실패하였으나, 5cm 이상에서 60%의 임신율을 나타냈다.

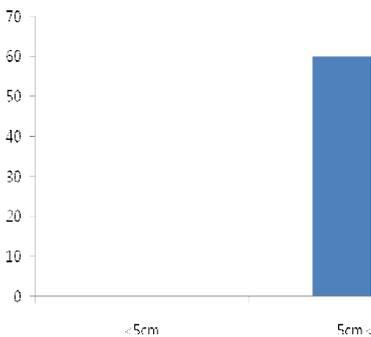


Fig 54. Effect of follicular size at insemination on pregnancy rate during equine frozen-thawed semen artificial insemination.

다. 발정 동기화

(1) 재료 및 방법

(가) 발정유도

발정유도는 Cidr-plus, Regumate(oral progesterone) 또는 PGF2a를 각각 이용하였다. Cidr-plus (1.9g progesterone)을 암말의 질내에 삽입(Day 0)한 후 7-10일 후에 제거하였다. 삽입 7일째부터 난소를 검사하여 황체가 형성되고 활성화된 난포의 존재가 확인되면 PGF2a 1 ml I.M. 하여 발정을 유도하였다. Regumate는 0.044 mg/kg 용량으로 매일 사료에 혼합하여 9일간 급여하였다. 발정은 PGF2a 주사로 유도하였다. PGF2a는 번식말의 난소를 검사하여 황체와 활성화된 난포 2cm 이상이 존재하는 경우에 1 ml I.M.하여 발정을 유도하였다(Figure 55).

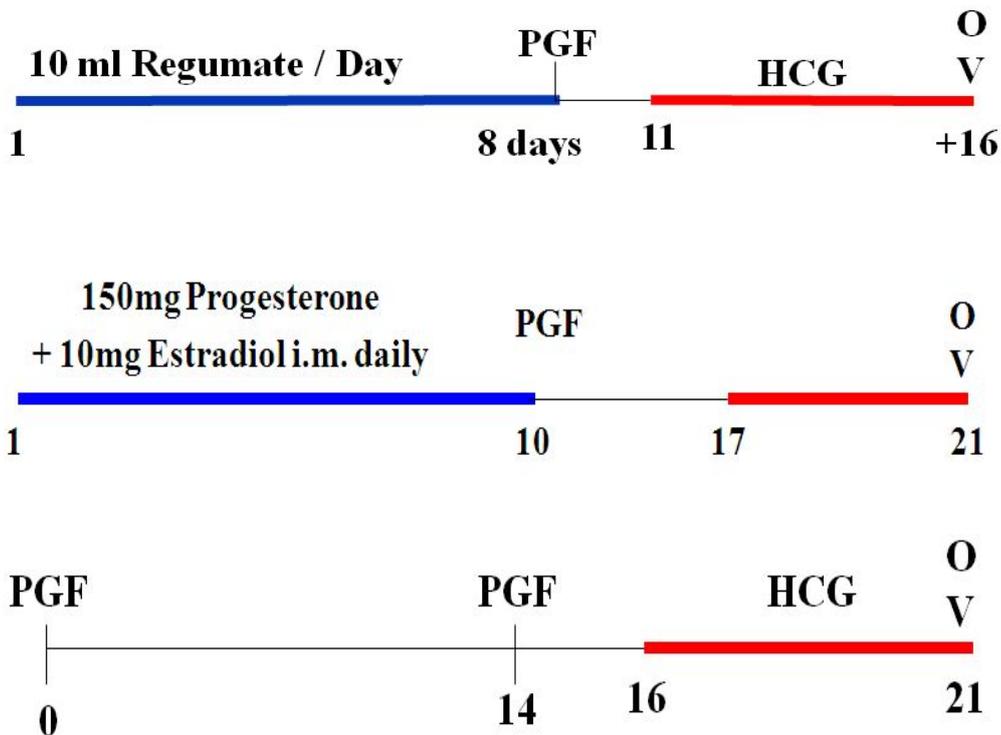


Fig 55. Procedures of donor and recipient synchronization in mare.

(나) Timed insemination

발정기 번식말의 난소는 12시간 간격으로 검사를 하여 난포가 3.5 cm 이상으로 판단될 때 배란을 유도하기 위하여 hCG 500iu/100kg I.V. 하였다. 인공수정은 hCG 투여 후 24시간 및 40시간째에 2회 실시하였다. hCG 투여후 난소 변화는 Figure 56과 같다.

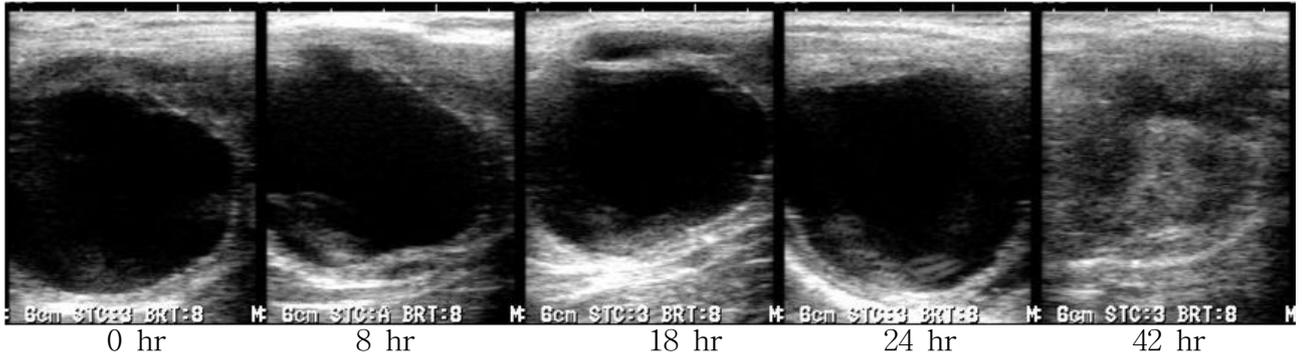


Fig 56. Picture of follicle induced ovulation using hCG.

(다) 호르몬 분석

발정유도 및 발정기 난소 상태에 따른 호르몬 변화를 조사하기 위하여 progesterone과 estradiol을 각각 분석하였다. 시험 샘플은 경정맥으로부터 채취하여 serum을 분리 후 -20°C에서 분석시까지 보관하였다. 호르몬 분석은 전문 분석기관에 의뢰하여 분석하였다.

(2) 결과

(가) Cidr-plus 발정동기화 단계별 난소 및 호르몬 변화

발정동기화 처리 방법에 따른 호르몬 변화를 조사한 결과는 Figure 57과 같다. 발정동기화는 Cidr-plus 삽입 및 PGF2a 투여를 이용하였다. Cidr-plus 삽입부터 혈중 프로제스테론 농도가 상승하여 7일째 PGF2a를 투여 황체 퇴행을 유도한 이후 프로제스테론 농도가 급격히 감소하였다. 발정증상은 미약하게 발현되는 경향으로 외부적인 징후를 관찰하기 어려웠다. 따라서 전문시설에서 전문가의 관리하에서는 사용이 가능하겠지만 일반 농가 및 승마장에서는 사용이 어려울 것으로 판단된다.

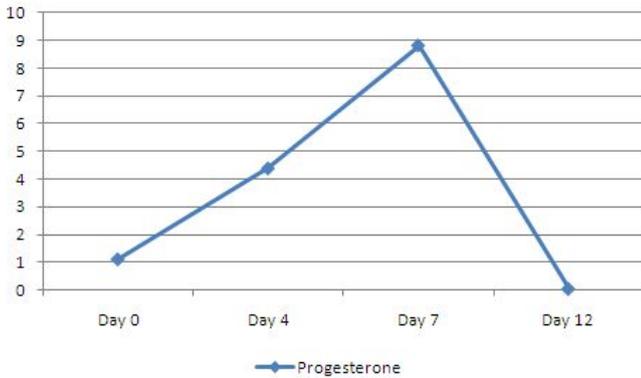


Fig 57. Concentration of progesterone during Cidr-plus insertion in mare.

(나) Regumate 발정동기화

Regumate는 투여 전, 투여 후 3일, 6일 9일 및 PGF2a 투여 후 3일째에 각각 평균 0.04 ng/ml, 0.03 ng/ml, 1.59 ng/ml, 8/84 ng/ml 및 0.93 ng/ml이었다(Figure 58). Regumate 투여 후 난소변화는 Figure 59와 같다.

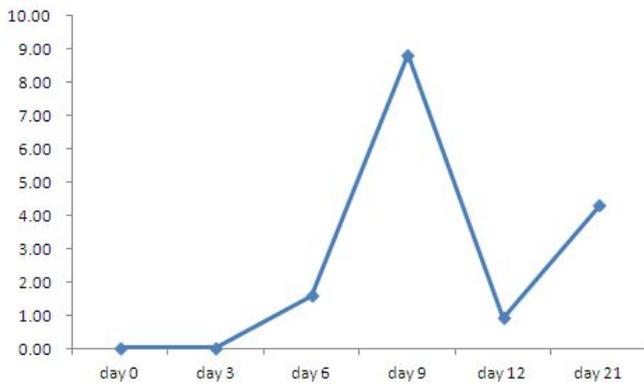


Fig 58. Concentration of progesterone during supplementation of regumate.

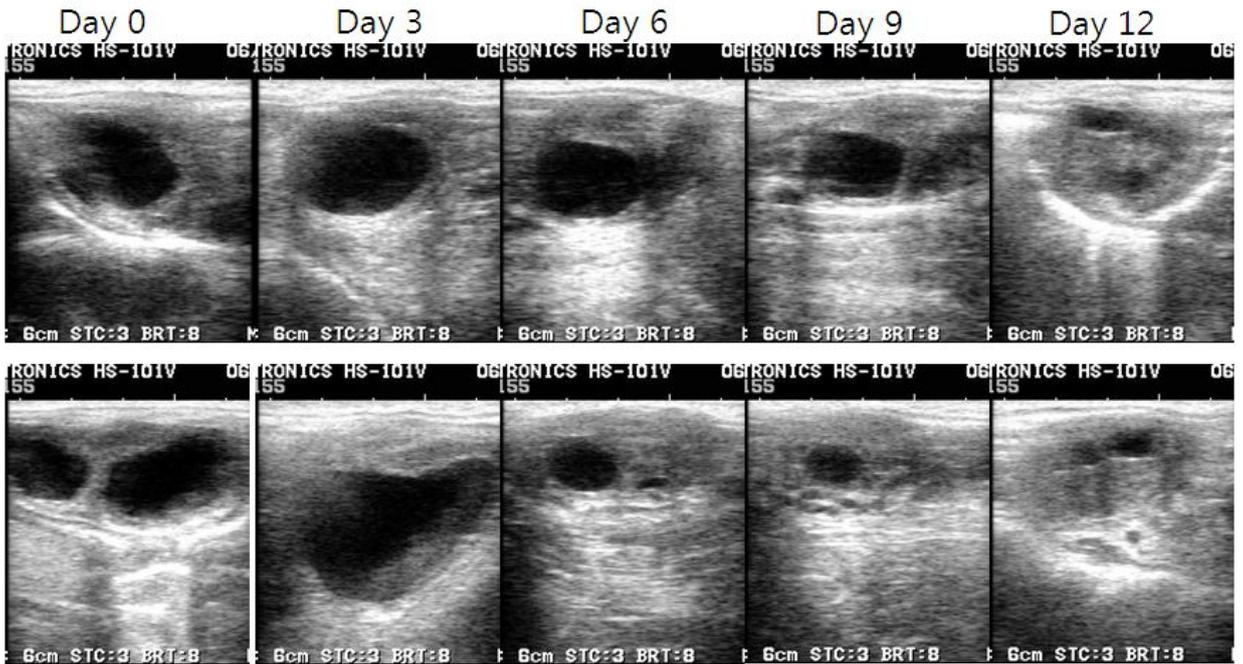


Fig 59. Picture of ovary during supplementation of regumate.

(다) PGF2a 발정동기화 단계별 난소 및 호르몬 변화

PGF2a를 이용하여 발정유도를 시도한 결과는 Figure 60 및 61과 같다. PGF2a는 황체 퇴행을 유도하는 호르몬으로 Fig 16과 같이 황체 존재시 투여로 황체 퇴행을 유도하여 발정을 유도하였다. 발정이 발현되는 시기는 난포의 크기가 3cm 이상에서는 3-4일이었으나, 난포의 크기가 2cm 미만에서는 7일정도 소요되었다. 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 호르몬 농도는 투여 시작부터 급격히 감소하는 경향이였다.

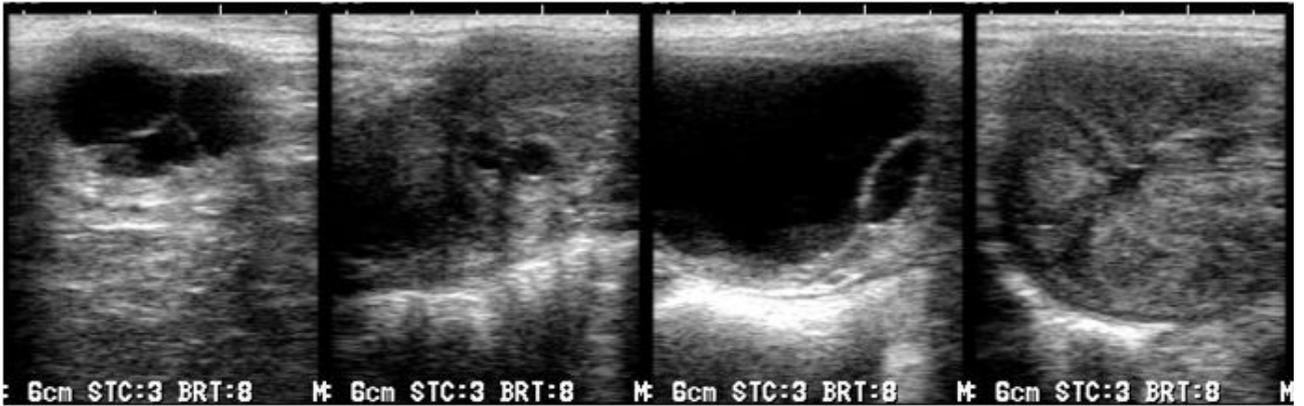


Fig 60. Ovary and uterus change at onset of PGF2a injection and estrus (Right ovary, Left ovary at PGF2a injection, ovary and uterine horn at estrus).

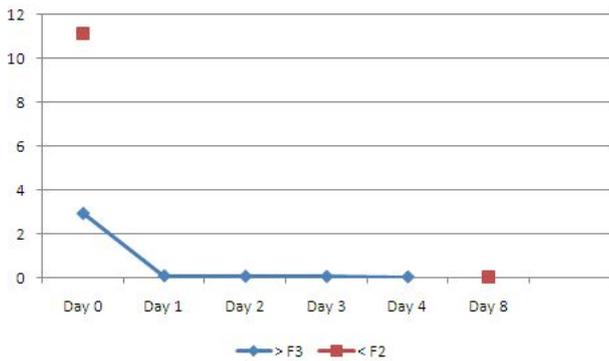


Fig 61. Concentration of progesterone during estrus induction using PGF2a.

(라) hCG 배란유도 난소 및 호르몬 변화

발정이 유도된 암말에서 배란을 정확한 시간에 유도하기위하여 hCG를 투여한 결과 호르몬 농도는 Figure 62~63과 같다. 발정기의 암말에서 난포크기가 4cm 이상에 도달 하였을 때 hCG를 투여하였다. 투여 직후부터 급격히 감소하는 경향이였다.

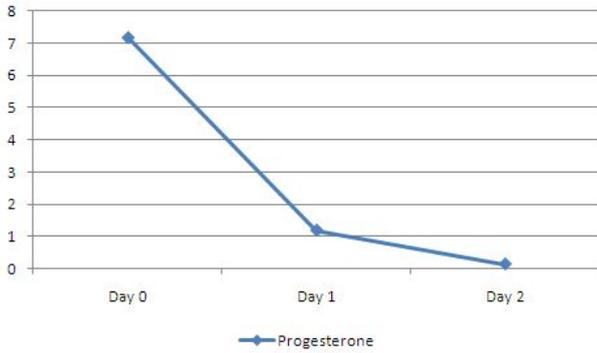


Fig 62. Concentration of progesterone during ovulation induction using hCG.

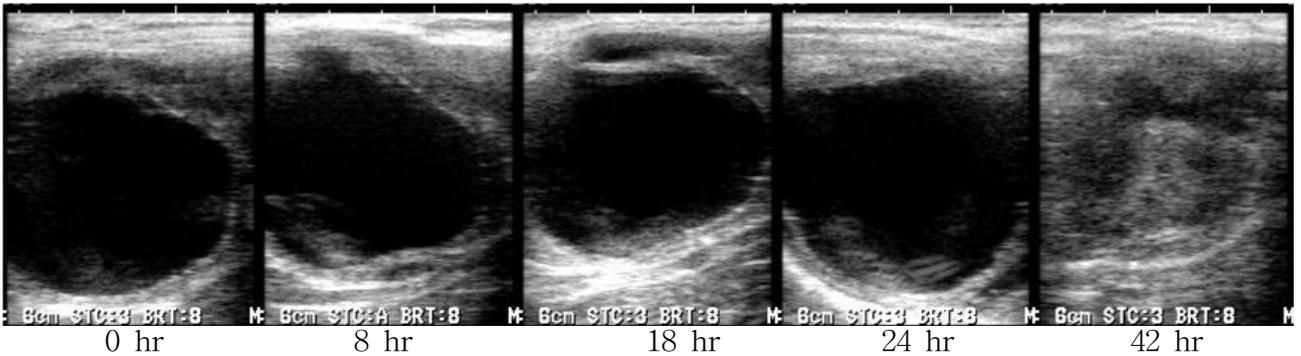


Fig 63. Picture of follicle induced ovulation using hCG.

(마) 발정기 난포 크기에 따른 프로제스테론과 에스트로젠 농도

발정기의 말에서 혈액내 프로제스테론 농도는 난포의 크기가 각각 2cm, 3cm 및 4cm에서 평균 9.09 ng/ml, 13.04 ng/ml 및 1.40 ng/ml로서 4cm에서 급격하게 감소하였다. 한편 에스트로젠농도는 각각 평균 59.20 pg/ml, 48.5 pg/ml, 및 41.07 pg/ml로서 차이가 없었다 (Table 30).

Table 30. Concentrations of progesterone and estradiol of different follicle size during estrous in equine

Follicle(cm)	Progesterone(ng/ml)	Estrodiol(pg/ml)
2	9.09±2.91	59.02±14.80
3	13.04±1.82	48.53±8.16
4	1.40±0.68	41.07±1.37

라. 수정란 이식

(1) 재료 및 방법

(가) 발정동기화 및 배란유도

발정동기화 및 배란유도는 경구용 프로세스테론인 Regumate 또는 PGF2a로 유도하였으며, 배란은 hCG를 투여하여 유도하였다.

(나) 수정란 회수

수정란 채취를 위하여 공란마는 번식이상이 없는 젊은 암말(5-7세)을 사용, 전체적인 건강상태가 좋고, 번식주기가 정상, 선정하기 전에 신체검사를 하여 이상이 없는 것을 선발하였다. 한편 수란마는 공란마의 선정 기준과 비슷한 기준으로 전체적인 건강상태가 양호하고 번식주기가 정상인 것을 선발하였다. 본 연구에 사용된 공란마 및 수란마는 연구농장인 곰바위목장(경북 영주 소재)에 사육중인 5-7세 더러브렛 암말로서 공란마 3두와 수란마 5두를 선정하였다.

수정란의 회수과정은 Figure 64~65와 같다. 그 순서는

- ① 공란말을 잘 보정하고 꼬리는 묶어서 옆으로 고정시킨다.
- ② 외음부 세척 및 소독
- ③ large bore 폴리카테타를 경관을 통해서 삽입하고 공기를 주입
- ④ internal cervical os에 위치 될 때까지 cuff를 뒤쪽으로 당긴다.
- ⑤ 1%의 FCS가 포함된 DPBS 1-2 리터의 관류액을 이용하여 자궁을 관류한다.

- ⑥ 수정란을 회수하기 위하여 관류액을 필터에서 거른다.
- ⑦ 관류는 적어도 3회 반복한다.
- ⑧ 회수된 수정란을 현미경에서 확인하면, 크기, 등급을 판정하여 기록한다.

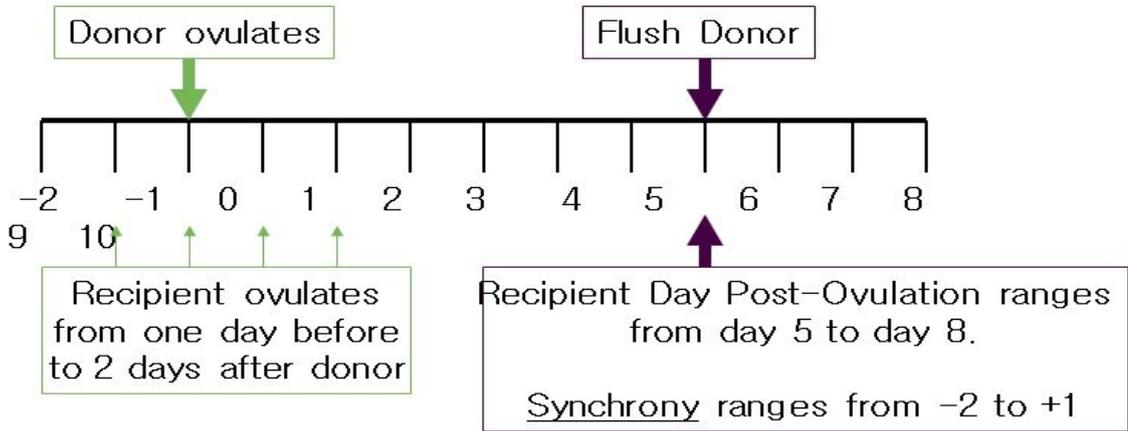


Fig 64. Time schedule of embryo transfer.



Fig 65. Procedures of embryo collection in mare.

회수된 대부분의 수정란은 초기에서 확장 배반포 단계이고, 크기는 0.4-1.0 mm 정도 이다(Figure 66).

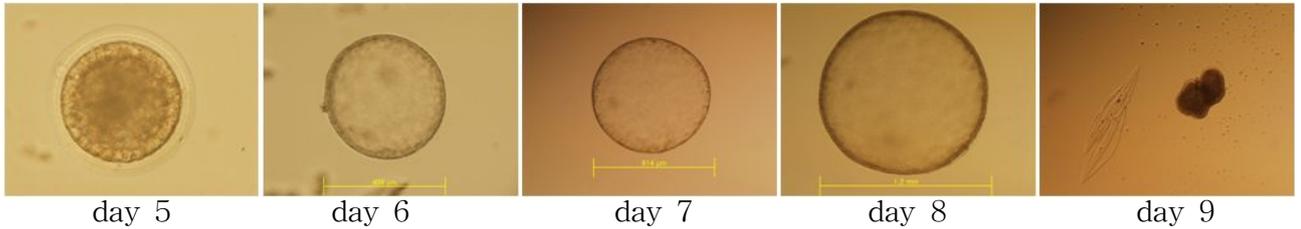


Fig 66. Pictures of equine embryos at different development day after artificial insemination.

(다) 수정란 이식

회수한 수정란의 이식과정은 인공수정과 유사하며 관류된 수정란은 0.5mm 플라스틱 스트로우에 장착한다. 대리말은 자궁의 상태를 최적으로 유지하기 위하여 공란말의 발정과 비교하여 발정 1일전이나 3일이내 있는 것으로 한다. 자궁과 경관 조직의 탄력을 이식전에 측정하여 대리말의 생식기는 공란말의 것과 동일한 상태로 동기화 한다. 다음은 비수술적 이식 과정(Figure 67)이다.

- ① 대리말의 보정
- ② 직장검사를 이용 자궁 및 경관의 탄성을 검사
- ③ 수정란을 스트로우에 장착
- ④ 수정란을 자궁체에 주입한다.



Fig 67. Procedures of embryo transfer in mare.

(2) 결과

공란말 8두에 발정동기화를 유도하여 6두(87.5%)가 발정이 유도되었고, 6두가 배란유도 및 인공수정에 성공하였다. 인공수정 공란말 중 5두가 채란에 이용되어 3두(60%)에서 채란에 성공하였다(Table 31).

Table 31. Results of estrous induction, artificial insemination and embryo collection in equine

No.	Estrus (%)	Artificial Insemination (%)	Collection (%)
8	6 (87.5)	5 (83.3)	3 (60.0)

채란된 수정란은 수정 후 배양 5일째 150 μm , 6일째 409 μm , 7일째 814 μm 및 8일째 1.2 mm로 발달한 후 부화하였다(Figure 68). 한편 채란된 7일째 수정란 2개를 수란말 2두에 이식하여 1두가 임신에 성공하였다.

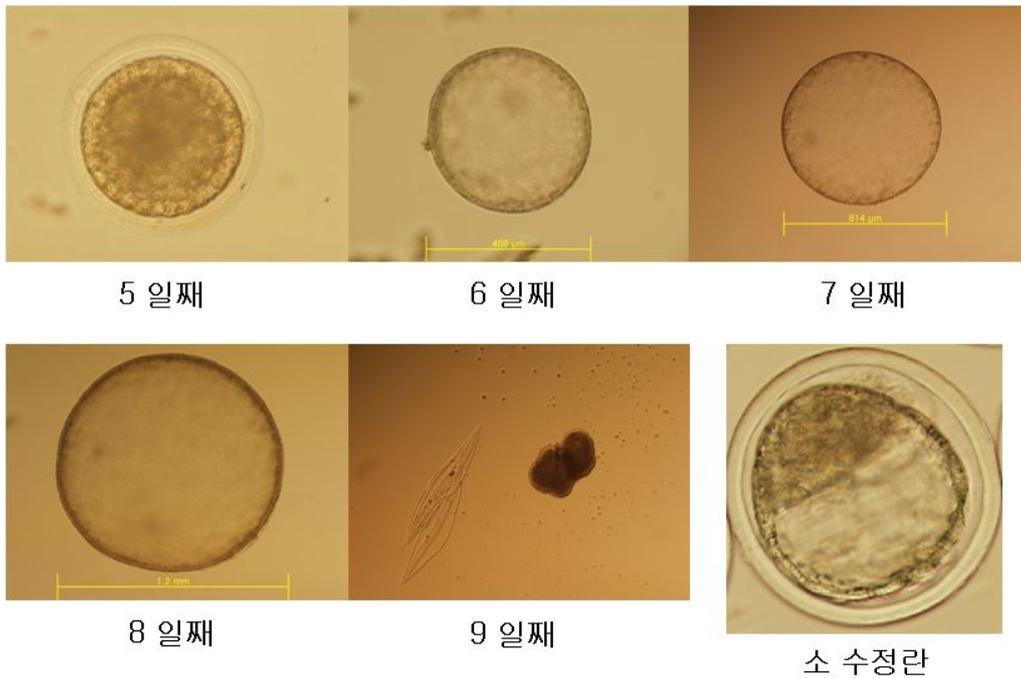


Fig 68. Pictures of equine embryos at different development day after artificial insemination.

한편 공란말의 혈중 프로제스테론 및 에스트로젠 농도는 각각 평균 7.91 ng/ul 및 24.45 ng/ul이었고, 수란말의 혈중 프로제스테론 및 에스트로젠 농도는 각각 평균 16.06 ng/ul 및 49.13 ng/ul였다(Table 32).

Table 32. 채란 및 이식 시의 공란말과 수란말의 혈중 호르몬 농도

	Progesterone	Estrodiol
Donors	7.91±0.37	45.45±12.65
Recipients	16.06±3.27	49.13±10.09

마. 인공수정 및 수정란이식 과정에서 발생한 암말의 이상

국내에서 사육되고 있는 암말의 번식장애에 관한 보고는 없었다. 본 연구과정에서 확인된 암말의 이상에는 자궁내 이물질 존재, 미배란성 난포 및 조기유산이었다. Figure 69(좌)와 같이 자궁에 이물질이 존재하는 경우는 인공수정 후 임신이 되지 않았고, Figure 69(우)와 같이 난소에 미배란성 난포가 존재하는 경우는 발정이 발현되지 않았다. 또한 일반 농가에서는 수말과 암말의 관리가 제대로 되지 않아 발정기때에 잠시 합사한 것으로 암말이 임신하여 인공수정을 위하여 발정유도나 발정 후 인공수정 시에 정확한 검사를 실시하지 않는 경우는 유산의 위험성도 있었다(Figure 70).

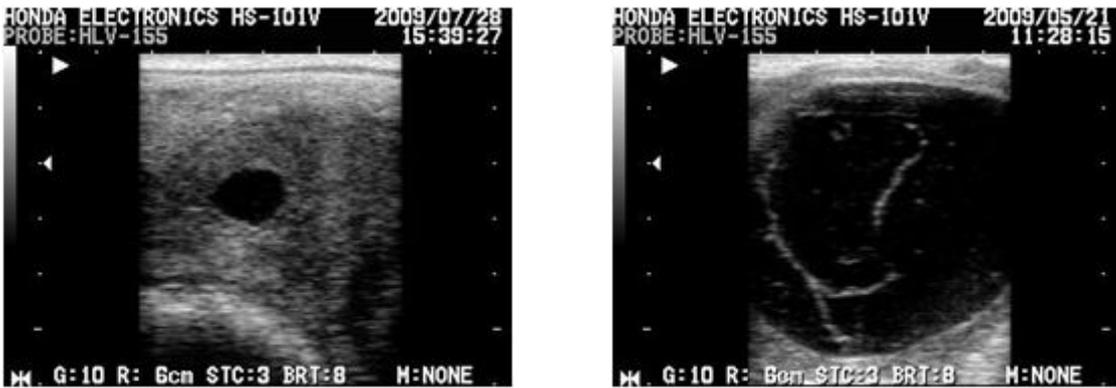


Fig 69. Abnormal uterine and unovulatory follicle.



Fig 70. Aborted fetus of mare at 70 day after conception.

제3절 승용마 생산·육성 기반 및 실용화 체계 구축

1. 서론

자연교배 혹은 인공수정이나 수정란 이식을 통해 태어난 망아지를 승용마로 활용하기 위해서는 무엇보다도 사람과의 교감을 통해 목적하는 용도에 맞게 육성을 시켜야 한다. 말을 육성시키는 것을 순치(길들여 목표로 하는 상태에 도달하게 하는 것)라 한다. 순치는 말을 굴복시키는 것은 아니다. 말에 시키는 것이 아니라 말이 그렇게 하도록 대하는 자세가 중요하다. 순치를 순조롭게 진행하기 위해서 가장 중요한 것은 사람과 말과의 신뢰 관계 구축이다.

말 취급자나 기승자는 말에 접할 때 항상 리더라는 사실을 유의하지 않으면 안 된다. 이것은 말이 두려워하는 존재가 되는 것은 아니고 무엇인가 일이 일어났을 때에 사람의 지시가 존중되는 것을 의미한다.

순치는 단계적으로 스텝을 밟아서 진행시킨다. 항상 먼저 말의 순수한 눈을 바라보고서 대화를 한 후 훈련을 진행토록 한다. 이렇게 함으로서 말은 쉽게 사람을 따르고 일상을 벗어나 말과 함께 지내면서 정신적 여유를 찾고자 하는 승마인들의 요구에 부응할 수 있게 된다.

망아지 길들이기의 포인트에 대해 정리해 보면, 먼저 망아지에는 생후 가능한 한 빠른 시기에 접촉을 한다. 출생 후 가능한 한 빨리 망아지에 접해 “각인”을 실행함으로써 취급이 용이하게 된다. 생후 3일까지 충분히 손질을 하는 것이 그 후의 순치나 길들이기에 대해서도 막대한 영향을 준다. 다만, 과도한 “각인”은, 모마와 망아지의 스킨십의 시간을 방해해 모성의 발달을 저해하는 한 요인이 되기도 하므로, 특히 초산인 경우에는 필요 최소한의 “각인”에 멈추도록 한다. 둘째 말과 사람과의 신뢰 관계 구축에 최선을 다한다. 말을 굴복시키는 것이 아니라, 말이 사람의 요구에 따르면 즉시 압력을 해제토록 하여 온순하게 되도록 대하는 것이 중요하다. 말을 정신적으로 엄하게 몰아 패닉 상태에 빠뜨려서는 안 된다. 말은 항상 여유가 있는 자유로운 상태에 있는 것이 이상적이다. 이를 위해서 망아지를 애무하고 부드럽고 상냥한 말을 걸도록 유의한다.

국내에서 승용말 생산을 희망하는 말 생산자에게 접목시킬 수 있고 실용화될 수 있도록 씨암말의 관리와 말의 순치 및 망아지의 면역증강 방법에 대해 논의하고자 한다.

2. 연구개발의 방법 및 결과

가. 인공수정 후 임신진단 및 모니터링으로 씨암말의 생산성 향상 기술 확립

(1) 씨암말 생산성 향상을 위한 관리기법

우수한 말 관리와 성공적인 교배 및 자마 출산시기를 위한 중요한 열쇠는 연중 관리 과정이다. 양호한 말의 관리는 양질의 출산, 예방약 투여, 번식검사, 처치 그리고 적절한 기록 관리 등을 포함한다. 최상의 수의적 관리는 다음의 기본적인 축산관리 사항들이 이행되지 않으면 시술 될 수 없다.

(가) 임신한 씨암말은 다른 무리의 말들로부터 격리 되어야 하고 목장 보유 씨암말은 위탁 씨암말로부터 격리 되어야 한다.

(나) 대리 수유마는 분만마사에 수용되어서는 안되며, 씨암말들은 가능한 활동성이 적어야 한다.

(다) 질병에 대한 감염위험은 말 두수가 많을수록 증가하며, 경주마 및 승용마는 씨암말로부터 격리 수용되어야 한다.

(라) 임신한 씨암말이 다른 곳으로 이동해야 한다면, 분만 이전에 생활할 곳의 각종 곤충에 대한 면역력을 갖게 하기 위해 분만 4~6주 전에는 그곳으로 이동해야만 한다.

(마) 신규 씨암말은 1개월 가량 격리되어야 한다.

(바) 마사내에 말을 두는 것은 말의 건강에 좋지 않을 수 있다. 질병마의 대부분은 마사 채류 시 발생하는 경우가 많다. 말은 가급적 많은 시간을 야외공간에 있으면 있을수록 좋다.

(사) 마사의 쾌적한 환경유지를 위한 기본요소들은 첫째도 환기, 둘째도 환기, 셋째도 환기이다. 마사공간을 너무 크게 그리고 자동화시키는 것은 항상 좋은 것은 아니다.

(아) 가능한 질환마는 격리시킨다.

(자) 임신말에게 48시간 동안 사료를 주지 않으면 자궁에 영향을 주게 되고, 결국은 태아에 영향을 미친다.

(2) 기생충 구제 (매 2개월마다)

(가) 기생충을 구제하는 빈도는 말의 두수, 기온, 강우량, 목초지 상태의 상황에 따라 달라진다.

(나) 필요보다 자주 기생충 구제를 하는 것은 비용이 많이 들 뿐만 아니라, 기생충의 빈도를 증가시킬 수 있다.

(다) 배분 장소는 자주 바뀌주는 것이 좋다.

(라) 최근에 사용되는 대부분의 구제약은 임신기 어느 시기에도 안전하다.

(마) 마분줍기 기계는 방목초지의 이용률을 높이고, 적은 회수의 구충제 투입 등의 경제적인 효과가 있다.

(바) 1년동안 배분중의 기생충약을 여러번 조사하는 것은 기생충 양을 조절하는 방법이 될 수 있다.

(3) 시 정

(가) 교배 및 생산을 성공적으로 하는 것보다 더 중요한 것은 없다.

(나) 경험이 많은 사람이 시정을 해야 한다.

(다) 신생자마를 출산한 씨암말은 발정했을 때 감지하기 힘들다.

(라) 씨암말에 대해서는 모든 사항을 알고 있어야 한다.

(마) 시정을 매일 실시한다.

(바) 교배시즌 이전부터 시정을 시작한다.

(사) 기록관리를 철저히 한다. 지난해의 기록도 가지고 있어야 한다.

(아) 씨암말의 일반적인 건강상태를 한눈에 볼 수 있는 능력을 키운다.

(자) 외음부를 항상 관찰한다.

(4) 발정유도

이른 시기에 씨암말을 교배시키고 적은 회수로 교배를 성공시키기 위해서는 발정유도가 필요하다. 인공적인 조명은 발정유도를 위해 가장 많이 그리고 널리 이용되는 방법이다. 호르몬 조절은 특정상황에서 매우 효과적이다. 인공조명을 이용하기 전에 야간에 씨암말을 입사시키고, 사료를 잘 급여하는 것이 매우 중요하다.

(5) 조명

(가) 씨암말은 발정 사이클이 훨씬 일찍 온다.

(나) 빛을 쬐는 시간은 17시간 정도가 필요하다.

- (다) 일몰 3시간 후부터 실시한다(빛이 있을 때는 효과가 없음)
- (라) 씨암말의 두부에서 3.0m정도 높게 하여 조명을 비춰주는 것이 좋다.
- (마) 200와트 전구가 효과적이다.
- (바) 전구를 단 패독도 효과가 있다.
- (사) 12월 첫째주에는 늦어도 시작해서 4월 30일까지 실시한다.
- (아) 또한 임신마에게는 분만 시기를 앞당기고, 자마 크기를 크게 하고, 분만 발정 휴지기가 없다.

(6) 임신 씨암말의 혈청 성선호르몬

검사는 ± 40 일과 ± 120 일까지의 임신을 결정하는데 도움을 준다.

- (가) 검사는 씨암말이 자궁컵이 형성된 이후(36~40일경)에 유산을 한다면, 가짜 양성을 나타낸다.
- (나) 씨암말이 유산된다면, 그리고 PMSG 검사가 양성이라면 자궁컵은 여전히 존재하고, 씨암말은 ± 90 일 동안 발정으로 되돌아가지 않을지도 모른다.
- (다) 프로스타글란딘의 반복된 증상들은 씨암말의 발정을 유도하고, 씨암말을 임신할 수 없게 한다.

나. 임신 씨암말의 사양관리

임신말의 관리는 통상 3단계(임신초기, 임신중기, 임신말기) 기간으로 나눌 수 있다. 첫 2개월 동안에는 태아를 유산시킬 수 있는 모든 환경조건에 노출되지 않도록 하는 것이 중요하다.

(1) 임신초기

(가) Caslick 수술 : 씨암말의 질의 모양이 정확히 맞지 못하거나 음순이 비뚤어진 경우 Caslick 수술을 통해 교정하여야 한다. 음순외부의 끝을 봉합하는 Caslick 수술은 씨암말의 생식 건강성을 향상시키는 간단하고 효과적인 방법인데도 불구하고 소홀히 하는 경우가 있다.

(나) 쌍태 임신 진단 : 대부분의 동물은 건강한 쌍생자를 출산하지만 말은 한정된 스페이스와 영양으로 인해 쌍태를 출산할 수 없다. 수의사는 초음파검사를 통해 쌍태를

확인하고 만약 쌍태라면 한쪽 태아를 적출하여야 한다.

(다) 임신말의 운동 : 임신기간 동안 매일 운동을 시켜야 하는데 특히 마방내의 말은 매일 최소한 20분간 활발하게 보행할 수 있도록 하여야 한다.

(2) 임신중기-임신말기

(가) 건강유지 : 이때 씨암말은 좋은 상태로 유지시켜야 한다. 발굽, 치아 및 기생충 구제가 가장 중요하다. 이 기간동안 씨암말은 겨울철 생활에 들어가게 될 것이며 사료도 맞춰서 바꾸어야 하며, 씨암말을 적절하고 건강하게 유지시키는 것이 도움이 되지만 살찌게 해서 안된다. 요컨대 늑골은 숨겨져 있지만 살이 과묵혀 있지 않는 상태를 유지하는 것이 중요하다. 이 시기에 살이 찌면 신체에 지방을 축적시켜 임신을 방해할 뿐만 아니라 다리에 하중을 많이 주게 된다. 그러나 적절한 광물질, 비타민 및 기본 아미노산이 포함되어야 하며 유산을 유발할 수 있는 곰팡이가 없어야 한다.

겨울철이 다가오면, 씨암말의 주인은 건초가 깨끗하고, 잘 다듬어지고, 잘 저장될 수 있도록 조치를 취하고 배합사료는 광물질뿐만 아니라 비타민 A, D, E 및 엽산이 포함된 적절한 곡물이어야 한다.

(나) 스트레스 배제 : 스트레스는 발달중인 태아에게 최대의 적이다. 유산의 최대 원인은 스트레스이므로 임신한 말은 첫째 안정시키고, 만족시킬 것. 임신한 말은 건강을 유지하면 기분이 좋아진다. 그리고 평소의 작업 수순을 가능한한 변경시키지 않으면 암말은 행복하게 된다. 말은 습관의 동물이며 정해진 수순을 좋아한다. 스트레스 배제요인으로서 임신말의 수송이 매우 중요하다. 최소 임신 50일 후에 수송하는 것이 좋다.

(다) 굵의 손질 : 임신말의 다리 손질은 통상 소홀히 하는 경우가 많다. 발굽손질의 미흡으로 인해 다리의 통증이 발생할 수 있다. 임신한 말은 30일마다 굵을 손질하여 주어야 한다. 가능하면 장제보다는 삭제만 하는 것이 좋다.

(3) 임신말기(마지막 3개월)

이 기간동안에 가장 중요한 것은 계속 보살피고, 스트레스를 받지 않도록 하고, 건강식을 하는 것이다. 이시기는 태아의 성장이 급속하게 일어나며 여러 가지 영양소의 요구량이 정상 유지량 이상으로 필요하게 된다. 게다가 암말은 분만 전에 적당량의 지방을 축적해서 수유 초기에 많은 영양소가 필요할 때 쓸 수 있도록 해야 한다.

임신 말기의 마지막 단계에서는 암말의 정상 습관과 행동에 평상시보다 더 친숙해 지는

것이 중요하다. 이런 양상의 변화는 분만의 첫 징후이다.

예방접종과 구충 : 유산을 유발할 수 있는 비강폐렴 백신(임신 5,7,9개월 령에 접종)이나 파상풍(분만 1개월 전 접종)을 접종하여 초유를 통해 자마에 항체가 전달될 수 있도록 한다. 백신과 마찬가지로 적절한 위생관리 및 초지관리와 함께 효과적인 구충프로그램을 수립하여 실시하는 것이 중요하다. 암말에 대한 구충제는 목장의 위치, 임신상태를 고려하여 선택한다. 어떤 구충제는 태아에 부작용을 유발할 수 있으므로 주의가 요구된다.

(4) 임신말의 사료급여 권장량

체중 100 kg 당 농후사료 0.6-1.5 kg, 건초 0.6-1.5 kg 수준으로 급여하되 전체 섭취량은 2.5 kg/100 kg 이내에서 급여하도록 한다. 임신 8개월까지는 조사료 위주의 유지 요구량 수준에서 급여하고 임신 9개월부터는 농후사료 급여수준을 점차 높여 태아의 발달에 필요한 에너지와 영양소 공급을 증가시킨다. 임신말기의 에너지 요구량은 유지 요구량에 비해 2-50% 정도 증가한다. 양질의 초지에 방목하는 경우 임신말기를 제외하고는 농후사료나 알팔파 건초 등을 추가로 급여할 필요가 없다. 임신기간 중 알팔파 건초 또는 칼슘제를 다량 급여할 경우 칼슘과다로 인한 태아의 골격 이상을 가져올 수 있기 때문에 요구량 이상의 칼슘 공급은 주의해야 한다. 곰팡이 발생 등 부패한 사료는 다양한 질병과 유산의 원인이 되기 때문에 절대 주의가 필요하다. 일반적으로 임신말은 분만전에 보통 체중보다 18% 정도 높이는 것이 분만 후 번식률을 증가시키는 것으로 알려져 있으며 규칙적이고 충분한 운동을 시키며 분만 전 후 몇 일 동안은 사료급여량을 줄여야 한다.

다. 인공수정을 통한 망아지 생산 및 육성

국내 최초로 냉장 운반정액을 이용하여 1두 및 동결정액을 이용하여 2두의 망아지가 태어나 건강하게 성장하고 있다(Figure 71). 한편 냉장-희석정액으로 태어난 망아지의 성장률을 조사한 결과는 Table 33과 같다. 6개월령 체중이 170-190 kg으로 정상적인 성장률을 나타내고 있다.



Fig 71. Foals by using artificial insemination.

Table 33. 냉장-희석정액을 이용한 인공수정으로 태어난 망아지의 육성율(10. 10. 18일 현재 체중)

마명	생년월일	부(종)	모(종)	체중	체고
맨디리 자마	10.4.3	바람돌이(아랍)	맨디리(페인트)	190kg	110cm
오스퀸자마의 자마	10.4.16	바람돌이(아랍)	오스퀸자마(더러)	170kg	113cm
원너수자마	10.4.13	바람돌이(아랍)	원너수(더러)	187kg	115cm
카라	10.6.21	바람돌이(아랍)	coffeateight(더러)	125kg	104cm
마굿간	10.5.17	바람돌이(아랍)	천금(더러 잡)	146kg	101cm
금오	10.4.25	무명(교잡종)	금오(더러)	159kg	103cm
오스퀸자마의자마	10.4.16	바람돌이(아랍)	오스퀸자마(더러)	170kg	114cm
이밴트폴자자의자마	10.4.24	바람돌이(아랍)	이밴트폴자마(더러)	180kg	116cm

(1) 망아지의 초기 육성 기법 정립

(가) 초기 육성(출생 후~6개월령)

① 각인 순차

말의 출산은 3개의 스테이지로 나눌 수 있다. 임신중기 무렵부터 등을 아래로 해 자궁 내에 위치하고 있던 태아가, 자궁 내에서 회전한 후 만출에 대비 등을 위로 향한 상태가 되고, 이 후 파수가 시작될 때까지의 기간을 제 1스테이지라고 부른다. 제 1스테이지에서 모마는 안정감이 없어져 마방 내를 걸어 다니거나 발한이나 가벼운 산통과 같은 증상을 보이기도 한다. 자궁 수축이 강해지면 파수가 일어난다. 파수가 된 다음부터 태아가 세상에 나올 때까지의 기간을 제 2스테이지라고 부른다

통상 파수하고 난 후 약 30분(10-60분)정도에 태아가 밖으로 나온다. 그 후 태반(후산)이 배출될 때까지의 기간을 제 3스테이지라고 부르고, 통상 태아의 만출로부터 약 3시간 이내에 태반이 배출되게 된다. 출산 직후부터 모마는 양수로 젖어 있는 신생 망아지의 냄새를 맡고 핥아주기 시작한다. 이 시점부터 모마와 망아지 사이에 정이 형성되기 때문에 필요이상으로 타월로 망아지를 닦아주는 것은 부모와 자식 사이의 정을 저해하는 위험성이 있다는 사실을 인식해 두지 않으면 안 된다. 갓 태어난 망아지는 휘청거리면서도 생후 1시간 정도에 일어나고 기립한 후에는 휘청거리면서도 엄마의 유방을 찾아내 생후 약 2시간내에 초유를 섭취한다(Figure 72).



Fig 72, 막 출생한 망아지는 2시간 이내에 일어서서 초유를 섭취

출생 직후의 망아지가 허약한 경우에는 건 조직이 이완되어 있기 때문에 구절이 과도하게 침하해 제첩이 지면에 떠 있는 일도 가끔 있는데 이들 증상의 대부분은 생후 2주일

정도에 거의 정상적인 상태로 회복된다.

그럼 여기서 본격적으로 이런 시기의 망아지 취급은 승용마로서의 장래에 대한 매우 큰 영향을 미친다. 생후 가능한 한 빠른 시기에 망아지와 교감함으로서 망아지는 비교적 용이하게 사람한테 익숙하게 된다고 하여 이른바 “각인”이 중요하다고 여겨지고 있다. 생후 3일째까지 얼마나 충분히 망아지와 접촉을 하는가가 그 후의 순치나 길들이기에도 막대한 영향을 준다고 여겨지고 있다. 한편 과도한 “각인”은 모마와 망아지의 스킨십 시간을 방해하고 모성 발달을 저해하여 망아지방치의 원인이 되거나 망아지가 사람을 동료라고 여겨 사람을 존경하지 않게 되는 한 요인이 된다고도 한다. 특히 초산으로 신경질적인 모마의 경우에는 필요이상으로 타월로 닦는 것에 의해서 망아지 냄새를 너무 없애지 않도록 주의할 필요가 있다.

망아지를 길들이는 데는 예스와 노를 명확하게 실시하는 것이 중요하다. 사람의 요구에 솔직하게 따랐을 때는 곧바로 망아지에 대한 압력을 해제해서 이것으로 좋다는 것을 이해시키는 것이 중요하다. 안 되는 상태인 경우 시간을 길게 함으로서 그 상태를 푸는 타이밍도 매우 중요하다.

또 망아지를 취급하는 경우에는 “점과 선”이 아니고 “면”으로 접할 것, 즉 끌기 운동만으로 망아지를 다루는 것이 아니라 양팔을 사용해 면으로 보정하는 것도 중요한 사항이다. 특히 생후 1~2주일까지의 망아지는 허약함으로 길들이기로 인해 스트레스를 주지 않도록 해야 한다. 이를 위해서 굴레를 통한 고삐 한줄만으로 보정하는 것이 아니라 양팔로 껴안아 보정도록 한다.

② 출생 직후부터 2주일까지의 끌기 운동

출생 직후부터 2주일 령까지의 끌기 운동은 왼 손으로 모마의 고삐를 잡고, 망아지는 고삐를 사용하지 않고 오른 팔로 망아지의 목을 가볍게 감싸면서 걷는다. 태어난 직후의 망아지는 허약하기 때문에 고삐를 사용해 “점과 선”으로 망아지를 보정한 경우에는 망아지가 무언가에 놀라 몸의 균형을 잃고 넘어져 경부 신경을 손상시키기 쉽기 때문에 고삐를 사용하지 말고 망아지의 어깨로부터 목까지 손을 돌려 “면”으로 보정하면서 자발적으로 걷도록 시킨다. 만약에 망아지가 날뛰어 방마가 되더라도 망아지는 고삐로 연결되어 있지 않기 때문에 용이하게 스스로가 균형을 유지해 좀처럼 사고로 연결되지 않는다. 가냘픈 망아지에 스트레스를 주지 않도록 다루는 점에서도 고삐를 사용하지 않고 목에서부터 어깨를 끌어안는 방법은 아주 효과가 있다(Figure 73).



Fig 73. 2주일 령 미만의 망아지를 한 사람이 끌기 운동하는 모습.

출생 직후인 이 시기부터 끌기 운동 시에는 망아지와 사람의 어깨가 같은 위치로 해 걷지 않으면 안 된다는 사실을 의식하도록 함으로서 1세의 경매 순치 등도 매우 원활하게 실시할 수 있다.

㉠ 2인 1조에 의한 끌기 운동

생후 직후부터 2주일 령까지는 2명이 씨암말과 망아지 1쌍을 취급하는 것이 원칙이 된다. 1명이 왼손으로 모마를 끌고 오른 팔로 망아지의 목을 감싸 잡고 걷게 하고 다른 1명이 망아지의 오른쪽 후방에서 망아지가 곧바로 진행하도록 도와준다. 망아지가 멈춰 서려고 할 경우에는 오른쪽 후방 사람이 망아지의 엉덩이를 가볍게 밀어 앞으로 나아가도록 재촉한다.

㊦ 1명이 실시하는 어미말과 망아지의 끌기 운동

생후 직후부터 2주일령까지는 2명이 어미말과 망아지 1쌍을 취급하는 것이 원칙이지만, 생후 1주일이 경과되면 스스로 전진하는 망아지도 드물지 않다. 이러한 경우에는 혼자서 모자의 끌기 운동을 실시하는 것이 가능해진다. 앞서 말한 것처럼 왼손으로 모자를 끌고 오른 팔로 망아지 목을 감싸서 끌기 운동을 한다. 망아지가 멈춰 서려고 할 경우에는 망아지 목을 감싸고 있던 오른 팔을 일시적으로 풀어 오른쪽 손바닥으로 망아지의 늑부 후방을 가볍게 쳐 자극하고 앞으로 너무 나아간 후에는 채차 목을 감싸고 있는 오른 팔로 스피드를 조절한다(Figure 74). 오른쪽 손바닥으로 망아지의 늑부 후방을 가볍게 쳐 자극해 전진을 촉구한다.



Fig 74. 2주일령 미만의 망아지를 한 사람에게 의한 끌기 운동

③ 2주일 이후의 망아지 끌기 운동

고삐를 사용한 끌기 운동은 망아지 사지가 제대로 역할을 할 수 있는 2주일령 이후부터 개시한다. 오른손으로 망아지에 장착한 고삐를 쥐다. 기본적으로는 망아지를 자발적으로 사람의 어깨 위치에서 걷게 시키고, 망아지가 멈춰 서려고 했을 경우에는 오른쪽 다리로 망아지의 엉덩이를 가볍게 밀어 앞으로 나아가도록 촉구한다(Figure 75).



Fig 75. 망아지가 멈추거나 앞으로 나가지 않을 때에는 빨리 엉덩이를 가볍게 밀어 걸어 나가도록 촉구

오른쪽 다리로 망아지 엉덩이를 밀기 위해서는 사람은 망아지 어깨 부위에 위치해야 하기 때문에 망아지를 사람보다 조금 앞에 서서 걷도록 한다. 이러한 방법으로 끌기 운동을 실시해 두면 망아지가 멈춰 서려고 할 때에 사람이 망아지 어깨보다 조금 뒤에 위치하려고 하는 것만으로 망아지는 엉덩이를 가볍게 맞다고 생각해서 앞으로 나아가게 된다. 망아지가 자발적으로 앞으로 나아가는 상태가 되면 다음은 스피드만 조정하면 되므로 비교적 용이하게 망아지의 끌기 운동을 실시할 수 있다. 또 하나 중요한 포인트는 모마가 망아지보다 앞에서 걸어 뒤에서 따라오는 망아지가 멈추었을 경우에는 어떤 것도 할 수 없게 되기 때문에 어쨌든 모마보다 망아지가 앞에서 걷도록 해야 한다.

망아지에 장착하는 고삐는 고정 도구가 없는 1개의 로프를 사용한다. 이 로프를 굴레 턱 가죽을 통해 반으로 접어 양 끝의 고삐를 쥐다. 관리사는 고정 도구를 사용하지 않고 굴레 턱 가죽에서 한 개의 로프를 반으로 접어 연결하고 있을 뿐이므로 비록 망아지가 방망이 되어 관리사를 밟았다고 하더라도 로프는 쉽게 굴레에서 빠지기 때문에 이차적인 사고는 예방할 수 있다. 망아지 체중이 100 kg을 넘게 되면 끌기 운동 도중, 특히 마방에서 방목지로 향하는 도중에 기립하는 말도 적지 않다. 이러한 경우에는 고삐를 쥐지 않고 집게손가락과 중지의 2개 손가락으로 굴레를 직접 잡고서 끌기 운동을 한다. 그리고 말이 기립하려고 하는 것을 멈추었을 때는 아래쪽으로 유지했던 굴레 압력을 풀어 자유에 가까운 상

태로 유지시킨다. 이와 같이 압력과 자유를 명확하게 구분해 사용함으로써 기립하려고 하는 말을 교정한다. 이 때 다섯 손가락 모두가 굴레를 꽉 잡고 있으면 압력과 자유가 전달되기 어려워지고, 또 고삐를 사용해 제어하면 너무 쉽게 기립하게 되어 더욱 제어하는 타이밍이 늦어지기 쉬우므로 주의할 필요가 있다.

망아지가 멈춰 서거나 혹은 후퇴하려고 할 경우에는 고삐를 당기지 말고 망아지를 중심으로 모마와 함께 일회전하는 동안에 망아지를 앞에 내보내고 더 앞서 나가도록 하기 위해서 오른쪽 발로 망아지의 엉덩이를 민다. 회전이 끝나 진행 방향으로 향할 때에는 망아지 어깨에 위치하도록 회전하는 동안에 온 몸으로 규제를 한다. 절대로 당기지 않고 망아지를 중심으로 모마와 함께 회전해서 원래 가려고 하는 방향을 향하도록 한다. 이때도 망아지가 모마보다 앞서 가는 위치가 되도록 한다(Figure 76).

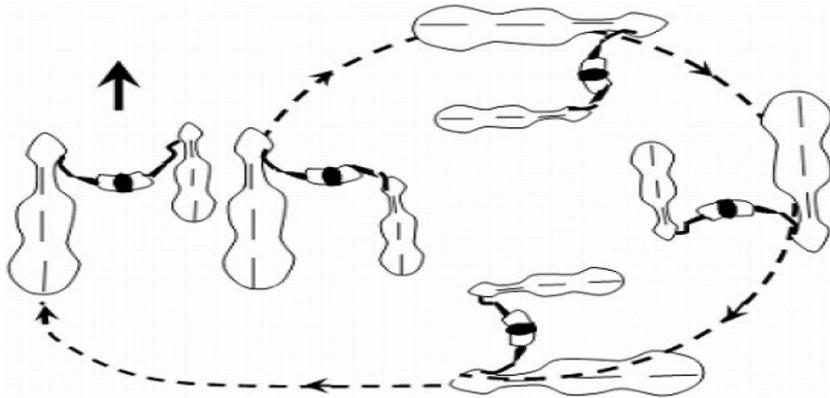


Fig 76. 망아지가 멈추거나 앞에 나아가지 않을 때 대처법

어린 말의 순치 교육 첫 단계는 태어나 얼마되지 않아서 시작되기 때문에 반복적인 교육이 필요하다. 이 시기에는 주로 사람과의 접촉에 중점을 두고 다음과 같이 한다.

시 기	목 표	방 법
2주령 까지	① 사람과 접촉 ② 보정 ③ 굴레 씌우기 ④ 손질 ⑤ 체온 측정 ⑥ 끌기 운동 ⑦ 굽 손질	① 말을 걸면서 애무, 뺨과 목부분을 가볍게 두드리고 만져 보거나 손가락으로 가볍게 찢어본다 ② 가슴과 엉덩이를 조용히 안고 움직이지 못하도록 한다 ③ 소리를 내면서 굴레를 씌운다 ④ 목, 등, 배, 얼굴, 콧등, 귓가를 수건으로 비비거나 긁기 도 한다. 사지를 하나씩 가볍게 문지르면서 들어올린다 ⑤ 꼬리 끝부분, 항문 주변을 쓰다듬는다 ⑥ 방목지까지 끌기 운동을 가르친다 ⑦ 제저와 제차의 흠을 제거한다
2주령~ 1개월령	① 보정, 사람과 접촉 ② 손질 ③ 굽 손질 ④ 끌기 운동	① 코와 귀를 애무하고 입주면에 손가락, 손을 넣어본다 ② 목, 등, 배, 얼굴, 콧등, 귓가를 수건으로 비비거나 긁기 도 한다. 사지를 하나씩 가볍게 문지르면서 들어올린다 ③ 소리를 내면서 굴레를 씌운다 ④ 힘이 들어가지 않도록 굴레 또는 고삐를 쥐고 어미마와 같이 근처를 걷거나 방목을 시킨다
1개월령~ 2개월령	① 자립, 이유준비 ② 수송	① 서서히 어미마에서 떨어지게 한다. 급하게 뒤에서 뛰어 도망가지 않도록 주의한다 ② 말 수송차에 어미마와 같이 태워 짧은 여행을 한다
2개월령~ 4개월령	① 자립	① 사람이 망아지 곁에 붙어 있으면서 마방내에서 단시간 묶어 세운다
4개월령~ 6개월령	① 이유 ② 마의	① 자립, 이유, 마방안에서 사료를 공급한다 ② 마의를 착용, 복대에 익숙케 한다

(2) 전기육성 (7~18개월)

이 시기에는 말 세우기, 재갈 씌우기, 굴레 씌우기, 끌기운동 등을 실시한다. 마방에서 말을 잡는 방법은 말(言)을 걸면서 말 왼쪽에서 다가서서 굴레를 씌우기 전에 고삐를 말의 목에 두른다. 이 때 끈은 고삐 줄을 말의 목에 둘러 매듭지으면 말이 후퇴하거나 일어서거나 할 때 목이 죄어져 상처를 입으므로 절대 묶어서는 안 된다. 굴레를 씌우기 전에 고삐를 목 주위에 걸치는 것은 굴레를 씌우는 작업을 하는 동안에 말이 얄전하고 도망치지 않도록 하기 위해서이다. 설령 한 가닥의 끈이라도 목에 둘러지면 사람의 손안에 있는

듯한 기분을 갖게 된다. 굴레를 장착하면 코 끈 또는 가죽의 위치가 콧등의 움푹한 곳 바로 윗부분에 오도록 조절한다.

당세 때의 어린 시기는 몸이 작기 때문에 사람이 왼쪽에서 양팔로 망아지의 가슴과 엉덩이를 감싸듯해서 제어하는 것이 좋고, 이 때 상냥하게 말을 걸면 사람에게 억눌리는 것도 쉽게 받아들여지게 된다. 말의 본성인 공포심이나 겁을 극복시키는 데는 말에 대한 상냥한 배려심의 축적이 중요하다. 처음에는 양팔로 감싸는 것에 대해 망아지는 저항할지도 모르지만 부드럽게 말을 걸면 차분해진다.

(가) 말 세우기 : 우선 말 세우기 교육은 망아지의 엉덩이가 사람 쪽으로 향하지 않도록 망아지를 벽면 또는 목책 쪽에 평평하게 세우고, 왼손으로 고삐를 쥐고 망아지의 왼편에서 오른손에 긴 채찍을 든다. 망아지가 그 장소에서 움직이려고 하면 가볍게 고삐를 끌어당긴다. 이 때 힘껏 잡아당기지 않도록 고삐 줄은 항상 느슨한 상태로 해둔다. 그리고 조용히 일어서도록 가르친다. 만일 망아지가 후퇴할 것 같으면 긴 채찍으로 가볍게 비절 밑을 건드리고 말(言)을 걸어준다.

말(言)을 잘 듣지 않는 망아지에게는 코에 더욱 통증을 주는 방법을 선택할 필요가 있다. 체인 고삐는 자주 사용되며 코끈에 둘러 콧등에 갖다 댄 체인은 통증을 결정적으로 줄 수 있다. 망아지를 기립시키는 순치 교육에서는 항상 가볍게 끌어당기는 것만으로 시작되지만 필요에 따라 세게 강도를 높여간다. 긴 채찍도 처음에는 가볍게 접촉하는 것에서 진행하고 필요에 따라 고통을 가르친다. 도저히 감당할 수 없을 정도로 나쁜 말인 경우에는 종종 강한 채찍이 필요하다. 더욱이 체인 고삐를 사용할 때 체인을 말 턱 밑으로 사용해서는 안 된다. 턱 아래에 통증을 주면 말은 머리를 들어 후퇴한다. 그리고 일어서서 앞다리로 두드리거나 한다. 대개 2~3일이 되면 망아지는 기립할 수 있게 된다.

(나) 말 끌기 : 말 일어서기가 가능해지면 「말 끌기」를 가르친다. 처음에 망아지를 나무 울타리 또는 목책과 평행하게 세워 사람은 말 왼쪽 머리와 어깨 사이에 위치하고 말과 같은 방향을 향한다. 오른손에 끄는 고삐줄을 말 턱 밑 15cm 정도의 위치에서 잡고 왼손은 고삐줄 끝과 함께 긴 듯한 조교용 채찍을 든다. 채찍의 끝은 망아지의 후지쪽을 향하게 하여 땅에 닿는 정도로 한다.

말의 주의를 끌기 위해 충분한 힘을 주어 고삐줄의 느슨함을 없애고 전진 표시로써 분명한 소리로 혀소리를 낸다. 이 때 절대 망아지를 놀라게 하지 않는 것이 중요하다. 경직된 채 앞으로 나아가지 않을 때는 반복해서 혀를 차고 바로 채찍 끝으로 비절 뒤를 가볍게 된다. 채찍으로 두드려서는 안 된다.

망아지의 순치 교육에서 사람의 음성이나 혀소리를 잘 사용하여 사람과 말과의 약속을 하나 만들어 가는데 말은 언어를 이해하는 것이 아니라 소리를 듣고 구분하는 것이므로

가능한 단순한 말로 혹은 혀를 차서 더욱이 억양을 넣어 사용한다. 예를 들면 「평보」라든가, 「멈추기(정지)」를 분명한 음성으로 알기 쉽게 몇 가지 소리를 사용하여 명령의 혼란을 피하도록 한다. 똑같이 혀소리와 음성으로 반복해서 명령하면 어떤 망아지라도 본능적으로 전진하게 된다.

여기서 중요한 것은 고삐줄로 망아지를 잡아당기며 걷게 해서 안된다. 사람이 말을 잡아당기면 망아지는 끌어야 걷는 것이라고 기억해버려서 망아지가 걷는 것이 싫어지면 사람과 줄다리를 하게 되고 힘있는 말에게 사람이 지는 수가 있다.

망아지가 걷기 시작하면 끄는 사람은 말의 머리와 어깨 사이의 위치를 항상 유지하고 말의 보폭에 맞춰 걷는다. 말이 크지 않은 동안은 사람이 천천히 따라 갈 수 있지만 몸집이 커지게 되면 보폭이 넓어지게 되므로 끄는 쪽이 빨리 걷지 않으면 따라갈 수 없다. 절대 말의 걸음을 늦추려 해서 안된다. 자연스런 전진 자세를 약화시키지 말고 긴 보폭을 유지하도록 한다. 고삐줄로 망아지와 가벼운 연락을 취하고 말의 머리를 부드럽게 유도하며 오른쪽 방향 혹은 왼쪽 방향으로 유도한다.

망아지가 걷기 시작하면 말의 머리는 상하로 그리고 가볍게 좌우로 움직임을 알 수 있다. 사람은 고삐줄의 접점에서 이 자연스런 동작을 억누르지 않도록 주의하고 말의 보행을 방해하지 말아야 한다. 이렇게 하면서 끄는 사람은 말에게 붙어가는 요령을 알게 되고 망아지도 안심하고 걷게 되는 것이다.

망아지는 이끌리는 것에 익숙하게 되면 때때로 게으름 피우기 시작하고 천천히 무거운 듯이 걷게 된다. 이때 끄는 사람은 바로 알아차려 고삐를 앞으로 당겨 말의 속도를 빠르게 한다. 그렇게 하지 않고 망아지의 꼬임에 넘어가 하는 대로 하게 내버리면 망아지의 자연스런 추진력 발달을 약화시키게 된다.

전진 기세가 없을 때는 혀를 차면서 「앞으로」하고 세게 소리를 낸다. 이 명령에 대한 적절한 반응은 망아지가 보폭을 늘임으로써 보다 빠르게 걷는 것이다. 이 때 망아지는 평보에서 속보로 이행할 수도 있다. 그럴 경우에는 「좋아, 좋아」하고 말을 해서 망아지의 기분을 안정시키면서 고삐줄을 가볍게 당긴다. 망아지는 바로 이 명령을 기억하여 속보에서 평보로 되돌아가 걷게 된다. 말과 함께 걷고 있을 때 손은 고삐를 말과 연락을 취하면서 말의 전진에 맞춰 따라 간다.

다음으로 정지시킬 때는 급히 세우거나 제한 없이 천천히 하는 것이 아니라 원활하게 행하는 것이 중요하다. 원활한 정지법은 망아지의 보폭을 서서히 줄여감으로써 정지할 때 완보 중도에 멈추지 않도록 후지를 옮기게 한다. 평보에서 정지시킬 때 「정지」라는 소리를 내어 명령한다. 이렇게 끌기 운동을 해가면 날이 갈수록 망아지는 끄는 사람의 명령, 고삐줄의 감촉을 학습한다.

시끄러워서 끄는데 힘든 말이나 장난치고 일어서는 말에게는 조기에 특수 재갈을 몸에 익혀 사용하는 것이 좋을 것이다. 이 재갈을 말을 제지하거나 난폭하게 굴어도 소용없다는 것을 가르치는데 매우 효과적이다.

징계는 망아지의 순치 교육에서 매우 중요한 일로 징계 방법에 따라서는 망아지를 정신적으로 혼란스럽게 하여 갈수록 다루기 어려운 말로 만들어 버린다. 징계의 기본은 관리사가 싫어하는 행위를 망아지가 했을 때 지체 없이 바로 질책하는 것이다. 이 때 「차지 마」, 「물지 마」, 「두드리지 마」 하는 식으로 여러 가지 명령을 사용하면 망아지는 많은 발음을 배우지 않으면 안 되게 되어 혼란스러워 한다. 망아지는 사람의 말을 이해하는 것이 아니라 사람이 내는 음성의 고저에 의해 말과 사람의 커뮤니케이션을 취하고 있기 때문에 가능한 한정된 명령으로 다루도록 한다. 따라서 망아지가 나쁜 짓을 했을 경우에는 어떤 경우든 통용되는 「안돼」를 사용한다. 몇 번이고 같은 것을 반복해서 나쁜 짓을 할 경우에는 여지없이 바로 「안돼」라고 높은 소리를 내면서 질책한다. 그러면 망아지는 무엇 때문에 질책 받았는지 알 수 있을 것이다.

경매 시장에 내놓을 때 구매자로부터 속보를 요구받기도 하므로 망아지에게는 속보 명령도 학습시켜 둔다. 속보를 시킬 때는 반드시 평보에서 시작한다. 말 끌기에서 평보로 끌고 있을 때, 전진 기세를 지속시키고 나서 「속보」하고 명령함과 동시에 강하게 혀소리로 신호를 보낸다. 이 때 말을 끄는 사람이 속보 흉내를 내서 말을 구르는 것은 좋지 않다. 반드시 망아지가 주도이고 사람이 거기에 맞춰 따라가는 것이 좋다. 「멈춰」 「평보」 「앞으로」 그리고 「속보」라는 4가지 기본적 명령에 망아지가 익숙해지면 말을 끄는 사람의 명령에 대한 망아지의 반응을 잘 확인할 수 있게 되어 있다.

다시 말하면 망아지가 앞전히 서 있으면 「평보」라고 말하여 걷게 하고, 필요하면 「앞으로」라고 명령하여 전진 기세를 취하게 하고, 거기서 「속보」라고 호령한다. 그 때 망아지가 속보에서 구보로 이행하는 일이 있으므로 그 때는 가볍게 고삐를 밑으로 누르면서 「괜찮아」 또는 「그래」하고 소리를 내 준다. 이러한 교육은 망아지를 가능한 한 정신적으로 안정시키면서 실시하는 것이 가장 중요하다. 속보를 끝낼 때에는 「오라, 오라」하고 소리를 내서 평보를 조용히 이행시키고, 그리고 「멈춰」라는 명령으로 자연스럽게 멈추게 한다. 이것으로 초기 순치는 목표를 이루게 된다(Figure 77~82).



Fig 77. 조마삭 및 자갈 순치 과정.



Fig. 78. 복대 착용 훈련.



Fig 79. 복대 착용 후 기승 훈련.



Fig 80. 복대 착용, 사이드라인 착용 적응 및 조마삭 훈련.



Fig. 81. 사이드라인 착용 조마삭 훈련.



Fig 82. 안장 장착 후 조마삭 훈련 및 기승 훈련.

라. 생산된 망아지의 면역증강 효과 평가

감염증은 망아지에게 있어서 질병을 일으키거나 폐사를 일으키는 가장 흔한 원인 중의 하나이다. 보통 전신적인 감염증(Septicemia)이든 국소적인 감염증이든 모두 합쳐서 질환 망아지의 35~40% 정도를 차지하는 것으로 알려져 있다. 망아지 감염증인 경우에는 흔히 감염이 되어 증상이 나타난 후에 치료하는 예가 많지만, 발병 후에 치료하는 것보다는 출생 후 관리를 철저히 해 주고, 특히 초유 섭취가 잘 이루어져서 면역상태가 좋도록 함으로써 사전에 예방하는 것이 훨씬 더 효과적이다.

(1) 초유 분석

망아지가 처음으로 먹는 젖은 단백질이 농후한 것으로 이것을 일반적으로 「초유」라 부르고 있다. 초유는 산후 18시간 정도 지나면 나오는데 망아지에게 있어 건강하게 성장해 가기 위해 꼭 필요한 것이다. 다음 Table 34는 말의 초유 성분 함량을 나타낸 것이다.

Table 34. 말의 초유 성분 함량

분만후 시간	젖 고형분	회분	유당	총질소	순단백질	유지방
시간	%	%	%	%	%	%
6	23.07	0.69	3.88	16.03	15.21	0.96
12	18.86	0.63	4.48	11.83	11.56	2.10
18	16.21	0.56	4.91	7.73	7.21	2.50
24	12.10	0.61	5.28	3.71	3.55	2.10

초유가 중요한 이유는 성분에 함유되어 있는 단백질속의 면역글로불린을 필요로 하기 때문이다. 망아지는 감염증을 방지하기 위한 필요한 면역이 아직 갖춰져 있지 않다. 따라서 입, 코, 피부의 상처, 탯줄 등에서 들어오는 병원체에 당하기 쉽다. 이 병원체의 감염을 막기 위해 분만 직후 씨암말의 초유를 충분히 먹임으로써 병에 대한 저항력을 갖게 할 필요가 있다.

사람, 원숭이, 개, 고양이 등은 씨암말의 혈액속에 있는 면역글로불린이 태반을 통해 태아의 체내로 들어가지만 말, 소, 양, 돼지 등은 초유를 먹어야만 면역글로불린을 획득할 수 있다.

말은 통상 1시간당 160 ml정도의 초유가 분비된다. 면역글로불린은 초유속의 단백질에

약 40%를 차지하고 있고, 병에 대한 저항력을 갖게하는 가장 큰 역할을 한다. 면역글로불린 외에도 초유에는 락토페린, 리소자임, 림프구, 혈구, 대식세포(면역 담당의 식균세포) 등이 함유되어 세균에 대한 저항력을 갖게 한다.

망아지의 소장 점막에 특수한 상피세포가 갖춰져 있어 분자량이 큰 면역글로불린을 흡수할 수 있게 되어 있지만, 이 특수한 상피세포는 출생후 24시간쯤에서 거의 소실되어 버리므로, 그 때까지 초유를 먹지 않으면 면역효과를 기대할 수 없다. 또 초유속의 면역글로불린 농도는 분만후 급속히 감소하고 6시간에서 약 50%로, 15시간에서 10-20%까지 내려간다. 따라서 생후 4-6시간 이내에 초유를 먹는 것이 중요하며 허약하여 먹을 수 없는 망아지에게는 초유를 짜서 줄 필요가 있다.

체내로 옮겨간 면역글로불린은 매일 감소되어 5개월령쯤에는 완전히 소실된다. 한편 말이 자기 힘으로 면역글로불린을 만들기 시작하는 것은 생후 2주경부터이고 약 3개월령에서 성마와 같은 양의 면역글로불린 양에 도달한다고 알려져 있다.

초유의 좋고 나쁨은 색과 점조성으로 알 수 있다. 좋은 초유는 황색으로 점조성이 있으며 농후한 젖으로 되어 있으나 좋지 않은 초유는 하얗고 묽은 액으로 되어 있다.

망아지가 초유를 충분히 먹고 흡수하면 6-12시간에 탁한 일과성의 단백뇨를 배설하므로 초유를 먹었는지 그 여부를 확인할 수 있다. 정확하게 조사하는데는 망아지 혈청속의 단백질분화를 전기영동법으로 조사하여 면역글로불린(IgG)을 측량한다. 최근에는 라텍스(latex) 법이라는 키트에 의한 판정법도 개발되어 있어 야외에서도 간단히 검사할 수 있다.

면역 물질이 소장에서부터 흡수되어 망아지의 혈액속으로 항체가 옮겨지기까지는 2-3시간이 걸리고, 또한 어미마가 가지고 있는 혈중 항체 농도와 동등한 수준까지 이르러 세균이나 미생물로부터 감염을 방지하는 효과를 발휘하기까지는 약 48시간 정도 걸린다고 보고되어 있다.

망아지는 혈액 검사를 실시하여 혈장속의 면역글로불린 농도가 400 mg%이하인 경우에는 초유속의 면역물질이 충분히 망아지에게 전달되지 않은 것으로, 감염을 방어할 수 없기 때문에 동결 보존한 초유(초유 벙크라 함)나 어미마 또는 건강한 성마의 동결 보존한 혈청(혈청 벙크라 함)을 투여한다.

초유 벙크의 경우에는 동결된 초유를 흐르는 물로 천천히 해동하고 초유와 망아지 혈액 사이에서 면역반응을 하여 적법 여부를 조사한 뒤에 초유를 잘 흔들고 나서 출생 후 24시간 이내에 500 ml씩 2시간 간격으로 2-3회로 나누어 투여하면 된다.

한편 혈청 벙크의 경우는 동결된 혈청을 흐르는 물로 천천히 해동시키고, 출생 후 24시간 이내라면 300-1000 ml를 초유와 같이 먹인다. 24시간 이후의 망아지에게는 체중 1 kg 당 20 ml의 비율로 37℃로 따뜻하게 데운 혈청을 1-2시간 이상의 간격으로 정맥내에 투여

한다. 대부분의 경우 혈청 1000 ml를 필요로 한다. 이미 감염에 걸려 있을 때에는 2000 ml를 주사 투여한다.

초유는 이처럼 막 태어난 망아지에게 있어 매우 중요한 것이지만 때로는 골칫거리를 만든다. 그것은 초유를 먹음으로써 발병하는 「신생자마 용혈성 질환」으로써 태어난 망아지의 1~2%가 걸린다고 추정되고 있다.

이 병은 어미마의 초유에 분비되는 항체를 망아지가 섭취함으로써 일어난다. 이 항체는 망아지의 적혈구를 파괴하고 망아지에게 빈혈을 일으켜 심해지면 황달을 발병하게 한다.

초유 속에는 면역글로불린외에 완화 작용물질이 함유되어 있어 태변의 배설을 촉진시킨다. 망아지가 태어나서 처음으로 변을 보는 것은 생후 1-2시간 일어서고 나서 30-90분경에 배설한다. 12시간이 경과해도 태변이 배설되지 않을 때에는 관장약을 투여해야 한다. 변이 나왔는지 어떤지 모를 때에는 가능한 한 빨리, 특히 수말에게는 관장약을 투여하는 것이 좋다. 그 후 망아지의 변 배설은 하루에 3-5회가 된다.

(2) 망아지에서 흔히 감염을 일으키는 원인체

망아지에서 흔히 감염을 일으키는 병원성 원인체의 종류는 사육되는 지역이나 장소에 따라조금씩 차이가 있다. 그러나 임상적으로 E. coli는 어느 지역에서든 가장 흔하게 검출되고 있고, 비교적 흔하게 검출되는 세균으로는 *Actinobacillus*, *Klebsiella*, *Psuedomonas* 등이 있으며, *Salmonella*는 약간 나이가 든 망아지에게서 감염이 일어나며 좀 드문 편이다.

(3) 망아지 패혈증의 진단 기준

(가) 침울(가장 흔한 증상이지만, 특이 증상은 아님)

(나) 발열 (>39℃) : 패혈증 증세를 지닌 망아지의 많은 경우에는 발병 초기에 발열을 나타내지만, 50%이상이 전혀 발열을 나타내지 않든가 또는 수일 후 관절부위에 증상을 나타낼 때까지 발열을 보이지 않는 경우도 있다. 그러나 발열이 있다고 인정될 경우에는, 특히 흥분한 상태 주위 환경의 높은 기온 또는 경련 등이 없는 상태에서 발열이 있다면 심각하게 받아 들여야 한다.

(다) WBC count : 예후가 나쁜 경우에는 백혈구 수는 매우 낮게 나타나며, 극도로 독소에 감염된 백혈구(toxic WBC)가 많이 나타나는 것이 전형적이다. 약간 덜 심한 상태, 특히 그람음성균 감염에 의한 경우에는 호중구 좌방 변위와 호중구의 독성 변화를 동반하면서 처음에는 백혈구의 숫자가 야간 낮거나 정상 범위로 나타난다. 그래서 백혈구 전체 숫자로 검사함과 동시에 band형과 독성호중구가 있는지를 판단하기 위해서 감별 카운트를

하는 것이 반드시 필요하다. 백혈구의 독소에 감작되어 나타나는 독성 변화는 백혈구 내에 Doehl체, 독성 과립, 공포 형성 등이 있으며, 전체 WBC 및 호중구 수는 수일 동안 정상 이하로 유지되다가 그 다음에는 정상 또는 정상보다 더 높게 나타나기도 한다. 이와 같이 정상보다 더 높게 나타나는 WBC 수는 보통 수주일 동안 계속해서 그대로 남아 있기도 하는데, 특히 심한 폐렴인 경우에는 더욱 심하다.

(라) Fibrinogen : 신생자마의 급성 감염에서는 보통 정상 범위에 있는 경우가 많지만, 자궁 내에서부터 감염이 일어난 경우에는 태어날 때부터 fibrinogen 수치가 높게(700~1000 mg/dl, 정상 ; 400 mg/dl이하) 나타나기도 한다. 출생 직후에 감염된 경우에는 좀 더 만성적으로 혈장 fibrinogen이 증가하는 경향이 있다.

(마) Hypoglycemia : 망아지가 생후 24시간이 지나지 않은 경우에 허탈 상태에 이르게 되면 저혈당증이 매우 흔하게 일어난다. 특히 어린 망아지 일수록 혈당치 수치에 민감하게 영향을 받으므로 즉시 적절한 치료를 해 주어야 한다.

(바) Respiratory rate : 호흡수가 증가하거나 휴식기에 심한 노력성 호흡을 하는 경우에는 반드시 그 원인을 찾아 봐야 한다. 흔히 초기 폐렴 증세일 경우가 많으며, 폐렴이 있더라도 증상이 매우 미묘하게 나타나는 경우가 많으므로 세심한 주의를 가지고 살펴봐야 한다.

(사) Urine : 뇨 중에 백혈구나 세균이 섞여서 나오는 것은 패혈증의 다른 임상 증상보다 먼저 나타나거나 또는 같이 나타나기도 하므로 반드시 검사하는 것이 좋다.

(아) Blood cultures : 신생자마 패혈증의 확진을 위해서는 절대적으로 필요한 것임. 배양에서 양성으로 나타났다면, 그 다음 단계에서 세균의 종류가 무엇이며 항생제에 대한 감수성 경향 등을 알 수 있게 된다. 대부분의 배양은 24~48시간 내에 이루어지는데, 결과가 나오지 않더라도 패혈증이 의심이 되는 경우라면 항생제 치료를 시작해야 한다. 혈액 배양은 사실 매우 쉽다. 먼저 채혈할 부위의 털을 깨끗이 깎고 소독을 한 다음, 10cc의 혈액을 채취하여 5 ml씩 호기성(aerobic) 및 혐기성(anaerobic) 혈액 배양 용기에 넣어서 바로 배양시키면 된다.

(자) Sepsis score : 임상 증상이나 혈액학적 검사결과 중에서 어느 한 가지를 가지고 패혈증 망아지를 진단할 수 있는 것은 사실상 없으며, 여러 가지 검사결과를 종합해서 판단하는 것이 정확성을 높여 준다. 그래서 실제 임상에서는 CBC검사, 혈중 포도당, 외부 물리적 검사 및 병력 청취 등 여러 가지 검사결과를 종합해서 판단하는 “Sepsis Score”시스템이 이용되고 있다(Table 35).

Table 35. A standard score of septicemia in foal.

항 목	Score				
	4	3	2	1	0
I. CBS					
1. Neutrophil count		<2000/mm ³	2000-4000 or >12,000	8000-12,000 0	Normal
2. Band neutrophil count		>200/mm ³	50-200		<50
3. Doehle bodies, toxic, granulation in neutrophils	Marked	Moderate	Slight		None
4. Fibrinogen			>600	500-600	≤400
II. Other Laboratory Data					
1. Hypoglycemia			<50mg/dl	50-80	>80
2. Zinc sulfate turbidity test	<200	200-400	401-800		>800
3. Arterial oxygen		<40torr	40-50	51-70	>70
4. Metabolic acidosis		Yes			No
III. Clinical Examination					
1. Petechiation or scleral injection not secondary to eye disease or trauma		Marked	Moderate	Mild	None
2. Fever			>38.9°C	<37.8°C	Normal
3. Hypotonia, coma, depression, convulsions			Marked	Mild	Normal
4. Anterior uveitis, diarrhea, respiratory distress, swollen joints, open wounds		Yes			No
IV. Historical Data					
1. Placentitis, vulvar discharge prior to delivery, dystocia		Yes			No
2. Prematurity			300-310	310-330	>330

(해석 : 11점 이상이면 Sepsis의 확률이 93%, 10점 이하이면 Non-sepsis일 확률이 88%임)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연도별 연구 목표 및 달성도

구분	연구 개발 목표	목표의 달성도
1차 년도 (2008. 12.~200 9.11)	○ 말 번식장애 유발 세균, 바이러스 병원체의 신속 검출과 동정을 위한 진단법 및 예방법 개발	○ 번식장애 유발 세균 병원체의 신속 검출과 동정을 위한 진단법 개발 ○ 음문의 Caslick수술 및 약제감수성 검사를 통한 예방법 개발 ○ 씨수말의 생식기질환 원인체인 EHV의 동정을 위한 진단법 및 예방법 개발\
	○ 국내 환경에 적합한 씨수말로부터 정액 채취 및 동결정액 제조 기술 개발 ○ 인공수정(10두)	○ 정액 채취(콘돔, 인공질) 및 정액 회석 기술 개발 ○ 액상정액 제조·보관 및 동결정액 제조 기술 개발 ○ 냉장정액(13두), 동결정액(7두) 인공수정 실시
	○ 최적 교배적기 기준 정립 및 씨암말의 임신기간별 모니터링	○ 수정 후 15일 및 40일, 임신확인 후 30일 간격 임신 모니터링 기술 확립 ○ 임신말에 대한 최적의 사양관리 프로그램 확립
	2차 년도 (2009. 12.~201 0.11)	○ 말 번식장애 유발 병원체의 host내 작용기전 및 유전학적 특성 규명, 예방법 개발
○ 동결정액 이용한 말 분만 및 관리 체계		○ 망아지 태반무게, 체중 및 체고, 기타 이상 연구 ○ 인공수정(10두) 대상 번식말에 대한 질병검사 모니터링 ○ 말 수정란이식을 위한 발정동기화 체계 개발
○ 망아지의 초기 육성 기법 정립		○ 이유 전 망아지 육성 및 초기육성 기법 정립 ○ 생산된 망아지의 면역증강 효과평가 ○ 최적 수정란 이식 기준 설정 및 씨암말의 모니터링

구분	연구 개발 목표	목표의 달성도
3차 년도 (2010. 12.~201 1.11)	○ 승용마 친자감정 기법 정 립 및 등록시스템 구축	○ 유전자(DNA) 분석기법(ISAG Horse Ms panel 및 SNP) 개발 및 등록시스템 구축 ○ SNP를 통한 승용마 특이 유전형질 탐색
	○ 수정란 이식에 의한 승용 마 생산기술 시험	○ 말 수정란 이식 기법 개발 : 국내 최초 말 수정 란 회수 및 이식 시험 및 성공(5두 채란, 3두 회 수) ○ 수정란 이식 : 2두 이식(1두 임신)
	○ 임신 씨암말의 모니터링 및 승용마 육성 기반 구축	○ 최적 수정란 이식 기준 설정 및 씨암말의 모니터 링 ○ 동결정액 활용 인공수정으로 태어난 망아지의 육 성 시험(1두) ○ 관련기술의 실용화 체계 구축 및 농가 전수
최종 평가	○ 한국형 승용마 생산을 위 한 기술 개발 및 실용화 체계 구축	○ 승용마 생산성 향상을 위한 번식장애 씨암(수)말 의 병원체 모니터링 기술 및 예방법 개발 ○ 말의 인공수정에 필요한 기술 개발 및 수정란 이 식을 위한 토대 마련 ○ 본 연구는 국내 말 생산농가에 활용할 수 있는 실용 연구로서 향후 국내 말 생산분야에 생산성 향상과 농가의 소득 증대에 기여할 수 있음

제2절 관련분야 기술 발전에의 기여도

1. 기술적 측면

가. 본 연구는 말의 인공수정과 수정란 이식을 통해 승용마 생산에 필요한 번식장애 씨암(수)말을 대상으로 먼저 번식마의 생식기 및 정액 유래 병원체의 신속 진단 및 예방법을 생산농가에 적용하여 수태율 및 생산성 향상에 기여할 수 있을 것이다.

나. 번식장애 유발 병원체에 대한 백신 개발에 중요한 연구자료로 활용할 수 있을 것이고 개발된 유전자(DNA) 분석 기법을 승용마의 번식과 혈통등록 시 개체식별 및 친자확인에 활용함으로써 공정하고 체계적인 등록사업화에 기여할 것이다.

다. 말의 인공수정과 수정란 이식에 필요한 기술(정액 채취 및 동결정액 제조, 융해 및 인공수정, 수정란 채란 및 이식 등)을 국내에서 처음으로 정립함으로써 향후 국내 승용마 생산에 크게 기여할 것이다. 또한 말 동결정액 생산 공급 및 말 전문 인공수정사 양성에도 기여할 것이다.

라. 망아지 생산 후 체계적인 사양 및 질병관리로 망아지의 면역증강을 통해 고부가가치를 높이고 한국형 승용마로서 육성 및 조련의 체계 구축으로 신성장 승용마 산업화에 기여할 것이다.

2. 경제·산업적 측면

가. 본 연구는 주로 경마산업 위주로 편중되어 있는 국내의 말산업을 승마산업으로의 전환을 위한 계기를 만들고자 정부의 말산업육성법 시행과 FTA 이후 예상되는 대체산업으로서 승용마 생산업이 국내 주요 축산산업으로의 자리매김과 생활승마 활성화에 따른 승용마 저변 확대를 위한 생산기술의 개발로 승용마 생산업의 안정화에 기여할 것이다.

나. 승용마 생산을 위한 번식장애 씨암(수)말의 병인학적 특성 및 생산성 향상 기술을 개발하고 승용마 생산·육성기반 및 실용화 체계를 구축하여 향후 승용마를 생산코자 하는 농가의 고소득 창출로 이어지는 경영의 안정화에 기여할 것이다.

다. 본 연구를 통해 얻은 정액 제조 기술 및 정액 제품은 고가의 씨수말을 구매비용과 사육비용을 줄일 수 있고 또한 외국의 우수 품종의 수정란을 도입 농가 씨암말에 이식하는 체계를 확보하므로 농가의 실질 소득 향상이 가능하고 수입 축산물(특히 정액)에 대한 국내 축산물의 경쟁력 강화에 기여할 것이다.

라. 대학 및 연구기관의 말 산업 전문 인력 pool 형성·경영 기법 습득을 통한 창업(말 번식센터 운영, 정액 제조 및 판매, 인공수정 시술, 말 조련업 등) 기회를 제공하는데 기여할 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 실용화 · 산업화 계획

가. 일반적으로 분리 동정되지 않는 전염성 자궁염을 일으키는 세균을 쉽고 빠르게 동정하는 kit 제품화, 교배기에 수정란이 잘 착상 할 수 있도록 자궁의 환경을 최적의 환경으로 만들어 주는 자궁 세척기구 개발, 망아지의 면역력 향상을 위한 경구 섭취용 면역강화제 개발 및 실용화, 국내 승용마의 혈통등록 및 개체확인에 유용한 유전자 감정 kit 개발 및 실용화 등 국내 말의 생산성 효율 향상에 기여하고자 한다.

나. 본 연구를 통해 얻은 말의 동결정액 제품 개발은 국내에서는 처음으로 현재 시장은 초보적인 단계이나 향후 정부의 승용마산업 육성 및 활성화 정책에 따라 그 규모가 확대되고 있는 상황이다. 특히 미국의 대학(Colorado state university)에서는 씨수말 사육 농가와 번식마 사육 농가를 연결하여 씨수말 정액의 동결 서비스를 제공하여 수익을 창출하고 있다. 따라서 본 연구를 통해 승용마 동결정액을 승용마 사육 농가 또는 승마장에 판매를 통해 수입대체 효과 및 말 생산 효율 향상에 기여하고자 한다.

다. 말의 수정란 이식은 번식마 사육 농가의 요구에 맞게 주문자 생산 방식을 취하고 있고, 능력은 우수하지만 불임이 된 경우에 적극 활용하고 있다. 향후 국내에서도 승용마 생산산업이 활성화되고 말의 가치 상승 및 기술력이 축적된다면 국내에서 사육중인 우수형질의 말을 대상으로 불임 치료 서비스가 가능할 것이다.

라. 결론적으로 본 연구를 통해 얻은 결과를 바탕으로 향후 국내 승용말 생산 및 육성사업에 활용될 수 있도록 농림수산식품부의 한국마사회 특별적립금 사업인 말 생산농가 육성 및 인공수정 양성과정 사업에 적극적으로 활용할 것이고 정부와 한국마사회로부터 가칭) 한국 말 번식센터로 지정 받을 수 있도록 노력할 것이다.

제2절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

가. 본 연구를 통해 얻은 결과를 바탕으로 경상북도 농민사관학교 말산업 전문인력양성과정과 농림수산식품부의 한국마사회 특별적립금 사업인 말 생산농가 육성 및 인공수정 양성과정 사업에 적극적으로 활용할 것이고 정부와 한국마사회로부터 가칭)한국 말 번식센터로 지정 받을 수 있도록 노력할 것이다.

나. 본 연구 결과는 국내 관련 학회 및 세미나, 신문 등을 통해 지속적으로 홍보할 것이고 정부의 승용말 생산 활성화 방안의 일환으로 한국마사회에서 수입한 정액을 본 연구진이 위탁받아 한국형 승용마 생산을 위한 인공수정 시행 및 번식효율 극대화에 적극적으로 기여할 것이다.

다. 국내에서 승용말 생산을 희망하는 말 생산자에게 본 연구 결과가 실용화될 수 있도록 맞춤형(주문식) 인공수정을 실시할 계획이다.

제3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

가. 본 연구를 통해 얻은 결과는 국내외 전문 학회지에 투고하거나 전문 학회에서 발표하여 연구 결과의 우수성을 알리고 또한 특허 출원 등을 통해 지식재산권을 확보할 계획이다.

나. 특허는 현재 2건이 출원되어 심사 중(수정란 동결보관 스트로우용 플러그, 10-2010-0094184; 휴대용 수의기구 박스, 10-2011-0095445)에 있으며 향후 추가적인 실험이 완료되면 진단기법과 인공수정 기술 및 정자처리에 관련된 특허를 출원할 예정이다.

제4절 추가연구, 타연구에 활용 계획

가. 본 연구를 통해 얻은 결과는 농림수산식품부(한국마사회)의 승용말 육성 정책과 국내 비육말 생산에 적극적으로 활용할 것이다.

나. 우수 유전자원의 씨수말로부터 정액을 채취하여 동결정액 제품을 생산한 후 국내 말 생산농가에 제공할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 맞춤형 망아지 생산

최근 연구에서 미국의 연구진은 말 정자의 성감별과 이를 활용한 상업적인 말 생산 프로그램을 개발하여 말 번식의 부가가치를 한차원 업그레이드 시켰다.

국외의 가축 번식은 기존의 대량 생산 차원을 넘어서 맞춤형 산자(암컷, 수컷의 소, 말) 생산으로 변화하고 있어, 국내에서도 이에 대한 연구와 산업화를 추진하여, FTA에 대응한 맞춤형, 고품질, 축산물 생산을 통한 농가 신소득원 개발에 박차를 가해야 할 것으로 판단된다.



The screenshot shows the homepage of **theHORSE.com**, with the tagline "YOUR GUIDE TO EQUINE HEALTH CARE". The navigation menu includes: Home, Topics, News, Videos, Free Reports, Resources, Free Horses, Blogs, Podcasts, Newsletters, and Subscribe. A featured article banner for **Nano-E** is visible, stating: "Olympian Karen O'Connor uses Nano-E® to support muscle recovery and repair after strenuous three-day competition." Below this, the main article is titled "Sexed Equine Semen Available Commercially in 2010" and is attributed to "by: Edited Press Release". The article text begins: "The ability to have stallion semen sorted for sex-selected foals is being offered on a commercial basis through a new alliance between Sexing Technologies and Equine Reproduction Innovations. The use of sex-selected semen in conjunction with intracytoplasmic sperm injection will be offered to horse breeders for the 2010 breeding season. Why used sexed semen?..."

제 7 장 참고문헌

- Asbury AC. Endometritis in the mare. In : Current Therapy in Theriogenology. Ed : Morrow DA, WB Saunders, Philadelphia, USA, 1986, 718-722.
- Amann RP and Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J. Equine Vet. Sci 1987. 7, 145~173.
- Anzai T, Timoney JF, Kuwamoto T, Wada R, Oikawa M, Higuchi T. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of the SzP gene of *Streptococcus zooepidemicus* isolated from respiratory tract of horses. Am. J. Vet. Res 2002. 63, 1298~1301.
- Backman T, Bruemmer JE, Graham JK and Squires EL. 2004. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. J. Anim. Sci 2004. 82, 690~694.
- Barbacini S, Loomis P and Squires EL. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. Anim. Reprod. Sci 2005. 89, 203~235.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol 1996, 45, 493-496.
- Bedford-Guaus SJ. 2007. Transported stallion semen and breeding mares with cooled or frozen-thawed semen. Clin. Tech. Equine Pract 2007. 6, 239~248.
- Benjamin J, Li L, Patterson C, Greenberg BD, Murphy D. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. Nat Gen 1996. 12, 81~84.
- Binns MM, Uolmes NG, Holliman AM. The identification of polymorphic microsatellite

- loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *Brit. Vet. J* 1995. 151, 9~15.
- Breen M, Lindgren G, Binns MM, Norman J, Irvin Z, Bell K, Sandberg K, Ellegren H. Genetical and physical assignments of equine microsatellites—first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mamm. Genome* 1997. 8, 267~273.
- Bowling AT, Eggleston-Scott ML, Byrns G, Clark RS, Dileanis S, Wictum E. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim. Genet* 1997. 28, 247~252.
- Cho GJ. Genetic relationship among the Korean native and alien horses estimated by microsatellite polymorphism. *Asian-Aust. J. Anim. Sci* 2006. 19, 784~788.
- Cho GJ, Kim BH. Studies on blood types in Thoroughbred horses. *Kor. J. Vet. Res* 2000. 40, 683~689.
- Cho GJ, Cho BW. Microsatellite DNA typing using 16 markers for parentage verification of the Korean native horse. *Asian-Aust. J. Anim. Sci* 2004. 17, 750~754.
- Cho GJ, Yang YJ, Cho BW, Kim BH. Blood groups and antierythrocyte antibody for prevention of neonatal isoerythrolysis in horse. *Korean J. Vet. Res* 2002. 42. 469~473.
- Choi SK, Kim SG, Cho GJ. The biochemical and molecular characteristics of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from the genital tract of Thoroughbred mares in Korea. *Kor. J. Vet. Serv.* 2011. 34, 201~208.
- Clark C, Greenwood S, Boison JO, Chirino-Trejo M, Dowling PM. Bacterial isolates from equine infections in western Canada(1998-2003). *Can. Vet. J* 2008, 49, 153~160.
- Colenbrander B, Gadella BM and Stout TAE. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Domest. Anim* 2003. 38, 305~311.

- Coogle L, Bailet E, Reid R, Russ M. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci LEX002, -003, -004, -005, -007, -008, -009, -010, -011, -013 and -014. *Anim. Genet* 1996. 27, 126~127.
- Cristanelli MJ, Squires EL, Amann RP and Pickett BW. Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology* 1984. 22, 39~45.
- Crockett EC, Graham JK, Bruemmer JE and Squires EL. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology* 2001. 55, 793~803.
- Dimoski P. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croat. Med. J* 2003. 44, 332~335.
- Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y. Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat. Genet* 1996. 12, 78~80.
- Ecot P, Vidament M, de Mornac A, Perigault K, Clement F and Palmer E. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J. Reprod. Fertil* 2000. 56, 141~150.
- Eggleston-Stott M, L DelValle A, Bautista M, Dileanis D, Wictum E, Bowling AT. Nine equine dinucleotide repeats at microsatellite loci UCDEQ136, UCDEQ412, UCDEQ425, UCDEQ437, UCDEQ467, UCDEQ487, UCDEQ502 and UCDEQ505. *Anim. Genet* 1997. 28, 370~371.
- Ellegren H, Johansson M, Sandberg K, Andersson L. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim. Genet* 1992. 23, 133~142.
- Erdman MM, Creekmore LH, Fox PE, Pelzel AM, Porter-Spalding BA, Aalsburg AM, Cox LK, Morningstar-Shaw BR, Crom RL. Diagnostic and epidemiologic analysis of

- the 2008–2010 investigation of a multi-year outbreak of contagious equine metritis in the United States. *Preventive Vet. Med* 2011. 101, 219~228.
- Guerin G, Bertaud M, Amigues Y. 1994. Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. *Anim. Genet* 1994. 25, 62.
- Hafez ESE and Hafez B. *Reproduction in farm animals*. 7th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, 2000. pp. 382~385.
- Hemberg E, Lundeheim N and Einarsson S. Successful timing of ovulation using deslorelin (Ovuplant) is labour-saving in mares aimed for single AI with frozen semen. *Reprod. Domest. Anim* 2006. 41, 535~537.
- Hembery E, Lundeheim N, Einarsson S. Restrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in Thoroughbred mares. *J. Vet. Med* 2005. 52, 474~477.
- Herholz C, Miserez R, Nicques J, Frey J, Popoff M, Gibert M, Gerrer H, Straub R. Prevalence of β 2-Toxigenic *Clostridium perfringens* in Horses with Intestinal Disorders. *J. Clin. Microbiol* 1999. 358~361.
- Ike K, Kamada M, Azai T, Imagawa H, Kumanomido T, Nakazawa M, Kashiwazaki M, Kume T. Some Properties of *Escherichia coli* isolated from Foals with Diarrhea and Mares with Metritis. *Bull Equine Res. Inst* 1987, 24, 33-41.
- Irvin Z, Giffard J, Brandon R, Breen M, Bell K. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci ASB21, 23, 25 and 37-43. *Anim. Genet* 1998. 29, 67.
- Kamada M, Anzai T, Kanemaru T, Wada R, Kumanomido T. Contagious equine metritis; Characterization of small and large colonial varienants of *Taylorella equigenitalis* isolated from a laboratory strain. *Bull. Equine Res. Inst* 1987. 24, 23~32.

- Kwon DY, Cho GJ. Standardization and Usefulness of ISAG Microsatellite Markers for Individual Identification and Parentage Verification in Horse Breeds. *J. Vet. Clin* 2009. 26, 220~225.
- Lee SY, Cho GJ. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. *J. Vet. Sci* 2006. 7, 63~67.
- Lee CS, Lee DW, S대 GH, Rhu IS, Son DS, Kim MH, Lee HC, Choi GC, Kim JY. Scening of normal flora in mare's vagina during breeding season. *Proc KSV* 1999. 43, 127.
- Loomis PR. 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci* 2001. 68, 191~200.
- Loomis PR and Graham JK. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci* 2008. 105, 119~128.
- Martin JC, Klug E and Gunzel AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 1979. 27, 47~51.
- Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, Sandberg K, Andersson L. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Genet* 1994. 25, 19~23.
- Metcalf ES. Optimizing pregnancy rates using frozen-thawed equine semen. *Anim. Reprod. Sci* 2005. 89, 297~299.
- Metcalf ES. The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology* 2007. 68, 423~428.
- Morel MD. Equine reproductive physiology, breeding and stud management.

- Wallingford, Oxon: CABI Publishing 1999. 208~227.
- Morris LH, Tiplady C and Allen WR. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Vet. J* 2003. 35, 197~201.
- Müller Z. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 1987. 35, 121~125.
- Nielsen JM, Kofoed Bock TS and Ersbøll AK. Factors associated with fertility in horse in a Danish equine practice after artificial insemination with frozen-thawed semen. *Anim. Reprod. Sci* 2008. 107, 336~337 (Abst.).
- Palmer E and Magistrini M, Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Vet. Scand. (Suppl.)* 1992. 88, 137~152.
- Park YS, Park HD, Jang YS, Cho GJ. Factors affecting on the motility and fertility of frozen-thawed stallion semen. *J. Emb. Trans* 2008. 23, 161~166.
- Rose RJ, Hodgson DR. *Manual of equine practice*. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1993. 250~274.
- Samper JC. 2008. Induction of estrus and ovulation: why some mares respond and others do not. *Theriogenology* 70:445-447.
- Samper JC. *Equine breeding management and artificial insemination*. 2nd ed, Saunders, Missouri, 2009. pp. 175-183.
- Sieme H, Schafer T, Stout TA, Klug E and Waberski D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology* 2003. 60, 1153~1164.
- Stormont, C., Suzuki, Y. and Rhode, E. A. 1964. Serology of horse blood groups.

Cornell Vet 54. 439~452.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol* 1995. 33, 2233-2239.

Timoney JF. Strangles vaccines in trouble again. *Equine Vet J* 2007. 39, 196.

Timoney JF. Strangles. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract* 1993. 9, 365-374.

Timoney JF, Artiushin SC, Boschwitz JS. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzP. *Se. Infect. Immun* 1997. 65, 3600-3605.

Tozaki T, Kakoi H, Mashima S, Hirota K, Hasegawa T, Ishida N, Miura N, Tomita M. The isolation and characterization of 18 equine microsatellite loci, TKY272-TKY289. *Anim. Genet* 2000. 31, 149.

Tozaki T, Kakoi H, Mashima S, Hirota K, Hasegawa T, Ishida N, Miura N, Tomita M. 2000. The isolation and characterization of 34 equine microsatellite loci, TKY290-TKY323. *Anim. Genet* 2000. 31, 234-236.

Van Haeringen H, Bowling AT, Scott ML, Lenstra JA, Zwaagstra KA. A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Anim. Genet* 1994. 25, 207.

Vidament M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci* 2005. 89, 115~136.

Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P and Palmer E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 1997. 48, 907~917.

Vidament M, Ecot P, Noue P, Bourgeois C, Magistrini M and Palmer E.

- Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2000. 54, 907~919.
- Woods J, Rigby S, Brinsko S, Stephens R, Varner D and Blanchard T. Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E2 prior to insemination of mares in the uterine horn or body. *Theriogenology* 2000. 53, 1827~1836.
- Younan M, Estoepongastie AT, Cengiz M, Alber J, EI-Sayed A, Lammler C. Identification and molecular characterization of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from camels(*Camelus dromedarius*) and camel milk in Kenya and Somalia. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet Public Health* 2005. 52, 142~146.
- Zoetendal EG, Heilig HG, Klaassens ES, Booijink CC, Kleerebezem M, Smidt H, de Vos WM. Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. *Nat. Protoc* 2006. 1, 870-873.
- 김태중, 윤화중, 최귀철, 박정문. 번식마 생식기내 세균총 조사 및 약제 감수성에 관한 연구. 건국대학교 축산대학 동물자원연구센터. 1991.
- 양영진, 조길재, 남치주. 제주지역 더러브렛 말의 번식특성 조사. *대한수의학회지* 2004. 44, 105~111.
- 윤성욱, 권도연, 최성균, 이희수, 조길재. 말에서 분리한 *Escherichia coli*의 특성 및 항생제 감수성 양상. *대한수의학회지* 2010. 50, 231~237.
- 최성균, 이수길, 양재혁, 조길재. 더러브렛 씨암말의 생식기내 세균의 분포 및 항생제 감수성 양상. *한국임상수의학회지* 2007. 24, 19~25.