

간접형광항체법을 이용한 닭 로타바이러스의 혈청역가 조사

김혜경, 곽학구, 박경재, 안재문, 강신영*

충청북도 축산위생연구소 남부지소, 충북대학교 수의과대학*

Serological studies of avian rotaviruses in chicken sera using indirect immunofluorescence assay

Hea-Kyung Kim, Hak-Koo Kwak, Kyung-Jae Park, Jae-Moon Ahn,
Shien-Young Kang*

*Southern Branch, Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute,
College of veterinary medicine, Chungbuk National University*.*

Abstract

A total of 420 chicken sera from various regions were tested for the presence of antibodies to avian rotavirus using indirect immunofluorescence assay (IFA). In broiler farms, rotavirus antibodies were detected from 20 farms among 30 farms tested and the positive rates were above 50% in 9 farms. In parent stock farms, rotavirus antibodies were detected from 5 farms among 14 farms tested. From sera collected in 7 layer farms rotavirus antibodies were not detected.

Key words : Avian rotavirus, Serology, IFA, Broiler, Layer, Parent stock,

서 론

로타바이러스는 *reoviridae* family에 속하는 바이러스로서 사람을 포함한 모든 포유동물 및 조류에서 장염을 유발시키는 원인체로 알려져 있다^{1~6)}. 로타바이러스는 피막이 없고 직경 75nm의 정20면체 protein capsid를 가지고며 11개의 분절로 된 핵산을 가지고 있는 double-stranded RNA (ds RNA) 바이러스로서

outer capsid proteins, inner capsid proteins, core로 구성되어 있다^{3,4,7~9)}.

로타바이러스는 처음에는 epidemic diarrhea of infant mice (EDIM), nebraska calf diarrhea virus (NCDV), neonatal diarrhea virus, Nebraska or neonatal calf diarrhea (scour) virus, orbivirus, orbivirus-like, duovirus, reo-like agent, infantile gastroenteritis virus 등으로 불려졌으나, 지금은 숙주의 이름을 따

서 bovine, canine, equine, feline, human, ovine, porcine, avian rotavirus 등으로 불려지고 있다³⁾.

모든 로타바이러스는 전자현미경상에서 동일한 형태를 하고 있으며 또한 소장의 장점막세포에 병원성이 있는 점에서 동일하지만 면역전자현미경법이나 혈청중화시험에서 상당수의 차이점이 존재하여 동물간의 차이를 구별할 수 있다¹⁰⁾. 초기의 혈청학적 연구에서 많은 수의 로타바이러스주들은 공통항원을 가지고 있는 것으로 생각되었으며¹¹⁾, 나중에 혈청중화시험으로 비교하여 보았을 때 각각 다른 항원을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다¹²⁾. 또한 하나의 로타바이러스주는 여러개의 다른 바이러스 단백질을 가지며 이러한 항원의 복잡성과 다양성을 근거로 하여 많은 연구자들이 혈청학적인 분류를 시도하였다^{12~16)}. 여러 종류의 동물에서 분리된 로타바이러스는 면역형광법, 면역전자현미경법, 보체결합반응, ELISA 등에서 밝혀진 바와 같이 공통의 그룹항원(VP6)을 가지고 있다.

조류 로타바이러스는 미국 중서부에서 설사증세를 나타내는 2~3주령의 칠면조에서 1977년 처음으로 발견되었다¹⁷⁾. 그 이후 미국과 아일랜드, 프랑스, 일본 등에서 조류 로타바이러스에 대한 연구가 계속되어 칠면조 로타바이러스를 세포배양으로 증식하였으며^{17~20)} 포유류의 group A 로타바이러스와 항원적으로 관계가 있다는 것을 발견하였다¹⁸⁾. 발전하여 북아일랜드에서는 group A와 형태는 같으나 항원적으로 다른 group D의 turkey rotavirus-like virus를 발견하였다^{21~23)}.

국내에서는 송아지와 자돈의 로타바이러스 분리 및 연구가 활발히 이루어지고 있는데^{24~26)} 반하여 닭 로타바이러스에 대해서는 발생 보고가 아직 없는 실정이다. 따라서 본 실험에서는 우리 나라에 사육되고 있는 닭에 대한 로타바이러스 항체 보유 여부를 조사하여

현재 국내에서 보고되지 않은 닭 로타바이러스에 대한 감염 실태를 파악하고 그 피해 사례를 조사하여 닭 로타바이러스로 인한 설사증 발생 여부를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양

Embryonic rhesus monkey kidney (MA104) cell을 10% fetal bovine serum (FBS)과 gentamicin (80mg/ml)이 첨가된 Eagle's minimum essential medium (EMEM) 배지를 이용하여 96-well plate에 배양하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 monolayer가 형성되도록 배양하였다. 바이러스를 접종하기 전에 monolayer가 형성된 plate는 growth medium (GM)을 제거하기 위해 serum-free EMEM (SFM) 배지를 이용하여 3번 세척하였다. 마지막 세척시 각 well에 200μl의 SFM을 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 30분 배양으로 FBS를 완전히 제거하였다.

바이러스 배양 및 정제

Group A turkey rotavirus A strain을 충북 대학교 수의과대학 바이러스연구실에서 분양 받아 MA104 cell을 이용하여 24시간 배양하였다. 바이러스 정제는 바이러스를 감염시킨 후 세포변성효과 (CPE)가 나타나면 얼리고 녹이는 과정을 3번 반복하여 세포 내 바이러스를 유리시키고 바이러스가 증식된 배양액을 4,000rpm에서 30분 원심 분리하여 세포를 제거하고 SFM으로 polyethylene glycol (PEG)과 NaCl이 각각 8%와 0.5M이 되도록 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 진탕하여 바이러스를 침전시키고 다시 PBS로 부유시켜 8,000 rpm에서 2시간 원심 분리하여 바이러스 pellet을 PBS로 2ml가 되도록 만들었다. 이것을 반투

막에 넣고 PBS로 4°C에서 진탕하면서 투석하였다.

양성 혈청 준비

30주령된 로타바이러스 음성 산란계에 정제된 바이러스를 freund's complete adjuvant와 동량으로 섞어서 1㎖씩 1차 근육 주사하였다. 2차, 3차, 4차 접종은 각각 마지막 접종 2주 후에 바이러스를 freund's incomplete adjuvant와 동량으로 섞은 다음 1㎖씩 근육 주사하였다. 4차 접종 후 산란계의 익정맥 (wing vein)에서 채혈한 후 혈청을 분리하여 56°C에서 30분간 비동화시킨 후 로타바이러스에 대한 혈청 역가를 간접형광항체법으로 검사하여 1:1,280 이상의 로타바이러스 항체 역가를 나타내는 것을 양성 혈청으로 준비하였다.

가검혈청 전처리

가검혈청은 육계의 경우 30개 농장에서 215개의 혈청을, 종계의 경우 14개 농장에서 135개 혈청, 산란계의 경우 7개 농장에서 70개 혈청을 준비하였다. 준비된 가검혈청은 비특이 반응을 제거하기 위해 56°C에서 30분 동안 비동화한 후 PBS에 1:20으로 희석하여 바이러스에 감염되지 않은 MA 104 배양 세포에 반응시켰다. 가검혈청과 세포를 37°C에서 1시간 반응시킨 후 다시 4°C에서 20시간 반응시키고 microplate를 3,000rpm에서 30분간 원심하여 상층액을 채취하여 실험에 사용하였다.

간접형광항체법 (Indirect immunofluorescence assay : IFA)

단층이 형성된 MA 104 세포는 3회 세척 후 turkey rotavirus를 SFM으로 희석하여 well당 100µl씩 접종한 후 37°C CO₂배양기에서 1시간 감작시켰다. 감작된 microplate에 pancreatin을 SFM으로 1:100으로 희석하여 100µl씩 첨가한

다음 37°C CO₂ 배양기에서 20시간 배양 후 세포변성이 나타나기 전에 80% acetone으로 고정시켰다. 고정된 microplate는 실험 전까지 -4°C에서 보관하며 사용하였다.

가검혈청 및 음성, 양성혈청을 고정된 microplate에 100µl씩 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 세척 후 FITC conjugated anti-chicken IgG를 PBS로 1:100으로 희석하여 각 well에 100µl씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시키고 다시 위와 같은 방법으로 세척한 다음 glycerol buffer를 한 방울씩 첨가하여 형광현미경으로 관찰하였다.

결 과

간접형광항체법에 의한 로타바이러스 양성 혈청에 의한 반응은 Fig 1과 같이 세포질에서 로타바이러스 특유의 형광을 관찰할 수 있었으나 음성 혈청에서는 형광이 관찰되지 않았다 (Fig 2). 이러한 간접형광항체법을 이용하여 국내에 사육되는 육계, 종계, 산란계에서 닭로타바이러스에 대한 혈청의 항체 여부를 확인한 결과는 다음과 같다.

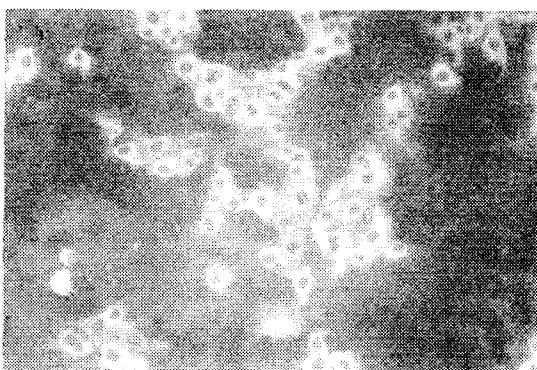


Fig 1. Immunofluorescence of MA104 cells infected with turkey rotavirus A strain. Cells were stained with positive serum samples by indirect immunofluorescence assay.

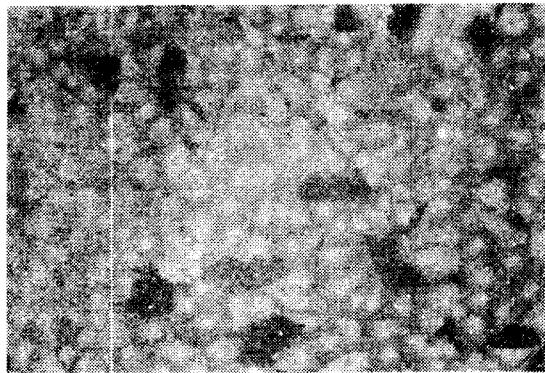


Fig 2. Immunofluorescence of MA104 cells infected with turkey rotavirus A strain Cells were stained with negative serum samples by indirect immunofluorescence assay.

육계에서 로타바이러스 감염은 총 30개 농장에서 수집한 혈청 중 20개 농장의 혈청(B1~4, B6~9, B11~14, B20~27)에서 로타바이러스 양성반응을 확인하였고, 10개 농장의 혈청에서는 로타바이러스 양성반응을 확인할 수 없었다 (Table 1). 양성반응을 확인한 20개 농장 중 9 개 농장의 혈청(B1~3, 6, 8, 12, 14, 22, 23)에서 50%이상의 양성반응을 확인하였다.

종계의 로타바이러스 감염은 총 14개 농장 중 5개 농장의 혈청(P1, 4, 9, 11, 12)에서 로타바이러스 양성을 확인할 수 있었다 (Table 2). 그러나 5개 농장의 양성반응은 모두 50%이하로 낮은 감염률을 나타내었다. 산란계의 경우

Table 1. Prevalence of avian rotavirus infection of broiler by indirect immunofluorescence assay(IFA)

Samples	Age(days)	Type	No of chickens		Infection rate(%)	Sources
			Examined	Infected		
B1	38	Floor	10	6	60	Chungbuk
B2	38	"	5	4	80	Kyungbuk
B3	38	"	10	6	60	Chungbuk
B4	35	"	5	2	40	Chungnam
B5	35	"	5	0	0	Kyungbuk
B6	35	"	10	5	50	Chungbuk
B7	37	"	10	2	20	"
B8	38	"	5	3	60	Chungnam
B9	36	"	5	1	20	Kyungbuk
B10	35	"	15	0	0	"
B11	39	"	5	4	80	Chungbuk
B12	40	"	5	3	60	Kyunggi
B13	39	"	5	2	40	"
B14	39	"	5	4	80	Chungbuk
B15	35	"	5	0	0	"
B16	37	"	5	0	0	Chungnam
B17	38	"	5	0	0	Chungbuk
B18	38	"	5	0	0	"
B19	38	"	5	0	0	Chungnam
B20	36	"	5	1	20	Chungbuk
B21	35	"	5	2	40	"
B22	35	"	5	5	100	"
B23	35	"	5	4	80	"
B24	9	"	10	1	10	"
B25	13	"	10	1	10	Chungnam
B26	21	"	10	1	10	Chungbuk
B27	41	"	10	2	20	"
B28	14	"	10	0	0	"
B29	17	"	10	0	0	"
B30	13	"	10	0	0	"
Total			215	59	27.44	

Table 2. Prevalence of avian rotavirus infection of parent stock by indirect immunofluorescence assay (IFA).

Samples	Age (weeks)	Type	No of chickens		Infection rate(%)	Sources
			Examined	Infected		
P1	26	Floor	10	1	10	Chungbuk
P2	30	"	5	0	0	Chungnam
P3	45	Cage	10	0	0	"
P4	25	"	10	2	20	Kyunggi
P5	40	Floor	10	0	0	Chungbuk
P6	42	"	10	0	0	Kyunggi
P7	38	"	10	0	0	Chungnam
P8	32	Cage	10	0	0	Kyunggi
P9	30	Floor	10	4	40	Chungbuk
P10	36	"	10	0	0	Chungnam
P11	37	"	10	2	20	Chungbuk
P12	40	"	10	4	40	Chungnam
P13	42	Cage	10	0	0	Chungbuk
P14	36	Floor	10	0	0	"
Total			135	13	9.63	

Table 3. Prevalence of avian rotavirus infection of layer by indirect immunofluorescence assay(IFa)

Samples	Age (weeks)	Type	No of chickens		Infection rate (%)	Sources
			Examined	Infected		
L1	40	Cage	10	0	0	Chungbuk
L2	20	"	10	0	0	"
L3	41	"	10	0	0	Chungnam
L4	19	"	10	0	0	"
L5	50	"	10	0	0	Chungbuk
L6	18	"	10	0	0	Kyunggi
L7	17	"	10	0	0	Kyungbuk
Total			70	0	0	

7개 농장의 혈청 모두에서 로타바이러스 감염이 확인되지 않았다 (Table 3).

고 칠

조류에서 발생하는 로타바이러스는 1977년 미국 Bergeland 등¹⁷⁾에 의해 설사증세를 나타내는 2~3주령의 칠면조에서 최초로 보

고되었다. 닭에서 로타바이러스는 1997년 Legrottaglie 등²⁷⁾에 의해 설사로 인해 폐사율이 증가되는 6~8일령 닭에서 분리된 보고가 있다. 가까운 일본에서도 조류 로타바이러스에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 반하여²⁰⁾ 국내에는 돼지 및 소에서의 로타바이러스에 대한 연구는 많이 이루어지고 있으나 닭 로타바이러스에 관한 보고는 미흡한 실정

이다.

로타바이러스의 serogroup은 A형부터 G형 까지 7가지가 있으며, 그 중 조류 로타바이러스의 serogroup에는 A형, D형, F형, G형이 있다. serogroup A형 로타바이러스는 전 세계적으로 분포되고 있으며, 이러한 내용을 뒷받 하는 보고가 북아일랜드, 미국, 일본, 이탈리아, 오스트리아 등^{6,17,20,27)}에서 보고되었다.

현재 로타바이러스의 진단법으로는 세포배양에 의한 바이러스 분리, 분변 가검물로부터 전자현미경을 통한 관찰, electropherotyping에 의한 RNA분석, 형광항체법 및 효소면역흡착법 등이 널리 사용되고 있다. 본 연구는 간접형광 항체법을 이용하여 국내에서 발생하는 닭 로타바이러스의 감염 분포를 확인하였다.

각 농장으로부터 채취한 혈청을 이용하여 육계, 종계, 산란계의 로타바이러스에 대한 항체 여부를 확인한 결과, 육계와 종계에서 로타바이러스 양성반응을 확인하였다. 그러나 산란계의 혈청 sample에서는 로타바이러스 양성 반응은 확인할 수 없었다. 육계에서 확인된 로타바이러스 감염은 총 30개 농장에서 수집한 혈청 중 20개 농장의 혈청(B1~4, B6~9, B11~14, B20~27)에서 로타바이러스 양성반응을 확인하였고, 10개 농장의 혈청에서는 로타바이러스 양성반응을 확인할 수 없었다. 양성반응을 확인한 20개 농장 중 9개 농장의 혈청(B1~3, 6, 8, 12, 14, 22, 23)에서 50%이상의 양성반응을 확인하였다. 종계의 로타바이러스 감염을 확인하기 위하여 14개 농장의 혈청을 검사하였다. 그 결과 5개 농장의 혈청(P1, 4, 9, 11, 12)에서 로타바이러스 양성을 확인할 수 있었다. 그러나 5개 농장 모두에서 양성반응은 50%이하로 육계에 비하여 감염율이 낮았다. 산란계의 경우 총 7개 농장의 혈청을 검사한 결과 로타바이러스 양성반응이 나타나지 않았다. 육계, 종계, 산란계의 지역별분포를 살펴보면 육

계에서 닭 로타바이러스 양성반응이 나타난 농장은 충북지역 19개 농장 중 13개 농장의 혈청에서 양성반응을 확인하였으며, 충남은 5개 농장 중 3개 농장, 경기는 2개 농장 모두 양성반응을 확인하였으며, 경북은 4개 농장 중 2개 농장에서 로타바이러스 양성반응을 확인하였다. 종계는 충북, 충남, 경기, 전북지역에서 각각 2개, 1개, 1개, 1개 농장에서 로타바이러스 양성반응을 확인하였다. 이 결과로 보아 닭 로타바이러스는 전국적인 감염율을 나타내고 있으리라 예상된다. 사육형태별로 로타바이러스 양성반응은 평사에서 로타바이러스의 발생이 cage사육보다 많은 발생 분포를 확인하였다. 이 결과는 로타바이러스의 감염이 주로 분변에 의한 경구감염이 이루어지고 있기 때문에 cage 사육보다 평사 사육이 더 높은 감염율을 나타낸 것으로 생각된다. 로타바이러스의 감염은 주로 병아리(15일령이전)에 주로 발생되기 때문에²⁷⁾ 이 시기의 로타바이러스 혈청 항체가는 매우 낮으며, 35~40일령의 닭에서 높은 항체가를 유지하게 되므로 35일령 전후의 육계 혈청에서 로타바이러스 양성반응이 가장 높게 나타난 것으로 추측된다. 그 이후에는 항체가 점점 감소하게 되므로 종계와 산란계에서 양성을이 육계보다 낮게 나타나는 것으로 판단된다.

본 실험에서 얻은 결과를 이용하여 로타바이러스 항체 양성농장의 닭 분변 중에서 로타바이러스를 분리하기 위한 실험이 본 실험실에서 진행 중이다. 아직까지 우리나라에서 닭 로타바이러스가 분리되지 않았기 때문에 닭 로타바이러스에 의한 양계농가의 피해가 어느 정도인지 확인되지 않은 상태이다. 따라서 닭 로타바이러스를 분리하여 병원성을 조사하고 다른 포유류 로타바이러스와의 항원성을 밝히기 위한 실험을 진행할 계획이다.

결 론

간접형광항체법을 이용하여 국내에서 사육되고 있는 육계, 종계, 산란계의 로타바이러스 감염 분포를 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 육계에서 로타바이러스 감염은 총 30개 농장에서 수집한 혈청 중 20개 농장의 혈청(B 1~4, B6~9, B11~14, B20~27)에서 로타바이러스 양성반응을 확인하였다. 양성반응을 확인한 20개 농장 중 9개 농장의 혈청(B1~3, 6, 8, 12, 14, 22, 23)에서 50%이상의 양성 반응을 확인하였다.
2. 종계의 로타바이러스 감염은 총 14개 농장 중 5개 농장의 혈청(P1, 4, 9, 11, 12)에서 로타바이러스 양성을 확인하였다.
3. 산란계의 경우 총 7개 농장의 혈청을 검사한 결과 로타바이러스 양성이 확인되지 않았다.

참고문헌

1. Burke B, McCrae MA, Desselberger U. 1994. Sequence analysis of two porcine rotaviruses differing in growth *in vitro* and in pathogenicity: distinct VP4 sequences and conservation of NS53, VP6 and VP7 genes. *J Gen Virol* 75 : 2205~2212.
2. Burns JW, Chen D, Estes MK, et al. 1989. Biological and immunological characterization of a simian rotavirus SA11 variant with an altered genome segment 4. *Virol* 169 : 427~435.
3. Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF. 1983. Rotaviruses : a review. *Curr Top Microbiol Immunol* 105 : 123~184.
4. Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53 : 410~449.
5. Glass RI, Keith J, Nakagomi O, et al. 1985. Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska Calf Diarrhea Virus rotavirus : comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotavirus. *Virol* 141 : 292~298.
6. Huang J, Nagesha HS, Snodgras DR, et al. 1992. Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses(B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. *J Clin Microbiol* 30 : 85~92.
7. Bican PJ, Cohen A, Charpilienne SR. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J Virol* 43 : 1113~1117.
8. Lu W, Duhamel GE, Hoshino Y, et al. 1995. Characterization of the bovine group A rotavirus strain Neonatal Calf Diarrhea Virus-Cody(NCDV-Cody). *J Clin Microbiol* 33 : 990~994.
9. Rosen BI, Parwani AV, Gorziglia M, et al. 1992. Characterization of full-length and polymerase chain reaction-derived partial-length Gottfried and OSU gene 4 probes for serotypic differentiation of porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol* 30 : 2644~2652.
10. Shekarchi IC, Fuccillo DA, Sever JL. 1988. Avidin-biotin latex agglutination assay for detection of antibodies to viral antigens. *J Clin Microbiol* 26 : 954~956.
11. Theil KW, Bohl EH, Agnes AG. 1977. Cell culture propagation of porcine rotavirus(Rotavirus-like agent). *Am J*

Vet Res 38 : 1765~1768.

12. Theil KW, Benfield DA, Lopez JW, et al. 1990. Comparison of three bovine group A rotaviruses possessing supershort genome electropherotypes. *J Vet Diagn Invest* 2 : 246~248.
13. Beards GM, and Desselberger U. 1989. Determination of rotavirus serotype-specific antibodies in sera by competitive enhanced enzyme immunoassay. *J Virol Methods* 24 : 103~110.
14. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. 1994. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol* 32 : 1338~1340.
15. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. 1994. VP4 typing of bovine and porcine Group A rotaviruses by PCR. *J Clin Microbiol* 32 : 1333~1337.
16. Greenberg H, McAuliffe V, Valdesuso J, et al. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 39 : 91~99.
17. Bergeland ME, McAdaragh JP, Stotz I. 1977. Rotaviral enteritis in turkey poult. In *proceedings of the 26th Western Poultry Disease Conference*. University of California, Davis : 129~130.
18. McNulty MS, Allan GM, Todd D, et al. 1979. Isolation and cell culture propagation of rotavirus from turkeys and chickens. *Arch Virol* 61 : 13~21.
19. Saif LJ, Saif YM, Theil KW. 1985. Enteric viruses in diarrheic turkey poult. *Avi Dis* 29 : 798~811.
20. Takase K, Uchimura T, Katsuki N, et al. 1990. A survey of chicken sera for antibody to atypical avian rotavirus of duck origin, in Japan. *Nippon Huigaku Zasshi* 52(6) : 1319~21.
21. Reynolds DL, Saif YM, Theil KW. 1987. A survey of enteric viruses of turkey poult. *Avi Dis* 31 : 89~98.
22. Reynolds DL, Saif YM, Theil KW. 1987. Enteric viral infections of turkey poult: incidence of infection. *Avi Dis* 31 : 272~276.
23. Saif LJ, Saif YM, Theil KW. 1984. Detection and pathogenicity of enteric viruses recovered from diarrheic turkeys : role of a rotavirus-like agent. *Proc. 17th World's Poultry Congress*, Helsinki, Finland : 531~541.
24. 강신영, 전성진, 장경옥 등. 1997. 국내에서 분리된 소 로타바이러스의 VP7 유전자 크로닝 및 염기서열 분석. 대한수의학회지 37 : 367~374.
25. 안재문, 조선희, 강신영. 1996. 소 로타바이러스(국내 분리주)에 대한 단크론항체 생산 및 특성에 관한 연구. 대한수의학회지 36 : 395~403.
26. 유영수, 김두희, 안수환. 1989. 송아지에서의 rotavirus 감염증. 농시논문집. 31(3) : 6~10.
27. Legrottaglie R, Rizzi V, Agrimi P. 1997. Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 20(3) : 205~210.