

## 경북지역 산란계에서 *Avian pneumovirus*에 대한 항체가 및 바이러스 검출 조사

김정은<sup>1</sup>, 황지영, 배동록, 성명숙, 김순태, 김상윤

경상북도 가축위생시험소 북부지소

(접수 2007. 2. 6 게재승인 2007. 3. 15.)

## Examination of seroprevalence and detection of *Avian pneumovirus* from layer hens in Gyeongbuk province

Jung-Eun Kim<sup>1</sup>, Ji-Young Hwang, Dong-Rok Bae,  
Myoung-Suk Sung, Soon-Tae Kim, Sang-Yun Kim

Northern Branch, Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, 760-803, Korea

(Received 6 February, accepted in revised form 15 March 2007.)

### Abstract

*Avian pneumovirus*(APV), also known as *avian rhinotracheitis*(ARTV), affects both turkeys and chickens and is known to be the primary causative agent of *turkey rhinotracheitis*(TRT). The aim of this study was to establish the presence or absence of antibodies to APV by an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and confirm APV by a reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR). The tested serum and feces were collected from laying hens in Gyeongbuk province.

The positive farms with antibody against APV by ELISA were 90(96.7%) of 93 and positive serum samples were 433(93.1%) of 465 different sera. By regional group, sera

---

<sup>1</sup>Correponding author

Phone : +82-54-850-3286

E-mail : jekim798@freechal.com

from Uiseong, Cheongsong and Bonghwa were noted as 100% positive and positive rates of samples from Yeongju, Andong and Yeongyang were 93.3%, 85.7% and 50%, respectively. However, APV was not detected in feces samples by RT-PCR.

Key words : *Avian pneumovirus*(APV), Layer hens

## 서 론

칠면조와 닭에서 호흡기 질환의 원인이 되는 *Avian pneumovirus* (APV)는 칠면조에서는 *turkey rhinotracheitis* (TRT)로 닭에서는 swollen head syndrome (SHS)으로 불리며, 상부 호흡기도에 감염되어 모든 일령에서 약한 호흡기 증상을 일으키나(mobility 50~100%) 2차 세균감염이 발생하면 30%까지 폐사율이 나타날 수도 있으며, 특히 산란계에서는 호흡기 질환에 따른 산란율 저하의 원인이 되어 경제적인 손실을 주는 것으로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. APV는 1978년 남아프리카에서 처음 보고 된 후 유럽의 많은 국가로 빠르게 전파되었으며 현재는 캐나다와 호주를 제외하고 거의 모든 나라에서 발생 보고가 되어있다<sup>3,4)</sup>.

APV의 원인체는 외피막을 가지는 RNA 바이러스로 family *Paramyxoviridae*, subfamily *Pneumovirus*, genus *Metapneumovirus*에 속하며, subtype은 A와 B type으로 분류되다가, 미국의 Colorado의 칠면조에서 분리된 APV (APV/CO,1996)와 Minnesota에서 분리된 APV(APV/MN-2a)를 포함해서 1996년에서 1999년 동안 미국에서 분리된 APV는 유럽에서 분리된 APV의 subtype A, B와 유전학적, 항원적으로 차이를 보여 subtype C로 분류되었다<sup>5-7)</sup>.

APV의 숙주 범위는 정해지지 않을 정도로 많은 숙주를 가지고 있으며 증상도 다양

하다. 1988년 Gough 등은 APV를 실험적으로 접종한 후 칠면조, 닭, 꿩에서는 임상증상을 나타내었으나 빨닭에서는 면역반응을, 비둘기, 거위, 오리 등에서는 임상증상을 나타내지 않았다고 보고하였다<sup>8)</sup>. 또한 Shin<sup>9)</sup>은 Minne sota 분리주 (APV/MN-2a)를 마우스에 접종하여 바이러스의 분리를 실험한 결과 접종 후 14일에 ELISA 검사에서 APV 특이항체를 검출할 수 있었고, 접종 후 8일과 10일경에 폐와 직장 swab 시료에서 RT-PCR법으로 바이러스를 확인할 수 있었으나 바이러스의 재분리는 할 수 없었음을 보고하였다.

APV의 진단은 중화시험법이나 간접형광 항체법 및 ELISA 법에 의한 항체검사 및 CEF cell이나 Vero cell 등을 이용한 바이러스 분리와 RT-PCR에 의해서 가능하다. 혈청검사에서는 ELISA법이 가장 많이 활용되고 있으며, 항체 검출은 감염 후 7~10일경에 가능한 것으로 알려져 있다. 바이러스의 분리는 감염 후 3~5일 이내 바이러스 배출이 이루어지므로 그 시기에 시료채취가 이루어져야 하며, 감염 7일 후에는 바이러스 역가가 급격히 떨어지게 되어 계태아 난황에 blind passage를 하는 동안 바이러스 역가가 더욱 낮아지게 되는 점 때문에 바이러스 분리가 쉽게 이루어지지 않으므로 바이러스 확진에는 RT-PCR이 추천되고 있다<sup>10)</sup>.

본 연구에서의 목적은 경북북부지역 산란계에서 APV의 감염 동향을 알아보고자 ELISA법으로 혈중 항체를 알아봄과 동시

에 분변시료에서 바이러스의 분리가 이루어지는지 RT-PCR법으로 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

경북북부지역의 본 지소 관내 6개시·군(안동, 영주, 봉화, 의성, 영양, 청송)에서 사육중인 산란계 93개 농가 465수의 혈청에 대하여 ELISA법을 이용하여 APV 항체가를 측정하였으며, 3개 시·군(영주, 의성, 봉화) 54농가의 분변시료를 농가 당 5개의 분변을 가지고 RT-PCR을 수행하여 바이러스의 유무를 확인하였다.

### APV 항체가 검사

준비된 가검혈청을 ELISA Kit (IDEXX, USA)의 실험방법에 따라 수행하였다. 혈청을 1:500으로 희석하여 항원이 코팅된 plate 각 well에 양성대조군, 음성대조군, 가검혈청을 각 100 $\mu$ l씩 분주하고 30분간 실온에서 반응시킨 후 세척액 350 $\mu$ l씩 4회 세척한 다음 HRPO-conjugate를 각 well에 100 $\mu$ l씩 분주하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 세척액 350 $\mu$ l씩 4회 세척하였다. 그 후 TMB-substrate를 각 well에 100 $\mu$ l씩 분주하여 15분 실온에서 반응 후 stop 용액을 넣어 반응을 정지시킨 후 흡광도 650nm에서 측정하였다.

### RNA 추출

바이러스의 RNA는 Viral Gene-Spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON biotechnology, Korea)의 사용방법에 따라 추출하였다. 분변 상층액을 300 $\mu$ l에 lysis buffer 500 $\mu$ l를 넣고 혼합한 뒤 상온에서

10min 반응시켰다. 그 후에 binding buffer 350 $\mu$ l를 첨가하고 잘 혼합하여 kit에 준비되어 있는 membrane binding column에 상층액을 넣고 원심한 뒤, membrane에 binding 되어있는 유전자를 washing buffer A와 B (70% ethanol)로 각각 세척하였다. Column의 ethanol을 2분간 원심하여 제거한 후, column의 collection tube를 바꿔주었다. Column의 membrane 정중앙에 elution buffer 45 $\mu$ l를 떨어뜨려 1분간 상온에서 반응시킨 뒤, 1분간 원심하여 바이러스의 유전자를 elution하였다.

### APV RT-PCR 검사

RT-PCR은 VeTeK™ TRT Detection Kit (iNtRON biotechnology, Korea)을 사용하였으며 그 실험방법에 따라 준비된 premix tube에 RNase free water 18 $\mu$ l 그리고 template 2 $\mu$ l를 넣어 Pre-PCR(45 $^{\circ}$ C/30 min, 94 $^{\circ}$ C/5 min), PCR (denaturation 94 $^{\circ}$ C/30s, annealing 52 $^{\circ}$ C/30s, extension 72 $^{\circ}$ C/40s, 40 cycles) 그리고 post-PCR (72 $^{\circ}$ C/5 min, 4 $^{\circ}$ C/ $\infty$ )의 조건에서 핵산 증폭기 (Biometra, Germany)를 사용하여 유전자 증폭을 실시하였다.

## 결 과

### 지역별 APV 항체가

6개시·군 93농가의 465수에서 이루어진 APV에 대한 항체 양성 농가는 93농가 중 90농가에서 항체 양성으로 나타나 평균 96.7%로 나타났다. 의성, 청송, 봉화는 농가 별 검사에서 100% 항체 양성으로 나타났으며 안동 85.7%, 영주 97.3% 그리고 영양 50%로 나타났다. 계군 당 5수씩 개체별로

검사한 결과 465수중 433수가 양성(93.1%)으로 나타났으며 안동 82.9%, 영주 91.4%, 의성 99.3%, 청송 95%, 영양 20% 그리고 봉화 75%로 나타났다(Table 1, Fig 1).

**지역별 APV RT-PCR 결과**

3개 시·군의 54계군의 분변에 대하여 RT-PCR을 수행한 결과 모든 시료에서 APV를 확인할 수 없었다(Table 2).

Table 1. Results of ELISA test for APV from layer farms in Gyeongbuk province

|                       | County |         |         |            |           |         | Total   |
|-----------------------|--------|---------|---------|------------|-----------|---------|---------|
|                       | Andong | Yeongju | Uiseong | Cheongsong | Yeongyang | Bonghwa |         |
| Farms No <sup>a</sup> | 6/7    | 36/37   | 27/27   | 4/4        | 1/2       | 16/16   | 90/93   |
| % <sup>b</sup>        | 85.7   | 97.3    | 100     | 100        | 50        | 100     | 96.7    |
| Serum No              | 29/35  | 169/185 | 134/135 | 19/20      | 2/10      | 60/80   | 433/465 |
| %                     | 82.9   | 91.4    | 99.3    | 95         | 20        | 75      | 93.1    |

a : Positive number/sample number

b : Positive number/sample number × 100

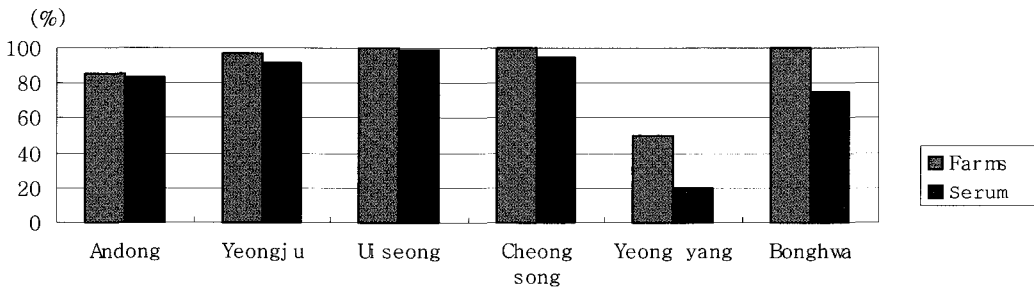


Fig. 1. Positive rate of antibodies to APV in Gyeongbuk province

Table 2. Results of RT-PCR for APV from layer farms in Gyeongbuk province

|       |                 | County  |         |         | Total |
|-------|-----------------|---------|---------|---------|-------|
|       |                 | Yeongju | Uiseong | Bonghwa |       |
| Feces | No <sup>a</sup> | 0/20    | 0/9     | 0/25    | 0/54  |
|       | % <sup>b</sup>  | 0       | 0       | 0       | 0     |

a : Positive number/sample number

b : Positive number/sample number × 100

**고 찰**

칠면조에서 APV에 대한 감염은 재채기,

swollen sinues, 콧물, 사료섭취량감소 및 음수량 감소를 특징으로 하는 호흡기 질병으로 알려져 있으며 TRT, ART 또는 APV로 불린다. 닭에서는 swollen head syndrome (SHS)으로 불리며 발육저하, 산란을 저하, 체중

손실로 인한 2차 감염에 의한 피해와 경제적 손실을 주는 질병으로 알려져 있다<sup>11-12)</sup>.

닭에서 발생하는 다른 호흡기 질병과는 다르게 APV는 임상 소견상 조기 발견이 어렵고 질병의 확진 또한 어려운 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. 이<sup>10)</sup>는 일본에서 SHS 증상을 보인 계군의 혈청으로 ELISA kit를 이용하여 TRTV에 대한 항체를 조사한 결과 모두 음성인 것을 근거로 일본에서의 SHS에 대한 원인체는 TRTV가 아닌 것으로 보고했으며, 미국에서 SHS증상을 보인 계군에서도 TRTV에 대한 항체는 검출되지 않았으며 *coronavirus*, *adenovirus* 등의 다른 병원체가 분리됨으로써 미국에서의 SHS의 원인체는 TRTV가 아닌 것으로 보고하였다<sup>10)</sup>.

본 조사에서는 경북지역 산란계를 대상으로 혈청검사를 실시한 결과 93계군에서 중 90계군(96.7%)이 양성항체 양성계군으로 판정되었고, 개체별로는 평균 465수 중 433수(93.1%)가 양성으로 나타났으나, 54계군의 분변시료에 대한 RT-PCR 결과에서는 바이러스를 확인할 수 없었다.

Shin<sup>11)</sup>은 APV를 안와와 비강으로 접종한 마우스에서 바이러스의 분리를 실험한 결과 감염 후 4일에서 14일까지 혈액, 폐, 기관, 구강 swab 시료에서는 RT-PCR에서 바이러스의 확인이 이루어졌으나 직장시료에서는 바이러스의 확인은 이루어지지 않았다. 그러나 접종은 하지 않고 감염된 마우스와 접촉시킨 마우스에서는 동거 후 8일과 10일 후에 폐와 직장 swab 시료에서 바이러스가 확인되었으나 혈액에서는 바이러스의 확인이 이루어지지 않았다. 또한 두 그룹에서 바이러스의 재분리는 되지 않았다. 또한 Shin 등<sup>13)</sup>이 오리에 APV를 안와비강과 구강으로 접종하여 바이러스를 확인 한 결과 접종 후 3~21일 동안 혈액, 폐, 기관, 후비공에서는

RT-PCR에 의해서 바이러스의 확인이 이루어졌으나 장의 어느 부분에서도 바이러스의 확인은 이루어지지 않았다. 물론 APV의 진단에 있어서 가장 이상적인 조직이 기관 조직이라는 것은 이미 알려져 있으나 분변에서도 APV가 분리된다고 보고되어 있다.

본 실험에서 바이러스가 검출되지 않은 이유로서는 농장 내 미감염 농가일 가능성과 본 실험에서 농장별로 실험 전체 계군에서 항체 양성이 높게 나타난바 분변 채취 계군도 항체양성으로 간주하였을 경우, APV 감염 후 3~5일이 내에 시료채취가 이루어져야하며 감염 7일 이후에는 급격히 바이러스 역가가 떨어지게 되어 바이러스의 확인이 어렵게 된다는 보고에서 처럼<sup>10)</sup> 농장 내 APV 감염 이후 이미 질병이 종식되었을 가능성을 원인으로 본다. 또한 APV는 호흡기 질병이므로 바이러스 확인을 위한 시료에 있어서 우선적으로 비강에서 획득한 시료로 RT-PCR을 수행했어야 하나 시료채취의 어려움 등으로 분변에서 RT-PCR을 실시함으로 바이러스의 확인이 되지 않았을 원인이 될 수도 있을 것으로 생각한다. 김<sup>14)</sup>은 국내 APV를 RT-PCR을 이용한 항원검출에서 152건 중 80건(52.6%)양성으로 보고하고, 시료는 기관 swab 시료와 전혈이 유용하다고 밝혔다. 분변으로 바이러스의 배출이 이루어지기는 하나 그 양이 너무 작아서 RT-PCR에 의해서는 바이러스의 진단이 정확하지 않을 수도 있으므로 앞으로 조사에서는 혈청검사 결과 양성농가 계군의 기관 swab 시료와 전혈에서 바이러스 확인을 해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

이 등<sup>15)</sup>은 전북지역 종계장을 대상으로 APV 항체양성 검사를 실시한 결과 38종계장중 36(94.7%) 종계장, 78계군 중 71(91.0%)계군에서 양성임을 보고하였고, 지역으로

는 특히 전주, 정읍, 남원, 장수 지역에서는 100%의 양성율을, 익산지역에서는 85.7%의 양성율을 보였다고 보고하였다. 또한 김 등<sup>16)</sup>은 경북지역 내 산란율 저하를 나타내는 농장 및 정상적인 농장을 대상으로 APV에 대한 항체검사를 한 결과 산란율 저하를 나타내는 16농장 중 11농장(68.8%)이 양성으로 나타났으며, 임상증상이 없는 건강한 계군의 26농가 중 12농가(46.2%)에서 양성을 나타내었다. 경북지역 내 APV에 대한 혈청에 대한 항체 양성율(96.7%)은 전북지역의 94.7%와 비슷하며, 2003년도 경북지역의 APV 항체 양성율(46.2%)과 비교해서 두 배 이상 양성율이 증가한 것으로 경북지역 내 APV 감염이 증가하고 있음을 시사한다.

다음 조사에 있어서는 경북 전 지역을 대상으로 항체가 조사 및 기관조직에 대한 시료를 채취하여 RT-PCR을 수행하여 바이러스의 존재 유무의 조사가 이루어져야 하며, 농장별 역학 조사를 실시하여 실제 농가의 경제적 피해를 조사하여 APV에 대한 예방 대책이 수립되어야 할 것으로 사료되며, 농장에서는 질병 예방 및 차단을 위한 노력이 필요하다고 판단된다.

## 결 론

경북북부지역 내 산란계를 대상으로 APV에 대한 항체의 존재 유무와 분변시료에서 RT-PCR을 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 6개 시·군의 93농가의 혈청시료에서 항체 양성농가는 90농가(96.7%)로 나타났으며 개체별 검사에서는 465수중 433수(93.1%)에서 항체 양성으로 나타났다.

2. 지역별 농가에서는 의성, 청송, 봉화에서 100% 항체 양성으로 나타났으며, 영주가 93.3%, 안동이 85.7% 그리고 영양이 50% 항체 양성을 보였다.
3. 3개 시·군의 54농가의 분변시료에서는 RT-PCR법으로 바이러스를 확인할 수 없었다.

이상의 실험결과로 보아 경북북부지역 대부분의 산란계 농장에서 APV의 감염을 의심할 수 있으며, 정확한 APV의 진단을 위해서는 역학조사 및 임상증상이 있는 계군에서 기관시료에서 바이러스를 확인 해볼 필요가 있다고 사료되었다.

## 참고문헌

1. Shin HJ, McComb B, Back A, et al. 2000. Susceptibility of broiler chicks to infection by *avian pneumovirus* of turkey origin. *Avian Dis* 44: 797-802.
2. Pedersen JC, Reyonlds DL, Ali A. 2000. The sensitivity and specificity of a reverse transcription polymerase chain reaction assay for the *avian pneumovirus* (Colorado strain). *Avian dis* 44: 681-685.
3. Robert AH, Davis JM, Ahmad A, et al. 1993. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies avian pneumovirus. *Avian Dis* 38: 694-700.
4. Seene DA, Pederson JC, Edson PK, et al. 1998. *Avian pneumovirus* in turkey: preliminary. *Proc West Roche Avian Pneumovirus Workshop* 51: 1998.

5. Saif YM, Barnes HJ, Gilsson JR, et al. 2003. *Disease of poultry*, 11 eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa : 92-99, 283-293.
6. Seal BS. 2000. *Avian pneumovirus* and emergence of a new type in the United States of America. *Anim Health Res Rev* 1 : 67-72.
7. Goudh RE, Manvell RJ, Drury SEN, et al. 1994. Isolation of an *avian pneumovirus* from broiler chickens. *Vet Rec* 134 : 353-354.
8. Alexander DJ. *Disease of poultry*, 9 eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa : 669-673
9. Shin HJ. 2001. Murine susceptibility to *avian pneumovirus*(APV) of turkey origin. *Korean J Vet Res* 41(4) : 529-533.
10. 이윤경. 1995. 단클론성 항체 및 polymerase chain reaction을 이용한 turkey rhinotracheitis virus 검출에 관한 연구. 건국대학교 대학원 석사논문집.
11. Shin HJ. 2001. Persistent infection of *avian pneumovirus* (APV) in Turkeys. *Korean J Vet Res* 41(4) : 523- 528.
12. Shin HJ, Cameron KT, Jacobs JA, et al. 2002. Molecular epidemiology of subgroup C *avian pneumoviruses* isolated in the United States and comparison with subgroup A and B viruses. *J Clin Microbiol* 40(5) : 1687-1693.
13. Shin HJ, Njenga MK, Halvorson DA, et al. 2001. Susceptibility of ducks to *avian pneumovirus* of turkey origin. *Am J Vet Res* 62(7) : 991-994.
14. 김홍집. 2005. 닭 뉴모바이러스 감염증의 원인과 대책. 양계연구 181 : 78-81
15. 이정원, 손구례, 박기승 등. 2006. 전북지역 종계에서 및 reovirus 항체가 조사. 한가지위 29(1) : 9-18.
16. 김순태, 김성국, 조민희 등. 2003. 경북지역 산란계에서 *avian pneumovirus*에 대한 항체가 조사. 한국가축위생학회지 26(1) : 51- 56.