

국내 육계에서의 조류 레오바이러스 감염에 대한 역학 조사

김종만¹ · 김민정² · 송진석¹ · 모인필^{1,†}

¹충북대학교 수의과대학 수의학과, ²국립수의과학검역원 질병진단센터

Epidemiological Studies of Avian Reovirus Infection in Broilers in Korea

J. M. Kim¹, M. J. Kim², J. S. Song¹ and I. P. Mo^{1,†}

¹Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University,
410 SungBong-Ro, Heungduk-gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

²Animal Disease Diagnostic Center, National Veterinary Research and Quarantine Service

ABSTRACT Avian reovirus (ARV) is a causative agent of viral arthritis/tenosynovitis, and malabsorption syndrome in broiler. The characteristics of malabsorption syndrome caused by ARV are diarrhea, poor feed conversion and stunting. Therefore, ARV infection has been recognized as one of the most important disease in the poultry industry because of economical losses. However, few study of ARV infection in broiler industry has been conducted in Korea. To evaluate the presence of ARV infection in broiler farms, epidemiological survey such as serological test and virus isolation has been conducted. For the serological survey using ELISA method, we selected five broiler farms which were located at different area and had a history of growth retardation, lameness, diarrhea and poor feathering. From these farms serum samples were collected at 1 day, 14 days and market age. All these farms had no history of vaccination against ARV. In addition to serological survey, we tried to isolate ARV from birds of designated farms at market age and collected feces and tissue samples such as cecal tonsil, intestine and liver. We were identified ARV by RT-PCR and transmissible electron microscopy. The samples were inoculated into 9-day-old embryonated eggs via the chorioallantoic membrane to observe the pock formation. For the pathogenicity test of ARV isolates, we inoculated with the isolates to the right footpad of 3-week-old SPF chicks and observed clinical signs and pathological changes for 14 days after challenge.

Most broilers sampled for serological survey have maternal antibodies which were widely distributed at 1 day and decreased by 14 days. However, at the market age several broiler farms showed fairly high antibody titer against ARV. This increase of antibody titer at market age means the possible infection of ARV during the grow-out period. Among total 15 samples for the isolation of ARV. 2 samples were positive by RT-PCR and finally identified as a ARV. We inoculated these isolates in the SPF birds and observed that the antibody titer was increased from 7 days after challenge. However, we did not find any clinical signs both control and challenge groups.

Based on the above results, it is clear that the ARV infection has been circulated in the broiler industry and caused significant economic losses. Further study is needed to evaluate the virulence of the isolates in the digestive system of broiler and the molecular characteristics of isolates.

(Key words : avian reovirus, broiler, maternal antibody, ELISA, RT-PCR)

서 론

Avian reovirus(ARV)는 Reoviridae과(科, family)의 *Orthoreovirus*속(屬, genus)에 속하고 닭을 포함한 칠면조와 오리 등 여러 종류의 조류에 감염된다(Jackson and Muldoon, 1973; Wooley et al., 1972; Robertson and Wilcox, 1985; Malkinson

et al., 1981).

ARV는 포유동물의 reovirus와 물리·화학적 및 형태학적 특징을 공유하고 있으나(Spanididos and Graham, 1976; Liu et al., 1997) 피막이 없으며(Liu et al., 2003), 구조적으로 바이러스 입자는 45 nm의 core와 75 nm의 capsid로 구성되어 있고, 이 capsid는 92개의 capsomeres로 구성된 정20면체의 형태로

[†] To whom correspondence should be addressed : moip@cbu.ac.kr

되어 있다(Walker et al., 1972).

ARV의 유전체는 10개의 분절로 구성된 2중 나선구조의 RNA(double-stranded RNA)로 되어 있으며(Gouvea and Schnitzer, 1982; Schnitzer, 1985), polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 L(large), M(medium), S(small) 3개로 구분한다(Koide, 1970; Spandidos et al., 1976). 이들 분절 중에서 S2와 S4 유전자가 대부분의 병원성 strain에서 가장 큰 돌연변이가 일어나는 유전자이며, 감염 시 체내에서 지속적인 감염의 유지와 관련이 있다(Huang et al., 1985).

ARV의 strain은 일반적으로 항원형에 따라 분류하거나 닭에 대한 병원성 정도에 따라 구분할 수 있는데(Kawamura et al., 1965; Kawamura and Tsubahara, 1966), 연구자에 따라 4개(Sahu and Olson, 1975), 5개(Kawamura et al., 1965), 11개(Wood et al., 1980) 등의 혈청형으로 구분하기도 한다. ARV는 서로 다른 혈청형과 공통 항원 구조를 가지고 있으며, 혈청학적으로 동정 시 서로 교차 반응이 나타날 수 있다(Van der Heide et al., 1974; Wood et al., 1980; Meanger et al., 1995).

닭에서 ARV 감염 시 나타나는 임상 증상으로는 관절염(viral arthritis), 흡수불량증후군(malabsorption), 장염(enteritis), 간염(hepatitis), 심낭수종(hydropericardium), 심근염(myocarditis), 만성호흡기질환(chronic respiratory disease) 등이 있으며, 종계에 감염 시 모계로부터 수직전파(vertical transmission)를 통하여 후대 병아리에게 감염이 될 수도 있다(Van Loon et al., 2002; Menendez et al., 1974; Ni and Kemp, 1995). ARV가 닭에게 감염될 경우, 위의 임상 증상으로 인하여 양계 농장에서는 사육 성적 저하 (증체율 저하, 사료 이용율 감소, 도체 폐기율 증가, 부화율 감소 등)의 문제가 발생하여 많은 경제적 손실을 일으키게 된다(Dobson and Glisson, 1992; Macdonald et al., 1978; Apple et al., 1991; Takase et al., 1987; Songserm et al., 2003; Hollmen et al., 2002).

육계에 ARV 감염 시 나타나는 흡수불량증후군의 경우, 임상 증상에 따라 발육부전증후군(runting-stunting syndrome), 헬리콥터병(helicopter disease), 전염성 선위염(infectious proventriculitis), 각약증(brittle bone disease), 창백증(pale bird syndrome) 등으로 다르게 불리는데, 특히 2주령 이내의 어린 병아리에 감염 시 피해가 크다(Songserm et al., 2000). 농장에서 5일령 이내에 ARV 감염이 되면 폐사율이 높고, 그 후 10일령까지 계군의 약 30% 정도가 성장 불량 문제가 일어나며, 14일령 이내에 감염이 된 경우에는 10~18%의 폐사를 일으켰다는 야외 실험도 보고된 바 있다(Bains et al., 1974). 바이러스성 관절염 또한 ARV와 관련되어 종계에 경제적으로 큰 피해를 주며(Hemzani et al., 1996; Jones et al., 1994; Jones et

al., 1989), 산란계(Jones and Onunkwo, 1978; Schwartz et al., 1976)와 칠면조(Ai Afaleq and Jones, 1989; Page et al., 1982)에서도 감염이 확인된 바 있다. 또한, 칠면조에서 분리된 ARV를 1일령 병아리에 감염시켰을 때 관절염 증상이 나타났다는 보고도 있다(Van der Heide et al., 1980). 바이러스성 관절염의 경우 비복근(gastrocnemius tendon) 파열의 병리학적 소견을 보이며, 보행 곤란, 관절 종대 등의 임상 증상이 나타난다(Johnson and Van der Heide, 1971; Jones et al., 1975). 이와 같은 임상 증상을 보인 닭들은 사료와 음수 섭취가 곤란하게 되어 결국 영양적으로 결핍이 됨으로서 성장 장애 및 증체 불량 등의 문제를 유발하게 된다(Tang et al., 1987).

일반적으로 ARV의 감염을 진단하기 위한 방법으로는 바이러스 분리, 혈청학적 검사, 조직학적 검사가 있다(Liu et al., 1997). ARV 분리 및 확인법으로는 세포 배양법, 계태아 접종, RT-PCR법이 있으며(Hieronymus et al., 1983), 계태아 접종을 이용한 ARV 확인법은 주로 요양막(chorioallantoic membrane; CAM)으로 접종하여 Pock 형성과 세포질내 봉입체를 확인한다(Jackson et al., 1973; Guneratne et al., 1982; Van der Heide et al., 1981). 이러한 검사법은 많은 노력과 시간이 소요되는 단점이 있어 단순하고 빠르면서 민감도가 높은 검사법이 필요한데, PCR 검사의 경우 민감도와 특이성이 높아 분자생물학적 연구와 실험실적 진단을 위해 현재 가장 일반적으로 이용된다(Liu et al., 1997). 특히, RT-PCR법의 경우, 백신주와 야외 바이러스를 구분할 수 있는 장점이 있어 ARV 감염 진단을 위해 유용하게 이용될 수 있다(Bruhn et al., 2005). ARV 감염을 진단할 수 있는 혈청학적 검사 방법으로는 항체를 증명하는 hemagglutination inhibition test(Wood et al., 1980), agar-gel precipitin test(Menendez et al., 1975) 등이 있으며, 조직 배양에 의한 혈청중화시험법이 있다. 또 다른 방법으로는 immunofluorescence test(Kawamura and Tsubahara, 1966)와 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)(Island and Jones, 1988) 검사법이 있는데, ELISA 검사법의 경우 다른 검사법에 비해 높은 민감도와 재현성을 가지고 있으며, 다량의 혈청 시료를 쉽고 빠르면서 저렴하게 이용할 수 있는 장점이 있다(Adair et al., 1987; Giambone and Solano, 1988; De Herdt et al., 1999).

ARV에 대한 병원성 시험은 SPF 닭이나 일반 실용계에 경구 또는 피하로 공격 접종하여 폐사와 증체 불량, 관절염 등의 임상 증상을 관찰하고, 각 장기의 육안적 검사와 조직학적 검사를 실시하는데 ARV의 strain, 접종 경로, 접종 일령에 따라 병원성이 다르게 나타난다(Tang et al., 1987; Rosenberger et al., 1989; Songserm et al., 2003).

지금까지 국내에서 ARV에 대한 연구는 chicken embryo kidney cells (CEK세포)를 이용하여 8~12주령의 국내 육계의 장관과 관절로부터 3개의 ARV strain을 분리하여 바이러스의 증식성 및 혈구 응집성 조사와 부화란의 계태아에서 병원성 시험, 바이러스의 electropherotype 조사에 대하여 보고하였으나(Kim et al., 1992), 아직까지 국내 육계에서 ARV에 대한 혈청학적 조사와 바이러스의 분리 동정 및 병원성에 대한 연구가 부족하고 미흡한 실정이다.

따라서 본 실험은 국내 육계를 중심으로 ELISA 검사법을 이용하여 ARV에 대한 일령별 항체 역가 변화를 조사하고, 감염이 의심되는 개체에 대하여 RT-PCR 검사를 실시하여 바이러스 감염 여부를 확인하였다. ARV 감염을 확인한 다음, 이들 감염 개체의 장기로부터 바이러스 분리를 시도하여 분리된 바이러스의 병원성 시험을 통해 국내 육계에서 ARV의 감염 실태를 밝히는데 본 실험의 목적이 있다. 또한, 향후 분리된 ARV에 대한 유전적 특성 및 성장 등에 대한 기초적 정보를 제공하여 국내 육계 농장에서 ARV의 예방 및 관리 대책을 수립하는데 도움을 주고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 설계

국내에서의 ARV 발생 확인을 위하여 3단계로 나누어 진행되었다(Table 1).

첫 번째 실험에서는 ARV에 대한 국내 일반 닭, 특히 육계에서 항체 분포 조사를 위해 ARV백신을 접종하지 않은 일반 육계 농장을 무작위로 선정하였다. 농장별, 일령별에 따른 항체가 변화를 조사하고, 31~38일령의 육계 농장을 별도로 선정하여 출하시기의 농장별 항체 역가 수준도 비교하였다.

두 번째 실험에서는 지속적으로 육계를 사육하면서 ARV백신을 접종하지 않은 농장 중 증체 불량, 관절염, 출하 일령 지연, 출하 성적 불량의 문제가 나타났던 육계 농장 5개를 선

정하여 1일령부터 ARV감염 여부에 대한 임상 증상을 관찰하면서 일령별로 항체 역가 변화를 조사하고, 임상 증상이 나타난 개체로부터 ARV의 확인 및 분리를 시도하였다.

세 번째 실험에서는 분리된 바이러스의 병원성 검사를 위해 ARV 항체가 음성인 3주령의 SPF 닭에 공격 접종하여 폐사, 체중 변화, 설사, 보행 곤란 등의 임상 증상을 관찰하고, 일령별 항체가 변화와 감염시킨 SPF 닭에서 ARV를 재확인하였다.

2. 조사 대상 농장의 선정

1) 일반 육계 농장

충북대학교 수의학과 조류질병학 교실에 의뢰된 일반 육계 농장의 혈청 중 ARV 백신을 접종하지 않은 농장 중 충북 충주와 영동, 충남 청양, 전북 익산에 위치한 4개 농장(A, B, C, D)을 선정하였다.

2) 육계 농장 출하 시 검사

모체 이행 항체가 소실된 후 사육 중에 ARV에 감염된 사례를 확인하기 위해 경기(양평, 용인, 가평, 여주, 화성)와 충남(천안)지역의 육계 농장을 대상으로 출하시기에 집중적으로 조사하였다.

3) ARV 감염 임상 증상이 관찰된 육계 농장

지속적으로 육계를 사육하면서 증체 불량, 만성 설사, 사료 소화 불량, 관절염 등의 임상 증상을 나타냈던 농장을 모니터링한 후 ARV 백신을 접종하지 않은 경기 용인, 양평, 여주, 가평에 위치한 5개 육계 농장(DH, HJ, SY, YG, HP)을 선정하여 1일령, 14일령, 31~34일령의 출하 시기에 시료를 채취하였다.

3. 바이러스 및 실험 동물

1) 바이러스

표준주로서 (주)중앙백신연구소(대전광역시 유성구)로부

Table 1. Experimental design for epidemiological studies of on ARV infection in broilers

Experiments	No. of farms	Days at sampling	Methods for test	Remark
I	4	1, 14, >21	Serology (ELISA)	Randomly selected
II	14	Market age ¹⁾	Serology (ELISA)	Randomly selected
III	5	1, 14, >30	Serology (ELISA) Virus identification (RT-PCR)	Select the farms with history of ARV infection

1) Market age : ranged from 31 to 38-day-old.

터 분양받은 S-1133, 1733, 2408주를 이용하여 RT-PCR법으로 유전자 검사를 실시하였고(Fig. 1) 공격 접종용 바이러스는 본 실험을 통해서 육계 농장에서 분리된 HJL-01과 HPI-01 바이러스와 이들 바이러스를 1차 계대 배양한 HJL-02, HPI-02 바이러스를 공시하였다.

2) 실험 동물

실험 동물로는 성일파마(경기도 군포시)에서 구입한 SPF 종란을 충북대학교 조류질병학 교실에 있는 부화기(은조상사, 경기도 포천시)에 입란하여 부화시켰다. 부화된 ARV 항체 음성인 SPF 닭 24수를 Isolator(Three shine, 충남 금산군) 계사에 넣은 후 20~33 °C까지 일령에 따른 온도를 유지하면서 사료와 물을 충분히 공급하며 3주령까지 사육하였다.

4. 시료의 채취

1) 혈청 시료

A, B, C, D 4개의 일반 육계 농장에서 1일령, 14일령, 21일령 이후에 각각 무작위로 10수씩 선택하여 혈액을 채취하였고, 일반 육계 농장에서는 출하시기인 31일령 이후에 각각 10수씩 무작위로 선택하여 혈액을 채취하였다. ARV 감염 임상 증상을 보이는 5개 육계 농장에서는 각 농장별로 1일령, 14일령, 출하 일령 시에 각각 20수씩을 선택하여 혈액을 채취하였다.

2) 바이러스 분리용 시료

ARV감염 임상 증상을 보이는 5개 육계 농장에서 혈액채취 일령과 동일한 일령에 각각 농장별로 살아있는 닭 6수씩을 선별하여 수거하였으며, 특히 출하 일령 시에는 증체 불량이나 보행 곤란, 깃털 불량, 설사 등의 임상 증상이 뚜렷하게 관찰된 닭을 수거하였다(Fig. 3). 수거된 각각의 개체들에

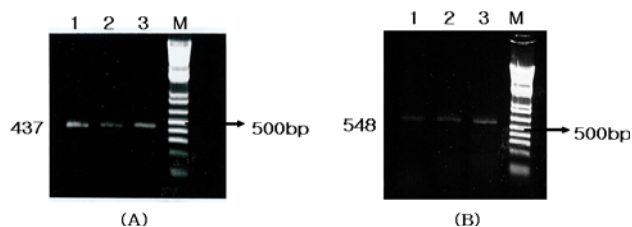


Fig. 1. Result of RT-PCR using primer pairs ARV_S4_P4 / ARV_S4_P5 (A), and ARV_S3_P2 / ARV_S3_P3 (B); Lanes 1 to 3 indicate the virus 1133, 1733, 2408 respectively. A 100 bp DNA ladder was used as a molecular size control in lane M.

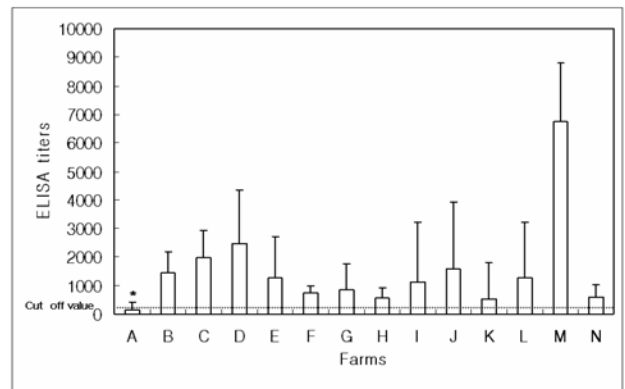


Fig. 2. Comparison of mean ELISA titers against ARV among commercial broiler farms at market age.

* Geometric mean titer \pm standard deviation. Ten blood samples were tested from each farm except farm D and F from which 7 and 9 blood samples were tested respectively.

대해 부검을 실시하였고, ARV 분리용 시료로 소장, 간, 맹장 편도를 채취하였다. 각 농장에서 일령별로 채취한 같은 종류의 장기는 한 용기에 모아서 RT-PCR 방법으로 ARV 유전자 검사를 위해 -80 °C에 냉동 보관하였다.

5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ARV 항체를 측정하기 위해 상품화된 ELISA kit (Flock-Chk ARV[®], IDEXX Laboratories, Inc., ME, USA)를 구입하



Fig. 3. The chickens showing various clinical signs were sampled from the broiler farms with history of ARV infection at market age (ranged from 31 to 34-day-old). The clinical signs were lameness (A, B, C), poor feathering and growth retardation (D).

여 제조사가 권장하는 방법에 따라 검사하였다. ELISA 검사법을 요약하면 먼저 Kit 내에 있는 dilution buffer로 U자형 96 well plate에 시험 혈청을 500배 희석하였다. 희석한 혈청을 항원이 코팅된 ELISA plate에 100 μ L씩 분주한 다음 실온에서 30분간 반응시키고, 350 μ L 증류수로 각각의 well을 3~5회 세척하였다. 각각의 well에 이차 항체로 anti-chicken HRP conjugate (peroxidase goat anti-chicken IgG)를 100 μ L씩 분주하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 다시 세척을 3~5회 실시한다. 이후 발색을 유도하기 위해 100 μ L의 tetramethylbenzidine (TMB) 용액으로 15분간 반응시킨 다음 100 μ L의 stop solution으로 반응을 정지시킨다. ELISA reader(Molecular Devices Emax[®], CA, USA.)로 650 nm에서 흡광도를 측정 후 xChek[™] 프로그램(Version 2.20)을 이용하여 ELISA 역가를 측정하였다.

6. 바이러스의 분리 및 확인

ARV감염 임상 증상이 관찰된 5개 육계 농장 중에서 RT-PCR검사 결과 양성으로 판정된 조직과 ELISA 검사 결과 ARV에 대한 항체 역가가 상승되었던 5개 농장의 출하일령 시의 조직을 멸균된 막자 사발에 넣고, 소량의 silica sand를 넣고 유제하였다. 유제된 조직시료의 1.5배에 해당하는 항생제가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2을 넣어주고 완전히 갈아서 시험관에 옮겨 주었다. 항생제는 streptomycin, penicillin G, kanamycin을 첨가하였고, 0.2 mg/mL, 200 IU/mL 그리고 0.025 mg/mL의 농도를 사용하였다.

전 처리된 시료들을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취해 9일령의 SPF 부화란의 요양막에 0.1 mL씩 접종하여 10일간 배양하였다(Hieronymus et al., 1983; Rosenberger et al., 1989). 배양 기간 동안 부화란의 폐사 여부를 관찰하였고, 10일째 냉장 과정을 거쳐 요양강액(allantoic cavity fluid : ACF) 및 계태아의 간조직을 채취하고 요양막에서 Pock 형성 유무와 병변을 확인하였다. Pock가 형성된 계태아는 바

이러스가 분리된 것으로 간주하였고, 이들 시료를 가지고 RT-PCR을 실시하여 ARV를 재확인하였다.

7. Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction (RT-PCR)을 이용한 ARV 항원 검사

RT-PCR의 조건은 RT-PCR시에 사용하는 시약(AccessQuick[™] TM RT-PCR system: Promega, WI, USA)에 준하여 RT 과정을 설정하였으며, PCR 과정에서 중요한 annealing 과정의 온도는 primer의 TM값에 준하여 설정하였다. 본 실험에 사용한 primer는 기존에 발표된 P2와 P3(Lee et al., 1998), ARV_S4_P4와 ARV_S4_P5 (Bruhn et al., 2005)를 사용하였다(Table 2). cDNA 증폭은 35cycles (denaturation 94 $^{\circ}$ C 30 sec, annealing 54 $^{\circ}$ C 30 sec, elongation 72 $^{\circ}$ C 1 min, final extension 75 $^{\circ}$ C 10 min)에서 수행되었다. RT-PCR products 6 μ L를 2% agarose gel (Invitrogen, CA, USA)에 넣은 후 0.5X TBE Buffer에서 100 volts 22분간 전기 영동 후 UV-transilluminator로 촬영하였다(Fig. 1).

8. 전자현미경(Electron Microscopy : EM)을 이용한 ARV 확인

국립수의과학검역원(경기도 안양시) 병리과 전자현미경실에 부화란 접종 후 형성된 Pock 시료를 의뢰하여 투과전자현미경(H-7100FA;Hitachi, Ltd, Tokyo, Japan)으로 ARV를 확인하였다. Pock 시료와 증류수를 1대 9의 비율로 혼합하여 유발로 유제를 하였다. 유제액은 냉동과 해동을 3회 반복한 후 3,000 rpm에서 1시간 동안 원심 분리하였다. 분리한 상층액을 10,000 rpm에서 다시 1시간 동안 원심 분리한 후 상층액을 또 다시 약 24,000 rpm에서 2시간 동안 초고속 원심 분리하여 농축하였다. 농축된 시료를 현탁하여 음화염색 후 건조하여 투과 전자 현미경으로 관찰하였다.

9. 분리 바이러스의 병원성 조사

분리된 ARV의 병원성 조사는 성일파마에서 구입한 SPF

Table 2. Oligonucleotide primers used for ARVs

Target gene	Designation	Sequence (5'-3')	Position ¹⁾	Size (bp) ²⁾
S3	ARV_S3_P2	CAAGCATTACAGGGCCAGC	720	548
	ARV_S3_P3	ATTACGGGACTCTGCCCGC	199	
S4	ARV_S4_P4	GTGCGTGTGGAGTTTC	29	437
	ARV_S4_P5	ACAAAGCCAGCCAT(G/A)AT	449	

¹⁾ Position relative to strain 1133.

²⁾ Size of amplified product.

종란을 충북대학교 조류질병학 교실에서 부화시킨 후 3주령이 되었을 때 실시하였다. 총 24수의 닭을 각각 4수씩 6개의 그룹으로 나누었으며, 공격 접종 전 각 그룹별로 체중을 측정하였고, ARV 항체 검사를 위해 대조구에서 채혈을 실시하였다. 백신 접종 그룹은 (주)중앙백신연구소에서 분양받은 ARV S-1133 strain을 접종하였다. 바이러스 공격 접종 그룹은 Pock를 형성한 부화란의 시료 중 RT-PCR 결과 양성으로 확인된 시료인 HJL-01과 HPI-01 및 부화란에 1차 계대 접종한 HJL-02와 HPI-02를 오른쪽 발바닥에 동량 접종하였다. 바이러스 접종량은 $10^{6.4}$ EID₅₀였다. 접종 후 각 그룹별로 차폐 장치인 양압 isolator에 넣고 사료와 물을 자유 급이시켰다. ARV의 병원성 조사 및 혈청 역가 검사를 위해 접종 후 14일 간 매일 폐사와 보행 곤란 및 관절 종대, 설사 등의 임상 증상을 관찰하였고, 7일째와 14일째에 혈액 채취와 체중을 측정하였다. 14일째에는 혈액 채취와 체중을 측정한 후 경추를 탈골시켜 부검을 실시한 후 바이러스 확인을 위한 실질 장기를 채취하였다. 각 그룹의 개체별로 간, 소장, 맹장편도, 건을 채취하였으며, 채취한 모든 혈액은 ELISA 검사법으로 ARV에 대한 항체가 측정을 실시하였고, 채취된 장기의 유체 상층액으로 RT-PCR을 시행하여 바이러스를 확인하였다.

10. 병리조직학 검사

분리된 ARV를 공격 접종 한 SPF 닭으로부터 채취한 소장, 간, 건을 10% 중성 포르말린용액에 24시간 고정하였다. 고정된 장기들은 일반적인 조직 제조 과정을 거쳐 파라핀 포매 후 4 μ m 두께로 절편하고 hematoxylin and eosin (H&E) 염색하여 조직 병변을 관찰하였다.

11. 통계 처리

본 실험의 자료는 분산 분석의 일원배치법을 사용하여 통계 처리하였다($p < 0.05$).

결 과

1. 일반 육계에서의 ARV 항체가 분포

일반 육계 계군에서 ARV에 대한 일령별 평균 항체가를 ELISA법으로 측정된 결과는 Table 3과 같다. 각 농장의 1일령 모체 이행 항체의 평균 역가 분포는 189에서 2850으로 다양하게 나타났다. 즉, A농장과 C농장은 1일령 모체 이행 항체 평균 역가가 높게 검출되었으나, B농장과 D농장은 상대적으로 낮게 검출되었다. 이러한 농장간 역가 분포의 다양성은

Table 3. Comparison of mean ELISA titers against ARV among commercial broiler farms randomly selected

Farms	ELISA titers		
	1 day	14 days	after 21 days
A	2348 \pm 2739 ¹⁾ (10/10) ²⁾	339 \pm 153 (3/10)	379 \pm 346 (5/10)
B	906 \pm 477 (9/10)	847 \pm 1127 (8/10)	768 \pm 543 (9/10)
C	2850 \pm 2663 (10/10)	441 \pm 411 (6/10)	377 \pm 392 (2/10)
D	189 \pm 498 (4/10)	20 \pm 149 (0/10)	13 \pm 96 (0/10)

¹⁾ Geometric mean titer \pm standard deviation.

²⁾ Positive rate: number of positive /number of tested.

개체별 역가 분포도 동일한 양상으로 나타났고, 개체 간 뚜렷한 차이를 보였다. 1일령 양성 개체수는 A농장과 C농장은 10수 모두가 양성으로 나타났고, D농장은 4수가 양성으로 나타나 농장 간 양성 개체수의 차이가 있었다. 그러나 시험 대상 4개 농장 모두 모체 이행 항체 역가의 감소 경향은 일정하였고, 14일령 평균 항체 역가는 A농장과 D농장의 경우 각각 339와 20으로 양성 한계치인 396보다 낮게 나타났으나, B농장과 C농장은 847과 441로 양성 한계치보다 높게 나타났다. 14일령 양성 개체수의 경우, D농장은 10수 모두 음성으로 나타났으나, B농장은 8수가 양성으로 나타나 1일령 양성 개체수와 비교하여 차이가 거의 없었다. 21일령 이후 농장의 평균 역가는 14일령과 비슷한 경향을 나타내었으며, B농장만 양성 한계치보다 높은 768이었고, 나머지 3개 농장은 양성 한계치 이하로 나타났다.

A농장의 경우, 21일령 평균 역가가 379로 양성 한계치보다 낮았지만, 14일령의 평균 역가인 339보다 높게 나타나 항체 역가가 점차 증가하는 것으로 보였고, 양성 개체수도 5수로 14일령 시 보다 2수가 증가하였다. B농장의 경우, 21일령 평균 역가가 양성 한계치 이상으로 나타났지만 1일령부터 서서히 감소 경향을 보였다. 그러나, 양성 개체수의 경우 9수로 1일령부터 21일령까지 양성 개체 비율이 가장 높았다. C농장의 경우, 평균 항체가가 377로 계속 감소하는 경향을 나타냈고, 양성 개체수도 2수로 양성 개체 비율도 계속 감소하였다. D농장의 경우, 평균 역가가 13으로 ARV 항체가가 거의 검출되지 않았으며, 양성 개체수도 10수 모두 음성으로 나타나 농장 내에 ARV가 감염되어 있지 않음을 알 수 있었다.

출하 일령 시 14개 농장에서 ARV에 대한 ELISA 항체 역가를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다. 농장별 평균 항체 역가는 A농장이 143으로 가장 낮았고, M농장이 6751로 가장 높았다. A농장을 제외한 13개 농장의 평균 항체 역가는 양성 한계치인 396 이상으로 나타났고, 농장별 평균 항체 역가 분포는 다양했다. 동일한 농장에서 각 개체별 편차는 F농장이 480으로 가장 작았고, J농장이 4684로 가장 컸다.

2. 임상 증상이 관찰된 육계 농장에서의 ARV 감염

1) ARV 항체가 분포

ARV 백신을 접종하지 않았으며, ARV 감염 관련 임상 증상이 관찰된 5개 육계 농장에서 ARV에 대한 일령별 기하 평균 역가를 ELISA 검사법으로 측정 한 결과는 Table 4와 같다. 1일령 기하 평균 역가는 농장별로 다양하게 나타났으며, 5개 농장 중 HP 농장이 6437로 가장 높았고, YG 농장이 891로 가장 낮았다. 항체 역가의 분포를 나타내는 CV(coefficient of variation: 변이계수)값의 범위는 4개 농장이 81.8에서 89.4로 매우 높게 나타났으나, HJ 농장의 경우 45.6으로 역가 분포가 좁게 형성되어 있고, 이 농장의 기하 평균값도 5620으로 높은 편이었다. 이는 모계로부터 전달받은 ARV에 대한 1일령 모체 이행 항체 평균 역가가 농장별로 다양하며, CV값도 높아 개체별 차이도 매우 심하다는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Comparison of ELISA titers among commercial broiler farms with history of ARV infection at various time

Farms	ELISA titers		
	1 day	14 days	Market age ³⁾
DH	2301 ± 2962 ¹⁾ (89.4) ²⁾	265 ± 1179 (125.3)	1261 ± 1752 (95.4)
HJ	5620 ± 2843 (45.6)	529 ± 181 (32.5)	2107 ± 1352 (55.4)
SY	4465 ± 5036 (81.8)	1163 ± 1454 (99.1)	2727 ± 2907 (76.3)
YG	891 ± 1131 (85.2)	289 ± 199 (60.7)	1138 ± 1118 (77.6)
HP	6437 ± 7319 (86.0)	610 ± 308 (45.8)	2105 ± 2162 (76.9)

¹⁾ Geometric mean titer ± standard deviation.

²⁾ Coefficient of variation (%).

³⁾ Market age: ranged from 31 to 34-day-old.

14일령 시 기하 평균 역가는 HJ, SY, HP 농장의 경우, 각각 529, 1163, 610으로 양성 한계치(ELISA titer 396이상)보다 높았으며, DH, YG 농장의 경우에는 265, 289로 다른 3개 농장과 비교 시 낮게 나타났다. 하지만, 5개 농장 모두 1일령 기하 평균 역가와 비교 시 모두 감소하는 것으로 나타나 ARV에 대한 모체 이행 항체가 14일령 이후 대부분 소실되는 것으로 나타났다. 특히 1일령 평균 모체 이행 항체가 높았던 농장의 경우, 14일령 때 급격한 감소 경향을 나타낸 반면, 낮았던 농장의 경우에는 완만한 감소 경향을 나타내었다. CV 값이 3개 농장에서 60.7에서 125.3으로 매우 높게 나왔지만, HJ와 HP 농장은 각각 32.5와 45.8로 나와 항체가 분포가 좁게 형성이 되었음을 알 수 있었다.

출하 시기인 31~34일령에 측정 한 기하 평균 역가는 5개 농장 모두 14일령 시 평균 항체가보다 상승한 것으로 나타났으며, SY 농장의 경우 2727로 가장 높았고, YG 농장의 경우 1138로 가장 낮게 나타났다. 5개 농장 모두 평균 항체가 양성 한계치인 396보다 높게 나타나 양성으로 판정되었으며, 이는 ARV 백신을 접종하지 않은 것을 고려할 때 14일령 이후 ARV의 감염으로 인한 역가의 상승을 나타낸 것으로 보인다. CV는 최소 55.4에서 최대 95.4로 높게 나타나, 항체가 매우 넓게 분포되었음을 알 수 있었다.

2) ARV 유전자 검출

5개 농장에서 1일령에 채취한 모든 시료에 대하여 RT-PCR 검사를 한 결과, 모두 음성으로 ARV 유전자가 검출되지 않았다. 하지만, 14일령 시료 검사에서는 HJ 농장의 간과 HP 농장의 맹장편도에서 ARV 유전자가 검출되어 14일령 이전에 ARV에 감염되었음을 알 수 있었다. 하지만, 14일령 시 검출되었던 HP, HJ 농장 중 HP 농장에서는 출하 일령 시에도 소장과 맹장편도에서 검출이 되었으나, HJ 농장에서는 검출이 되지 않았다(Table 5).

3) ARV 분리

임상 증상이 관찰된 육계 농장에서 채취된 시료를 대상으로 9일령 SPF 부화란에서 Pock 형성 유무와 병변을 확인한 결과, 14일령 접종 시료에서는 HP 농장의 맹장편도에서, 출하일령 시료를 접종한 결과에서는 HP 농장의 소장과 SY 농장 및 HJ 농장의 간, 소장, 맹장편도에서 양성으로 판정되었다(Table 6).

Pock가 형성된 시료 중 14일령의 HJ 농장과 HP 농장의 맹장편도 및 출하 일령 시 HP 농장의 소장시료에서만 RT-PCR 방법으로 ARV 유전자를 검출할 수 있었다. 하지만, Pock가

Table 5. Result of RT-PCR in various tissue samples collected from broiler farms with clinical signs

Farms	Tissues	RT-PCR		
		1 day	14 days	Market age ²⁾
DH	Liver	-	-	-
	Intestine	-	-	-
	Cecal tonsil	-	-	-
HJ	Liver	-	+ ¹⁾	-
	Intestine	-	-	-
	Cecal tonsil	-	-	-
SY	Liver	-	-	-
	Intestine	-	-	-
	Cecal tonsil	-	-	-
YG	Liver	-	-	-
	Intestine	-	-	-
	Cecal tonsil	-	-	-
HP	Liver	-	-	-
	Intestine	-	-	+
	Cecal tonsil	-	+	+

¹⁾ RT-PCR positive using ARV_S4_P4 / ARV_S4_P5 primer.

²⁾ Market age: ranged from 31 to 34-day-old.

형성되지 않았던 출하 일령 시의 HP 농장의 맹장편도에서도 ARV 유전자가 검출되었다(Table 6, Fig. 5). Pock 형성과 RT-PCR에서 양성으로 확인된 시료 중 하나인 HJ 농장의 간 조직 Pock 시료에 대한 전자현미경 검경 결과 외피가 없는 이중캡시드 구조이며, 입자 크기가 86 nm인 20면체 모양의 ARV가 확인되었다(Fig. 4).

4) 분리된 ARV의 병원성 조사

바이러스 병원성 조사를 위해 3주령 SPF 닭에 공격 접종한 결과, 6개 그룹 모두에서 폐사, 설사 및 관절염 등의 특이적인 임상 증상은 나타나지 않았다. 하지만, 분리된 ARV를 공격 접종한 4개 그룹에서는 대조구 및 백신 접종 그룹과 비교하여 접종 부위의 발적 및 발바닥 종대가 심하게 나타났다. 발적은 접종 후 4일까지 나타났으나 5일째부터는 사라졌고, 보행 곤란은 공격 접종 그룹 1과 2에서만 4일째까지 관찰되었으며, 발바닥 종대도 14일 동안 관찰되었으나 시간이 지나면서 점차 회복되는 양상으로 나타났다. 14일째 각 그룹의

Table 6. Comparison of egg mortality and pock formation rate of various tissue samples collected from broiler farms at market age

Days at sampling	Farms	Tissues	Egg mortality	Pock formation
14 days	HJ	Liver	2/3	0/3
		Intestine	NT ¹⁾	NT
		Cecal tonsil	2/3	2/3
	HP	Liver	NT	NT
		Intestine	NT	NT
		Cecal tonsil	3/3	1/3
	DH	Liver	0/3	0/3
		Intestine	1/3	0/3
		Cecal tonsil	0/3	0/3
	HJ	Liver	3/3	2/3
		Intestine	3/3	2/3
		Cecal tonsil	2/2	1/2
Market age ²⁾	SY	Liver	3/3	3/3
		Intestine	2/2	1/2
		Cecal tonsil	3/3	2/3
	YG	Liver	0/3	0/3
		Intestine	1/3	0/3
		Cecal tonsil	0/2	0/2
HP	Liver	3/3	0/3	
	Intestine	2/3	2/3	
		Cecal tonsil	3/3	0/3

¹⁾ NT: Not tested.

²⁾ Market age: ranged from 31 to 34-day-old.

개체별 부검 시 특이 병변은 나타나지 않았으며, 발바닥이 종대된 개체에서도 다른 개체들과 비슷한 소견을 보였다. 이들 SPF 닭으로부터 채취한 조직을 검사한 결과 특이병변은 발견되지 않았다.

공격 접종 후 14일째 각 그룹별로 체중을 측정된 결과 T4 그룹이 평균 체중 633.9 g 으로 제일 높았고, T2 그룹이 514.9 g 으로 제일 낮았으며, 두 그룹간의 오차는 119.0 g 이었다. 각 그룹간의 체중은 통계처리 결과 유의성이 없었다($P>0.05$) (Table 7).

ELISA 검사법을 이용한 ARV에 대한 항체 측정 결과, 대

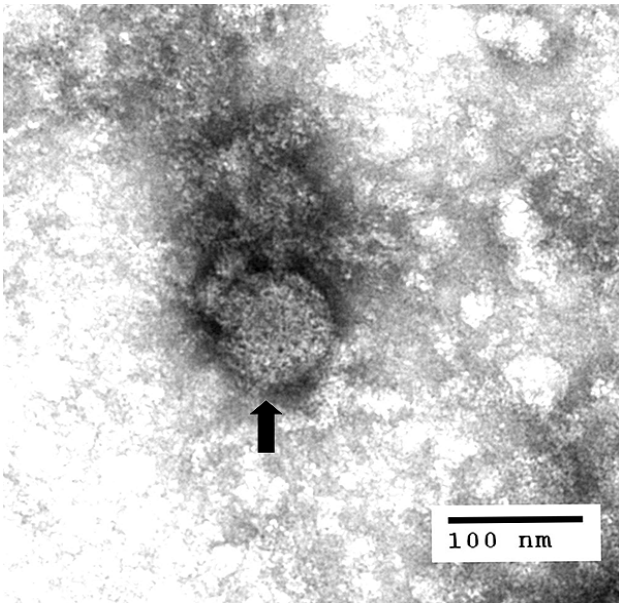


Fig. 4. Purified HJL-01 ARV (arrow) isolated from HJ farm was examined by transmissible electron microscopy with negative staining. Bar = 100 nm.

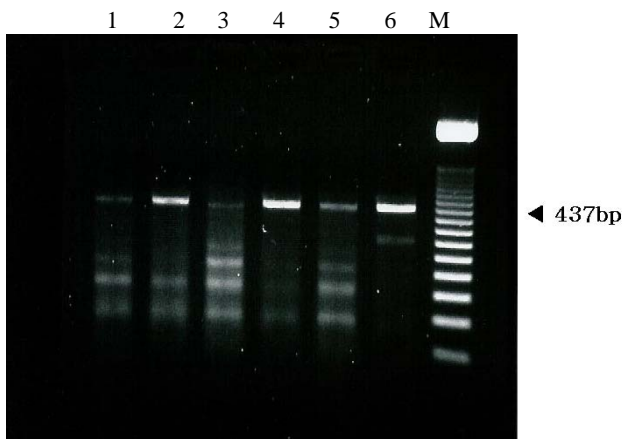


Fig. 5. Detection of ARV gene using RT-PCR from tissue samples collected from HP and HJ farm.

Lane 1, 2: Cecal tonsil from HP farm.
 Lane 3: Cecal tonsil from HJ farm.
 Lanes 4 & 5: Intestine from HP farm.
 Lane 6: Reovirus(S-1133) strain as positive control.
 Marker: 50 bp.

조구의 경우 14일째까지 모두 양성 한계치 이하로 음성으로 나타났으며, 백신 접종 그룹의 평균 항체 역가는 7일째까지 음성으로 나타났으나, 14일째에는 1432로 양성 한계치 이상으로 나타났다. 공격 접종 그룹의 경우, T1, T2, T4그룹에서는 7일

Table 7. Comparison of mean body weight among groups inoculated with various ARV isolates at 3-week-old SPF chickens

Groups	Viruses ¹⁾	Body weight (gm) ²⁾		
		0 DPI	7 DPI	14 DPI
Control	No	402.4 ± 51.7	502.1 ± 25.3	608.9 ± 46.1
TV	S-1133	377.0 ± 59.5	490.0 ± 85.2	615.3 ± 104.8
T1	HJL-01	379.7 ± 42.4	479.0 ± 50.2	611.6 ± 78.5
T2	HJL-02	340.2 ± 31.6	418.0 ± 41.1	514.9 ± 69.5
T3	HPI-01	348.2 ± 35.3	466.0 ± 43.9	582.3 ± 56.7
T4	HPI-02	373.2 ± 45.7	500.8 ± 54.7	633.9 ± 78.9

¹⁾ Viruses

S-1133: Reference reovirus for positive control.

HJL-01: Reovirus isolated from HJ farm.

HJL-02: Reovirus isolated from HJ farm.

HPI-01: Reovirus isolated from HP farm.

HPI-02: Reovirus isolated from HP farm.

²⁾ Means ± SD (standard deviation) (n = 4).

째부터 평균 항체 역가가 396 이상으로 증가하여 양성으로 나타났으며, 14일째에는 7일째 항체가와 비교하여 더욱 상승한 항체 역가가 나타났다. 하지만, 공격 접종 그룹 T3에서는 7일째 및 14일째까지 평균 항체 역가가 20과 365로 양성 한계치 이하로 나타났다(Table 8).

실질 장기에서 ARV 확인을 위한 RT-PCR 결과, 야외 분리 바이러스를 공격 접종 한 4개 그룹의 간과 맹장편도에서는 각 그룹별 모든 개체에서 양성으로 나타났으나, 건에서는 모두 음성으로 나타났다(Table 9).

고 찰

ARV는 닭을 비롯한 가금류에 감염이 되어 성장 불량, 사료 효율 저하, 부화율 감소, 관절염, 폐사 등의 임상 증상을 일으키며, 이로 인해 농장에 많은 경제적 피해를 유발한다(Dobson and Glisson, 1992; Macdonald et al., 1978; Apple et al., 1991; Takase et al., 1987; Songserm et al., 2003; Hollmen et al., 2002). 그러나 현재 국내 육계 산업에서 ARV 감염에 대한 실태 및 현황에 대한 연구는 미흡한 실정이며, 그에 따른 육계 산업에 미치는 경제적 영향에 대해서도 아직 정확한 분석이 보고된 바 없다. 김 등(1992)이 chicken embryo kid-

Table 8. Comparison of mean ELISA titers of among groups inoculated with various ARV isolates at 3-week-old SPF chickens via foot-pad

Groups	Viruses ¹⁾	ELISA titers		
		0 DPI	7 DPI	14 DPI
Control	No	316 ± 166 ²⁾ (45.9) ³⁾	0 ± 0 (0.0)	291 ± 65 (21.9)
TV	S-1133	NT ⁴⁾ -	0 ± 0 (0.0)	1432 ± 1146 (66.0)
T1	HJL-01	NT -	2211 ± 1832 (68.6)	4686 ± 1270 (26.0)
T2	HJL-02	NT -	1539 ± 1591 (75.9)	4331 ± 2737 (53.5)
T3	HPI-01	NT -	20 ± 339 (134.9)	365 ± 89 (23.8)
T4	HPI-02	NT -	658 ± 426 (53.3)	1806 ± 992 (49.5)

¹⁾ Viruses

S-1133: Reference reovirus for positive control.

HJL-01: Reovirus isolated from HJ farm.

HJL-02: Reovirus isolated from HJ farm.

HPI-01: Reovirus isolated from HP farm.

HPI-02: Reovirus isolated from HP farm.

²⁾ Geometric mean titer ± standard deviation.³⁾ Coefficient of variation (%).⁴⁾ NT: Not tested.

ney(CEK)를 이용하여 8~12주령의 국내 육계의 장관과 관절로부터 3개의 ARV strain을 분리하여 바이러스의 증식성 및 혈구 응집성 조사와 계태아에서의 병원성 시험, 바이러스의 전기영동 형태 등에 대하여 보고하였다. 하지만, 일반 육계 농장에서 ARV의 발생을 파악할 수 있는 전반적인 혈청학적 역학 조사를 실시하지 않았고, ARV에 의해 가장 큰 피해를 입는 육계의 평균 출하 일령이 35일령인 점을 감안할 때 8~12주령 육계는 토종닭 혹은 산란계일 가능성이 있어 ARV 감염에 가장 민감한 축종의 선택 및 바이러스 분리 동정 시기, 닭에서의 병원성 시험 연구가 미흡하였다.

본 실험은 국내 육계 농장에서 ARV에 대한 일령별 ELISA 역가 추이를 관찰하고, 모체 이행 항체가 소실된 2주령 이후와 출하 시 항체가를 검사하여 ARV 감염에 대한 항체 역가 분포를 조사하고자 하였다. 또한, ARV 감염이 의심되는 임상 증상을 보이는 닭에서 바이러스를 분리 확인하고 분리된

Table 9. Comparison of ARV reisoilation rate using RT-PCR at tissues of SPF chickens challenged with ARV isolates at 3 weeks old

Groups	Viruses ¹⁾	Tissues		
		Liver	Cecal tonsil	Tendon
T1	HJL-01	4/4 ²⁾	4/4	0/4
T2	HJL-02	4/4	4/4	0/4
T3	HPI-01	4/4	4/4	0/4
T4	HPI-02	4/4	4/4	0/4

¹⁾ Viruses

HJL-01: Reovirus isolated from HJ farm.

HJL-02: Reovirus isolated from HJ farm.

HPI-01: Reovirus isolated from HP farm.

HPI-02: Reovirus isolated from HP farm.

²⁾ Number of positive tissue/Number of tested tissue.

ARV에 대하여 병원성 조사를 실시하였다.

De Herdt 등(1999)에 의하면 1일령 육계 병아리의 경우, ARV에 대한 평균 항체 역가는 모체 평균 항체 역가의 49.8%를 전달받는다고 하였다. 본 실험에서 실시한 일반 육계와 ARV 감염 임상 증상이 관찰된 육계 농장에서 실시한 1일령 평균 항체 역가를 보면 각 농장별로 모체 이행 평균 항체 역가의 분포가 매우 다양한 것을 알 수 있다. 이는 종계의 ARV에 대한 항체 보유 상태가 계군별로 매우 다양함을 추론할 수 있으며, 그 결과로 1일령 육계 병아리의 모체 이행 항체가 불균일하고 다양하게 전달되어지고 있음을 알 수 있다.

Apple 등(1991)이 보고한 사례를 보면 만성적인 사료 소화 문제를 일으키는 육계 농장에서 ARV에 대한 ELISA 역가 검사 및 바이러스 분리를 시도한 실험에서 17일령의 육계에서 ELISA 역가가 200으로 낮아졌다가 24일령부터 다시 상승하는 결과를 보였으며, 24일령과 41일령에 ARV를 분리하였다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 1일령 ARV의 평균 항체 역가는 9개 농장 모두에서 2주령까지 일령이 경과함에 따라 감소되는 경향을 나타내었으며, 30일령 이후에는 농장별 정도의 차이는 있으나 6개 농장에서 상승하였다. 물론 농장별로도 다양하였지만 동일한 농장 내에서도 개체에 따라 항체 분포가 불균일하게 나타났다. 이와 같은 결과는 Apple 등(1991)이 보고한 사례와 일치하였으며, 국내 육계에서는 ARV에 대한 백신을 실시하지 않는 점을 감안할 때 농장 내 생산성 저하 문제가 ARV와 관련이 있다는 것을 국내에서도 확인할 수 있었다. 이를 재차 확인하기 위하여 출하 농장에 대한 혈

청 검사를 실시하였던 바 조사 대상 14개 농장 중 13개 농장에서 평균 항체 역가가 양성 한계치인 396 이상으로 나타났으며, 변이계수(CV)가 40% 이내의 균일한 분포를 나타내어 이들 또한 ARV 감염이 의심됨을 알 수 있었다. 마찬가지로 ARV 감염 임상 증상이 관찰된 5개 육계 농장의 출하 일령 시 평균 항체 역가는 모두 양성 한계치인 396 이상으로 나타나 국내 육계 농장에서의 ARV 감염이 인정되었으며, 경제적 손실과도 깊은 연관이 있음을 알 수 있었다.

혈청학적 방법으로 국내에서의 ARV 감염을 확인한 후 좀 더 직접적인 ARV 국내 발생을 확인하기 위하여 ARV 관련 임상 증상이 확인된 5개 육계 농장에서 유전자 검색과 바이러스 분리를 시도하였다. Bruhn 등(2005)은 ARV의 S2와 S4 유전자를 이용하여 64개의 야의 분리주 중 각각 55%와 80%의 ARV를 확인하였다고 보고하였다. 또한, Huang 등(1985)은 S2와 S4 유전자의 경우 병원성의 발현 및 닭에 감염 시 지속적인 감염 유지와 관련이 있고 감염 후 56일까지 이들 부위에서 변화를 확인할 수 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 Bruhn 등(2005)이 이용한 S4 유전자를 이용하여 모든 시료에 대하여 검사를 하였지만, 14일령 시 2개 농장의 2개 시료와 출하 일령 시 1개 농장의 2개 시료에서만 ARV를 확인하였다. 이는 Bruhn 등(2005)의 실험 결과만큼 확인율이 높지는 않았는데, 이는 RT-PCR 조건 등 다양한 요인에 의하여 검출율이 낮았을 것으로 판단되었다. 하지만, 임상 증상과 관련하여 RT-PCR로 ARV 유전자가 검출된 것은 국내에서의 ARV 발생을 확인시켜 주는 것이다. Xie 등(1997)은 ARV의 S1 유전자를 이용한 RT-PCR 결과 29개의 strain을 확인하였고, Lee 등(1998)은 S3 유전자를 이용하여 3개의 백신주와 6개의 분리주를 확인한 보고가 있는데, 본 실험에서 이용한 시료를 S1과 S3 유전자를 이용하여 확인할 경우 S4 유전자에서 확인이 안 된 ARV의 재확인 가능성이 있으므로 여겨진다. HJ 농장의 RT-PCR 결과 14일령의 간조직에서는 양성으로 나타났고 출하 일령 시에는 음성으로 나타났으나, 계태아 접종 시 형성된 Pock를 전자 현미경으로 관찰한 바이러스 입자는 Heggen-Peay 등(2002), Hollmen 등(2002) 및 Van der Heide 등(1980)이 확인한 ARV 입자와 동일한 것으로 확인되었다. 이는 HJ 농장에서 분리된 바이러스가 ARV임을 증명하는 것이다.

직접 ARV를 분리하는 방법으로는 embryonic chicken eggs, chicken kidney cells(CK), chicken embryo kidney cells(CEK세포)을 이용할 수 있는데(Hollmen et al., 2002, Takase et al., 1987; Hieronymus et al., 1983), 본 실험에서는 Guneratne 등(1982)과 Van der Heide 등(1981)이 실시한 방법에 따라 부화란의

요양막 접종을 통해 ARV를 분리 시도하였다. Guneratne 등(1982)과 Van der Heide 등(1981)에 따르면 부화란 접종 후 요양막 부위가 두꺼워지고 부종을 동반하면서 Pock와 같은 병변이 생겨 3~5일 사이에 대부분의 부화란이 폐사한다고 보고하였는데, 본 실험 결과 요양막에서도 부종이 나타나면서 Pock가 형성되고, 3~7일 사이에 폐사된 부화란에서 ARV가 분리되었다. 그러나 RT-PCR 양성으로 확인된 시료 중에서도 바이러스가 100% 분리되지 않아 RT-PCR 양성으로 확인된 HP 농장의 맹장편도에서는 바이러스가 분리가 되었으나, HJ 농장의 간에서는 바이러스가 분리되지 않았으며 출하일령 시 양성으로 확인된 HP 농장의 소장에서는 바이러스가 분리되었으나, 맹장편도에서는 분리가 되지 않았고, 출하일령 시 모두 음성으로 확인되었던 SY 농장 및 HJ 농장에서는 바이러스가 분리되었다. 이는 ARV의 감염 시 분리시료와 체내 장기에서의 존재 여부(Takase et al., 1987; Roessler and Rosenberger, 1989), ARV 확인을 위한 RT-PCR 검사 시 이용한 유전자의 종류(Huang et al., 1985; Lee et al., 1998; Xie et al., 1997) 및 ARV의 감염과 분리 시기(Goodwin et al., 1993; Apple et al., 1991)에 따라 바이러스의 분리에 영향을 미치는 것으로 보인다.

분리된 ARV를 3주령 SPF 닭에 공격 접종한 병원성 시험 결과, 항체 역가의 상승 및 분리 조직에서 RT-PCR을 이용한 바이러스 양성 확인으로 ARV의 감염을 확인하였으나, 폐사와 관절염, 설사 등의 특이적인 임상 증상이 나타나지 않았다. Rosenberger 등(1989)은 일령에 따른 ARV 감염 시험에서 2주령에 감염시킨 것보다 1일령이나 1주령에 감염시킨 닭들에서 감수성이 더 높다고 보고하였으며, Roessler와 Rosenberger(1989)는 바이러스 재분리를 감소 및 조직에서 병변 정도의 감소를 증거로 1일령 병아리보다 1주령 병아리 접종 시 더 저항성이 있음을 보고했다. 이는 닭이 연령이 증가함에 따라 ARV에 대해 저항성이 있음을 증명한 것이라 할 수 있는데, 특히 Ellis 등(1983)은 병원성주나 약병원성주를 4주령의 닭에 접종 시 불현성 감염이 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서도 혈청 검사 및 RT-PCR 결과, 바이러스의 감염은 확인이 되었지만, 임상 증상이 나타나지 않은 이유는 공격 접종한 닭의 일령이 3주령으로 ARV에 대한 연령에 따른 저항성으로 인해 병원성이 나타나지 않은 것으로 판단된다. 따라서 추후 본 실험에서 분리된 ARV를 1일령 또는 1주령의 닭에 공격 접종을 실시하여 병원성에 대한 평가를 재실시하여야 할 것으로 보인다.

공격 접종 후 14일째 실시한 체중 측정 시 대조구와 공격

접종 그룹 간의 증체량 저하에 따른 성장 불량 및 임상 증상을 관찰한 결과 통계학적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다(Table 7). 이는 Songserm 등(2003)이 1일령 SPF 닭에 ARV를 공격 접종한 후 측정된 체중 비교와 비슷한 결과가 나왔다. Songserm 등(2003)의 실험에서는 21일령 체중이 대조구에 비하여 공격 접종 그룹 4개중 3개에서 더 높게 나왔으며, 본 실험에서도 14일령 체중이 4개 그룹 중 2개에서 대조구보다 높게 나타났다. 이는 본 실험 조건과 야외 농장 상황을 비교하여 생각할 때 야외 농장에서 체중 감소는 ARV 단독 감염 시보다 다른 질병과의 복합 감염 여부 및 각종 스트레스 요인이 가중되어 증체 불량 등의 문제가 더 쉽고 심하게 야기 되는 것으로 보인다. Ruff와 Rosenberger(1985)는 ARV나 콕시듐이 단독으로 감염되었을 때보다 병원성이 낮은 ARV와 적은 수준의 콕시듐 원충을 복합 감염시켰을 때 증체량 감소와 위축이 훨씬 더 빈번하게 나타났다고 보고하였다. Ruff와 Rosenberger(1985)의 보고를 근거로 국내 야외 농장에서의 질병 발생은 병원체의 단독 감염보다는 다른 병원체와 복합 감염 및 여러 스트레스 요인이 중복되는 양상이 많을 것으로 여겨지는데, ARV 감염으로 인한 증체 불량 및 생산성 저하 문제도 콕시듐과 같은 질병이 복합 감염되었을 경우 더욱 현저하고 그 피해가 클 것으로 보인다.

본 실험에서 실시한 국내 육계 농장에서 ARV에 대한 역학 조사 결과, 국내에서의 ARV 감염을 혈청학적 검사를 통하여 확인하였으며 또한, ARV를 분리하였다. ARV 병원성 발현의 경우 본 실험에서는 재현이 되지 않았지만 ARV의 감염 일령과 ARV 단독 감염보다는 야외 농장에서 여러 복합적인 요인들이 중복되었을 경우, 증체 불량, 위축 등의 임상 증상이 쉽게 일어날 수 있을 것으로 여겨져 복합 감염에 대한 평가가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 또한, 본 실험에서 실시하지 못한 분리된 ARV에 대한 바이러스의 정상 확인, 유전학적 특징 및 병원성 재검사 등에 대한 연구가 실시되어야 할 것으로 보이며, 야외 농장에서 좀 더 많은 ARV를 분리하여 국내 양계 농장에서 ARV의 오염 방지 및 경제적 피해를 줄일 수 있는 연구가 좀 더 심도 있게 추진되어야 할 것으로 보인다.

적 요

국내 육계 농장에서 avian reovirus의 감염 여부를 확인하기 위한 ELISA 검사법을 이용한 혈청 검사와 바이러스 분리 및 2개 농장에서 분리된 바이러스를 SPF 닭에 공격 접종하여 병원성을 확인한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 1일령 육계 병아리에서 avian reovirus에 대한 모체 이행 항체 역가 검사를 통하여 육용종계에서 avian reovirus에 대한 항체 보유 상태가 매우 다양하며, 이로 인해 후대 병아리의 항체 수준도 매우 불균일하게 분포된다는 것을 알 수 있었다.
2. 육계에서 avian reovirus에 대한 모체 이행 항체 역가는 14일령 전에 대부분 소실되며, 그 이후 혈청 역가가 상승하는 것이 확인되어 국내 육계 농장에서도 avian reovirus가 감염이 되는 것을 확인할 수 있었으며, 각 농장의 감염 상황 및 계군의 면역 정도에 따라 혈청 역가가 다양하게 분포함을 알 수 있었다.
3. RT-PCR을 이용한 avian reovirus 확인 결과, 1일령 병아리에서 모두 음성으로 확인되었고, 14일령과 출하 일령에 2개 농장에서 양성으로 나타나, 국내 육계 농장에서 avian reovirus 감염은 주로 14일령 이후에 나타나는 것으로 판단되었다.
4. 본 실험에서 실시한 ELISA, RT-PCR, 전자현미경 관찰을 통하여 국내 육계 농가에서의 ARV 감염과 존재를 확인할 수 있었다. 그러나 검사 방법간의 결과가 불일치한 것은 avian reovirus의 분리가 감염된 농장의 상황, 닭의 감염 일령 및 분리 장기에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다.
5. 9일령 SPF 부화란 접종을 통해 2개의 육계 농장에서 avian reovirus가 분리되었고 분리된 바이러스를 3주령 SPF 닭에 공격 접종 시 혈청 역가의 상승 및 주요 조직에서 바이러스가 확인되었으나, 특이적인 임상 증상은 관찰되지 않았다. 이는 닭의 연령에 따라 avian reovirus에 저항성이 있는 것으로 여겨지며 ARV의 조직 내 잔존은 감염 장기에 따라 다르다는 것을 알 수 있었다.

사 사

이 논문은 2006년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었으며, 국립수의과학검역원 질병진단센터의 박중원 선생님의 전자현미경 시료 제작에 감사드립니다.

인용문헌

Adair BM, Burns K, McKillop ER (1987) Serological studies

- with reovirus in chickens, turkeys and ducks. *J Comp Path* 97:495-501.
- Al Afaleq A, Jones RC (1989) Pathogenicity of three turkey and three chicken reoviruses for poults and chicks with particular reference to arthritis/tenosynovitis. *Avian Pathol* 18:433-440.
- Apple RO, Skeeles JK, Houghten GE, Beasley JN, Kim KS (1991) Investigation of a chronic feed-passage problem on a broiler farm in Northwest Arkansas. *Avian Dis* 35:422-425.
- Bains BS, Mackenzie M, Spradbrow PB (1974) Reovirus-associated mortality in broilers chickens. *Avian Dis* 18:472-476.
- Bruhn S, Bruckner L, Ottiger HP (2005) Application of RT-PCR for the detection of avian reovirus contamination in avian viral vaccines. *J Virol Methods* 123(2):179-186.
- De Herdt P, Ducatelle R, Uyttebroek E, Hermans J, Sneepe A, Torbeyns R (1999) Reovirus serology in broiler parents and their progeny and its correlation with performance. *Avian Dis* 43:271-278.
- Dobson KN, Glisson JR (1992) Economic impact of a documented case of reovirus infection in broiler breeders. *Avian Dis* 36:788-791.
- Ellis MN, Eidson CS, Fletcher OJ, Kleven SH (1983) Viral tissue tropisms and interferon production in White Leghorn chickens infected with two avian reovirus strain. *Avian Dis* 27(3):644-651.
- Giambrone JJ, Solano W (1988) Serologic comparison of avian reovirus isolates using virus neutralization and an enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 32:678-680.
- Goodwin MA, Davis JF, McNulty MS, Brown J, Player EC (1993), Enteritis (So-called runting stunting syndrome) in Georgia broiler chicks. *Avian Dis* 37:451-458.
- Gouvea VS, Schnitzer TJ (1982) Polymorphism of the genomic RNAs among the avian reovirus. *J Gen Virology* 61:87-91.
- Guneratne JR, Jones RC, Georgiou K (1982) Some observations on the isolation and cultivation of avian reoviruses. *Avian Pathol* 11:453-462.
- Heggen-Peay CL, Qureshi MA, Edens FW, Sherry B, Wakenell PS, O'Connell PH, Schat KA (2002) Isolation of a reovirus from poult enteritis and mortality syndrome and its pathogenicity in turkey poults. *Avian Dis* 46:32-47.
- Hemzani E, Meroz M, Weisz A, Ayali G, Kass N, Mikhlin S, Berman E, Samberg Y (1996) Isolation of an avian reovirus with unique antigenicity from a tenosynovitis outbreak. *Proc International Symposium on Adenovirus and Reovirus Infections in Poultry*. Rauischholzhausen, Germany, 269-278.
- Hieronimus DR, Villegas P, Kleven SH (1983) Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malabsorption syndrome. *Avian Dis* 27:246-254.
- Hollmen T, Franson JC, Kilpi M, Docherry DE, Hansen WR, Hario M (2002) Isolation and characterization of a reovirus from common Eiders (*Somateria mollissima*) from Finland. *Avian Dis* 46:478-484.
- Huang DD, Nugent MA, Rosenberger JK, Schnitzer TJ (1985) Association of avian reovirus M and S genes with viral behavior *in vivo*. II. Viral pathogenicity. *Avian Dis* 31:446-454.
- Island MR, Jones RC (1988), ELISA for measuring antibody titer against avian reovirus using a single dilution of serum. *Avian Pathol* 12:411-425.
- Jackson GG, Muldoon RL (1973), Viruses causing respiratory infection in man. IV. Reovirus and adenoviruses. *J Infect Dis* 128:812-833.
- Johnson DC, Van der Heide L (1971) Incidence of tenosynovitis in Maine broilers. *Avian Dis* 15:829-834.
- Jones RC, Al-Afaleq A, Savage CE, Islam MR (1994) Early pathogenesis in chicks of infection with a trypsin-sensitive avian reovirus. *Avian Pathol* 23:683-629.
- Jones RC, Islam MR, Kelly DF (1989) Early pathogenesis of experimental reovirus infection in chickens. *Avian Pathol* 18:239-253.
- Jones RC, Jordan TW, Lioupis S (1975) Characteristics of reovirus isolated from ruptured gastrocnemius tendons of chickens. *Vet Rec.* 96:153-154.
- Jones RC, Onunkwo O (1978) Studies on experimental tenosynovitis in light hybrid chickens. *Avian Pathol* 7:171-181.
- Kawamura H, Shimizu F, Maeda M, Tsubahara H (1965) Avian reovirus : its properties and serological classification. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 5:115-124.
- Kawamura H, Tsubahara H (1966) Common antigenicity of avian reoviruses. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 6:187-193.
- Kim, SS, Park BO, Kim SJ (1992) Studies on properties of avian reovirus isolated in Korea. *Korean J Vet Serv* 15(1): 67-68.
- Koide F (1970) Molecular biology of avian reovirus. *Natl Inst*

- Anim Health Q 10:83-96.
- Lee LH, Shien JH, Shieh HK (1998) Detection of avian reovirus RNA and comparison of a portion of genome segment S3 by polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. Res Vet Science 65:11-16.
- Liu HJ, Giambone JJ, Nielsen BL (1997) Molecular characterization of avian reoviruses using nested PCR and nucleotide sequence analysis. J Virol Methods 65:159-167.
- Liu HJ, Lee LH, Hsu HW, Kuo LC, Liao MH (2003) Molecular evolution of avian reovirus : Evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segments and multiple cocirculating lineages. Virology 314:336-349.
- Macdonald JW, Randall CJ, Dagless MD, McMartin DA (1978) Observations on viral tenosynovitis (viral arthritis) in Scotland. Avian Pathol 7:471-482.
- Malkinson M, Perk K, Weisman Y (1981) Reovirus infection of young muscovy ducks (*Cairina moschata*). Avian Pathol 10:433-440.
- Meanger J, Wickramasinghe R, Enriquez CE, Robertson MD, Wilcox GE (1995) Type-specific antigenicity of avian reoviruses. Avian Pathol 24:121-134.
- Menendez NA, Calnek BW, Cowen BS (1974) Experimental egg-transmission of avian reovirus. Avian Dis 19:1.
- Menendez NA, Calnek BW, Cowen BS (1975) Localization of avian reovirus(FDO isolant) in tissues of mature chickens. Avian Dis 19:112-117.
- Ni Y, Kemp MC (1995) A comparative study of avian reovirus pathogenicity :Virus spread and replication and induction of lesions. Avian Dis 39:554-566.
- Page RK, Fletcher OJ, Villegas P (1982) Infectious tenosynovitis in young turkeys. Avian Dis 26:924-927.
- Robertson MD, Wilcox GE (1986) Avian reovirus. Vet Bull 56:155-174.
- Roessler DE, Rosenberger JK (1989) *In vitro* and *in vivo* characterization of avian reoviruses. III. Host factors affecting virulence and persistence. Avian Dis 33:555-565.
- Rosenberger JK, Sterner FJ, Botts S, Lee KP, Margolin A (1989) *In vitro* and *in vivo* characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. Avian Dis 33:535-544.
- Ruff MD, Rosenberger JK (1985) Interaction of low-pathogenicity reoviruses and low levels of infection with several coccidial species. Avian Dis 29(4):1057-1065.
- Sahu SP, Olson NO (1975) Comparison of the characteristics of avian reoviruses isolated from the digestive and respiratory tract, with viruses isolated from the synovia. Am J Vet Res 36:847-850.
- Schnitzer TJ (1985) Protein coding assignment of the S genes of the avian reovirus S1133. Virology 141:167-170.
- Schwartz LD, Gentry RF, Rothenbacher H, Van der Heide L (1976) Infectious tenosynovitis in commercial White Leghorn chickens. Avian Dis 20:769-773.
- Songserm T, Pol JM, van Roozelaar D, Kok GL, Wagenaar F, ter Huurne AA (2000) A comparative study of the pathogenesis of malabsorption syndrome in broilers. Avian Dis 44:556-567.
- Songserm T, van Roozelaar D, Kant A, Pol J, Pijpers A, ter Huurne A (2003) Enteropathogenicity of Dutch and German avian reoviruses in SPF White Leghorn chickens and broilers. Vet Res 34:285-295.
- Spandidos DA, Graham AF (1976) Physical and chemical characterization of an avian reovirus. J virology Sept p. 968-976.
- Takase K, Nonaka F, Yamamoto M, Yamada S (1987) Serologic and pathogenetic studies on avian reoviruses isolated in Japan. Avian Dis 31:464-469.
- Tang KN, Fletcher OJ, Villegas P (1987) Comparative study of the pathogenicity of avian reoviruses. Avian Dis 31:577-583.
- Van der Heide L, Geissler J, Bryant ES (1974) Infectious tenosynovitis : Serologic and histopathologic response after experimental infection with a connecticut isolate. Avian Dis 18:289-296.
- Van der Heide L, Kalbac M, Brustolon M, Lawson MG (1980) Pathogenicity for chickens of a reovirus isolated from turkeys. Avian Dis 24:989-997.
- Van der Heide L, Lutticken D, Horzinek M (1981) Isolation of avian reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis ("Brittle bone disease"; "Femoral head necrosis") in broiler chickens. Avian Dis 25(4):847-856.
- Van Loon AA, Suurland B, van der Marel P (2002) A reovirus challenge model applicable in commercial broilers after live vaccination. Avian Pathol 31:13-21.
- Walker ER, Friedman MH, Olson NO (1972) Electron micros-

scopic study of an avian reovirus that causes arthritis. *J Ultrastruct Res* 41:67-79.

Wood GW, Nicholas RA, Hebert CN, Thornton DH (1980) Serological comparisons of avian reoviruses. *J Comp Pathol* 90:29-38.

Wooley RE, Dees TA, Cromack AS, Gratzek JB (1972) Infectious enteritis of turkeys : characterization of two reoviruses

isolated by sucrose density gradient centrifugation from turkeys with enteritis. *Am J Vet Res* 33:157-164.

Xie Z, Fadl AA, Girshick T, Khan MI (1997) Amplification of avian reovirus RNA using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Dis* 41:654-660.

(접수일자: 2008. 03. 11, 채택일자: 2008. 03. 25)