

SPF 닭에서 레오바이러스와 아데노바이러스의 단일 혹은 혼합감염에 따른 병원성 비교

민경철 · 최동명 · 김지예 · 전은옥 · 변성환 · 모인필*

충북대학교 수의과대학 조류질병학실험실

(접수 2011. 3. 25, 게재승인 2011. 4. 20)

The comparison of pathogenicity in the SPF chickens challenged with avian reovirus and/or fowl adenovirus

Kyeong-Cheol Min, Dong-Myong Choi, Ji-Yea Kim,
Eun-Ok Jeon, Sung-Hwan Byun, In-Pil Mo*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received 25 March 2011, accepted in revised form 20 April 2011)

Abstract

Avian reovirus (ARV) and fowl adenovirus (FAdV) were evaluated for pathogenicity in specific pathogen free (SPF) chickens. ARV was isolated from the broilers with history of malabsorption syndrome (MAS). FAdV was isolated from the layer breeders with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome. Total 6 inoculated groups including 1 un-inoculated group were organized and inoculated with the ARV and/or FAdV by oral route. The minimal pathological lesions and lower viral gene detection rates were present in the ARV inoculated groups compared to those of FAdV or ARV/FAdV inoculated groups. Common gross lesions in the ARV inoculated group were distended intestine with foamy contents and in the FAdV group there were foamy cecal contents and hydropericardium among the evaluation methods such as gross and histological lesion, viral gene detection, body weight and serum chemistry, histopathological lesion score was reliable especially in the liver lesions such as hepatic necrosis and lymphocytic infiltration. However, we did not success to evaluate the synergetic effect of mixed infection of ARV and FAdV in this study. Therefore, we need further study to reproduce malabsorption syndrome of ARV infection using different viral agent such as rotavirus and using different dose of virus.

Key words : Avian reovirus, Fowl adenovirus, Pathogenicity, MAS

서 론

육계의 질병 중 일부는 다른 병원체의 혼합 감염에 의해서 임상증상이 더욱 심해지는 경우가 많다. 예를 들면 호흡기계 질병에서는 infectious bronchitis virus (IBV)와 *Escherichia coli*, *Mycoplasma spp.* 등의 혼합 감

염이 일반적이고, 소화기계 질병에서는 reovirus, adenovirus, parvovirus, entero-like virus, rotavirus, nephritis virus (McNulty 등, 1984; Decaesstecker 등, 1986; Decaesstecker 등, 1988; Shirai 등, 1990; Goodwin 등, 1993; Montgomery 등, 1997; Lenz 등, 1998) 등의 다양한 바이러스와 세균이나 기생충이 혼합 감염되는 것이 있다 (Goodwin 등, 1993; Montgomery 등, 1997).

소화기계 혼합감염을 일으키는 원인체 중 가장 대

*Corresponding author: In-Pil Mo, Tel. +82-43-261-3356,
Fax. +82-43-261-3224, E-mail. moip@cbu.ac.kr

표적인 Avian reovirus (ARV)는 reoviridae family/orthoreovirus genus에 속한다. Genome는 10개의 double stranded RNA segment로 이루어지고, 그 크기에 따라 L (large), M (medium), S (small)의 3가지로 구분 된다 (Spandidos와 Graham, 1976). ARV는 닭에서 viral arthritis/tenosynovitis (Van der Heide, 1977), malabsorption syndrome (MAS) (Decaesstecker 등, 1986; Goodwin 등, 1993), inclusion body hepatitis (McFerran 등, 1976; Mandelli 등, 1978), hydropericardium (Jones, 1975), respiratory disease (Simmons와 Lukert, 1972) 등의 여러 질병과 연관되어 있지만, 이 중 가장 직접적인 관계가 있으며 오랫동안 연구된 질병은 viral arthritis/tenosynovitis와 MAS이며 이 질병들은 현대 양계 산업에 다양한 형태로 매우 심각한 경제적 피해를 주고 있다 (Dobson과 Glisson, 1992).

MAS는 주로 1~3주령의 어린 육계에서 성장지연, 깃털불량, 설사 등의 증상을 보이며, 전 세계적으로 발생 보고가 되고 있다 (Songserm 등, 2000; Songserm 등, 2002). MAS는 한 가지 원인체에 의해서 나타나는 질병이 아니라 여러 원인체의 혼합 감염에 의해서 나타나는 대표적 질병으로 알려져 있으며 (McNulty 등, 1984; Decaesstecker 등, 1986; Smart 등, 1988; Goodwin 등, 1993; Montgomery 등, 1997; Songserm 등, 2000; Songserm 등, 2002), 영양학적 불균형이나 부족, 관리 불량, 스트레스 등의 요인에 의해서 MAS의 증상은 더욱 악화 될 수 있다 (Goodwin 등, 1993). 특히 adenovirus는 MAS의 증상 발현에 있어서 주요한 원인체는 아니지만, 오히려 다른 병원체들의 발현을 용이하게 해주는 enhancing effect가 있다고 알려져 있다 (Kouwenhoven 등, 1988).

최근 국내 육계 산업에 큰 피해를 일으키고 있는 질병 중 하나로, fowl adenovirus (FAdV)에 의해서 발병하는 hydropericardium syndrome (HPS)이 있다. HPS는 심낭에 수종을 보이는 질병으로 주로 3~5주령의 육계에서 60~70%까지 폐사를 일으킨다 (Ahmad 등, 1989). HPS를 일으키는 FAdV는 12개의 serotype 중 serotype 4에 속하며 (Hess 등, 1999) HPS는 파키스탄 (Khawaraja 등, 1988), 인도 (Swati 등, 2002), 이라크 (Abdul-Aziz와 al-Attar, 1991), 일본 (Abe 등, 1998; Na kamura 등, 1999), 에콰도르 (Mazaheri 등, 1998), 칠레 (Toro 등, 1999) 등 여러 나라에서 발생이 보고되었다. 국내 육계 산업에서 ARV와 FAdV 감염의 중요성은 점차 커지고 있지만, 아직 많은 연구가 이루어지지 않았다. 이 연구에서는 이

전 연구를 통해 국내 육계의 ARV 감염에 대한 역학 조사를 하여 국내 육계에서는 ARV 감염이 이미 만연되어 있다는 사실을 확인하였으며 HPS에 이환된 닭에서 분리한 FAdV의 분자 생물학적 특징 및 병원성 재현 연구를 하여 보고한 바 있다 (Kim 등, 2008).

그동안 ARV, FAdV 각각의 병원성에 관한 연구는 있었지만 (Vertommen 등, 1980a; 1980b; Montgomery 등, 1986; Tang 등, 1987; Ni와 Kemp, 1995; Lenz 등, 1998; Nakamura 등, 1999; Songserm 등, 2000) 두 바이러스의 혼합 감염에 대한 연구 보고는 없었다. 따라서 우리는 육계의 다양한 질병에서 공통으로 분리되기도 하며 (McFerran 등, 1976; Decaesstecker 등, 1988; Lenz 등, 1998) 최근 국내에서 많은 문제를 야기하고 있는 ARV와 FAdV의 혼합 감염 모델을 통해 그 상관관계 및 병원성을 규명하고자 이 실험을 하였다.

재료 및 방법

실험동물

1일령 Specific pathogen free (SPF) 닭 93수를 이 실험에 사용하였으며 이 병아리는 SPF 계란을 SPAFAS사 (North Franklin, USA)에서 구입하여 본 실험실의 부화기 (윤선부화기 평택, 경기)에서 부화하였다. SPF 닭은 실험에 공시하기 전에 ARV와 FAdV에 대한 모체이행 항체 검사에서 음성을 나타내었다.

바이러스

ARV는 MAS 임상증상을 보인 10일령 육계의 장에서 분리하였으며, primary chicken embryo liver cell에서 4회 계대배양 하였다. 접종 전 TCID₅₀를 측정하였으며 닭 1수당 $1.6 \times 10^{3.75}$ TCID₅₀로 접종하였다.

FAdV는 HPS을 보이던 37주령 산란계의 간에서 분리한 혈청형 4형 바이러스이며 (Kim 등, 2008), primary chicken embryo liver cell에서 2회 계대배양 하였다. 접종 전 TCID₅₀를 측정하였으며 닭 1수당 10^2 TCID₅₀로 접종하였다.

실험설계

1일령 SPF 닭 93수를 5개의 접종군 (15수/군)과 1개

Table 1. Experimental design to evaluate the pathogenicity of Avian Reovirus (R) and/or Fowl Adenovirus (A) in the SPF chickens

Group	Number of chickens	Inoculation	Titer (TCID ₅₀ /chicken)	Day of inoculation	Sampling at DPI*
R01	15	ARV	1.6×10 ^{3.75}	1 day	3, 7, 14
R14	15	ARV	1.6×10 ^{3.75}	14 day	3, 7, 14
A01	15	FAdV	10 ²	1 day	3, 7, 14
A01R01	15	FAdV	10 ²	1 day	3, 7, 14
A01R14	15	ARV	1.6×10 ^{3.75}	Mixed	3, 7, 14
		FAdV	10 ²	1 day	
CONT	18	ARV	1.6×10 ^{3.75}	14 day	3, 7, 14, 17, 21, 28
		PBS		1 day	

*Days post inoculation.

의 대조군(18수)으로 구분하였으며. 각 접종군의 SPF 닭은 음압 환경이 조성된 무균사육장치인 HBC2 (Threshine, 유성, 대전)에서 각각 사육되었고 사료와 물은 자율 급이 하였다. 각 접종군은 두 바이러스의 자연 감염을 재현하기 위해 각각 혹은 혼합하여 경구로 접종하였다. 1 접종군(R01)은 ARV 1일령 접종군, 2 접종군(R14)은 ARV 14일령 접종군, 3 접종군(A01)은 FAdV 1일령 접종군, 4 접종군(A01R01)은 FAdV/ARV 1일령 동시 접종군, 5 접종군(A01R14)은 FAdV/ARV 1일령/14일령 접종군, 6 접종군(CONT)은 음성 대조군으로 phosphate buffered saline (PBS)을 경구 투여하였다(Table 1).

모든 접종군의 닭들은 1일령 때 체중을 측정하였으며 해당 바이러스 최종 접종 후 3, 7, 14 DPI (day postinoculation)때 각 5수씩, 바이러스 비접종군인 대조군의 닭들은 3, 7, 14, 17, 21, 28 DPI때 각 3수씩 무작위로 선택하여 체중을 측정하고, 채혈 후 경추 탈구하여 부검을 하였다. 폐사한 개체들은 폐사 당일에 부검을 하였다.

실험기간 동안 매일 임상증상을 관찰하였으며 정해진 날에, 채취한 혈청으로는 AST (aspartate aminotransferase), CPK (creatine phosphokinase) 수치를 측정하였다. 부검을 통하여 각 접종군의 육안 병변을 확인하였으며 조직 병리학적 검사를 위해서 간, 선위, 십이지장, 췌장, 공장, 회장, Fabricius 낭, 흉선을 채취하였고, 접종한 바이러스의 유전자 검출을 위해서 간, 맹장편도를 채취하였다.

유전자 추출 및 PCR (Polymerase chain reaction)

각각의 접종군에서 미리 계획된 DPI 별로 간, 맹장편도를 채취하여 유제를 하였으며, 각 유제액은 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상층액으로부터 Viral Gene-spin™

(iNiRON Biotechnology, Inc., Korea)을 사용하여 viral gene을 추출하였다. PCR은 상업적으로 판매되는 AccessQuick™ RT-PCR System (Promega, WI, USA)과 TaKaRa Ex Taq™ (TAKARA BIO INC., Japan)을 사용하였다.

ARV primer는 기존 논문의(Bruhn 등, 2005) ARV_S4_P4 (5'-GTG CGT GTT GGA GTT TC-3'), ARV_S4_P5 (5'-ACA AAG CCA GCC AT(G/A) AT-3')를 사용하였으며, FAdV primer는 기존 논문의(Meulemans 등, 2001) Hexon A (5'-CAA RTT CAG RCA GAC GGT-3')와 Hexon B (5'-TAG TGA TGM CGS GAC ATC AT-3')를 사용하였다.

병리조직 검사

병리조직학적 병변을 관찰하기 위해서 각각의 접종군에서 각 DPI 별로 간, 선위, 십이지장, 췌장, 공장, 회장, Fabricius 낭, 흉선을 채취 하였다. 채취한 조직은 10% phosphate-buffered formalin 고정액으로 처리하였으며, 고정된 조직은 조직 처리과정을 거친 후 haematoxylin and eosin (H&E) 염색을 한 후 병변을 관찰하였다.

혈청화학적 검사

각각의 접종군에서 각 DPI 별로 채혈을 실시하였다. 혈액 샘플은 혈청화학적 측정을 위하여 혈청을 분리한 후 충북대학교 수의과대학 임상병리학 교실에 위탁하였고, 혈청 AST, CPK 수치를 측정하였다.

결 과

임상증상 및 부검소견

ARV 단독 접종군(R01, R14)에서는 선천적인 항문

폐색에 의한 1 DPI 때 1수 폐사 이외에는 폐사가 관찰되지 않았지만 FAdV를 단일(A01) 혹은 ARV 혼합 접종군(A01R01, A01R14)에서는 폐사가 관찰되었다(Table 2). 비접종 대조군인 CONT 군에서는 12 DPI 때 1수가 사고로 폐사한 이외 특별한 임상 증상이 발견되지 않았다. 폐사 이외의 임상증상에서도 ARV 단독 접종군과 FAdV 단독 혹은 ARV 혼합 접종군 간에는 확연한 차이가 인정되었다. ARV 단독 접종군은 특이적인 임상 증상이 발견되지 않았지만 A01 group은 4 DPI 때부터 일부 개체의 활력이 저하되면서, 5~7 DPI에 걸쳐서 조는 증상이 발견되었다. 죽은 개체는 결국 폐사하였으며, 6 DPI에 2수, 7 DPI에 3수가 추가로 폐사하였다. 혼합 접종군(A01R01)은 2~3 DPI 때 설사 등 다른 증상은 없이 활력만 저하되었고 폐사체도 나타나지 않았지만 또 다른 혼합 접종군(A01R14)은 6~9 DPI에 걸쳐서 조는 증상이 발견되었으며 죽은 개체들은 모두 폐사하였다. 폐사 개체 수는 6 DPI 1수, 8 DPI 3수, 10 DPI 1수 등 모두 5수였다.

부검소견은 ARV 단독 접종군과 ARV와 FAdV 혼합 접종군 간에 차이가 인정되었다. ARV단독 접종군인 R01 군은 3 DPI 때 간에서 미약한 출혈 반점과 장의 확

장 특히 맹장 부근의 확장 및 포말성 내용물이 관찰된 것이 유일한 부검소견이었다. 또 다른 ARV 접종군인 R14 군에서도 간의 육안 병변은 관찰되지 않았으며, 장의 병변은 R01 접종군에 비해 미약한 수준이었다. 반면에 FAdV 접종군에서는 다양한 부검소견이 관찰되었다. A01 접종군에서 발생한 6 DPI 폐사체의 부검 결과 1수에서 간의 출혈반점이 관찰되었고, 7 DPI 폐사체에서는 간의 출혈 반점과 장의 포말성 내용물, 미약한 심낭 수종이 관찰되었다. 혼합접종군 A01R01군에서는 3 DPI, 7 DPI때 주로 장의 확장 및 포말성 내용물이 관찰된 것이 유일한 부검소견이지만, 또 다른 혼합 접종군 A01R14 군에서 폐사된 개체에서는 간의 출혈반점과 심낭 수종이 모두 관찰되었다

체중의 변화는 실험기간 동안 대부분 접종군과 대조군 간에 통계학적 유의한 차이가 인정되지 않았다. 단, FAdV 단독 접종군(A01)에서만 접종 후 7일에 대조군 및 다른 접종군과 비교할 때 통계학적으로 유의한 차이가 인정되었다($P < 0.05$). 그러나 이후 A01 group의 체중은 회복되었으나 개체 간 표준편차가 29.1 g으로 체중의 차이가 다른 군의 개체 간 표준편차에 비하여 높았다(Table 3).

Table 2. Mortality of SPF chickens inoculated with Avian Reovirus (R) and/or Fowl Adenovirus (A) isolated in Korea

Group	Number of dead chickens at days post inoculation						
	0	3	7	14	14+3*	14+7	14+14
R01	0	1	0	0	NT**	NT	NT
R14	NT	NT	NT	NT	0	0	0
A01	0	0	5	0	NT	NT	NT
A01R01	0	0	0	0	NT	NT	NT
A01R14	NT	NT	NT	NT	0	1	4
CONT	0	0	0	1	0	0	0

*14+3 means the samples were collected at 3 days post inoculation in the SPF chickens inoculated with designed viruses at 14 days old of age, **NT: not tested.

Table 3. Comparison of mean body weight of SPF chickens inoculated with Avian Reovirus (R) and/or Fowl Adenovirus (A)

Group	Body weight (g) at days post inoculation						
	0	3	7	14	14+3*	14+7	14+14
R01	41.0 (3.97)**	45.1 (3.79)	75.0 (7.92)	127.9 (9.53)	NT***	NT	NT
R14	39.0 (2.50)	NT	NT	149.6 (12.59)	178.6 (12.68)	253.8 (13.74)	319.2 (19.67)
A01	39.8 (2.27)	48.9 (3.10)	58.8 (9.29)	136.4 (29.11)	NT	NT	NT
A01R01	40.1 (3.94)	51.2 (4.04)	69.7 (4.05)	141.8 (8.83)	NT	NT	NT
A01R14	39.5 (3.84)	NT	NT	142.6 (15.51)	178.2 (28.92)	216.6 (19.81)	342.0 (46.81)
CONT	40.1 (4.16)	49.3 (5.72)	76.7 (5.96)	131.9 (8.92)	160.3 (11.83)	215.1 (20.53)	272.3 (117.95)

*14+3 means the samples were collected at 3 days post inoculation in the SPF chickens inoculated with designed viruses at 14 days old of age, **Mean (SD) in a column with no common lowercase superscript differ significantly ($P < 0.05$), ***NT: not tested.

바이러스 유전자 검출

ARV 단독 접종군과 ARV (R01, R14)와 FAdV 단독 및 혼합 접종군(A01, A01R01, A01R14)의 간과 맹장편도에서 ARV에 대한 유전자 검출을 실시하였다. 그 결과, R01군에서 접종 후 3일째 채취한 닭 5수 중 3수의 간과 맹장편도에서 접종한 ARV에 대한 유전자가 검출되었으나 나머지 접종군 및 대조군에서는 ARV 유전자가 전혀 검출 되지 않았다(Table 4).

FAdV 유전자도 단독 접종군(A01)과 ARV 혼합 접종군(A01R01, A01R14)의 간과 맹장편도에서 검출을

실시하였다. 그 결과 A01 접종군에서 접종 후 3일째 간 5수 중 1수에서 검출되었으나 맹장편도에서는 검출되지 않았다. 그 후 접종 후 6일째 폐사체와 7일째에 채취한 간과 맹장편도에서는 검사대상 5수 중 5수 모두 FAdV 유전자가 검출되었으나 접종 후 14일째에서는 검출되지 않았다. FAdV와 ARV 혼합 접종군인 A01R01군에서는 접종 후 3일째에는 검출되지 않았으나 접종 후 7일째의 간 5수 중 1수, 맹장편도 5수 중 4수에서 FAdV 유전자가 검출되었다. 또 다른 혼합접종군인 A01R14군에서는 접종 후 6, 8일째에 폐사한 개체의 간, 맹장편도에서 모두 검출 되었고, 10

Table 4. Comparison of ARV detection rate using RT-PCR in the liver and cecal tonsil of SPF chickens among groups inoculated either at 1 day old or 14 days old of age

Group	Tissue	RT-PCR positive ratio at days post inoculation					
		3	7	14	14+3*	14+7	14+14
R01	Liver	3/5**	0/5	0/4	NT***	NT	NT
	CT****	3/5	0/5	0/4	NT	NT	NT
R14	Liver	NT	NT	NT	0/5	0/5	0/5
	CT	NT	NT	NT	0/5	0/5	0/5
A01	Liver	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	CT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
A01R01	Liver	0/5	0/5	0/5	NT	NT	NT
	CT	0/5	0/5	0/5	NT	NT	NT
A01R14	Liver	NT	NT	NT	0/4	0/3	0/3
	CT	NT	NT	NT	0/4	0/3	0/3
CONT	Liver	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2
	CT	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2

*14+3 means the samples were collected at 3 days post inoculation in the SPF chickens inoculated with designed viruses at 14 days old of age, **Number of the positive/number of the total tested, ***NT: not tested, ****CT: cecal tonsil.

Table 5. Comparison of FAdV detection rate using RT-PCR in the liver and cecal tonsil of SPF chickens among groups challenged at 1 day old of age

Group	Tissue	RT-PCR positive ratio at days post inoculation					
		3	7	14	14+3*	14+7	14+14
R01	Liver	NT**	NT	NT	NT	NT	NT
	CT***	NT	NT	NT	NT	NT	NT
R14	Liver	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	CT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
A01	Liver	1/5****	5/5	0/3	NT	NT	NT
	CT	0/5	5/5	0/3	NT	NT	NT
A01R01	Liver	0/5	1/5	0/5	NT	NT	NT
	CT	0/5	4/5	0/5	NT	NT	NT
A01R14	Liver	NT	NT	NT	0/4	0/3	0/3
	CT	NT	NT	NT	0/4	0/3	0/3
CONT	Liver	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2
	CT	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2

*14+3 means the samples were collected at 3 days post inoculation in the SPF chickens inoculated with designed viruses at 14 days old of age, **NT: not tested, ***CT: cecal tonsil, ****Number of the positive/number of the total tested.

일째 폐사한 개체 1수에서는 간에서만 검출되었다. 대조군에서 주기적으로 채취한 간과 맹장편도에서는 FAdV 유전자가 검출되지 않았다(Table 5).

병리조직 검사 소견

실험기간 동안 대조군을 포함한 접종군에서 채취한 간, 선위, 십이지장, 췌장, 공장, 회장, Fabricius낭, 흉선에 대하여 조직병리학적 병변을 평가해본 결과 간을 제외한 장기에서는 특이적인 병변이 관찰되지 않았다. 간에서 관찰된 주요 병변은 림프구의 침윤과 간세포의 괴사 소견이었다. FAdV 접종군(A01, A01R01, A01R14)의 조직학적 병변이 ARV만을 접종한 군보다 심하였으며 주로 접종 7일 이후부터 높은 병변지수를 기록하였다. 대조군인 CONT군에서는 조직학적으로 어떠한 병변도 관찰되지 않았다(Table 6).

혈청화학적 검사 소견

혈청 AST 수치는 FAdV 단독 접종군인 A01군과 혼합 접종군인 A01R01군에서만 접종 후 3, 7일에 비접종

대조군인 CONT군과 비교했을 때 유의성 있게 증가하였다. 그 이외의 ARV 혹은 FAdV 접종군에서는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Table 7).

하지만 혈청 CPK 수치는 ARV 혹은 FAdV 접종군 모두 대조군과 비교하였을 때 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Table 8).

고 찰

이 연구는 국내 분리 ARV와 FAdV 두 병원체를 이용하여 SPF 닭에 접종 시 병원성에 대한 상승효과 여부를 확인하기 위하여 수행하였다. 과거부터 ARV 단독 감염 시 ARV의 특징적 임상증상 중 하나인 MAS에 의한 증체 불량에 항상 나타나는 것은 아니었다. 다행히 증체 불량이 재현된 연구(Vertommen 등, 1980a; Montgomery 등, 1986; Rekik 등, 1991; Songserm 등, 2000; Songserm 등, 2002)도 있었지만 대부분의 연구에서는 증체 불량이 재현되지 않았다(Decaesstecker 등, 1986; Kouwenhoven 등, 1988; Songserm 등, 2003). 이처럼 MAS의 재현성에 문제가 있어 다양한 연구가

Table 6. Comparison of histopathologic changes of lymphocytic infiltration with necrosis in the liver among groups

Group	Histological lesion score at days post inoculation					
	3	7	14	14+3*	14+7	14+14
R01	1.6 (0.55) **	1.5 (0.58)	2.0 (0.00)	NT***	NT	NT
R14	NT	NT	NT	1.8 (0.45)	1.6 (0.55)	1.6 (0.55)
A01	1.2 (0.45)	2.4 (0.89)	3.0 (0.00)	NT	NT	NT
A01R01	1.4 (0.55)	3.0 (0.71)	1.8 (0.50)	NT	NT	NT
A01R14	NT	NT	NT	2.3 (0.96)	2.7 (0.58)	2.3 (0.58)
CONT	1.0 (0.00)	1.0 (0.00)	1.0 (0.00)	1.0 (0.00)	1.0 (0.00)	1.0 (0.00)

*14+3 means the samples were collected at 3 days post inoculation in the SPF chickens inoculated with designed viruses at 14 days old of age,

Mean histological lesion score (SD). The lesion score was classified as follows: 1 Normal, 2 Focal, 3 Multifocal, 4 Diffuse, *NT: not tested.

Table 7. Comparison of serum AST level of SPF chickens among groups

Group	AST level (U/L) at days post inoculation					
	3	7	14	14+3*	14+7	14+14
R01	500.8 (133.27)**	252.8 (58.56)	216.3 (17.63)	NT***	NT	NT
R14	NT	NT	NT	288.6 (104.16)	268.2 (38.93)	238.4 (41.53)
A01	803.4 (428.74)	984.2 (378.34)	264.0 (39.04)	NT	NT	NT
A01R01	1,036.8 (473.34)	307.4 (76.58)	235.0 (25.27)	NT	NT	NT
A01R14	NT	NT	NT	272.0 (75.54)	238.3 (25.38)	261.0 (47.84)
CONT	613.5 (118.09)	265.3 (107.10)	240.7 (27.93)	307.7 (22.72)	268.0 (53.36)	231.0 (49.50)

*14+3 means the samples were collected at 3 days post inoculation in the SPF chickens inoculated with designed viruses at 14 days old of age,

Mean (SD) in a column with no common lowercase superscript differ significantly ($P < 0.05$), *NT: not tested.

Table 8. Comparison of serum CPK level of SPF chickens among groups

Group	CPK level (U/L) at days post inoculation					
	3	7	14	14+3*	14+7	14+14
R01	2,378.0 (850.34)**	2,397.8 (1,140.76)	3,155.4 (6.34)	NT***	NT	NT
R14	NT	NT	NT	2,938.2 (618.51)	3,613.2 (406.63)	3,036.4 (1,470.80)
A01	3,952.2 (2,015.50)	2,160.8 (824.17)	3,704.7 (938.35)	NT	NT	NT
A01R01	2,540.4 (1,078.48)	1,777.8 (328.68)	3,387.8 (1,201.50)	NT	NT	NT
A01R14	NT	NT	NT	2,389.0 (569.34)	3,631.0 (461.01)	2,928.7 (596.42)
CONT	5,575.5 (3,754.03)	2,664.3 (1,117.67)	3,447.7 (632.46)	2,538.7 (423.91)	4,561.7 (1,363.55)	3,099.5 (195.87)

*14+3 means the samples were collected at 3 days post inoculation in the SPF chickens inoculated with designed viruses at 14 days old of age,

Mean (SD) in a column with no common lowercase superscript differ significantly ($P < 0.05$), *NT: not tested.

진행되어 ARV의 감염에 의한 증체 불량은 한가지 원인체로 이루어지는 것이 아니고 다양한 병원체 혹은 요소가 필요하다는 것으로 보고되었지만, 아직도 명확하게 밝혀진 것은 아니다(Decaesstecker 등, 1986; Goodwin 등, 1993; Songserm 등, 2000; Songserm 등, 2002; Songserm 등, 2003). 따라서 이 연구에서는 SPF 닭을 이용하여 최근 국내에서 비슷한 일령에 발생보고가 되고 있는 ARV와 FAdV를 단독 혹은 혼합 접종을 통하여 증체 불량을 재현해 보고자 하였다. 이 실험에서 SPF 닭을 사용한 이유는 만약 일반 실용계를 사용하면 장내에 이미 다른 병원체들이 있거나 바이러스에 대한 모체이행 항체가 있을 수 있기 때문이었다(Montgomery 등, 1986; Rekik 등, 1991; Songserm 등, 2003).

이 연구에서는 ARV 단독 접종군(R01, R14)에 의한 폐사는 관찰되지 않았다. 과거의 연구에서도 본 연구와 같이 MAS 증상을 보이는 닭에서 분리한 ARV를 단독으로 경구감염시켰을 때 폐사가 항상 관찰되는 것은 아니었다(Vertommen 등, 1980b; Montgomery 등, 1986; Kouwenhoven 등, 1988; Rekik 등, 1991; Ni와 Kemp, 1995; Songserm 등, 2000). 그 이유는 ARV는 접종한 바이러스의 종류, 접종 경로, 접종 일령 등에 따라서 병원성이 다르게 발현한다고 알려져 있기 때문이다. ARV 바이러스 종류에 따른 차이는 일반적으로 viral arthritis/tenosynovitis와 같은 임상증상을 발현한 개체에서 분리한 ARV가 MAS를 발현한 닭으로부터 분리한 ARV보다 병원성이 강하다고 알려져 있다(Gouvea와 Schnitzer, 1982; Rekik 등, 1991). 또한, 접종 경로에 따른 병원성을 비교한 연구(Gouvea와 Schnitzer, 1982; Montgomery 등, 1986; Ni와 Kemp, 1995)에서는 ARV의 경우 여러 감염경로 중 경구 감염으로 접종하였을 때 가장 병원성이 약한 것으로 보고되었다. 경구감염에서 병원성이 낮

은 이유는 여러 가능성이 있다. 첫째는 경구 감염이 다른 경로의 감염보다 바이러스의 전파와 증폭 능력이 떨어지기 때문이다(Ni와 Kemp, 1995). 둘째는 경구 감염의 경우 ARV는 장관 내 효소들에 감수성이 있기 때문에 다양한 효소나 체내의 면역체계에 의하여 병원성이 약해질 수 있다(Gouvea와 Schnitzer, 1982). 따라서 본 연구에서 ARV 단독 감염군에서 폐사가 발생하지 않은 이유는 본 연구에서 사용된 MAS 분리 ARV의 약한 병원성과 접종 경로가 경구 감염이기 때문으로 판단된다.

이 연구의 모든 접종군에서 설사, 깃털 발육 불량, 증체율 감소 등의 MAS 특이적 증상은 관찰할 수 없었다. 아직 MAS 발현에 관련되는 복합적 원인에 대하여 충분히 밝혀 지지 않았지만, 일부 연구에서 ARV가 MAS 발현에 trigger 역할을 한다는 사실이 보고된 바 있다(Kouwenhoven 등, 1988; Songserm 등, 2002). 따라서 이번 연구에서는 MAS 재현이 이루어지지 않았지만, 국내에서 분리되는 ARV 및 FAdV를 포함하여 로타바이러스, 아스트로바이러스 등 다양한 원인체에 의한 MAS의 발현에 대해서는 향후 연구가 필요할 것으로 판단된다.

FAdV를 단독 혹은 ARV와 혼합 접종한 접종군(A01, A01R14)에서는 각각 접종 15수 중 5수씩 폐사가 발생하였다. 폐사가 발생하는 동안 무작위 추출이 없었던 A01R14 접종군의 경우, 1일령 SPF 닭에서의 폐사율은 약 33%로 확인되었다. 일반적으로 HPS 유래 FAdV로 연구를 할때 접종 일령에 따라 혹은 접종 바이러스의 종류에 따라 다양한 폐사율이 보고된 바 있다. Nakamura 등(1999)은 1일령 닭에 FAdV 병원성 실험에서 100% 폐사를 보고한 바 있어 본 연구의 33% 폐사율과는 차이가 있지만 FAdV 단독감염으로 1일령에서 폐사를 일으킨다는 점에서는 동일한 결과가 확인되었다. 그러나 HPS 유래 FAdV는 자연 감염에서는 주로 3~5주령의 육계에서 질병을 일으키기 때문에 일반적으로 1

일령 SPF chicken에서의 병원성 실험보다는 보통 2주령 이상에서의 병원성 실험이 주를 이루었기 때문에 1일령에서의 폐사율 비교가 제한적이었다.

국내 분리 ARV와 FAdV의 병원성 관련 상호작용을 확인하기 위하여 접종한 바이러스의 배출 혹은 체내장기에서의 존재 여부를 특이 primer를 이용하여 검색한 후 검출률을 비교하였다. ARV 접종군 4개 중 (R01, R14, A01R01, A01R14) R01 접종군에서만 접종 후 3일에 간과 맹장편도에서 유전자가 검출되었다. 기존 연구 결과를 보면 빠르게는 접종 후 1일부터 길게는 접종 후 15일까지 바이러스가 확인된 바 있다 (Kouwenhoven 등, 1988; Rekik 등, 1991; Ni와 Kemp, 1995; Lenz 등, 1998; Songserm 등, 2003). 이 연구들에서 ARV가 확인된 대부분의 장기는 소화기관이었지만, 특이적으로 Fabricius낭(Ni와 Kemp, 1995; Songserm 등, 2003)에서도 ARV가 확인된 바 있다. 그 이유는 ARV를 경구감염 시킴으로써 Fabricius낭과 장관계에서 바이러스의 초기 증식이 일어나기 때문으로 생각된다. 이후 전신감염이 되면 간 및 비장에서 ARV가 확인된다(Ni와 Kemp, 1995). 이 연구에서 R01 접종군에서 접종 후 3일에 ARV 유전자가 간에서 검출된 것은 전신감염이 이루어진 것으로 판단된다. 그러나 이후 지속적인 검출이 되지 않은 것은 숙주의 면역시스템에 의하여 viremia가 지속하지 못하였기 때문이다. 물론 접종한 ARV의 접종량이 적을 수도 있지만, 기존 연구에서의 접종량과 비교할 때 적은 수준은 아니므로 접종 바이러스의 병원성, 접종일령 등 다른 이유가 있을 것을 추정된다. 특히 A01R14 접종군의 경우 접종 후에 간과 맹장편도에서 유전자가 검출되지 않은 것과 FAdV와 혼합 접종한 군에서도 전혀 ARV 유전자가 검출이 되지 않은 것은 접종일령과 바이러스 간의 간섭현상으로 판단된다.

반면에 FAdV 접종군에서는 1일령에 접종한 군 (A01, A01R01)에서는 모두 FAdV 유전자가 검출되었다. 대부분 접종 후 7일에서 FAdV 유전자가 검출되었으며, 폐사체의 경우는 접종 후 10일까지 검출되었다. 기존 연구 결과 중에도 본 연구의 결과와 유사하게 접종 후 7일에서만 FAdV가 확인되었다(Songserm 등, 2000). 이런 현상이 나타나는 이유는 HPS 유래 FAdV가 임상증상을 일으키기 시작한 시기부터 폐사가 일어나는 시기 사이에 바이러스의 재분리가 용이하기 때문이며 또한, 이 시기에 유전자가 검색되는 것으로 판단된다. 흥미있는 결과는 A01R01 접종군에서는 임

상증상 및 폐사가 발견되지 않았지만 접종 후 7일에 FAdV 유전자가 간과 맹장편도에서 모두 검출되었다는 점이다. 그러나 A01R01 혼합접종군의 간에서의 FAdV 유전자 검출률 20%는 A01 접종군에서의 유전자 검출률 100%와 비교할 때 현저히 낮았다. 이러한 결과로 우리는 두 가지 가정을 세워 볼 수 있었다. 첫째는 접종 후 7일에 유전자가 검출된 점은 FAdV에 의한 폐사는 FAdV가 전신적인 순환에 의해서 간까지 도달해야 한다는 것이며, 둘째는 ARV와 FAdV의 초기 증식장소가 장관계통으로 서로 유사함으로써 두 바이러스 간에 간섭현상을 일으켜 A01R01 접종군의 간에서 FAdV 유전자 검출률이 감소한다는 것이다.

간에서의 집중적인 FAdV 유전자 검출은 조직병리학적 검사결과와도 일치되는 현상이었다. 간을 비롯하여 총 8개의 장기에 대하여 조직병리학적 검사를 하였지만, 간을 제외한 장기에서는 특이적인 조직학적 병변이 관찰되지 않았다. 간의 조직병리학적 병변은 비접종군인 대조군(CONT)을 제외하고 모든 접종군에서 관찰되었다. 병변의 정도는 FAdV가 포함된 접종군(A01, A01R01, A01R14)이 ARV 단독접종군(R01, R14)에 비해서 더 심한 것으로 관찰되었다. 또한, 병변도의 변화도 접종 후 3일보다 그 이후에 더 높은 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 FAdV 접종군에서 접종 후 7일부터 폐사율, 유전자 검출률 등이 확인되는 결과와 밀접한 관련이 있다고 생각된다. 그러나 본 연구에서는 기존의 연구에서 보고된 핵내봉입체를 관찰하지 못함으로써 폐사율이 다소 낮은 33%였던 것처럼 병원성이 낮은 것이 원인인 것으로 판단된다(Kim 등, 2008). 또한, 이번 연구의 폐사율 및 유전자 검출률 등에서 확인된 결과와 마찬가지로 ARV 접종군에서는 조직병리학적 소견이 관찰되지 않았다. 그러나 기존의 연구에서는 ARV에 의해서 다양한 조직병리학적인 병변이 관찰되었다(Smart 등, 1988; Rekik 등, 1991; McNeilly 등, 1995; Ni와 Kemp, 1995; Montgomery 등, 1997; Lenz 등, 1998; Songserm 등, 2000; Songserm 등, 2003). 이 연구에서 ARV에 의한 조직병리학적 병변이 거의 관찰되지 않은 이유는 역시 이 연구에서 사용한 ARV의 병원성이 약한 것과 접종 경로로 인한 것으로 생각한다.

조직병리학적 검사 결과에 기초하여 간 손상 정도를 평가하기 위해서 혈청 AST, CPK 수치를 측정하였다. AST 수치는 A01 접종군의 접종 후 7일에 대조군과 비교하여 유의성 있게 증가한 결과를 얻을 수 있었다. 그

러나 혈청 내 CPK 수치는 모든 접종군에서 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 우리는 혈청화학적 검사에서 유의성 있는 결과를 얻을 수 없었지만, 최소한 A01 접종군의 접종 후 7일에 증가한 AST 수치가 근육 손상과는 관계가 없으며 간 손상과 관계된 것이라고 해석할 수 있었다. 향후 병원성이 높은 ARV 혹은 FAdV를 접종한다면 이 AST 및 CPK 수치도 통계학적으로 유의성 있게 변할 것으로 판단된다.

이 연구에서 우리는 ARV와 FAdV 두 병원체를 사용하여 병원성의 상승과 MAS를 재현해 보고자 하였다. 그러나 ARV 접종에 의한 임상증상, 유전자 검출, 조직병리학적 검사에서 충분한 결과를 얻지는 못했으나 FAdV 접종군에서는 병원성을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 아쉬웠던 점은 ARV의 병원성이 충분히 강하지 못했던 점이다. 그러나 MAS를 발현하는 닭 가검물에 있어서 ARV는 거의 항상 분리되고 있으며, 기존의 연구결과에서 중요한 원인체 중 하나라는 사실은 확실하므로 향후 ARV를 중심으로 다른 병원체 혹은 요소들을 복합적으로 연계하여 MAS 관련 연구를 지속해야 할 것으로 생각한다.

결 론

국내 육계와 산란계에서 분리한 ARV와 FAdV를 통한 SPF 닭에서의 단독 혹은 혼합감염에 의한 MAS 병원성 재현 연구를 위하여 체중측정 및 임상증상, 바이러스 유전자 검출, 조직병리학적, 혈액화학적 검사를 하였다. 임상증상은 ARV 접종보다는 FAdV 단독 혹은 ARV와의 혼합접종 시 더욱 강하게 나타났으며 폐사율 또한 높았다. 바이러스 검출은 복합감염보다 단독감염에서의 유전자 검출 확률이 높았으며 조직병리학적 병변은 대조군보다 복합감염군에서 높은 병변지수를 나타냈다. 향후 다양한 장관계통 관련 바이러스와 ARV의 병원성 관련 관계를 규명하기 위하여 다양한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참 고 문 헌

- Abdul-Aziz TA, al-Attar MA. 1991. New syndrome in Iraqi chicks. *Vet Rec* 129(12): 272.
- Abe T, Nakamura K, Tojo H, Mase M, Shibahara T, Yamaguchi S, Yuasa N. 1998. Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of hydropericardium syndrome in adult broiler breeders and broiler chicks. *Avian Dis* 42(3): 606-612.
- Ahmad I, Afzal M, Malik MI, Hussain Z, Hanif W. 1989. Disease pattern and etiology of hydropericardium syndrome (Angara disease) in broiler chickens in Pakistan. *Pak J Agric Res* 10(2): 195-199.
- Decaesstecker M, Charlier G, Meulemans G. 1986. Significance of paroviruses, entero-like viruses and reoviruses in the aetiology of the chicken malabsorption syndrome. *Avian Pathol* 15(4): 769-782.
- Decaesstecker M, Charlier G, Meulemans G. 1988. Epidemiological study of enteric viruses in broiler chickens: Comparison of tissue culture and direct electron microscopy. *Avian Pathol* 17(2): 477-486.
- Dobson KN, Glisson JR. 1992. Economic impact of a documented case of reovirus infection in broiler breeders. *Avian Dis* 36(3): 788-791.
- Goodwin MA, Davis JF, McNulty MS, Brown J, Player EC. 1993. Enteritis (so-called runting stunting syndrome) in Georgia broiler chicks. *Avian Dis* 37(2): 451-458.
- Gouvea V, Schnitzer TJ. 1982. Pathogenicity of avian reoviruses: examination of six isolates and a vaccine strain. *Infect Immun* 38(2): 731-738.
- Hess M, Raue R, Prusas C. 1999. Epidemiological studies on fowl adenoviruses isolated from cases of infectious hydropericardium. *Avian Pathol* 28(5): 433-439.
- Jones RC. 1975. Reoviruses from chickens with hydropericardium. *Vet Rec* 99(23): 458.
- Khawaraja DA, Ahmad S, Rauf AM, Zulfiqar M, Mahmood SM, Hassan M. 1988. Isolation of an adenovirus from hydropericardium syndrome in broiler chicks. *Pak J Vet Res* 1: 2-17.
- Kim JN, Byun SH, Kim MJ, Kim J, Sung HW, Mo IP. 2008. Outbreaks of hydropericardium syndrome and molecular characterization of Korean fowl adenovirus isolates. *Avian Dis* 52(3): 526-530.
- Kouwenhoven B, Vertommen M, Goren E. 1988. Investigations into the role of reovirus in the malabsorption syndrome. *Avian Pathol* 17(4): 879-892.
- Lenz SD, Hoerr FJ, Ellis AC, Toivio-Kinnucan MA, Yu M. 1998. Gastrointestinal pathogenicity of adenoviruses and reoviruses isolated from broiler chickens in Alabama. *J VeT Diagn Invest* 10(2): 145-151.
- Mandelli G, Rampin T, Finazzi, 1978. Experimental reovirus hepatitis in new born chicks. *Vet Pathol* 15: 531-543.
- Mazaheri A, Prusas C, Voss M, Hess M. 1998. Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hep-

- atitis and hydropericardium syndrome in chickens. *Avian Pathol* 27(3): 269-276.
- McFerran JB, McCracken RM, Connor TJ, Evans RT. 1976. Isolation of viruses from clinical outbreaks of inclusion body hepatitis. *Avian Pathol* 5(4): 315-324.
- McNeilly F, Smyth JA, Adair BM, McNulty MS. 1995. Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian Dis* 39(3): 532-537.
- McNulty MS, Allan GM, Connor TJ, McFerran JB, McCracken RM. 1984. An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. *Avian Pathol* 13(3): 429-439.
- Montgomery RD, Boyle CR, Maslin WR, Magee DL. 1997. Attempts to reproduce a runting/stunting-type syndrome using infectious agents isolated from affected Mississippi broilers. *Avian Dis* 41(1): 80-92.
- Montgomery RD, Villegas P, Kleven SH. 1986. Role of route of exposure, age, sex, and type of chicken on the pathogenicity of avian reovirus strain 81-176. *Avian Dis* 30(3): 460-467.
- Nakamura K, Mase M, Yamaguchi S, Shibahara T, Yuasa N. 1999. Pathology study of specific-pathogen-free chicks and hens inoculated with adenovirus isolated from hydropericardium syndrome. *Avian Dis* 43(3): 414-423.
- Ni Y, Kemp MC. 1995. A comparative study of avian reovirus pathogenicity: virus spread and replication and induction of lesion. *Avian Dis* 39(3): 554-566.
- Rekik MR, Silim A, Bernier G. 1991. Serological and pathogenic characterization of avian reoviruses isolated in Quebec. *Avian Pathol* 20(4): 607-617.
- Shirai J, Obata H, Nakamura K, Furuta K, Hihara H, Kawamura H. 1990. Experimental infection in specific-pathogen-free chicks with avian reovirus and avian nephritis showing runting syndrome. *Avian Dis* 34(2): 295-303.
- Simmons DG, Lukert PD. 1972. Isolation, identification, and characterization of an avian respiratory reovirus. *Bull Ga Acad Sci* 30: 1-10.
- Smart IJ, Barr DA, Reece RL, Forsyth WM, Ewing I. 1988. Experimental reproduction of the runting-stunting syndrome of broiler chickens. *Avian Pathol* 17(3): 617-627.
- 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(3): 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 and chickens and broilers. *Vet Res* 34(3): 285-295.
- Songserm T, Zekarias B, van Roozelaar DJ, Kok RS, Pol JM, Pijpers AA, ter Huurne AA. 2002. Experimental reproduction of malabsorption syndrome with different combination of reovirus, *Escherichia coli*, and treated homogenates obtained from broilers. *Avian Dis* 46(1): 87-94.
- Spandidos DA, Graham AF. 1976. Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J Virol* 19(3): 968-976.
- Swati D, Ravinder SN, Hess M, Baldev RG. 2002. Fowl adenovirus serotype 4 associated with outbreaks of infectious hydropericardium in Haryana, India. *Avian Dis* 46(1): 230-233.
- Tang KN, Fletcher OJ, Villegas P. 1987. Comparative study of the pathogenicity of avian reoviruses. *Avian Dis* 31(3): 577-583.
- Toro H, Prusas C, Raue R, Cerda L, Geisse C, González C, Hess M. 1999. Characterization of fowl adenoviruses from outbreaks of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in Chile. *Avian Dis* 43(2): 262-270.
- Van Der Heide L. 1977. Viral arthritis/tenosynovitis: a review. *Avian Pathol* 6(4): 271-284.
- Vertommen M, Van Der Laan A, Veenendaal-Hesselman HM. 1980a. Infectious stunting and leg weakness in broilers II. Studies on alkaline phosphatase isoenzymes in blood plasma. *Avian Pathol* 9(2): 143-153.
- Vertommen M, van Eck JH, Kouwenhoven B, Van Kol N. 1980b. Infectious stunting and leg weakness in broilers: I. Pathology and biochemical changes in blood plasma. *Avian Pathol* 9(2): 133-142.