

< Original Article >

전북지역 오리 써코바이러스 감염률 및 유전자 분석

정한솔* · 백귀정 · 고원석 · 이정원

전라북도축산위생연구소

Prevalence of infection and genetic analysis of duck circovirus in Jeonbuk province

Han-Sol Jeong*, Kui-Jeong Baek, Won-Seok Koh, Jeong-Won Lee

Jeollabuk-do Institute of Livestock & Veterinary Research, Jangsu 54968, Korea

(Received 24 February 2016; revised 15 March 2016; accepted 21 March 2016)

Abstract

Duck circovirus (DuCV) has been recognized as a contagious immunosuppressive virus affecting many duck species worldwide. To determine the prevalence of DuCV infection in ducks, we investigated 104 samples collected from 50 duck farms in Jeonbuk province with the polymerase chain reaction (PCR). Among collected samples, 40 (38.5%) were positive for DuCV. The prevalence of DuCV PCR-positive samples increased with age. Genomic sequences of 15 DuCV strains were determined and compared with previously available DuCV sequences in public databases. Phylogenetic analysis revealed that all strains were clustered into DuCV-1 group.

Key words : Duck circovirus, Duck, Prevalence, PCR, Phylogenetic analysis

서 론

Duck circovirus (DuCV)는 *Circoviridae* 과의 *Circovirus* 속으로 single-stranded, non-enveloped DNA virus이다. DuCV는 대략 1.99 kb의 작은 바이러스로 3개의 open reading frames (ORF)인 ORF1, ORF2, ORF3로 구성되어 있다. ORF1 (*rep* gene)은 viral strand에 위치하여 바이러스 복제에 관여하는 단백질을 암호화하고 ORF2 (*cap* gene)은 반대편 방향에 위치하며 숙주 면역반응에 관여하는 병원인자와 바이러스 구조단백질인 capsid protein을 암호화한다. ORF3는 자가사멸 활동에 관여하는 단백질을 암호화하며, ORF1의 대응 가닥에 위치하고 있다(Hattermann 등, 2003; Liu 등, 2010; Xiang 등, 2012). 이 바이러스는 capsid gene과 genomic sequences를 토대로 DuCV-1, DuCV-2인 2그룹의 genotype으로 나누어진다(Wang 등, 2011; Zhang 등, 2013).

*Corresponding author: Han-Sol Jeong, Tel. +82-63-290-5383, Fax. +82-63-290-5412, E-mail. hansol1205@korea.kr

DuCV는 2003년 독일에서 몸통과 날개 부분의 털이 소실되고 저체중을 보이는 6주령의 2마리 mulard duck에서 처음 분리되었다(Hattermann 등, 2003). 그 후 헝가리, 타이완, 미국, 중국 등에서 muscovy, mule, pekin duck에서 발생보고가 있었으며, 우리나라는 2013년에 DuCV의 발생이 보고되었다(Fringuelli 등, 2005; Chen 등, 2006; Banda 등, 2007; Zhang 등, 2009; Cha 등, 2013). DuCV 감염증은 깃털 손상과 원기소실, 체중감량 등을 특징으로 하며 림프구의 결손 등에 영향을 주어 숙주의 면역 억제에 관여하고, 그에 따른 세균이나 바이러스 등에 관련된 질병과 혼합감염에 의하여 질병의 정도를 심화시킨다고 보고되고 있다(Soike 등, 2004; Xiang 등, 2012). 이러한 면역 억제성의 특성은 DuCV에 감염된 증상을 보이지 않는 오리에서도 다른 질병의 감염에 좀 더 감수성이 있는 것으로 밝혀져 있으며, 이는 오리 산업의 생산성을 저하시켜 경제적 피해를 줄 수 있다.

2003년 DuCV의 첫 보고 이후 국외에서 연구가 활

발히 진행되고 있지만, 국내의 연구는 부족한 실정이다. 이 연구에서는 전북 지역 오리 농가의 DuCV 감염실태를 파악하고 분리된 DuCV의 유전자 염기 서열을 분석하여, 분리주를 국내의 다른 사례 및 외국의 사례와 비교 분석하여 유전적 상동성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료

2015년 전라북도 지역의 가금질병모니터링검사로 의뢰된 15농가 69건 및 병성감정 의뢰 35농가 35건, 총 50농가 104건의 시료를 채취하여 시험에 공하였다. 검사 시료는 오리의 간, 맹편 장기를 대상으로 하였으며 가금질병모니터링검사의 시료는 각각 다른 일자에 채취하여 시험을 실시하였다.

PCR 검사

DuCV *rep* gene의 증폭에 사용한 primer는 forward primer (5'-CGGCGCTTGACTCCGTACTION-3')와 reverse primer (5'-CCC GCGTGGTTTGTAATACTTG-3')로 Fu 등(2008)과 동일하게 합성하여 PCR을 다음과 같이 수행하였다. 시료는 오리의 간, 맹편 장기를 멸균 PBS를 사용하여 균질화한 후, viral gene spin viral DNA/RNA extraction kit (iNtRON)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 그 후 nucleotides 3 μ L와 각 primer 1 μ L를 PCR premix (Maxime PCR Premix, iNtRON)에 첨가하여 초기 denaturation 94°C에서 5분 후, 94°C에서 45초, 57°C에서 45초, 72°C에서 60초의 사이클을 35회 반복한 후, 72°C에서 6분 더 반응시켰다. PCR을 수행한 후 ethidium bromide (0.5 μ g/mL)가 함유된 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 자외선을 조사하여 620 bp 특이 band의 증폭 유무를 확인하였다.

염기서열 분석

염기서열 분석은 *rep* gene에서 증폭된 620 bp의 PCR 생성물을 정제한 후 cosmo genetech DNA sequencing service (Cosmo, Korea)를 이용하여 양방향으로 분석하였다. 분석한 유전자 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 네트워크

서버의 BLAST 검색을 이용하여 유사성 행렬을 구하였다. 이 연구에서 비교한 DuCV 유전자들은 총 19주로 다음과 같다. LZ01/2011 (KC460528), GX1105 (JX241045), D11-JW-002 (JQ740361), D11-JW-022 (KC851810), D12-KD-001 (KC851817), D12-KD-027 (KC851820), D12-MR-020 (KC851822), DuCV (AY228555), MH25 (EF451157), FJZZ302 (GQ334371), FujianZQ300 (GQ423740), DU092 (HM162346), DU104 (HM162353), TC2/2002 (DQ166836), TC3/2002 (DQ166837), WF0802 (GU131341), FJ0701 (GQ868757), FJFQ312 (GQ423745), FJFQ315 (GQ423744). 염기서열 분석과 동일성은 Multilian과 Clustal W 연산을 이용하여 다중정렬 하였으며, phylogenetic tree는 MEGA version 6을 이용하여 neighbor-joining (NJ) method를 통해 *rep* gene의 정렬을 분석하였다. 진화적 거리 행렬은 P distance method를 이용하였으며 bootstrap values는 1,000회 resampling을 통해 평가하였다.

결 과

PCR 검사 결과

항원검사결과 가금질병모니터링검사로 의뢰된 15농가 중 12농가(80.0%)에서 양성으로 조사되었고, 시료별로는 69건 중 19건(27.5%)에서 양성을 나타냈다. 병성감정으로 의뢰된 35농가의 시료 35건 중 21건(60.0%)에서 양성을 나타내었다. 결과를 종합해 보면 50농가에 대한 검사결과 31농가(62.0%)에서 양성을 나타내었고, 검사시료 104건 중 40건(38.5%)에서 항원이 검출된 것으로 조사되었다(Table 1). 연령이 파악된 94건의 시료에 대한 연령별 감염률을 조사한 결과 3주 미만의 오리에서는 56건 중 17건(30.4%), 3~6주는 25건 중 10건(40.0%), 6주 이상의 농가에서는 13건 중 9건(69.2%)이 양성의 결과를 보였다(Table 2).

Table 1. Duck circovirus positive rates and differences by sources

Sources	No. of positive (%)	
	Farms	Samples
Specimens from disease monitoring project	80.0 (12/15)	27.5 (19/69)
Specimens from disease diagnostic service	60.0 (21/35)	60.0 (21/35)
Total	66.0 (33/50)	38.5 (40/104)

rep gene 염기서열 분석

DuCV *rep* gene의 단편(620 bp)을 이용하여 분리된 양성 시료 중 15주의 DuCV gene에서 염기서열을 분석하였다(Table 3). 염기서열 분석 후 상동성을 비교한 결과 분리주간 97.8~100% 동일성을 나타내었다(Table 4). 또한 JBK1601, JBK1614과 JBB1602, JBB1606과 JBG1609과 JBJ1613는 100%의 상동성을 나타내었다. 특히 JBB1602와 JBB1606은 같은 농가에서 다른 시기에 분리된 시료이다. 본 실험에서 분리된 DuCV *rep* gene 염기서열과 이전에 전북에서 분리된 D12-KD-001 (Cha 등, 2013)의 상동성을 비교한 결과 98.2~99.6%의 상동성을 보였으며 가장 상동성이 높은 주는 JBJ1604로 99.6% 일치율을 보였으며 비교한 부위 중 2개의 부위에서만 서로 다른 염기서열을 보였다.

Table 2. Prevalence of duck circovirus from tissues of ducks by age

Age group (weeks)	No. of samples	No. of positive (%)
1~3	56	17 (30.4)
3~6	25	10 (40.0)
>6	13	9 (69.2)
Unknown	10	4 (40.0)
Total	104	40 (38.5)

Phylogenetic tree 분석

분리된 15주의 DuCV 염기서열에 의한 phylogenetic tree를 분석한 결과 이전에 분리된 한국주 D11-JW-002, D11-JW-022, D12-KD-001, D12-KD-027, D12-MR-020와 중국의 DU104, DU092와 같은 계열에 속하였으며 15주 모두 genotype 1에 속하였다(Fig. 1).

Table 3. Field isolated of DuCV used in samples

DuCV isolate	Regions	Age (weeks)
JBG1601	Gochang	6
JBB1602	Buan	6
JBN1603	Namwon	6
JBJ1604	Jeongeup	17
JBJ1605	Jeongeup	5
JBB1606	Buan	6
JBG1607	Gochang	37
JBJ1608	Jeongeup	6
JBG1609	Gochang	5
JBG1610	Gochang	4
JBN1611	Namwon	2
JBN1612	Namwon	41
JBJ1613	Jeongeup	1
JBG1614	Gochang	5
JBG1615	Gochang	5

Table 4. Homology comparison of genetic sequence in isolated samples

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1															
2	99.1														
3	99.4	98.5													
4	98.3	98.9	98.5												
5	98.5	98.3	98.7	99.4											
6	99.1	100	98.5	98.9	98.3										
7	99.1	98.5	99.6	98.5	98.7	98.5									
8	98.5	98.3	98.7	99.1	99.3	98.3	98.7								
9	98.7	98.5	98.9	99.6	99.8	98.5	98.9	99.4							
10	98	97.8	98.2	98.9	99.1	97.8	98.2	98.7	99.3						
11	99.1	98.5	99.3	98.5	98.7	98.5	99.3	99.1	98.9	98.2					
12	99.3	99.8	98.7	99.1	98.5	99.1	98.7	98.5	98.7	98	98.7				
13	98.7	98.5	98.9	99.6	99.8	98.9	98.9	99.4	100	99.3	98.9	98.7			
14	100	99.1	99.4	98.3	98.5	99.1	99.1	98.5	98.7	98	99.1	99.3	98.7		
15	99.8	98.9	99.3	98.2	98.3	98.9	98.9	98.3	98.5	97.8	98.7	99.1	98.5	99.8	

Percentages of identity between *rep* gene fragment sequences. The following sequences were compared: 1. JBG1601, 2. JBB1602, 3. JBN1603, 4. JBJ1604, 5. JBJ1605, 6. JBB1606, 7. JBG1607, 8. JBJ1608, 9. JBG1609, 10. JBG1610, 11. JBN1611, 12. JBN1612, 13. JBJ1613, 14. JBG1614, 15. JBG1615.

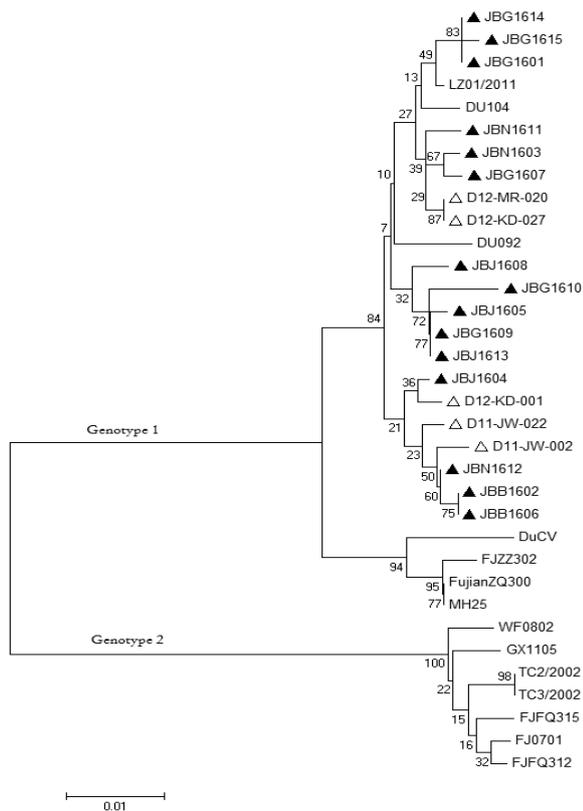


Fig. 1. Phylogenetic tree, based on the nucleotide sequences of *rep* gene, showing the relationship between 15 DuCVs in this study and 19 DuCVs from other regions of Korea and other countries. (▲) Strains determined in this study; (△) the Korea strain.

고 찰

우리나라 육용오리는 65%가 하우스시설에서 사육되고 있으며 깔짚을 1년에 평균 1회 교체하는 등 사육 및 방역 개념이 취약한 실정이며, 이에 따라 오리 농가에 오리장염바이러스감염증, 리메렐라, 대장균증 등에 오염되어 있음을 Jang 등(2013)이 보고하였다. 오리는 썩코바이러스에 단독 감염 되었을 때는 임상 증상 없이 상재하는 경우도 많지만 이차적으로 세균이나 바이러스, 기생충 질병 등이 감염될 기회를 제공하며, 실제로 이 바이러스에 노출된 많은 농가들은 특히 임상증상이 없기에 DuCV의 존재를 인식하지 못하는 경우가 많다.

중국의 여러 지역을 대상으로 DuCV를 조사한 결과 15.28~81.63%의 항원이 검출되었다고 보고되었으며(Jiang 등, 2008; Zhang 등, 2009), 국내에서는 21.8%로 보고되었다(Cha 등, 2014). 본 조사에서도 104건 중 40건에서 항원이 검출되어 38.5%의 양성률을 보였다. 이는 헝가리에 조사된(Fringuelli 등, 2005) 84%

보다 낮은 수치이지만 국내에서도 DuCV가 오리 농가에 상존하는 것을 알 수 있었으며 또한, 연령이 높을수록 감염률이 높아지는 것으로 보아 DuCV가 농장 내에서 순환 감염되거나 외부에서의 유입이 빈번히 이루어짐을 추측 할 수 있었다. 가끔질병모니터링 검사 결과 양성률이 27.5%, 병성감정은 60.0%로 더 높게 나타나는 것으로 관찰되었다(Table 1). 이는 일반적인 오리 사육농가보다 질병에 이환되어 병성감정 의뢰된 농가에서 DuCV 감염이 더 빈번하게 일어났다는 것을 나타낸다. 면역억제를 특징으로 하는 DuCV가 다른 질병의 노출에 관련이 있는지에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료된다. 또한, 양성농가 중에서 새로 입식한 다른 계군의 오리에서도 100% 동일한 염기서열의 바이러스가 분리되었다는 것은 바이러스가 농장에 상존하여 순환감염이 이루어지는 것으로 파악되어 이에 대한 농장내 차단방역의 중요성이 다시 한 번 강조된다.

같은 *Circoviridae* 과에 속하는 Chicken anemia virus (CIA)는 닭에서 심각한 면역저하를 일으키므로 농가에서는 백신 접종을 하는 등 철저한 관리를 하고 있다. 이에 비해 오리에서 면역력에 관련한 질병에 대한 대처방안은 미흡한 실정이다. DuCV는 CIA에 비해 임상증상이 뚜렷하지 않지만, 이 바이러스는 개체간 수평감염 뿐 아니라 난계대에 의한 수직감염이 가능한 질병이라 보고되고 있다(Liu 등, 2010; Li 등, 2014). 앞에서 언급한 것처럼 많은 농가에 상재하여 존재하고 있기 때문에 이 바이러스에 대한 인식 및 위생관리 강화 등의 노력이 요구된다고 하겠다.

현재까지 국외 분리주에 대한 연구 결과에 따르면 독일과 미국에 유행하고 있는 주는 genotype 1에 속해 있으며, 타이완에서 유행하고 있는 주는 genotype 2에 속해있는 것으로 보고되고 있다(Wang 등, 2011). 이번 전북지역에서 분리한 DuCV 15주의 유전자 염기서열을 분석한 결과 모두 genotype 1에 속하는 것으로 조사되어, 기존 연구에서 분리된 한국주와(Cha 등, 2013) 같은 그룹에 속하는 것으로 확인되었다. 이전에 전북에서 분리된 15주와 상동성을 비교한 결과에서도 98.2~99.6%의 높은 상동성을 보여 같은 계열의 바이러스가 유행됨을 확인할 수 있었다. genotype 1과 genotype 2가 고루 분포되어있는 중국과는 다르게(Zhang 등, 2013) 전북지역에서는 DuCV genotype 1에 속하는 유전자형의 바이러스가 전반적으로 분포되어 있는 것으로 조사되었다. 또한, 유전자 염기서열 분석을 통해 전북지역에서 분리된 DuCV가 국내

에서 유행하는 같은 계열의 바이러스임이 입증되어 앞으로 오리의 면역성에 관련한 DuCV의 지속적인 연구와 변이주의 감시가 지속적으로 필요할 것으로 사료된다.

결 론

2015년 전북지역 오리 사육농가의 DuCV 감염률 및 분리된 DuCV에 대한 유전자 염기서열을 분석한 결과 50농가 중 31농가(62.0%)에서 양성으로 조사되었으며, 시료별로는 104건 중 40건(38.5%)에서 항원이 검출되었고, 오리의 연령과 비례하여 DuCV의 검출률이 증가하는 경향을 보였다. 분리된 DuCV 15주의 유전자분석 결과 각각의 유전자 염기서열은 97.8~100%의 높은 동일성을 나타내었으며, 계통도 분석 결과 기존에 한국에서 분리된 주와 같은 genotype 1에 속하는 것으로 확인되었다.

REFERENCES

- Banda A, Galloway-Haskins RI, Sandhu TS, Schat KA. 2007. Genetic analysis of a duck circovirus detected in commercial Pekin ducks in New York. *Avian Dis* 51: 90-95.
- Cha SY, Kang M, Cho GJ, Jang HK. 2013. Genetic analysis of duck circovirus in pekin ducks from South Korea. *Poult Sci* 92: 2886-2891.
- Cha SY, Song ET, Kang M, Wei B, Seo HS, Roh JH, Yoon RH, Moon OK, Jang HK. 2014. Prevalence of duck circovirus infection of subclinical pekin ducks in South Korea. *J Vet Med Sci* 76: 597-599.
- Chen CL, Wang PX, Lee MS, Shien JH, Shieh HK, Ou SJ, Chen CH, Chang PC. 2006. Development of a polymerase chain reaction procedure for detection and differentiation of duck and goose circovirus. *Avian Dis* 50: 92-95.
- Fringuelli E, Scott AN, Beckett A, McKillen J, Smyth JA, Palya V, Glavits R, Ivanics E, Mankertz A, Franciosini MP, Todd D. 2005. Diagnosis of duck circovirus infections by conventional and real-time polymerase chain reaction tests. *Avian Pathol* 34: 495-500.
- Fu GH, Cheng LF, Shi SH, Peng CX, Chen HM, Huang Y. 2008. Genome cloning and sequence analysis of duck circovirus. *Chin J Virol* 24: 138-143.
- Hattermann K, Schmitt C, Soike D, Mankertz A. 2003. Cloning and sequencing of duck circovirus (DuCV). *Arch Virol* 148: 2471-2480.
- Jang HG, Park IJ, Jang SH, Kang M, Yoon RH, Lee JA, Jung JE, Lee JE, Gok J, Pak SY. 2013. Survey and analysis of hygiene and disease trend in domestic duck farm in Korea. National veterinary research and quarantine service, Anyang.
- Jiang S, Zhang X, Liu S, Wang Y, Kong Y, Wei X, Sun Y, Zhao Q. 2008. PCR detection and sequence analysis of duck circovirus in sick Muscovy ducks. *Virol Sin* 23: 265-271.
- Li Z, Wang X, Zhang R, Chen J, Xia L, Lin S, Xie Z, Jiang S. 2014. Evidence of possible vertical transmission of duck circovirus. *Vet Microbiol* 174: 229-232.
- Liu SN, Zhang XX, Zou JF, Xie ZJ, Zhu YL, Zhao Q, Zhou EM, Jiang SJ. 2010. Development of an indirect ELISA for the detection of duck circovirus infection in duck flocks. *Vet Microbiol* 145: 41-46.
- Soike D, Albrecht K, Hattermann K, Schmitt C, Mankertz A. 2004. Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders. *Vet Rec* 154: 792-793.
- Wang D, Xie X, Zhang D, Ma G, Wang X, Zhang D. 2011. Detection of duck circovirus in China: A proposal on genotype classification. *Vet Microbiol* 147: 410-415.
- Xiang QW, Wang X, Xie ZJ, Sun YN, Zhu YL, Wang SJ, Liu HJ, Jiang SJ. 2012. ORF3 of duck circovirus: a novel protein with apoptotic activity. *Vet Microbiol* 159: 251-256.
- Zhang X, Jiang S, Wu J, Zhao Q, Sun Y, Kong Y, Li X, Yao M, Chai T. 2009. An investigation of duck circovirus and co-infection in Cherry Valley ducks in Shandong Province, China. *Vet Microbiol* 133: 252-256.
- Zhang Z, Jia R, Lu Y, Wang M, Zhu D, Chen S, Yin Z, Chen X, Cheng A. 2013. Identification, genotyping, and molecular evolution analysis of duck circovirus. *Gene* 529: 288-295.