

Avian adenovirus 관련 심낭수종-봉입체간염 증후군 진단에 관한 연구

추금숙*, 이정원¹, 송희종²

전라북도 축산위생연구소 익산지소* 및 정읍지소¹, 전북대학교 생체안전성연구소²
(접수 2007. 8. 02, 게재승인 2007. 9. 18.)

Diagnosis of avian adenovirus-associated hydropericardium hepatitis syndrome

Keum-Suk Chu*, Jeoung-Won Lee¹, Hee-Jong Song²

*Iksan-Branch, Jeonbuk Institute of Livestock & Veterinary Research, Iksan, 570-390, Korea
¹Jeongeup-Branch, Jeonbuk Institute of Livestock & Veterinary Research, Jeongeup, 580-814, Korea
²Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
(Received 2 August 2007, accepted in revised form 18 September, 2007)

Abstract

Avian adenoviruses are diverse group of pathogens and recently hydropericardium hepatitis syndrome (HHS) is an important, emerged disease of poultry. Particularly 2-3 weeks old age broilers increased mortality ranging from 20-30% and brown native chicken 3-7 weeks sudden onset with mortality 20-50%, typically development secondary infection. The infection chicken shows liver enlarged, pale and straw-colored fluid is present in the sac surrounding the heart. Histopathological positive samples have necrotic foci and basophilic intranuclear inclusion bodies in the hepatocytes and polymerase chain reaction (PCR) was useful for detect the fowl adenovirus (FAV) associated with HHS.

Key words : Avian adenoviruse, Hydropericardium hepatitis syndrome,
Histopathology, Polymerase chain reaction

* Corresponding author

Phone : +82-63-834-4918, Fax : +82-63-834-4916

E-mail : chuks1103@hanmail.net

서 론

국내 양계산업은 많은 시설투자로 산업 및 규모화가 이루어지면서 사육환경과 방역의식이 높아져 철저한 백신프로그램에 의한 체계적인 관리가 이루어지고 있다. 그러나 사육 규모가 커짐에 따라 질병 발생에 따른 폐사율이 높으며, 단일 감염보다 복합감염의 발생이 증가하고 있고 질병도 다양화 되어 양계농가는 예방접종만으로 질병 발생을 제어하기에 어려움이 있다. 전북지역 양계농가는 2006년 조류인플루엔자 발생으로 인해 질병 발생에 대한 관심이 극대화 되어 있으며 규모가 큰 농가일수록 백신, 소독 등의 방역관리가 철저하게 이루어지고 있다.

그러나 복잡화된 질병의 근본적인 원인은 면역 억제성 질병 발생의 증가로 인한 것으로 사료되며, 면역력 저하 질병 중 infectious bursal disease virus (IBDV)는 여러 종류의 백신 등이 개발되어 예방책이 이루어지고 있으나, 최근 발생되고 있는 아데노바이러스 관련 봉입체간염 (inclusion body hepatitis, IBH), 심낭수종증후군 (hydropericardium syndrome, HPS) 및 닭 전염성 빈혈 (chick anemia virus, CAV)에 예방책에 대한 국내 연구는 미비한 실정이다.

Hydropericardium hepatitis syndrome (HHS)을 유발하는 것으로 알려진 Adenovirus는 family로 *Adenoviridae*이며, genus에 의해 조류에서 adenoviruses와 포유류의 mastadenoviruses로 구분되며, avian adenovirus (AAV) group I의 fowl adenovirus (FAdV), group II 칠면조 haemorrhagic enteritis virus (HEV), group III egg drop syndrome virus (EDS)가 경제적으로 중요시되고 있다. AAV group I은 다형태성으로 envelope가 없는 70-90 nm의 이중구조 DNA 바이러스이다. FAdV는 12종의 혈청형이 있으며, genotype은 A-E로 분류되고, IBH와 HPS 및 카탈성 기관지염, 췌장 괴사와 근위

미란 등을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 산란계에서는 산란율 저하와 난각의 품질 저하, 사료 섭취저하, 증체율 감소 등의 증상이 나타나기도 한다. 혈청형에 따른 병원성은 명확하지 않으나 현재까지 연구 보고에 의하면 FAdV-1은 메추리에서 기관지염, FAdV-4는 HPS의 중요한 원인체이며, 다른 strain은 면역반응을 억제하는 CAV 및 IBD가 조기 감염시 질병발생이 가능한 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾.

FAV의 감염에 의한 IBH는 1963년 미국에서 처음보고⁴⁾ 된 후 여러 나라에서 보고되었으나 AAV와 관련된 임상증상은 1950년 메추리 호흡기질병에서 발생한 것으로 확인되었다. IBH는 주로 3-7주령의 육계에서 갑자기 발생하여 치사율은 10-30%에 이르며 발생 3-4일에 최고를 기록하고 보통 발생 5일경에 감소하나 간혹 2-3주까지 지속되는 경우도 있다. 이병율은 낮으나 감염된 개체는 웅크리고, 우모가 역립하며 48시간 이내에 폐사하거나 회복되며, 병리조직 소견에서 간 및 췌장 등에서 basophilic intranuclear inclusion이 관찰되고, IBDV 감염이 IBH 발생을 촉진하는 것으로 알려져 왔으나 최근 남부 아일랜드 및 뉴질랜드에서는 IBDV의 감염이 없는 SPF 닭에서 IBH가 발생하였으며 CAV와 FAV 감염시 폐사율이 증가하는 것으로 보고^{1,5)} 되었다.

또한 FAV는 HPS와도 관련이 있으며, 1987년 파키스탄 Angara Goth에서 처음 보고되어 Angara disease, Litchi heart disease로 불리우며, 높은 폐사율과 생산성 감소를 유발하여 경제적으로 중요한 질병 분류되었다. 이라크(1991년), 쿠웨이트와 일본(1998년), 러시아(1997년), 남부와 중앙아시아(1996년), 슬로바키아(1991년) 등에서 발생되었고, 미국 및 멕시코에서는 피해가 심각한 IBH 감염이 확인되었다⁶⁾. HPS와 IBH는 폐사율에서 차이가 나며 20-80%의 높은 폐사율을 보이고 이병율은 낮은 것으로 알려져 있다. 아시아 및 미국 등의 보고에 의하면

HPS는 FAdV-4와 연관성을 갖고 있으며 다른 혈청형은 CAV와 같은 면역억제 요소와 관련이 있는 것으로 알려져 있다⁷⁻⁹⁾. 최근 FAdV는 HHS 복합감염 증상을 보이며 국내에서는 1997년 이후부터 육계에서 발생사례가 확인되었으며, 특히 봄과 여름에 증가하는 경향을 보이며 전북도내에서는 2006년부터 토종닭 및 육계에서 발생이 증가하고 있다.

Adenovirus의 진단은 형태학적 특성으로 인한 전자현미경으로 진단과 조직의 haematoxylin eosin (H & E) 염색법으로 핵내 봉입체의 확인 등의 방법이 있으나 바이러스 정제 없이 specific group과 serotype의 결정이 어려워 한 단계 발달된 간접효소면역법 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 형광면역법 (immunofluorescence assay, IFA), 중화시험 (neutralization test), 한천응집법 (agar gel precipitation test, AGPT) 등이 사용되고 있고, 최근에는 핵산을 이용한 연쇄증합반응법 (PCR)과 제한효소법 (restriction enzyme analysis, REA) 등이 사용되어 혈청형에 따른 질병의 발생에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다¹⁰⁻¹⁵⁾.

본 연구에서는 최근 관내에서 발생한 IBH-HPS 복합감염에 대한 검사방법을 확립하고 신속한 질병 진단을 통하여 양축농가 방역지

도의 기초 자료로 활용하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시 재료

전북도내 병성감정 의뢰 농가 중 봉입체간염으로 진단된 양계농가의 샘플을 이용하여 육안적인 병변 관찰, 조직검사 및 PCR을 이용하였다.

의뢰 가검물은 일반적인 부검 술식에 따라 부검을 실시하면서 병변으로 의심되는 조직을 채취하여 냉동 보관하여 PCR 검사에 공시하였고, 조직검사를 위해 병변을 중심으로 절단하여 10% 중성 포르말린에 고정하여 일반적인 방법에 따라 파라핀 포매 후 5 μ m의 두께로 조직절편을 제작하여 H & E으로 염색하고 광학현미경으로 관찰하였다.

PCR 검사

부검 후 실질장기 (간장, 비장, 신장 및 폐)를 균질화시킨 후 5% PBS 부유액을 원심분리하여 상층액을 -70°C에 보존하였고, Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction kit (iNtRON)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

Table 1. List of primers to detect adenoviruses

Primers	Adenovirus genes	Sequences ('5-3')	PCR product (bp)
H1	FAV1 hexon	TGGGACATGGGGGCGACCTA	1219
H2		AAGGGATTGACGTTGTCCA	
H3	FAV1 hexon	AACGTCAACCCCTTCAACCACC	1319
H4		TTGCCTGTGGCGAAAGGCG	
MK89	FAV1 hexon	CCCTCCCACCGCTTACCA	421
MK90		CACGTTGCCCTTATCTTGC	
Fad1	FAV8 IIIa/ penton base	TACGATTACGGGGGCTATGGA	1406
Fad2		TGTTCCGTCCACCCGTAGG	

Primer는 Table 1과 같이 제작하였으며, 추출한 nucleotides 3 μ l와 각 primer 1 μ l (10 pmol)를 PCR premix (Maxime PCR Premix, iNtRON)에 첨가하여 96°C에서 5분, 94°C에 2분, 60°C에 1분 및 72°C에 1분 30초씩 35회 반복 반응시킨 후 최종 72°C에서 2분간 반응시켰다. PCR이 완료되면 반응액 10 μ l와 loading dye 2 μ l를 1.5% agarose gel (ethidium bromide 0.5 μ g/ml in DW)에 100bp DNA marker와 함께 1× TAE buffer가 함유된 전기영동 tank에 gel을 침적시킨 후 100 V/cm, 40분간 (Owl Easy-Cast Minigel system) 전기영동을 실시하여 자외선 하에서 특이 band 증폭 유무를 확인하였다.

결 과

육안병변 소견

복강내 실질장기의 육안적인 병변은 간의 심한 종대, 창백과 충·출혈, 피사반점과 심낭에 젤리양 및 심낭수 저류, 심근의 지방변색, 신장 충·출혈, 선위 종대가 관찰되었다 (Fig 1).

병리조직 검사 결과

병변이 관찰된 조직을 처리하여 관찰한 결과 간세포의 심한 다발성 괴사, 충·출혈 소견과 핵내 바이러스에 의한 봉입체, 심외막 지방조직과 심근섬유 핵의 종대 및 농축과 근형질에 공포화, 신장 출혈과 사구체내 림프구 침윤, 선위 출혈과 림프구의 침윤이 관찰되었다 (Fig 2).

PCR 검사 결과

감염 개체의 실질장기에서 DNA를 추출하여 동일 샘플에 대해 각각의 primer를 이용한 PCR 항원검사 결과 H1/H2는 1219 bp, H3/H4는 1319 bp, Fad1/Fad2는 1406 bp에서 증폭되었으나 MK89/MK90은 증폭이 확인되지 않았고 Fig 3과 4를 보면 동일샘플

에서 H3/H4 primer가 가장 많은 증폭이 이루어짐을 확인하였다.

고 찰

현재까지 연구된 자료에 의하면 FAV의 혈청형에 따른 다양한 병원성이 확인되고, BDV와 CAV의 감염 없이 단일감염이 가능하며 CAV와 복합감염시 많은 피해가 발생하고 있어 백신의 방어효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁶⁻¹⁹. 그러나 국내 FAV의 혈청형에 대한 조사와 혈청검사 방법 및 진단법에 대한 연구가 미비한 실정이다. 품종에 따라 약간의 차이는 있으나 닭에서 FAV에 의한 HHS가 감염되면 3-6주에 갑자기 폐사가 발생되고 폐사율은 2-10%에서 40%까지 나타나고 바이러스 혈청형에 의해 폐사율은 변화 될 수 있으며, IBDV 및 CAV 복합감염시 폐사율은 더욱 증가되는 것으로 조사되고 있다. 또한 폐사율은 감염 3-4일경에 최고를 이루며 감염계가 회복되면 침울하고, 옹크리며 면역력 저하로 인한 2차 세균감염이 발생되기도 한다. 감염 개체의 초기 병변으로 간 종대와 창백, 유약한 간, 심낭에 담황색 젤리형 및 다량의 심낭수가 존재하여 심장을 감싸는 병변이 관찰 된다. 또한, 최근 FAV의 혈청형에 의한 근위미란과 채장출혈에 대한 연구가 이루어지고 있다.

국내에서 닭 adenovirus의 감염 상황은 1979년 이 등²⁰의 보고에 의하면 항체가는 도계장 21.5%, 산란계 13.5%로 나타났으며 도계장에서 분리된 16주 중 serotype 1이 12주, serotype 2가 1주, serotype 4가 2주가 동정되었고 1주는 동정하지 못하였다. 최근 전북도내 HHS 발생 농가는 주로 토종 닭 및 육계농가에서 감염이 확인되었으며 2-3주에 폐사가 급격히 발생하여 20-30%의 폐사율을 보이고, 토종닭에서는 3-7주에 감염되어 20-50%의 높은 폐사율을 보이기도 하나 이는 토종닭의 사육기간이 70-90일 정도로 육계에 비해 길어 2차적인 세균감염으로



Fig 1. Liver enlarged pale (a), with petechial haemorrhage, heart excessive fluid in pericardial sac (b)

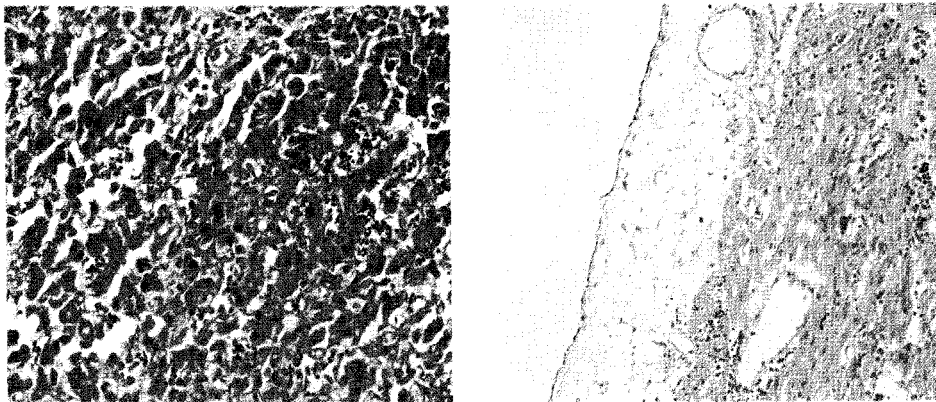


Fig 2. Liver with necrosis and intranuclear inclusion bodies of hepatocyte(a), heart congestion, hemorrhages and degenerative changes in myocardial fiber

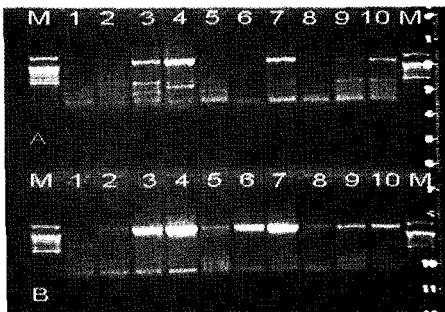


Fig 3. Detection of FAV virus using the primer H1/H2(A), H3/H4 (B)

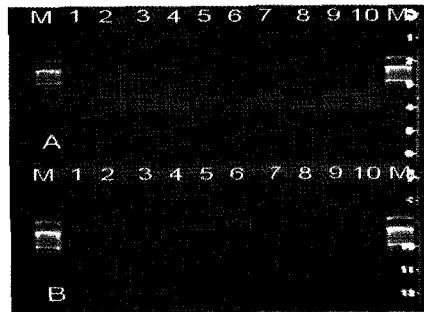


Fig 4. Detection of FAV virus using the primer MK89/MK90(A), Fad1/Fad2(B)

인한 지속적인 폐사로 농가에 커다란 피해를 주고 있는 것으로 사료된다. 이번 연구에서 HHS의 전형적인 육안병변과 조직학적 소견을 관찰 할 수 있었고 PCR을 이용하여 H1/H2, H3/H4, Fad1/Fad2에서 양성인 확인되었으나 H3/H4 primer가 가장 적합함을 알 수 있었으며, 앞으로 PCR를 이용용한 신속한 진단으로 농가의 방역 대책에 일부나마 도움이 되었으면 하는 바램이고, 국내에서도 HHS에 대한 피해 상황, 혈청검사를 통한 감염율 및 종계에서 감염으로 인한 수직감염 및 혈청형에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

결 론

관내 양계농장에서 관찰된 adenovirus 관련 심낭수종-봉입체간염 증후군에 대한 검사 방법을 확립하고 신속한 질병 진단을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

심낭수종-봉입체간염 증후군에 감염된 개체에서 간 종대와 출혈 및 심장에 켈리양 및 다량의 심낭수 저류 등의 전형적인 육안소견이 관찰되었다.

조직학적 검사에서 간내 핵내 봉입체, 심근 섬유 핵의 종대, 농축과 근형질에 공포화, 신장과 선위 출혈과 림프구의 침윤이 관찰되었다.

PCR을 이용하여 H3/H4 primer 1319 bp에서 증폭이 확인되어 HHS를 위한 진단에 사용이 적합함을 확인하였다.

참고문헌

1. McFerran JB, Adair BM. 2003. Group I adenovirus infection. in Diseases of poultry. 11 eds: Adenovirus Infections. Iowa State Press, Ames : 213-227.
2. Hess M. 2000. Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathol* 29(3) : 195-206.
3. Charlton BR, Bickford AA. 1995. Gross

- and histologic lesions of adenovirus group I in guinea fowl. *J Vet Diagn Invest* 7(4) : 552-554.
4. Helmboldt. CF, Frazier MN. 1963. Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance. *Avian Dis* 7(4) : 446-450.
5. Philippe C, Grgic H, Nagy E. 2005. Inclusion body hepatitis in young broiler breeders associated with a serotype 2 adenovirus in Ontario, Canada. *Appl Poult Res* 14(3) : 588-593.
6. Zaibun-Nisa Memon, Gachal GS, Yusuf M, et al. 2006. Incidence of hydropericardium syndrome disease in broilers of Hyderabad, Sindh. *Int J Poult Sci* 5(7) : 673-676.
7. Khawaja DA, Ahmed S, Raruf M.A, et al. 1998. Isolation of an adenovirus from hydropericardium syndrome in broiler chickens. *Pakistan J Vet Res* 1 : 2-17.
8. Nakamura K, Tanaka H, Mase M, et al. 2002. Pancreatic necrosis and ventricular erosion in adenovirus-associated hydropericardium syndrome of broilers. *Vet Pathol* 39(3) : 403-406.
9. Ashraf S, Malik SA, Naeem K. 2000. Persistence and transmission pattern of avian adenovirus-4 in broiler breeders. *Pakistan J Biol Sci* 3(4) : 633-635.
10. Shivaprasd HL, Woolcock PR, Mcfarland MD. 2001. Group I avian adenovirus and avian adeno-associated virus in turkey poults with inclusion body hepatitis. *Avian Pathol* 30(6) : 661-666.
11. Meulemans G, Boschmans M, Vandenberg TP, et al. 2001. Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differen-

- tiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathol* 30(6) : 655-660.
12. Okuda Y, Ono M, Shibata I, et al. 2006. Comparison of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism pattern of the fiber gene and pathogenicity of serotype-fowl adenovirus isolates from gizzard erosions and from feces of clinically healthy chickens in Japan. *J Vet Diagn Invest* 18(2) : 162-167.
 13. Kataria JM, Kumar NS, Dhama K, et al. 2003. Application of polymerase chain reaction and fluorescent antibody technique for the diagnosis of inclusion body hepatitis-hydropericardium syndrome (IBH-HPS) caused by fowl adenovirus serotype-4. *Indian J Comp Microbiol* 24(2) : 137-142.
 14. Hess M, Raue R, Prusas C. 1999. Epidemiological studies on fowl adenoviruses isolated from cases of infectious hydropericardium. *Avian Pathol* 28(5) : 433-439.
 15. Guy M, Bernard C, Mireille D, et al. 2004. Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses. *Avian Pathol* 33(2) : 164-170.
 16. Ono M, Okuda Y, Shibata I, et al. 2004. Pathogenicity by parenteral injection of fowl adenovirus isolation from gizzard erosion and resistance to reinfection in adenoviral gizzard erosion in chicken. *Vet Pathol* 41(5) : 483-489.
 17. Cao JX, Krell PJ, Nagy E. 1998. Sequence and transcriptional analysis of terminal regions of the fowl adenovirus type 8 genome. *J Gen Virol* 79(10) : 2507-2516.
 18. Ojkic D, Nagy E. 2000. The complete nucleotide sequence of fowl adenovirus type 8. *J Gen Virol* 81(7) : 1833-1837.
 19. Toro H, Gonzalez C, Cerda L, et al. 2002. Prevention of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in progeny chickens by vaccination of breeders with fowl adenovirus and chicken anemia virus. *Avian Dis* 46(3) : 547-554.
 20. 이영옥, 유병문, 김순복 등. 1979. 우리나라 계군의 닭 Adenovirus 감염상황. *농사보고* 21 : 45-50.