

< Original Article >

전북지역 육용종계에서 *Mycoplasma gallisepticum*과 *M. synoviae*의 항체 및 유전자 양성률 조사

곽길한¹ · 이흥재¹ · 육현수² · 이재욱³ · 이관호⁴ · 이영주^{5,6*} · 이상명^{5,6*}

전라북도 축산위생연구소¹, 남부지소², 서부지소³, 북부지소⁴, 전북대학교 환경생명자원대학 생명공학부⁵, 생명환경안전연구소⁶

Seroprevalence and molecular detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* infection in broiler breeder in Jeonbuk providence, Korea

Kilhan Kwak¹, Heungiae Lee¹, Hyunsu Yuk², Jaek Lee³, Kwanho Lee⁴,
Young-Joo Yi^{5,6*}, Sang-Myeong Lee^{5,6*}

¹Institute Livestock and Veterinary Research, ²Southern Branch, ³Western Branch, ⁴Northern Branch, Jangsu 55632, Korea, ⁵Division of Biotechnology, College of Environmental and Bioresource Sciences, ⁶Safety, Environment and Life Science Institute, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

(Received 23 May 2015; revised 21 June 2016; accepted 21 June 2016)

Abstract

The present study investigated serological and molecular prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) infection in unvaccinated broiler breeder farms in Jeonbuk providence. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) had been used to determine antibody titers against MG and MS, and genome of these pathogens, respectively. Seventy five percent of farms were seropositive for MG and 94% of farms were seropositive for MS. In addition, the rate of antibody positive flocks against MG were 65.3% (32/49), while the rate of positive flocks against MS were 84.2% (80/95). The geometric mean antibody titers were 802.2±626 and 27,726.7±2426 against MG and MS, respectively. Interestingly, none of samples was positive for MG genome by PCR, while 94% (farms), 82% (flocks) and 62.6% (broiler breeder) were positive for MS genome by PCR. These findings suggest that the prevalence of MG or MS infection could be higher than expected. Thus, strict prevention program including vaccination and environmental sanitation should be implemented to avoid disease transmission from breeder to broilers as well as transmission among broilers.

Key words : *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, Broiler breeder, Jeonbuk

서 론

종계 사육에 있어서 생산성 저하를 유발시키는 요인들로서는 품종, 사료, 사육환경 및 질병 등 다양한 요소들이 존재하고 있다(Yassin 등, 2009). 특히 닭의

종란을 통한 후대 병아리에 감염되는 난계대성 세균성 질병은 종계 사육장의 경제적 손실 및 생산성 저하를 일으키는 고질적 질병으로 알려져 있다(Park 등, 2008; Kwon 등, 2010). *Mycoplasma gallisepticum* (MG)에 의한 마이코플라즈마 감염증(mycoplasmosis)은 수포음과 기침, 비루 등의 증상을 동반하는 가금류의 호흡기 질병으로, 만성호흡기병(chronic respiratory disease; CRD)을 유발하고 이로 인한 산란율 및 부화율

*Corresponding author: Young-Joo Yi, Tel. +82-63-850-0835,
Fax. +82-63-850-0834, E-mail. yiyj@jbnu.ac.kr
Sang-Myeong Lee, Tel. +82-63-850-0835,
Fax. +82-63-850-0834, E-mail. leesangm@jbnu.ac.kr

감소, 난중 및 난질 저하, 병아리 품질 저하, 발육 불량 및 사료효율 감소 등을 유발시킨다고 보고되었다 (Carpenter 등, 1981; Mohammed 등, 1987; Stadelman, 1988; Patterson, 1994; Branton 등, 1999; Ley, 2003). *Mycoplasma*의 전파는 감염된 개체와의 직접접촉이나 먼지, 사료, 음수 등에 의하여 전파되는데, 대형농장이나 환경오염의 증가는 이러한 질병의 유발 및 확대를 더욱더 증가시켜 양계농가에 경제적 피해와 직결될 수 있다고 볼 수 있다(Kleven, 1997). 한편 *Mycoplasma synoviae* (MS)는 육계의 전염성 활막염을 유발하는 병원체로, 이 또한 호흡기 질환을 유발하고 나아가 난질과 생산성을 저하시키는 것으로 알려져 있다(Feberwee 등, 2009; Catania 등, 2010; Ranck 등, 2010). MS는 MG에 비하여 그 위험성이 덜 강조되어 왔으나, MG에 감염되지 않은 육계의 기낭염 병변 부에서 빈번히 분리됨으로써 최근에는 원래의 전염성 활막염 보다 기낭염과 관련하여 많은 관심이 고조되고 있다(Kleven, 1997).

따라서 이번 연구는 전북에서 사육 중인 육용종계에서의 MG와 MS의 감염 상황을 파악하기 위해, 육용종계 농장에서 수집한 시료를 대상으로 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)와 polymerase chain reaction (PCR) 검사를 실시하여 MG와 MS에 대한 항체 및 유전자 양성률을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시료채취

2015년 전라북도에 위치하는 백신접종(MS) 경력이 없는 육용종계 및 원종계 농장을 대상으로, 채혈 및 닭의 뒷 콧구멍 틈새(choanal cleft)에서 면봉을 이용하여 시료를 채취하였다. 분리된 혈청은 56°C에서 30분간 비동화 후 ELISA 검사 전까지 -20°C에서 냉동보관하였고 유전자검사용 면봉은 배양 전까지 -70°C에서 보관하였다.

항체검사

닭 *Mycoplasma*병에 대한 항체 검사는 ELISA를 이용하여 실시하였다. IDEXX사(Maine, USA)의 MG ELISA kit와 MS ELISA kit를 사용하였으며, 실험방법은 제품의 사용설명서에 기술한 대로 실시하였다.

혈청을 희석액으로 500배 희석하여 항원이 코팅된 plate에 100 μ L씩 분주하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 세척액 350 μ L로 5회 세척을 실시한 후 anti-IBD: horseradish peroxidase conjugate를 100 μ L씩 분주하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 plate를 5회 세척하고 TMB substrate를 100 μ L씩 첨가하여 실온에서 15분간 발색을 유도한 후 stop solution을 100 μ L씩 첨가하여 반응을 중지시키고 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검사 시료의 흡광도는 S/P ratio로 환산하였으며 S/P ratio가 0.5 이상일 때, 양성으로 판단하였다. ELISA 역가는 kit에서 제공하는 술식 [$\log_{10} \text{Titer} = 1.09(\log_{10} \text{S/P}) + 3.36$]으로 계산하여 시료의 1,077~4,999, 5,000~9,999, 10,000~19,999, 20,000 이상으로 각각 항체역가의 수준을 등급화하고 평균 항체가(geometric mean titer, GMT)를 비교하였다.

Mycoplasma 배양

닭 *Mycoplasma* 배양을 위해 멸균 면봉으로 뒷 콧구멍 틈새 내 삼출물을 채취하여 10% 돼지혈청(ThermoFisher Scientific, Seoul, Korea)이 첨가된 pleuropneumonia-like organism broth (Difco, Franklin Lakes, USA) 증균배지에 현탁시켜 37°C에서 10일간 배양하였다.

DNA추출 및 PCR

증균 배양액 1 mL을 14,000 x g에 10분간 원심하고 상층액을 버리고, 침전물에 멸균 PBS 1 mL을 가하여 세척하고 다시 원심한 후 상층액을 버리고 25 μ L의 멸균 증류수를 넣어서 부유시킨 후 100°C에서 10분간 가열 후 다시 14,000 x g에서 5분간 원심하고 상층액만 채취하여 DNA를 추출하였다. PCR은 HS Prime Taq Premix (GENETBIO, Daejeon)를 이용하여 실시하였다. Upstream primer (10 pmoles/ μ L) 1 μ L, downstream primer (10 pmoles/ μ L) 1 μ L, 추출한 DNA용액 5 μ L, 멸균 증류수를 3 μ L 넣어 반응 볼륨을 20 μ L 되도록 하고, Table 1과 같은 조건 하에 BIO-RAD C1000 Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다.

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) for MG and MS

Diseases	Primer	Product size
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	MG 1 : GGATCCCATCTCGACCAGGAGAAAA MG 2 : CTTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA	732 bp
<i>Mycoplasma synoviae</i>	MS 1 : GAAGCAAATAGTGATATCA MS 2 : GTCGTCTCGAAGTTAACAA	207 bp
PCR condition	94°C, 5 min; 35 cycles (94°C, 1 min -50°C, 1 min -72°C, 2 min); 72°C, 10 min	

Table 2. Antibody-positive rates against MG and MS in broiler breeders of Jeonbuk province

Diseases	No. of farms		No. of flocks		No. of broiler breeder	
	Test	Positive (%)	Test	Positive (%)	Test	Positive (%)
MG	16	12 (75%)	49	32 (65.3%)	1,469	232 (15.7%)
MS	33	31 (94%)	95	80 (84.2%)	2,852	1,436 (50.4%)

Table 3. ELISA antibody titers against MG and MS in broiler breeders of Jeonbuk province

Diseases	No. of broiler breeder to ELISA titer						GMT±SD
	Total	<1,077	1,077~4,999	5,000~9,999	10,000~19,000	≥20,000	
MG	1,469	1,237	203	24	4	1	802.2±626
MS	2,852	1,416	813	548	69	6	27,726.7±2426

결 과

MG와 MS 항체 양성률

MG와 MS 항체검사 결과 농장별로는 75% (12/16), 94% (31/33)로, 계군별로는 65.3% (32/49), 84.2% (80/95)의 항체양성률을 보였고, 개체별은 15.7% (232/1,469), 50.4% (1,436/2,852)의 항체양성률을 보였다(Table 2). 개체별 MG에 대한 평균 항체역가는 802.2±626로 항체양성률을 보인 232수 중 5수는 10,000이상의 높은 항체역가를 나타내었다. 한편 개체별 MS에 대한 평균 항체역가는 27,726.7±2426이었고, 75수가 10,000이상의 항체역가를 나타내었다(Table 3).

MG와 MS 유전자양성률

MG 혈청검사 결과 양성반응을 보인 12농가 32동 930수에 대한 유전자검사 결과 항체가 형성됨에도 불구하고 모든 시료에서 MG 유전자를 검출할 수 없었다. 그러나 MS의 경우 검사농가 94% (17/18)에서 유전자를 검출할 수 있었으며(Fig. 1), 개체별로는 62.6% (733/1,170)의 유전자 양성률을 보였다(Table 4).

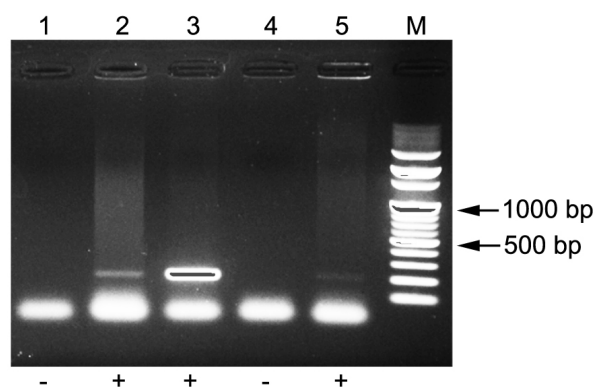


Fig. 1. Molecular detection of MS by PCR. Representative gel photo is shown. Lanes 1~5: samples. M: marker. Samples of lanes 2, 3 and 5 are MS-positive (+).

고 찰

대형화된 양계산업은 생산성 증대를 불러왔으나, 전염성 질병에 대한 노출 및 파급성 또한 증가시켰으므로 양계농가는 그에 대한 대처방안으로 적절한 사양관리 및 질병 모니터링을 실시하여 사전에 질병을 예방함으로써 경제적 손실을 피하도록 노력하여야 한다. 특히 닭 *Mycoplasma* 감염증은 이 등(1967)에 의해 처음 국내에 보고된 이후 국내 양계장에서 지속적

Table 4. Molecular detection rates of MG and MS in broiler breeders of Jeonbuk province

Diseases	No. of farms		No. of flocks		No. of broiler breeder	
	Test	Positive (%)	Test	Positive (%)	Test	Positive (%)
MG	12	0	32	0	930	0
MS	18	16 (94%)	39	32 (82%)	1,170	733 (62.6%)

으로 발생 만연되어 있는 질병으로 근절대책이 시급한 질병이다. 전파 양식이 주로 난계대 감염으로 전파되며, 아울러 수평감염을 유발하므로 그 파급력이 매우 크다고 할 수 있다. *Mycoplasma*에 감염된 닭들은 Newcastle disease (ND), infectious bronchitis (IB), infectious bursal disease (IBD), infectious laryngotracheitis (ILT), 대장균증 등과 같은 2차 감염의 감수성이 높아져 막대한 경제적 손실을 야기시킬 수 있는 질병으로 이에 대한 적절한 예방과 관리가 절실한 질병이라 할 수 있다.

이번 조사에서 전북지역의 육용종계에 대한 MG 유전자 검사결과 12농가 32계군 모두 음성으로 판명되었다. 그러나 항체검사 결과는 조사농장의 16농가 중 75% 항체가 양성농장으로 확인되었다. 49계군 중 65.3% 계군에서 항체를 보유하고 있었으며 개체별로는 약 15.7%가 항체 양성이었으며 평균 항체가는 802.2로 조사되었다(Table 2). 모든 시료에서 MG 유전자 검사가 음성으로 나온 것은 낮은 개체별 MG 항체 양성률, 시료 채취 및 증균 방법, 검출방법의 민감도와 관련이 있을 것으로 사료된다. 향후 연구를 통해 MG 유전자 검사법을 체계화하고 개선할 계획이다. MS의 경우 33농가 중 2개의 농장을 제외한 94%의 농가에서 양성으로 조사되었고, 95계군 중 84.2%의 계군에서 항체를 검출할 수 있었으며 개체별로 50.4%가 항체를 가지고 있었으며 평균항체가는 27,726으로 확인되었다(Table 3). 유전자 검사결과 2개의 농장을 제외하고 94%의 농장에서 유전자가 검출되었다. 또한 39계군중 82%의 계군에 유전자가 검출되었으며 개체별로는 62.6%에서 유전자가 검출되었다(Table 4). Kang 등(2014)은 전북지역 종계에서의 MG와 MS에 대한 계군별로 각각 71.1%, 50.0% 항체양성률을 보고하였고, 개체별은 각각 74.9%, 71.6%의 항체 양성률을 보고하였다. MG의 경우 Kang 등(2014)의 보고와 금번 검사 결과를 비교 할 때 계군별 양성률은 약간 낮았으나, 개체별 항체 형성률은 약 59.2%로 큰 차이를 보이는 것으로 조사되었고, MG 평균항체가는 이번 조사에서는 802.2±626, Kang 등(2014)의

보고에서 2,474±2,045로 각각 조사되어 2014년 조사에 비하여 감염률이 감소하고 계군 간 면역 격차가 줄어들었다는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 개체별 항체가의 차이의 원인은 이전의 보고 (Kang 등, 2014)가 MG백신 여부를 확인하지 않고 모든 닭에 대한 항체양성률을 조사한 것이 하나의 요인이며, 또한 금번 조사에서는 일반농장에 비해 상대적으로 차단 방역 및 위생 관리가 잘되어있는 원종계농장과 직영농장 등이 포함된 검사가 이루어져 차이점이 나온 것으로 사료된다.

MS의 경우 현재 백신투여가 행하여지지 않는 관계로 높은 유전자양성률과 항체양성률을 보여 주었다(Table 2, 4). Kang 등(2014)의 조사와 비교 하였을 때, 감염계군은 증가하였으나 개체별 감염율은 다소 낮게 나타났다. 그러나 평균항체가와 편차를 비교하여 보면 이번 연구에서는 27,726.7±2426, Kang 등(2014)의 보고에서는 1,469±1,230 되었다. 이번 연구는 앞서 기술한 바와 같이 이전의 보고(Kang 등, 2014)에서는 검사되지 않은 원종계장과 직영농장의 검사가 되었음에도 불구하고 오히려 평균항체가가 증가하였고, 농장간의 감염 상태의 편차가 큰 것으로 조사되었다. 이는 2014년도 조사(Kang 등, 2014)와 비교하여 MS 감염이 폭넓게 진행되고 있는 것으로 사료 된다. 또한 MS의 항체가 양성인 계군에서는 모두 유전자가 검출되었는데 이는 지속적인 수평감염이 이루어지고 있는 것으로 예상된다. 이를 근절시키기 위해서는 MS에 대한 방역조치가 우선적으로 실시되어야 하고, 아울러 분리균주의 병원성에 대한 조사가 체계적으로 이루어져야 된다고 사료된다.

국내에서는 2001년부터 약 15년에 걸쳐 MG 근절을 위한 백신접종을 실시해오고 있다. 4주령 병아리를 채혈 검사하여 MG 감염 여부에 따라 사균 또는 생균백신을 접종해오고 있는데, 백신접종 후 백신에 대한 체계적인 평가가 이루어지지 않고 있어 백신접종 후 야외 감염주에 대한 방어여부 등 백신효과를 증명할 과학적인 증거를 구축하고 있지 못하고 있어 이에 대한 대책 수립이 시급하다. 전북지역은 경기,

충남에 이어 많은 종계장을 보유하고 있으며, 닭 사육 규모면에서 약 2억7천만수를 사육하고 있어 역시 경기, 충남에 이어 전국 3위 규모의 사육지역이다. 특히 육계의 경우 사육규모가 전국 대비 24.6%로 가장 많은 육계를 사육하고 있는 국내 최대의 주요 양계지역이다(박과 이, 2016). 전북은 청정한 자연환경을 유지하고 있는 동남부 산악지역 위치하고 있어 질병으로부터 안전한 사육환경 조성할 수 있으므로 추후 원종계, 종계 농장 등이 대거 이전할 가능성이 높은 지역이다. 따라서 전북지역 양계산업의 지속적 발전을 위해서는 MG, MS와 같은 난계대 질병의 근절이 매우 중요하다 할 수 있을 것이다. 이들 질병을 근절하기 위한 백신, 투약과 같은 의료적 치료도 중요하지만 위생적인 환경관리, 철저한 차단방역, 지속적 모니터링을 통한 과감한 도태가 매우 중요하다고 사료된다.

결 론

2015년도 전북도내 육용종계 농가에 대한 MG, MS 항체검사 결과 농장별로는 75% (12/16), 94% (31/33)로, 계군별로는 65.3% (32/49), 84.2% (80/95)의 항체 양성률을 보였고, 개체별로는 15.7% (232/1,469), 50.4% (1,436/2,852)의 항체 양성률을 보였다. 개체별 MG와 MS에 대한 평균 항체역가는 802.2 ± 626 와 $27,726.7 \pm 2426$ 로 확인되었다. MG 유전자는 검출되지 않았으나 MS의 경우 검사농가 94% (17/18)에서 유전자를 검출할 수 있었고, 개체별로는 62.6% (733/1,170)의 유전자 양성률을 보였다. 따라서 전북도내에 MS에 대한 백신접종이 시급하며, 양계농가의 철저한 방역과 예방이 필요하다는 결론을 얻었다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 한국연구재단 기초연구사업 일부(Y.-J. Yi)를 지원 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다(NRF-2013-R1A6A3A04063769).

REFERENCES

이창구, 김순재, 남공선. 1967. 닭의 만성 호흡기병의 혈청학적 조사연구 및 진단항원의 제조. 가축위생연구소 시험연구보고서.

- 박상영, 이병식. 2016. 1/4분기 가축동향조사 (3월 1일 기준), 통계청.
- Branton SL, Lott BD, May JD, Maslin WR, Pharr GT, Brown JE, Boykin DL. 1999. The effects of F-strain *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and the dual infection in commercial layer hens over a 44-week laying cycle when challenged before beginning of lay. II. Egg size distribution. *Avian Dis* 43: 326-330.
- Carpenter TE, Mallinson ET, Miller KF, Gentry RF, Schwartz LD. 1981. Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Dis* 25: 404-409.
- Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RAJ. 2010. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Diseases* 54: 961-964.
- Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. 2009. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology* 38: 77-85.
- Kang MS, Kim SY, Lee HS. 2014. Seroprevalence of meta-neumovirus, reovirus and mycoplasma in the broiler breeder of Jeonbuk province. *Korean J Vet Serv* 37: 185-190.
- Kleven SH. 1997. *Mycoplasma synoviae* infection. pp. 845-856. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE(ed.). *Diseases of poultry*. 12th ed. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA.
- Kwon YK, Kang MS, Oh JY, Jung BY, Kim HR, Kim HY, Shin SY, Kwon JH, Chung GS. 2010. Prevalence report of transovarian transmitted diseases in the breeder chickens. *Korean J Poult Sci* 37: 237-245.
- Ley DH. 2003. *Mycoplasmosis-Mycoplasma gallisepticum* infection. pp. 722-744. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE(ed.). *Diseases of Poultry*. 11th ed. Iowa State Press, Ames, IA, USA.
- Mohammed HO, Carpenter TE, Yamamoto R. 1987. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. *Avian Dis* 31: 477-482.
- Park JB, Cha SY, Park YM, Zhang DD, Song HJ, Jang HK. 2008. Recently epidemiological survey of the viral diseases of broiler chickens in Jeonbuk province from 2005 to 2007. *Korean J Vet Serv* 31: 43-55.
- Patterson PH. 1994. Coping with *Mycoplasma gallisepticum*. *Internews* 7: 1-3.
- Ranck MF, Schmidt V, Philipp HC, Voss M, Kacza J, Richter A, Fehlhaber K, Krautwald-Junghanns ME. 2010. *Mycoplasma synoviae*-associated egg-pole shell defects in laying hens. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 123: 111-118.
- Stadelman WJ. 1988. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection of a laying flock. *Egg Industr* 94: 12.
- Yassin H, Velthuis AG, Boerian M, van Riel J. 2009. Field study on broilers' first-week mortality. *Poultry Sci* 88: 798-804.