

최 종  
연구보고서

닭 전염성 낭병(Infectious bursal disease)의  
진단법 및 백신개발

Development of Diagnostic Methods and  
Vaccine for Avian Infectious Bursal Disease

연구기관  
서울대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “닭 전염성 낭병(Infectious bursal disease)의 진단법 및 백신개발 (제1세부과제 “국내유행 전염성 낭병 바이러스의 특성 규명” 제2세부과제 “급성 전염성 낭병의 사망 기전 규명과 대증 치료법 개발” 협동과제 “전염성 낭병의 유전자 재조합 백신 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8 월 일

주관연구기관명 :	서울대학교
총괄연구책임자 :	김 선 중
제1세부연구책임자 :	김 선 중
제2세부연구책임자 :	류 판 동
협동연구기관명 :	강원대학교
협동연구책임자 :	한 태 옥

# 요 약 문

## I. 제 목

닭 전염성 낭병(Infectious bursal disease)의 진단법 및 백신개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재까지 국제적으로 Infectious bursal disease (IBD) virus (IBDV)에 관한 많은 연구가 이루어졌으나 1) IBDV의 시험관내 배양(adaptation)의 어려움으로 생체시험 외에는 IBDV strain간의 혈청학적 관련성의 파악이 불가능하며 실령 수 십대 세포배양에 계대배양하여 적응이 될지라도 계대배양 중 나타날 수 있는 바이러스의 변이를 담보할 수 없다는 점에서 제약이 있다. 따라서 제1세부과제에서는 1) IBDV의 cell culture 적응과정 없이 직접 IBDV 증식의 target cell인 immature B cell을 시험관내 배양하면서 바이러스의 증식 여부와 감염 역가를 신속하고 정확하게 측정하는 방법을 정립코자하였다. 이러한 방법이 정립된다면 국내에서 유행하고 있는 IBDV의 특성은 물론 IBD의 진단, IBDV가 분리된 상태 그대로의 혈청학적 관련성 및 역학적 특성 규명이 용이하게 이루어질 수 있을 것으로 기대된다. 2) IBDV에는 표준형 외에 혈청학적 변이주, 병원성 변이주들이 알려져 있는바 현재 국내에서 급성 IBD를 유발하는 병원성 변이주의 유행은 확실하나 국내에서 분리, 보존된 표준주가 없을 뿐만 아니라 변이주의 존재 여부도 밝혀지지 않은 상태이다. 3) 급성 IBD 발병 당시에는 높은 폐사율과 Fabricius 낭의 특징적인 소견에 의하여 급성 IBD의 감별진단이 가능하나 발병 후반부(발병 후 약 7일)에는 백신 바이러스를 포함한 모든 IBD바이러스가 Fabricius 낭에 동일한 병변을 초래하기 때문에 병리학적 소견뿐만 아니라 혈청학적으로도 감별진단이 불가능하다. 따라서 본 연구를 통하여 이들 변이주의 유행 여부, 혈청학적 및 생물학적 성상과 더불어 분자적인 특성을 파악하는 연구는 IBD의 역학적 특성 파악, 백신의 효능 평가, 진단 및 새로운 백신 개발을 포함한 IBD 방역에 필수적인 연구분야이다.

2세부과제에서는 IBD 바이러스 감염 후 나타나는 사망의 직접원인으로 여겨지는 인자를 규명하고 나아가서 IBD 바이러스감염시 대증요법으로 쓰일 수 있는 약물을 검색하고자 하였다.

협동과제에서는 IBDV에 대한 유전자 재조합 백신을 개발하고자 수행하였다. IBDV는 환경에서의 저항성이 매우 높기 때문에 일단 발병된 농장에서는 닭이 존재해 있는 한 영속적으

로 발병이 일어날 수 있다. 따라서 농장의 철저한 소독 외에 IBDV의 예방을 위해서는 백신접종이 필수적이다. IBDV의 감염은 주로 어린 일령에서 일어나기 때문에 충분한 모체이행항체가 전달될 수 있도록 성계에 백신접종을 실시하고 있으며 이런 목적으로 불활화 오일백신이 되어지고 있다. 또한 갓 부화된 병아리에는 약독화 백신을 접종하고 있다. 백신접종의 시기는 모체이행항체가 약독화 백신을 중화시켜 백신의 효력이 상쇄될 수 있기 때문에 매우 중요한 요인으로 작용한다. 강병원성의 IBDV는 때때로 약독화 백신접종에 의해 형성된 면역을 극복하고 감염될 수 있다. 또한 보다 강한 면역반응을 유발하기 위해 덜 순화된 약독화 바이러스 백신 (hot vaccine)을 사용하고 있지만 때때로 F낭내의 follicle에 병변을 유발하여 백신을 접종한 닭에서 면역억제를 유발하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 본 연구에서는 성계에서 강한 모체이행항체를 유발하는 동시에 어린 병아리에서 모체이행항체를 극복할 수 있는 유전자 재조합 백신을 개발하고자 하였다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 1차년도에 우리 나라 야외 IBD바이러스의 분리·동정, 병원성 조사, 야외분리 IBD바이러스 정량법(titration) 정립 및 야외 IBD바이러스에 효과적인 소독제를 선별하였다. 2차년도에는 IBD바이러스에 대한 Monoclonal antibody (mAb)를 생산하여 표준주 및 야외 분리주 간의 항원적인 차이 및 감별진단법을 모색하였으며, 항혈청을 이용해 항원적인 관련성을 비교하였고, 야외 IBD바이러스의 유전자 염기서열 분석을 시도하여 유전적인 다양성을 밝혔다. 3차년도에는 야외감염 IBD 감별 진단을 위해 Competitive enzyme-linked immunosorbent assay (C-ELISA)법, 용혈시험법, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)/nested PCR 및 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 법을 비교하여 국내 상황에 가장 적합한 방법을 선별하였다.

IBDV의 구조 단백질 중에서 야외 감염의 방어에 필수적인 역할을 하는 것이 VP2단백질임은 이미 밝혀져 있다. 또한 VP2-VP4-VP3를 구성하고 있는 segment A도 방어에 있어 중요한 목적 단백질로 보고되어 있다. 유전자 재조합 백신의 개발에 있어 현재까지 보고된 기술은 fowl pox vector, Marek disease virus, fowl adenovirus와 Semliki forest virus vector를 사용한 것과 효모, baculovirus, 대장균에서 단백질을 사용하는 방법을 보고되었다. 그 중 본 연구에서는 baculovirus 발현 시스템을 이용하여 국내 IBDV분리주인 SH92주의 VP2와 SegA를 발현시켜 불활화 백신으로 효과를 분석하였다. VP2와 SegA유전자의 cDNA를 제조하기 위해 RT-PCR을 실시한 후 염기서열과 아미노산 서열을 분석 확인하였

다. 이들 증폭된 유전자를 Baculovirus transfer vector인 pBacPAK8에 클로닝한 뒤 Sf21 insect세포에 coinfection시킨 후 recombinant baculovirus를 생산하였다. recombinant virus를 plaque assay를 통해 바이러스 클론을 순수하게 분리한 후 바이러스내의 VP2와 SegA의 발현을 간접형광항체법 (IFA), Western blot hybridization등으로 분석한 후 바이러스를 대량 배양하였다. 국내 IBD양성 항체들에 대한 유전자 재조합 단백질의 항원성을 살펴 보고자 발현된 VP2와 SegA을 항원으로 사용하여 ELISA방법으로 항원성의 유무를 조사하였다. 또한 배양시간에 따른 발현단백질의 발현정도를 dot blot hybridization으로 분석하였다. 발현된 단백질의 방어력을 조사하기 위해 SPF닭에 피하로 2회 접종한 후 강병원성의 IBDV SH/92로 공격접종한 후 폐사율, B:B ratio, F양의 병리조직학적 소견을 관찰하였으며 공격접종 전후의 항체를 ELISA를 사용하여 측정하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제1세부과제에서는 야외 병계로부터 총 20주의 IBDV를 분리하였고 SPF닭에서 바이러스의 증폭을 모두 완료하였다. 증폭된 바이러스는 RT-PCR로 IBDV의 특이적인 밴드를 확인하였으며, 20주의 야외분리주에 대한 병원성을 4주령의 SPF닭을 이용하여 평균 치사율을 측정한 결과 평균 60.1%의 높은 치사율을 보였다. 야외분리주에 대한 계대배양을 chicken embryo fibroblast (CEF) 세포배양에 실시한 결과 CPE는 나타나지 않으나 바이러스의 증식은 이루어지는 것으로 확인되었으며 phorbol myristate acetate (PMA)를 첨가한 배지에서 병아리 또는 부화전 병아리의 bursal cell의 배양방법을 확립하였고 6주의 야외 분리주에 대한 감염역가를 측정하였다.

7개의 chemical group의 19개 시판 소독제의 IBDV에 대한 소독효과를 모두 측정하였으며 유기물의 존재 및 희석농도에 따른 소독효과를 조사하였다.

국내분리 IBDV SNU 9423주를 면역원으로 사용하여 총 40개의 IBDV specific MAb를 산생하는 hybridoma 세포주를 작성하였고, 40개의 mcAb 중 13주는 IBDV 중화능을 보였으며 그중 4개의 중화능을 보이는 MAb에 대하여 국내 분리 및 백신 IBDV에 대한 중화능을 조사한바 국내 분리주와 백신주인 D78 및 S706주에 대하여는 homologous strain (SNU 9423)과 유사한 중화능을 보였으나 SAL 및 Lukert 백신주에 대하여는 homologous strain에 비하여 1/4~1/64의 낮은 중화능을 보였다. 세포배양(CEF)에 적용시킨 야외 분리주 5주와 SAL 및 Lukert 백신주간에 교차 중화시험을 수행하여 혈청학적 관련성을 조사한바 야외 분리주들간에는 70%가 넘는 상관관계를 보였으나 야외 분리주와 백신주간에는 25% 이하의

낮은 관련성만을 보여 mcAb의 중화능과 일치하는 결과를 보였다.

IBDV 야외 분리주 17주에 대하여 항원성 및 중화항체 유발 부위인 VP2의 hyper-variable region을 nested RT-PCR 방법으로 증폭하고 염기서열과 deduced amino acid 서열을 결정하여 기 보고된 IBDV 표준주, 병원성 변이주 및 항원성 변이주들과 비교하고 phylogenetic tree를 작성한 바 병원성 시험에서 50% 이상의 치사율을 보인 (1차년 시험성적) 국내 분리주들은 일본에서 분리된 병원성 변이주 90-11주와 98% 이상의 염기서열 상동성과 병원성 특이 amino acid motif를 보였으며 phylogenetic tree에서도 90-11주와 근접한 cluster를 이루었다. 병원성 시험에서 13%의 치사율을 보였던 SNU 9423주는 90-11주와는 90.8%의 낮은 염기서열 상동성을 보였으나 백신주인 CUI과는 염기 및 아미노산 서열에서 각기 98.6%와 96.7%의 높은 상동성을 보였다. 병원성 시험에서 0%의 치사율을 보였던 SNU 9414주는 염기서열 상동성에서는 항원성 변이주인 DELE주와 91.1%, 아미노산 서열 상동성에서는 2512주 및 SNU 9991주와 90.0%로 최고의 상동성을 보였을 뿐 어떤 분리주보다도 낮은 상동성을 보였으며 phylogenetic tree에서도 독립된 위치를 나타내어 국내 고유 항원성 변이주로 생각되었다. 1985-1986년 사이에 수집된 bursa of Fabricius (F낭) 유제액을 대상으로 nested RT-PCR을 수행한 결과 IBDV 특이 유전자가 검출되었으며 염기서열 분석결과 병원성 변이주와 가장 높은 상동성을 보여 국내 최초로 병원성 변이주를 분리하였던 1991년 이전에도 병원성 변이주가 존재하였음을 알 수 있었다.

Lukert 주를 제외한 백신주와 야외주에 높은 중화능을 보이는 단클론 항체 33/25와 24/17와 병원성 변이주인 SNU91108과 백신주인 S706에 대한 항혈청을 사용하여 SNU91108 및 S706 항원을 코팅한 96-well plate에서 competitive ELISA를 수행한 결과 항혈청에 의해 단클론 항체의 결합이 최고 92-95% 억제되어 단클론 항체와 poly-clonal antibody가 공통으로 인식하는 epitope이 존재하고 있음을 알 수 있었으나 야외주와 백신주에 각각 특이적인 단클론 항체가 없어 야외주와 백신주를 구분할 수는 없었다.

IBDV가 감염된 F낭 유제액은 시험관내에서 닭 적혈구를 특이적으로 용혈시킨다는 사실이 본 연구 과제를 통해 처음으로 확인 되었다. 용혈의 민감도를 향상시키기 위한 적정 닭 혈구농도는 0.015%이었으며, 감염 F낭 유제액의 용혈현상은 면역혈청과 정상혈청에 의해 억제 되었으며, 감염 F낭 유제액으로부터 순수 분리된 바이러스는 용혈 능력이 없었으나 바이러스를 제거한 상층액은 용혈능력을 유지하고 있었으며 56°C, 30분간 열처리한 경우에는 용혈성이 관찰되지 않아 용혈에 단백질이 관련 되어 있을 것으로 추정되었다.

39일령 산란 숫병아리에 국내 분리 강병원성 IBDV 분리주 SNU9818을 접종하고 접종후

경시별로 F낭 유제액의 용혈 역가와 혈액의 PCV(packed cell volume) 및 ESR(erythrocyte sedimentation rate)를 조사한바 용혈은 접종 2일부터 15일까지 관찰되었고, PCV는 접종 2-4일 사이에 현격히 감소하였으며 ( $P < 0.01$ ), 5-7일 사이에도 유의성 있게 감소하다가 ( $P < 0.05$ ) 회복되는 경향을 보였다. ESR은 접종 후 2-5일 사이에 유의성 있게 ( $P < 0.05$ ) 증가하였다가 이후 회복되었다. 4주령의 SPF 병아리에 병원성을 달리하는 IBDV strains을 접종한 후 용혈역가를 측정된 결과 강병원성주인 SNU9750과 SNU9960은 접종 3-5일 사이에 약병원성 백신주인 Bursine-2 나 IBDL에 비하여 유의성 있게 높은 용혈 역가를 보여 ( $P < 0.05$ ) 감별진단을 위한 보조 자료로 사용할 수 있는 것으로 나타났다. PCV 값에 있어 국내 분리주 SNU9960은 백신주 Bursine-2에 비하여 감염 2-5일 사이에 현격히 낮게 측정되었으며( $P < 0.01$ ), 접종 후 11일에도 유의성 있게 낮은 값을 보여주었다 ( $P < 0.05$ ). ESR 값 역시 접종 후 3-4일 사이에 강병원성 분리주를 접종한 군이 약병원성 백신주 접종군에 비하여 유의성 있게 상승하는 결과( $P < 0.05$ )를 보였다.

국내 분리주 및 백신주의 VP2 gene의 hyper-variable region의 염기서열 분석결과 국내 병원성 변이주와 백신주인 D78, Bursine-2 및 Lukert 주와 차이를 보이는 부분을 확인하였으며, 이 부위의 염기서열을 이용하여 pathotype specific PCR을 수행하는 경우 병원성주만을 특이적으로 검출할 수 있어 감별진단에 이용할 수 있을 것으로 기대되었으며, 강병원성 IBDV 국내분리주와 국내에서 사용하고 있는 4주의 IBDV 백신주의 RT-nested PCR 증폭 산물에 대한 제한효소 분석을 실시한 결과 StyI과 BstNI 제한 효소에 의하여 강병원성 분리주와 백신주의 구별이 가능하였다. 본 연구사업으로 확인된 국내 고유 항원성 변이주의 존재는 백신 접종 계군에서 무증상으로 면역억제가 일어날 수 있음을 의미하며 경제적으로 큰 위해요인이 될 것으로 사료되므로 향후 전국적인 감염상황 조사 및 효과적인 백신 개발이 시급하고, 1991년 이전 1985-1986년 병원성 변이주의 존재는 국내 IBD 역학연구에 있어 중요한 발견으로써 향후 심도있는 연구가 요구된다. Nested-RT-PCR 방법을 이용한 분자진단은 가장 민감하였으며, RFLP에 의하여 백신주와 야외주를 감별하는 경우 StyI 보다 BstNI을 사용하는 것이 보다 해상도가 좋을 것으로 기대되었으며, 향후 분자진단 키트로 개발 가능할 것으로 기대된다.

본 연구사업에서 처음으로 밝혀진 감염 F낭 유제액의 용혈능은 감별진단 및 IBDV에 의한 병원성 기전을 이해하는데 중요하며 향후 용혈과 관련된 수용성 인자에 대해 보다 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2세부과제에서는 1) 연령별감수성: IBDV(SNU 91108주)를 1-6주령의 SPF 닭에 접종한 바

나이가 어릴수록 치사율은 낮아지는 경향을 보였으며 4-6주령의 닭에서는 100%의 치사율을 보였다. 2) 감염계의 폐사양상: IBDV(야외분리주)감염 SPF 닭에서 감염후 2-4일에 집중적인 폐사가 있었으며 이후에는 폐사가 없었다. 3) 체온의 변화: 감염 후 2-3일에 최고 1.25-1.5℃까지 증가되다 정상으로 회복되는 경향을 보였다. 그러나, 폐사된 닭의 경우 죽기 전 체온이 급격히 감소되는 경향이 있었다. 4) Bursa/Body weight ratio: 야외분리 IBDV SNU 9818을 감염시킨 갈색 산란계에서 B/B ratio는 감염 3일째까지 급격하게 감소하다가 감염 4-20일 까지는 비교적 완만하지만 지속적으로 감소하는 경향을 보였다. IBDV 감염후 생존 SPF 닭의 B/B ratio는 정상닭의 경우보다 유의성있게 낮았다. 5) PCV와 ESR: 감염 5-7일 사이에 PCV는 감소하고 ESR은 증가하는 경향을 보였으며 9-10일에는 정상으로 회복하였다. 6) 약물이 IBDV 감염계의 생존율에 미치는 영향: 조사된 4종의 약물 가운데 dexamethasone은 IBDV 감염계의 폐사를 효과적으로 막는 작용이 있었으나, aspirin, Vit-E와 selenium합제, S-methylthiourea (10 mg/kg)는 폐사를 줄이지 못하였다. 특히, NOS 억제제인 S-methylthiourea를 50 mg/kg로 투여한 경우에는 폐사율이 바이러스만 투여한 경우의 두배로 높았다. 7) 약물이 IBDV 감염계의 체온에 미치는 영향: 약물처리군에서 IBDV 감염계의 체온은 1일째부터 증가하여, 2일째에 가장 높았고 이후 감소하여 3-6일경에는 대조군보다 다소 낮게 유지되다가 생존한 닭의 경우 6일째에는 무감염대조군 수준으로 회복하였다. 접종 2일째의 체온은 IBDV 단독투여군과 S-methylthiourea(10 mg/kg) 투여군은 43.3℃이었으며 dexamethasone 투여군 (약 42.7℃)과 aspirin 투여군과 Vit-E+selenium 투여군(약 42.5 ℃)에서는 0.5 - 1 ℃ 만큼 낮아지는 경향을 보였다. 8) 약물이 IBDV 감염계의 혈중 NO농도에 미치는 영향: IBDV 감염계의 혈중 NO농도는 감염 3일째에 최고(80 μM)에 도달한 이후 5일째에 무감염대조군 수준(30 μM)으로 회복되었다. 감염 3일째 농도는 aspirin 투여군과 S-methylthiourea (10 mg/kg) 투여군 (60 μM), 그리고 dexamethasone 투여군(50 μM)에서 낮아지는 경향을 보였다. 그러나, Vit-E+selenium 투여군에서는 IBDV단독 투여군에서보다 혈중 NO가 더 높았다(90 μM). 9) IBDV 감염계의 혈중 corticosterone의 농도의 변화: 혈중 corticosterone의 농도는 IBDV 감염 후 처음 1-3일에 증가되었다가 4일째에는 정상으로 회복되는 양상을 보이며, 감염후 1-2일의 dexamethasone투여군의 혈중 corticosterone 농도는 무감염대조군의 농도보다 낮았다.

IBDV 감염계의 증상은 septic shock과 유사하다고 알려져 있다. 따라서, 바이러스에 의한 탐식세포의 파괴로 각종 cytokine의 분비가 증가되고, 이로 NO의 생성이 증가될 것으로 여겨진다. 한편, IBDV 감염계의 면역기능의 억제는 바이러스가 면역세포(B림프구, T림프구,



탐식세포)를 손상시키기 때문으로 여겨지고 있다(Sharma et al., 2000; van den berg, 2000). 그러나, 임상적으로 감염계의 폐사를 유발하는 직접적인 원인이 무엇인지는 규명되어 있지 않다. 본 연구의 기획단계에서 폐사의 직접적인 원인으로 의심하였던 '체온의 변화'는 다음과 같은 이유로 폐사의 직접적인 원인으로 볼 수는 없다고 사료된다. 체온은 감염후 2일 혹은 3일에 최고조에 도달하나 폐사직전에는 감소하는 경향을 보였으나, 아스피린투여와 Vit-E와 selenium합제 투여로 체온이 떨어진 경우에도 폐사율은 변화가 없었으며, 폐사 하루전의 체온을 비교한 경우 폐사한 닭과 살아남은 닭의 체온 간에 차이가 없었기 때문이다. 연구의 결과는 IBDV감염으로 인한 폐사의 직접적인 원인은 septic shock syndrome임을 암시하고 있다. 그 이유는 septic shock syndrome의 주요 혈중지표인 NO의 농도의 증가와 폐사율과 상관성이 있기 때문이다. 즉, septic shock 의 치료에 쓰이는 dexamethasone을 투여하였을 때 혈중 NO농도와 체온의 증가가 둔화되며, dexamethasone을 투여한 군에서는 폐사율이 0에 가깝기 때문이다. 또한, 감염후 4일과 5일을 기준으로 다음날 죽은 닭과 살아남은 닭의 혈중농도를 비교하였을 때 살아남은 닭의 혈중 NO농도가 높았기 때문이다. 본 연구에서는 소염제로 흔히 패혈증의 치료에 쓰이는 dexamethasone이 IBDV 감염계의 폐사율을 감소시킴을 두 차례의 감염실험에서 확인하였다. glucocorticoid 수용체를 차단하는 RU486으로 전처치한 경우, dexamethasone의 폐사율에 미치는 작용은 변화되지 않았다. 따라서, glucocorticoid 수용체가 아닌 다른 작용의 가능성도 있으나 이에 대한 결론은 사용한 RU 486의 농도가 적절하였는지 등에 대하여 추가적인 조사 후에 내려야 할 것이다. IBDV 감염계에서는 바이러스에 의한 면역세포의 손상으로 인하여 면역기능이 억제되어 있음이 잘 알려져 있다. 흥미롭게도 본 연구에서는 IBDV 감염계에서 혈중의 corticosterone의 농도 NO의 증가와 체온증가의 경우와 유사한 양식으로 증가하였다. 일반적으로 corticosterone은 면역반응을 억제하기 때문에, 이는 IBDV 감염계에서 관찰되는 면역기능의 억제가 가운데 일부는 corticosterone에 의하여 나타남을 암시하고 있다. 이에 대하여는 추가적인 연구가 필요하다. IBDV감염계에 dexamethasone을 투여한 결과 폐사가 효과적으로 예방되었으며, 감염계의 폐사율과 혈중의 NO농도의 증가와 상관성이 있었다. dexamethasone이 패혈증의 치료에 쓰이는 중요한 약물이며 또, NO가 패혈증의 병인과 밀접한 관련이 있음을 고려할 때, IBDV 감염계의 폐사의 직접적인 원인은 바이러스 감염으로 인하여 나타나는 septic shock syndrome으로 판단된다. 본 연구의 결과는 IBDV 감염계의 폐사를 예방하는 방법이나 약물요법의 개발에 크게 도움이 될 것이다.

협동연구과제에서는 Baulovirus 발현 시스템을 이용해서 방어에 중요한 역할을 하는 VP2와

SegA(VP2-VP4-VP3)를 발현시킨 후 방어력을 살펴보았다. RT-PCR을 이용하여 여러 가지 백신주와 병원성 국내분리주를 대상으로 VP2유전자와 SegA유전자를 증폭하였다. 이중 백신주인 Blen, Bur706, Bursine-plus, Bursine2 및 Cevac의 VP2를 증폭할 수 있었으며 병원성 국내 분리주인 1030 및 SH92의 VP2도 증폭되었다. 이들의 유전자는 대략 1540 bp의 크기에서 검출되는 것으로 나타났다. SegA유전자의 증폭은 SH/92, Bursine2, Cevac의 경우 잘 나타났으나 1030의 경우 매우 미약한 밴드로 검출되었고 나머지 바이러스주는 증폭이 되지 않았다. SegA유전자의 경우 약 3,148 bp의 크기에서 검출되었다. 이들 증폭된 유전자는 VP2의 경우 pBluescript에, SegA의 경우 pCR2.1-TOPO vector에 클로닝한 후 염기서열을 실시하였다. 이 중 SH/92의 VP2와 SegA의 염기서열 및 아미노산 서열분석을 완료하였다. 또한 국내 분리주인 SH/92와 백신주인 Bur706, Bursine2 및 Cevac의 VP2의 염기서열과 아미노산 서열의 상동성을 조사한 결과 모두 96%이상으로 높은 상동성을 보이는 것으로 나타났다. 증폭된 VP2유전자와 SegA의 유전자를 baculovirus transfer vector인 pBacPAK8 vector에 클로닝 한 후 recombinant plasmid를 분리하였다. IBDV VP2와 SegA 유전자가 삽입된 pBacPAK8 transfer vector plasmid와 linearized baculovirus DNA를 cotransfection 시킨 후 96-120시간에 세포변성효과 (CPE)가 관찰되었다. IBDV에 특이적인 다가항체 및 단크론 항체를 사용하여 recombinant virus의 발현을 확인한 결과 VP2와 SegA를 발현하는 재조합 바이러스는 모두 강한 형광을 나타내는 반면에 미 감염된 세포와 baculovirus만을 감염시킨 세포에서는 어떠한 형광도 관찰되지 않았다. 유전자 재조합된 바이러스에서 VP2와 SegA의 발현을 보다 직접적으로 확인하기 위해 SDS (12% gel)-PAGE를 실시한 후 western hybridization을 실시하여 각각의 band를 관찰한 결과 발현된 재조합 VP2와 SegA단백질은 세포 상층액에는 존재하지 않고 cytoplasmic fraction에 재조합 단백질이 검출되는 것을 알 수 있었으며 검출 감도는 매우 희미하게 band가 검출되는 것으로 나타났다. VP2의 경우 예상대로 45 kDa의 크기를 지니는 것으로 나타났다. 또한 SegA를 발현시에는 cell lysate에서 45kDa 크기의 band외에 VP3(32 kDa)와 VP4 (28 kDa)의 밴드가 매우 희미하게 나타나는 것이 확인되었다. 발현된 단백질을 항원으로 하여 ELISA를 실시하여 야외 감염혈청을 대상으로 발현된 단백질의 항원성을 조사한 결과 Absorbance수치는 매우 낮았으나 whole IBDV를 항원으로 한 일반 ELISA로 측정된 항체가의 수준과 비례해서 Absorbance의 수치가 나타났다. 따라서 발현된 recombinant protein은 야외 IBD감염혈청에 대해 항원성이 있는 것으로 판단되었다. 배양시간에 따른 재조합 단백질의 발현량을 측정하기 위해 동일한 역가의 recombinant VP2 virus와 recombinant SegA virus를

Sf21 cell에 접종한 후 시간대별로 수확한 후 dot blot을 실시한 결과 배양 후 4일째에 발현량이 가장 높은 것으로 나타났다. 유전자 재조합 VP2와 SegA의 면역원성 및 방어력을 조사하기 위해 SPF닭에 6주령과 7주령에 각각 2회의 백신을 접종한 후 1주 후에 강병원성 IBDV로 공격접종을 실시하였다. 대조군으로는 백신비접종비공격접종군 (Negative control)과 백신비접종공격접종군(Challenged control)을 두었으며 이들에게는 백신 대신 PBS를 0.5ml씩 접종하였다. 또한 양성 대조군으로는 시판중인 Bursine-plus를 규정용량에 맞게 음수로 백신접종하였다. 공격접종 후 10일까지의 생존율을 보면 백신비접종공격접종군의 경우 90%의 폐사율을 보인 반면 백신접종군의 경우 모두 0%의 폐사율을 나타냈다.

공격접종 후 살아있는 닭을 도태시킨 후 체중과 F낭을 적출하여 무게를 측정한 후 B:B ratio를 산출하였다. VP2와 SegA를 접종한 군의 B:B ratio는 백신비접종비공격접종군의 수치와 유사하게 나타나 강병원성 바이러스의 공격접종에도 불구하고 거의 손상을 입지 않는 것으로 나타났다. 그러나 시판되는 Bursine-plus를 접종한 군의 B:B ratio는 유전자 재조합 백신 접종군과 백신비접종비공격접종군에 비해 매우 낮은 B:B ratio를 보였다. 비록 Bursine-plus접종군은 유전자 백신 접종군과 생존율이 유사하게 관찰되었으나 F낭은 공격접종 바이러스에 의해 손상을 받은 것으로 나타났다. 유전자재조합 단백질 VP2접종군과 SegA접종군 사이에서의 폐사율과 B:B ratio의 차이는 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 VP2와 SegA의 유전자 재조합 단백질이 현재 시판되고 있는 백신과 비교할 때, 최소한 동등 또는 우월한 방어력을 나타내는 것을 보여주고 있다. 병리조직학적인 소견측면에서도 유전자 재조합 단백질을 접종한 군이 방어력에 있어 탁월한 효과를 보이는 것으로 나타났다. 백신비접종공격접종군에서는 배설강의 위축, 소포간 결체조직의 증가, 수질내 RE세포의 증가, 세포괴사 및 탐식, 표면 상피세포의 출혈등이 심하게 관찰되었다. Bursine-plus vaccine접종 및 공격접종군에서도 이러한 소견이 부분적으로 미약 또는 중등도로 관찰되었다. 그러나 VP2와 SegA재조합 단백질을 접종한 군에서는 이러한 소견이 거의 나타나지 않거나 일부에서 매우 미약하게 나타남이 관찰되었다. 따라서 유전자 재조합 단백질은 탁월한 방어력을 나타내는 것으로 확인되었다. 공격접종하기 전과 공격접종 후 10일째에 채혈을 하여 혈청을 분리한 후 ELISA를 이용하여 IBDV의 항체가를 측정하였다. 백신비접종공격접종군의 경우 공격접종전에는 항체가 거의 검출되지 않았는데 반해 공격접종 후 생존한 한 마리의 항체가는 21,524로 모든 군중에서 가장 높은 항체가를 나타냈다. 이는 바이러스가 감염 증식되어 항체가 높게 생성된 것으로 판단된다. VP2재조합단백질 접종군의 경우 공격접종전에는 1,514로 중등도의 역가를 나타냈고 접종후에는 2,218로 역가의 상승이 있

었다. SegA단백질의 경우 공격접종전에는 가장 높은 항체가를 보였다가 접종후에는 오히려 역가가 감소하는 것으로 나타났다. Bursine-plus의 경우 SegA접종군과 유사하게 높은 역가를 나타냈고 공격접종 후에는 역가가 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 IBDV에 대한 항체가와 F낭의 병변과는 서로 일정한 상관관계가 없는 것으로 암시되며 따라서 체액성 면역는 물론 세포매개성 면역도 IBDV의 방어에 중요한 역할을 한다는 기존의 보고와 일치하는 것으로 나타났다.

본 과제에서 개발한 IBDV의 VP2와 SegA의 유전자 재조합 백신은 기존의 백신과 동등 또는 이상의 방어력을 나타내고 있다. 현재 유전자 재조합 백신의 용량결정, 다른 strain간의 교차방어능, 모체항체가 존재하는 실용계 병아리에서의 백신의 효능 등을 수행 또는 계획중에 있다. 이러한 시험을 통해 보다 임상적인 자료를 구축한 후 생산기술을 백신제조회사에 이전하고자 한다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Project Title: Development of Diagnostic Methods and Vaccine for Avian Infectious Bursal Disease

Infectious Bursal Disease (IBD) virus (IBDV) induces an acute, highly contagious immunosuppressive disease in young chickens and resulting in major economic losses in the poultry industry. Highly virulent IBDV was first isolated in Korea in 1991. Since then most of the commercial chicken flocks, even flocks repeatedly vaccinated against IBD, have experienced heavy losses by the disease. The purposes of this study were to evaluate pathogenicity of field isolates of IBDV, to characterize the isolates biologically and molecular-biologically, to establish an in vitro virus titration method by using bursal immature B cells, to check the presence of antigenic variant of IBDV, to set up practical diagnostic method differentiating vaccine, and field viruses, and to evaluate efficacy of commercial disinfectants to develop recombinant IBD vaccines. Firstly, we evaluated the virulence of the recent Korean isolates of IBDV. The viruses were propagated in 4-5 weeks old specific pathogen free (SPF) chickens. Fifteen to twenty four-week-old SPF chickens were inoculated intra-ocularly with a dose of 1,000 EID<sub>50</sub> and observed for 14 days. Of the 20 isolates suspected as highly virulent IBDV resulted in mean mortality of 60.1%.

Secondly, we set up chick bursal cell culture method by PMA (phorbol myristate acetate) stimulation and applied for titration of 6 field isolates successfully.

From the BALB/C mice immunized with IBDV isolate SNU9423, we could produce 40 of IBDV specific monoclonal antibodies. Of the monoclonal antibodies, antibodies from 13 clones showed neutralizing activity against IBDV. When vaccine strains and field isolates were compared by the neutralization indices by using 4 units of neutralizing antibodies. Four antibodies showed similar neutralizing activity to D78 and S706 but 4-

to 64-fold less activity compared to homologous isolate (SNU9423). When antigenic relatedness between IBDV strains was examined by running cross neutralization tests using anti-sera raised in SPF chickens 70% and 25% relatedness were found, respectively, between vaccine strains and between vaccine strains and field isolates.

Part (491 bp) of the VP2 gene of IBDV (17 isolates) covering hypervariable region was amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT/PCR) and sequenced. When analyses were made for the deduced amino acid sequences, all of the thirteen highly virulent (hv) IBDV isolates as well as isolate 9593 showed either 100% homology or differences in only one amino acid with the Japanese hv IBDV 9011 strain. The isolates 9423 and 9414 had an homology of 96.7% with the CU1 strain and 90.0% with the varian strain 2512. Additionally IBDV specific gene sequences could successfully be amplified from the three bursal samples collected during 1985-86. Two of the samples showed deduced amino acid sequences characteristic for hv IBDV strains, suggesting that hv IBDV were prevalent before 1991, the year hv IBDV isolated for the first time in Korea, and even earlier than World first isolation of the virus in 1987.

By employing biotinylated monoclonal antibodies (mcAbs) (33/25 and 24/17) and micro-plates coated with antigens prepared from hv IBDV 91108 or vaccine strain S706, a competitive ELISA was established. Though both antisera raised against the strains completely blocked binding of mcAbs, it was not possible, due to shared recognition of the epitope(s) by the mcAbs, to differentiate between vaccinal immunity and field exposure.

The bursal homogenates from the chickens infected with infectious bursal disease virus (IBDV) caused hemolysis of chicken red blood cells (RBC) in vitro systems. This phenomenon could be observed by simply mixing equal volumes of RBC suspension and bursal homogenate in microtiter plates and incubating for one hour at room temperature. Hemolytic activities of bursal homogenates could be titrated by employing serial two-fold dilutions of the homogenates and sensitivities of hemolytic (HL) activity could be enhanced by lowering the concentrations of RBC suspension, eg., down to 0.015%. In chicken embryo fibroblast cell cultures, red blood cells originated from the embryos were lysed two to three days after inoculation with a filtered (0.22 $\mu$ m pore diameter) infected

bursal homogenate. Hemolytic activity of the bursal homogenates from the chickens inoculated with vaccine viruses was observed from 3 days post inoculation (DPI) and lasted up to 5 DPI. However, HL activity of bursal homogenate of the individual chickens was inconsistent and HL titers were generally low. On the other hand, those from the chickens infected with a virulent IBDV showed consistently high HL titers from 2 DPI up to 15 DPI. The HL test could readily be applied for the diagnosis of IBDV infection. Hemolytic activity of the bursal homogenate appears to be mediated by the soluble factor(s) produced by the infected cells.

Based on the nucleotide sequence analysis we designed a promising primer set for pathotype-specific PCR and PCR-RFLP (StyI or BstNI) technique could be useful tools for differentiating field IBDV isolates from live vaccine strains.

Among the 19 commercially available disinfectants evaluated for efficacy for disinfection of IBDV, representing 7 chemical groups, products of alkali, iso-cyanurate and aldehyde chemical groups showed most consistent efficacy, where those of chlorine and quaternary ammonium compounds were inefficient. Nevertheless, the efficiency of the most effective disinfectants were significantly compromised under the presence of organic material challenge.

In summary we have set up an in vitro virus titration method, identified antigenic variant, verified the presence of virulence variant in 1985-1986, found for the first time the presence of hemolytic soluble factor in the IBDV-infected bursal tissues and applied the finding to differential diagnosis, and set up several molecular differential diagnosis methods, pathotype-specific PCR and PCR-RFLP technique.

To understand the pathophysiology of the death of IBDV-infected chickens and to find possible ways to prevent the high mortality of IBDV-infected chickens in the early stage of disease, we investigated the changes in body temperature, plasma nitric oxide, plasma corticosterone in SPF chickens inoculated with IBDV. In addition, we also studied the morbidity of IBDV-inoculated chickens in relation to the ages and the treatment of the following drugs, dexamethasone, aspirin, vitamin E + selenium, and S-methylthiourea. The results are summarized below.

1) Morbidity and age: In IBDV-inoculated SPF chickens of 1-6 weeks, the

morbidity was higher with age. In particular, all the infected chickens of 4-6 weeks died. 2) Time course of death: The infected chickens died only at 2-4 days postinoculation of IBDV and there was no death after this period. 3) Changes in body temperature (BT): The BT of the infected chickens peaked at 2-3 days postinoculation of IBDV by 1.25-1.5°C and, then decreased to the normal during 4-8 days postinoculation. 4) Bursa/Body weight ratio (B/B ratio): The B/B ratio in the IBDV-inoculated chickens decreased up to day 3 postinoculation, and then the rate of decrease slowed down during the day 4 to 20 postinoculation. The B/B ratio of the survived chickens was significantly lower than those of the control chickens. 5) Packed cell volume (PCV) and erythrocyte sedimentation rate (ESR): At days 5-7 postinoculation, the PCV decreased and the ESR increased, but recovered to their normal levels at days 9-10 postinoculation. 6) Effects of drug on the morbidity of IBDV-inoculated SPF chickens: Among four drugs tested, dexamethasone effectively blocked the death of chickens. Other agents such as aspirin, vitamin E and selenium, and s-methylthiourea (10 mg/kg) did not change the morbidity of IBDV-inoculated SPF chickens. Interestingly, the morbidity was doubled by high dose of s-methylthiourea (50 mg/kg). 7) Effects of drugs on the body temperature of IBDV-inoculated SPF chickens: BT of the infected chickens in drug treatment groups peaked at day 2 postinoculation and returned to the normal at day 6 postinoculation in survived chickens. At day 2 postinoculation, the BT in the IBDV-inoculated chickens without drug treatment and those treated with s-methylthiourea (10 mg/kg) was 43.3 °C, which was highest. Aspirin, dexamethasone, and vitamin E + selenium tended to reduce the BT of the infected chickens to 42.5-42.7 °C. 8) Effects of drugs on the body temperature of IBDV-inoculated SPF chickens: The plasma NO level in the IBDV-inoculated chickens reached its peak (80 µM) at day 3 postinoculation and returned to the level of normal chickens (30 µM) at day 5 postinoculation. At day 3 postinoculation, the NO levels in the IBDV inoculated chickens were somewhat lower in the IBDV-inoculated chickens treated with treatment. aspirin, S-methylthiourea (10 mg/kg) (60 µM), and dexamethasone (50 µM). However, that in the chickens treated with Vit-E+selenium was even higher than that in the IBDV-inoculated chickens without drug treatment.



9) Changes in plasma corticosterone in IBDV-inoculated SPF chickens. The plasma corticosterone was maintained high during 2-4 days postinoculation (peak at day 3). Dexamethasone significantly reduced the plasma level of corticosterone in the IBDV-inoculated chickens during days 1-2 postinoculation.

In conclusion, the results show that dexamethasone can effectively prevent the death of IBDV-infected chickens which was closely related to the changes in NO level in the plasma. In view of that dexamethasone is one of major drug used for the treatment of septic shock and NO is a key factor in pathophysiology of septic shock, our observation suggest that the primary reason of death in IBDV-infected chickens is likely to be the damages caused by a septic shock syndrome. This finding would be an important clue in development of drug therapy for the death in IBDV-infected chickens.

In order to develop the recombinant vaccine for IBD, genomic segment A and VP2 genes of the Korean IBDV isolates SH/92 were amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and were expressed by baculovirus expression system. The amplified segment A (SegA: VP2-VP4-VP3; 3148bp) and VP2 gene (1540 bp) were cloned into the baculovirus transfer vector pBacPAK8. Baculovirus recombinants were identified by restriction enzyme digestion patterns and correct clones were selected and large amount of plasmid DNAs were prepared. The framing sequence and total sequence of VP2 and SegA was analysed. The two types of recombinant baculoviruses containing VP2 and SegA gene, respectively, were produced by cotransfection in Sf29 insect cells and baculovirus recombinants were plaque purified by two times. The expression of recombinant baculovirus in Sf21 cells were confirmed by indirect fluorescent antibody (IFA) by using anti-IBDV positive sera and monoclonal antibodies. All antibodies recognized the Sf21 cells infected with baculovirus containing VP2 or SegA but not Sf21 cells only and Sf21 cells infected with only baculovirus. Baculovirus expression of recombinants produced IBDV-specific proteins that were determined by SDS-PAGE and western blot hybridization. The recombinant baculovirus containing VP2 produced IBDV specific VP2 corresponding to 45 kDa protein VP2 of Bursine 2 vaccine strain. The recombinant baculovirus containing SegA produced VP4 (28 kDa) and VP3 (32 kDa) in addition to VP2. However, intensities of VP4 and VP3

were very low, which is comparable to those of the proteins in Bursine 2 strains. Moreover, IBDV specific proteins were detected only in infected Sf21 cell lysate with recombinant baculovirus but not in culture supernatant after infection. In order to determine the time of the highest expression, the recombinant baculovirus was inoculated and harvest 1, 2, 3, and 4 days postinoculation. The same amount of cell lysates were analyzed by dot blot hybridization using IBDV positive antisera. The expression rate of recombinant VP2 and SegA was high at 4 days postinoculation, respectively.

For examining antigenicity of recombinant VP2 and SegA protein, baculovirus-expressed proteins (VP2 and SegA) were used as antigens in separate indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and analyzed against nine positive sera obtained from separate different farms. All baculovirus-expressed VP2 and SegA proteins bound antisera against 9 IBDV positive antisera but the measured absorbances were not high. However, the negative control antisera did not bind to the baculovirus-expressed proteins. This indicates that recombinant VP2 and SegA proteins are antigenic to IBDV.

SPF chickens were injected with recombinant VP2 and SegA at 4 and 5 weeks of age. As positive control, chickens were administered orally with Bursine-plus commercial vaccine. Two groups of negative controls (nonvaccinated & challenged; nonvaccinated & nonchallenged) were injected with PBS. At 2 weeks after second vaccination, the chickens were challenged with  $1 \times 10^{4.8}$  EID<sub>50</sub> virulent strain IBDV SH/92 orally. The nonvaccinated group showed 90% mortality, whereas there was no mortality of chickens vaccinated with recombinant VP2 or SegA or commercial vaccine Bursine-plus. However, B:B ratio (bursa weight:body weight ratio) of chickens vaccinated with recombinant VP2 and SegA were significantly higher than those of the Bursine-plus vaccinated chickens and negative control group. Histopathologically, bursa of chickens vaccinated with recombinant VP2 and SegA had almost same appearance of the normal control (without challenge) which had simple columnar epithelium and large active lymphoid follicle. In other hand, bursa of chickens vaccinated with Bursine-plus had necrosis of lymphocytes, atrophy of bursa and moderate interfollicular fibroplasia.

Antibody titer to IBDV, as measured by ELISA, showed that the chickens vaccinated with recombinant VP2, SegA and Bursine-plus produced higher protective level of antibodies. The survived chicken in negative control group showed the highest antibody titer among chickens after challenges. Taken together, the recombinant VP2 and SegA proteins derived from baculovirus expression system had fully protection against virulent IBDV and can be used as a potential subunit vaccine.

# CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter I. Outline of Research Project .....	21
Chapter II. Present Situation of Research .....	26
Chapter III. Materials and Methods .....	29
1. The 1st Subtitle .....	29
2. The 2nd Subtitle .....	40
3. The Co-operative Project .....	44
Chapter IV. Results .....	53
1. The 1st Subtitle .....	53
2. The 2nd Subtitle .....	71
3. The Co-operative Project .....	90
Chapter V. Plan of Practical Use .....	118
Chapter VI. Data Collection during Project .....	119
Chapter VII. References .....	130

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	26
제 3 장 연구개발수행방법 .....	29
1. 제 1 세부과제 .....	29
2. 제 2 세부과제 .....	40
3. 협동과제 .....	44
제 4 장 연구수행내용 및 결과 .....	53
1. 제 1 세부과제 .....	53
2. 제 2 세부과제 .....	71
3. 협동과제 .....	90
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	118
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	119
제 7 장 참 고 문 헌 .....	130

## 제 1절 연구개발의 목표 및 필요성

### 1. 기술적 측면

닭의 전염성 낭병 (Infectious bursal disease: IBD)은 일명 감보로병(Gumboro disease)으로도 알려진 병으로 IBD 바이러스(IBDV)에 의하여 발병되는 전염병이다. 이 병은 닭의 체액성 면역의 중심 기관인 Fabricius 낭(Bursa of Fabricius: BF)을 집중적으로 파괴하여 면역억제를 일으키므로 닭의 AIDS로도 알려진 병이다. 이 병은 1962년 최초로 알려진 이래 현재까지 발병되고 있는 소위 표준형 IBD (Classical IBD) 외에 변이형 IBD 및 강병원성(급성) IBD도 있다. 이들 IBD 병형들은 면역억제를 일으키는 점에서는 공통이나 표준형 IBD는 세계 각국에서 발병되고 있으며 주로 4~8주령의 육성중인 닭에서 발병하며 폐사율이 낮은 특징이 있으며 변이형 IBD (serological variant)는 현재까지 미국에서만 발병되는 것으로 보이며 발병 자체에 의한 폐사는 무시할 정도이나 표준형 IBD 백신에 의하여 방어되지 않는 특징이 있다. 한편 급성 IBD (pathogenic variant)는 1987년 유럽에서 최초로 보고된 이래 북미 및 오세아니아 국가를 제외한 세계 대부분의 국가에서 발병 피해를 입히고 있다. 급성 IBD는 표준형 IBD와는 혈청학적으로는 높은 관련성을 보이거나 병원성이 강하여 12주령이 넘는 닭에서도 발병하며 단기간에 높은 폐사율을 일으키는 특징이 있다. 국내에서는 1991년 최초로 급성 IBD의 발병이 확인된 이래 닭을 기르는 거의 모든 농장에서 발병 피해를 입히고 있는 실정이다. IBD 바이러스(IBDV)는 생존성이 가장 강한 바이러스의 하나로 꼽히며 일반적으로 양계장에서 사용하는 소독제로는 사멸하지 않기 때문에 한번 발병한 농장에서는 병이 영속화하는 경향을 보인다.

현재까지 국제적으로 IBDV에 관한 많은 연구가 이루어졌으나 1) IBDV의 시험관내 배양(adaptation)의 어려움으로 생체시험 외에는 IBDV strain간의 혈청학적 관련성의 파악이 불가능하며 설령 수 십대 세포배양에 계대배양하여 직용이 될지라도 계대배양 중 나타날 수 있는 바이러스의 변이를 담보할 수 없다는 점에서 제약이 있다. 본 연구과제가 채택된다면 IBDV의 cell culture 적응과정 없이 직접 IBDV 증식의 target cell인 immature B cell을 시험관내 배양하면서 바이러스의 증식 여부와 감염역

가를 신속하고 정확하게 측정하는 방법을 정립코자한다. 이러한 방법이 정립된다면 국내에서 유행하고 있는 IBDV의 특성은 물론 IBD의 진단, IBDV가 분리된 상태 그대로의 혈청학적 관련성 및 역학적 특성 규명이 용이하게 이루어질 수 있을 것으로 기대된다. 2) IBDV에는 표준형 외에 혈청학적 변이주, 병원성 변이주들이 알려져 있는바 현재 국내에서 급성 IBD를 유발하는 병원성 변이주의 유행은 확실하나 국내에서 분리, 보존된 표준주가 없을 뿐만 아니라 변이주의 존재 여부도 밝혀지지 않은 상태이다. 3) 급성 IBD 발병 당시에는 높은 폐사율과 Fabricius 낭의 특징적인 소견에 의하여 급성 IBD의 감별진단이 가능하나 발병 후반부(발병 후 약 7일)에는 백신 바이러스를 포함한 모든 IBD바이러스가 Fabricius 낭에 동일한 병변을 초래하기 때문에 병리학적 소견뿐만 아니라 혈청학적으로도 감별진단이 불가능하다. 본 연구를 통하여 이들 변이주의 유행 여부, 혈청학적 및 생물학적 성상과 더불어 분자적인 특성을 파악하는 연구는 IBD의 역학적 특성 파악, 백신의 효능 평가, 진단 및 새로운 백신 개발을 포함한 IBD 방역에 필수적인 연구분야이다.

급성 IBD는 최초 발병부터 병증이 종료되는데 7일 내외밖에 걸리지 않을 정도로 경과가 매우 급속하며 그 기간 중에도 발병 4~6일째 집중적인 폐사(60~90%)가 발생하는 현상을 보인다. IBD 발병으로 주로 손상을 입는 기관은 Fabricius 낭으로 이 기관은 뇌, 심장, 폐 등과 같이 단기간의 생존에 필수적인 기관이 아닌데도 불구하고 급사하는 결과를 초래한다는 점에서 IBD의 병원성 기전에 대하여 오래 전부터 의문이 제기되어 왔다. 한때 IBD의 병원성 기전으로 혈액의 응고장애가 제기되기도 하였으나 최근에는 가능성이 희박한 것으로 알려지고 있다. 급성 IBD 발병시 2~3일 동안 폐사수가 급격히 증가하다가 2~3일 내에 급격히 감소하는 소위 spiked mortality 양상을 보이긴 하나 본격적인 폐사 발생 수일 전에 비록 낮은 수준이기는 하지만 비정상적이고 점차 증가하는 양상의 폐사를 보일 뿐만 아니라 발병하는 시기가 3~14 주령으로 국한되어 있어 일반 양제인에 의해서도 쉽게 IBD 발병을 인지할 수 있다. 따라서 IBD 발병 후 사망하는 기전을 규명하고 이에 상응하는 대책을 강구한다면 (예컨대 발열이 사망의 원인이라면 해열제 사용) 폐사로 인한 피해를 감소시킬 수 있을 것이라는 점에서 연구의 필요성이 제기된다.

IBD 백신으로는 병원성 및 면역원성에 따라 Mild type, Intermediate type, Intermediate Plus type (Hot vaccine) 및 Intermediate Plus + Virus Neutralizing Factor type 등 각종 생 바이러스 백신과 불활화 오일 에멀전 백신이 있다. 모체

이행항체에 의한 후대 계군에 방어능을 부여하기 위하여 종계군에는 3~5회의 생 바이러스 백신접종 외에 불활화 오일 백신까지 예외 없이 접종하고 있으며 실용계 (육계 및 산란계)에서도 2~3회씩 생백신을 접종하고 있다. 그럼에도 불구하고 거의 모든 계군들이 IBD 발병 피해를 입고 있는바 그 원인으로 1) IBDV의 강한 생존성으로 인한 광범위한 농장 오염, 2) 모체 이행항체에 의한 백신면역의 방해현상이 꼽히고 있다. 모체 이행항체는 나이가 들면서 점차 소실되며 동일한 계군내에서도 개체에 따라 그 수준이 다양하기 때문에 효과적인 백신프로그램의 적용이 어려우며 병원성이 있는 야외 IBDV는 백신 바이러스보다 모체이행항체를 극복하는 수준이 높다는 점에서 어려움이 가중된다. 모체이행항체에 의한 방해현상을 피하기 위하여 소위 Hot vaccine도 널리 사용되고 있으나 잔존하는 병원성 때문에 예외 없이 면역억제 현상이 초래되며 때로는 폐사까지 발생하는 부작용이 있다. 따라서 IBD의 방어에 필수적인 항원 결정기만을 발현하는 유전자 재조합 백신을 개발하여 모체 이행항체의 방해현상을 피할 수 있는 백신의 개발이 절실한 과제로 대두된다.

## 2. 경제·산업적 측면

IBD에 의한 피해로 면역능력의 저하에 의한 2차 감염 및 백신 면역의 불량은 IBDV의 type과 육계, 산란계를 불문하고 공통적으로 나타나나 급성 IBD의 경우처럼 직접적인 폐사에 의한 손실은 산란계에서 월등 높게 나타난다. 실제로 야외 산란계군에서 급성 IBD 발병으로 1주일 이내에 10~40%의 폐사를 경험하는 계군이 허다하다. 반면 육계의 경우에는 급성 IBD 자체에 의한 폐사율은 대개 5% 이하이나 정상적인 계군에서는 거의 문제가 되지 않는 대장균증 등의 2차 감염에 의한 손실이 더 큰 것으로 나타나고 있다. 실제로 국내에서 사육되고 있는 육계군에서 극히 드물지만 IBD 감염이 없이 사육된 계군은(예, 대한양계협회 경제능력 검정계) 출하시까지의 생존율, 체중, 사료 요구율 및 사육일수를 반영한 브로일러 생산지수(Broiler Index)가 예외 없이 240을 상회하나 IBD를 경험한 계군들은 대부분 180 이하를 보여 30% 이상의 생산성의 감소를 초래하는 것으로 추정된다. 뿐만 아니라 국내 양계산업의 활로로 세계 최대 닭고기 수입국인 일본에 닭고기 수출을 수년동안 모색하고 있으나 아직까지 이렇다 할 성과를 거두지 못하고 있다. 일본의 닭고기 시장은 생체중 2.8 kg 이상의 큰 닭을 요구하며 냉동육에 비하여 신선육이 월등 높은 값을 보인다 [2001년 1월 13일 현재 다리정육 kg당 일본 동경 도매시세: 신선육 - 680¥, 냉동육 - 385¥ (신



선육의 56.6%); 1999년 일본 닭고기 수입 총량 53만톤중 85%인 45만톤이 정육임]. 한국은 유일하게 일본에 신선 닭고기를 수출할 수 있는 지리적 요건을 갖추었음에도 불구하고 수출을 하지 못하는 가장 큰 요인으로 일본 시장에서 요구하는 큰 닭으로의 사육에 어려움이 지목되고 있다. 1999년 국내 육계 계열화회사 평균 도계일령은 37.1일로 발표되었으며(계육산업 뉴스) 평균 사육일수보다 짧은 계군들은 대부분 질병으로 인한 피해가 커 조기 도계하는 것으로 알려지고 있다. 이에 반하여 56일 이상을 사육하여야 하는 수출용 육계의 경우 무엇보다도 사육일수의 장기화에 따른 생산성 불량의 위험부담이 그만큼 크기 때문에 시도되지 못하고 있다.

1997년 7월부터 닭고기 시장이 완전히 개방되었으나 IMF 구제금융 체제의 경제적 어려움과 중국산 가금육에서의 조류 인플루엔자 검출로 1998년 1월부터 2000년 5월까지 중국산 가금육 수입 중단 조치 등으로 닭고기 수입물량이 국내 총 생산량의 10% 이하였지만 1999년 4.6만톤, 2000년 6.6만톤으로 국내 생산량의 20%를 상회하며 수입 물량의 증가추세는 가속화할 것으로 예견된다.

축산업 중에서도 양계산업은 국제경쟁력을 갖추기에 가장 유리한 것으로 지목되어왔다. 그럼에도 불구하고 한국에 닭고기를 많이 수출하는 미국이나 브라질과는 소비자들의 닭고기 선호 부위의 차이에서, 그리고 태국이나 중국과는 생산 원가의 차이 때문에 한국의 양계산업은 국제 경쟁력에서 어려움을 겪고 있다. 이러한 제약조건에도 불구하고 국내 양계산업의 활로는 생산성 향상과 대일 가금육 수출에서 찾을 수밖에 없으며 이를 위해서는 가장 큰 장애요인인 질병에 대한 효과적인 대책의 강구인 것으로 사료된다.

### 3. 사회·문화적 측면

가금류의 전염병으로 강병원성 인플루엔자와 국내에서 흔히 발생하면서 가장 큰 피해를 미치고 있는 뉴캐슬병의 경우 국내에서는 1급 가축전염병으로, 국제수역기구(OIE)에서는 List A 전염병으로 규정하고 있으나 현재 우리 나라에서는 소나 돼지의 전염병과는 달리 닭에서 이러한 병들의 발병시 살처분 명령만 있을뿐 아무런 보상 규정도 없는 실정이다. 더구나 근년 구제역, 돼지 콜레라 박멸정책 등 타 축종에서는 국가적인 지원이 이루어지고 있으나 양계분야에는 상응하는 지원이 없어 양계인들은 소외감과 상대적인 박탈감까지 느끼고 있다. 현실적인 어려움과 WTO 규정 등 제약 때문에 양계농가에 대한 직접적인 지원이 어렵다면 생산성 향상에 실질적으로 기

여할 수 있는 방역대책에 관한 연구 지원으로 양계농가를 지원할 수 있는 방안이 모색되어야 할 것으로 사료된다.

식품의 안전성은 무엇보다도 중요하며 가장 위력적인 무역장벽으로 작용하고 있다. 식품의 안전성은 인체에 유해한 병원 미생물과 항생제, 호르몬 등을 포함하는 유해성 물질의 유무가 핵심이며 근년 MRSA, VRE 등 소위 Super Bacteria가 출현하면서 항생제 잔류규제는 날이 갈수록 엄격해지고 있다. 다수 밀집사육을 하는 양계는 질병발생 빈도가 높아 단위 생산량 당 항생제 사용량이 가장 많은 편으로 꼽히고 있다. 닭의 질병중 항병력을 저하시키는 대표적 질병인 IBD에 대한 대책을 강구함으로써 간접적으로나마 항생제 사용을 줄일 수 있을 것으로 기대되며 이는 곧 식품의 안전성에 기여할 것으로 사료된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. IBD 바이러스에는 표준형, 혈청학적 변이형, 병원성 변이형이 있으며 형에 따라 피해 정도가 다름
2. 국가나 지역에 따라 유행하는 IBD 바이러스의 형은 다를 수 있으나 세계 각국에서 발병
3. 국내에서는 병원성 변이형(급성) IBD 바이러스의 유행은 확인되었으나 다른 형은 미확인 상태임
4. 유행하는 IBD 바이러스의 형에 따라 백신을 사용하여야 하나 국내에서는 이에 대한 규명이 없이 각종 백신이 사용되고 있음
5. 백신접종과 야외감염에 의한 항체간에 혈청학적 구별 불가능 -> 감별진단 불가
6. Cell culture에서 IBD 바이러스 adaptation의 난점 때문에 유행하는 바이러스의 특성 파악이 어려움
7. 유효하면서도 실용적인 소독제에 대한 연구가 이루어진바 없음
8. 단기간 생존에 필수적인 기관이 아닌 Fabricius 낭이 IBD의 주된 손상기관이나 사망의 원인이 규명되지 않은 상태임
9. 2000년 9월 미국 Urburn University에서 IBD 치료제로 Dicationic aromatic molecules (DACs)가 유효하다는 발표가 있었으나 구체적인 내용은 불명
10. IBD 바이러스의 방어와 관련이 있는 VP2를 encoding하는 유전자의 염기서열은 밝혀졌으나 유전자 염기서열과 혈청형 또는 병원성과의 관련성은 규명되지 않은 상태
11. 기존 IBD 백신의 경우 모체이행항체에 의한 방해현상의 극복이 가장 어려운 문제임
12. 미국에서는 "Intermediate Plus + VNF" 백신을 18일령의 부화란에 접종하는 기법이 실용화되고 있으나 국내에서는 시도된바 없음
13. 일부 선진국에서 subunit 백신, DNA 백신 개발 등이 시도되었으나 면역능력의 불량 및 경제성의 제약이 있음
14. 일부 선진국에서 Fowl poxvirus, Herpesvirus 등을 이용한 Recombinant vaccine 개발이 보고되고 있으나 실용화되지 않은 상태임

15. EU(유럽 국가연합)에서는 영국 등 18개국이 참가하는 면역억제성 가금질병 [IBD와 CAV (chicken anemia virus)]에 관한 COST Action 839 (Cooperation in the field of Scientific and Technological research)에 따라 5개의 Working group을 구성하고 1998년부터 5개년 계획으로 연구를 수행하고 있음; 이 연구사업의 연장으로 개발도상국의 IBD 지원 대책으로 INCO-DC (International Cooperation with Developing Countries Action 97 on Acute Infectious Bursal Disease)를 구성하여 1998년부터 3개년 계획으로 참여하는 개도국의 IBD 바이러스의 특성, 역학, 백신시험 등 연구 진행중이며 아시아국가로는 중국과 인도네시아를 참여시킴
16. 어느 나라를 막론하고 양계 생산성에 미치는 IBD의 비중을 충분히 인식하고 있기 때문에 종합적인 방제대책에 대한 연구가 보다 치열하게 이루어질 것으로 예견되며 연구를 통하여 얻어진 know-how는 자국의 양계산업 경쟁력 향상과 지적 재산권 무기로 활용될 것으로 예견됨

## 제 2절 연구결과가 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

### 1. 역학연구분야

국내 병원성 변이주가 서양 분리주보다 일본 분리주와의 높은 관련성 및 국내 고유 항원성 변이주의 존재는 기존 국내 IBD 연구의 결과를 재확인 한 결과이며, 1985-1986년 병원성 변이주 IBDV의 존재는 국내 최초로 밝혀진 내용이며 국제적으로도 1987년 화란에서 최초 발생한 것으로 보고된 것보다 이 전에 병원성 변이주의 존재를 밝힌 것으로 그 의미는 IBD 역학연구에서 중대한 것으로 사료된다.

### 2. 병원학 (Pathogenesis) 연구 분야

감염 F낭 유제액 내 용혈 인자 존재 및 병원성과의 관련성 규명은 세계 최초로 증명된 실험 결과로써 향후 병원성 변이주 감염에 의한 폐사 기전 이해와 치료를 위한 표적발굴에 중요한 의미를 가지는 것으로 사료된다.

### 3. 진단 및 예방기술 개발 분야

StyI 및 BstNI을 이용한 PCR-RFLP법에 의한 감별진단법은 국외 연구자의 결과를 재확

인 한 것이며, 병원성 주 특이 RT-PCR 용 프라이머는 본 연구과제를 통해 처음으로 제안된 것으로서 실험을 통해 증명되는 경우 국내외적으로 최초의 연구결과이다. 감염 BF 유제액의 용혈능 비교에 의한 감별진단법, PMA 자극-F낭 세포를 이용한 바이러스 정량법 및 항혈청을 이용한 백신주와 야외 병원성 변이주와의 항원적 차이 규명은 국내외적으로 처음 이루어진 일로써 중요한 의미를 갖는다.

#### 4. 방역기술 개발 분야

국내에서 유통되고 있는 축산용 소독제에 대한 광범위한 효능 평가는 본 연구에서 최초로 시도된 것으로 IBD 방역 효율 제고에 결정적인 기여를 할 것으로 사료된다.

## 제 3 장 연구개발 수행방법

### 제 1 절

#### 제 1세부과제: 국내 유행 전염성낭병 바이러스의 특성규명

##### 1. 종란 및 닭:

Sun Rise Farms Inc. (Catskill, N.Y., U.S.A.)에서 공급하는 SPF (specific pathogen free) 종란을 실험실에서 부화하면서 사용하였다. 부화한 병아리는 여과된 공기가 양압으로 유지되는 isolator에서 사육하면서 시험에 사용하였다.

##### 2. IBD 바이러스 (IBDV):

IBDV SNU 91108주를 비롯한 국내 계군에서 분리한 IBDV 총 26주 (Table 1-1)를 사용하였으며 IBDV reference virus로는 세포배양에 적응된 Lukert, SAL, D78 및 S706 strain을 사용하였다. 모든 국내분리 IBDV는 4~5주령의 SPF (specific pathogen free) 닭에 점안으로 접종하고 접종 4~5일 후 죽거나 증상을 보이는 닭으로부터 bursa of Fabricius (BF)를 채취하여 PBS (pH 7.2)에 20% (w/v) 유제액을 만들어  $-70^{\circ}$  C보관하면서 시험에 사용하였다.

##### 3. 야외 계군에서의 IBDV 분리 및 seed virus의 작성:

IBD의 전형적인 증상이나 소견을 보이는 야외 계군으로부터 F낭 (bursa of Fabricius)을 채취하여 IBDV 분리용 재료로 사용하였다. F낭 유제액을 28~39일령의 SPF 닭 4~6수에 점안으로 접종하고 접종 2~4일째 죽은 닭으로부터 채취한 F낭과 죽지 않는 경우 접종 4일째 희생시켜 채취한 F낭을 PBS (pH 7.2)에 20% (w/v) 농도로 유제하여  $-70^{\circ}$  C에 보관하면서 seed virus로 사용하였다.

##### 4. IBDV 동정시험:

야외 분리 IBDV의 동정은 분리주 접종 후 채취한 F낭 유제액(20%)을 항원으로, IBDV Lukert strain 면역혈청을 항혈청으로 사용한 agar gel precipitation test, F낭 유제액을 대상으로 IBDV specific primer set을 사용한 RT-PCR 및 접종후 10~14일까지 생존한 닭 혈청에 대한 IBDV 중화시험으로 동정하였다.

## 5. Primer 및 nested RT-PCR:

IBDV RT-PCR용 primer set은 Genebank database를 바탕으로 VP2 hyper-variable region을 포함하는 IBDV VP2 gene을 target으로 2쌍의 primer set (P1/P2와 P3/P4)을 작성하여 사용하였으며 각각의 증폭 크기는 643bp 및 491bp이며 primer set P3/P4는 nested PCR용으로 사용하였다 (Table 1-2).

Table 1-1. Origins of field isolates of infectious bursal disease virus

Isolates	Type of chickens	Age (day)	Vaccination
SNU85-7	?	?	?
SNU86-15	?	?	?
SNU91-108	Layer	56	0
SNU91-108F15	Layer	56	0
SNU94-14	Broiler	22	0
SNU94-23	Broiler	38	1
SNU95-39	Broiler	25	1
SNU95-93	Broiler	25	1
SNU95-96	Broiler	35	?
SNU97-50	Broiler	19	0
SNU98-18	Broiler	35	0
SNU98-58	Layer	28	0
SNU99-12	Broiler	27	1
SNU99-14	Broiler	38	1
SNU99-19	Broiler	28	3
SNU99-27	Broiler	22	1
SNU99-46	Broiler	35	2
SNU99-77	Broiler	22	1
SNU99-91	Broiler	20	1
SNU99-93	Broiler	19	2
SNU99-103	Broiler	42	2
SNU99-107	Broiler	19	1
SNU99-122	Broiler	24	0
SNU99-125	Broiler	17	1
SNU1030	Broiler	30	0
SNU2058	Broiler	15	0

Table 1-2. Oligonucleotide sequences of primers for amplification of the VP2 gene of IBDV

Primer	Sequence	Locations*	Size (bp)
P1	5' -TCACCGTCCTCAGCTTAC-3'	587-604	643
P2	5' -TCAGGATTTGGGATCAGC- 3'	1212-1229	
P3	5' -GCCCAGAGTCTACACCATAACTGC- 3'	703-726	491
P4	5' -GCGACCGTAACGACAGATCC- 3'	1174-1193	

\* Locations are based on the sequence of IBDV STC strain (Kibenge 등, 1990)

F낭 유제액으로부터 Chomczynski와 Sacchi의 방법 (1987)에 따라 RNA를 추출하고 cDNA 합성은 25o C 10분, 42o C 50분, 70o C 15분의 cycle로, PCR은 94o C에서 3분간 denaturation한 후 94o C 45초, 55o C 30초, 72o C 30초의 cycle로 30회 반복한 후 72o C에서 10분간 extension시켰다. Nested PCR은 상기 1차 PCR product를 template로 하여 P3/P4 primer set을 사용하여 위와 같은 방법으로 실시하였다. PCR product의 확인은 ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel (Gibco BRL)에서 전기 영동한 후 UV transilluminator에서 확인하였다.

## 6. 국내분리 IBDV의 세포배양 적응 및 교차 중화시험

야외 분리 IBDV의 세포배양 적응은 chicken embryo fibroblast (CEF) 세포 배양과 동시에 바이러스를 접종하고 3~4일 후 배양액을 채취하여 CEF 세포배양에 동시 접종하는 방법으로 10대까지 계대배양하였다. 중화시험에 사용한 IBDV는 CEF 세포배양에 적응돼 CPE를 일으키는 분리주만을 대상으로 수행하였으며 면역혈청은 분리주별 병원성 시험(1년차)에서 바이러스 접종 10~14일까지 생존한 닭에서 채혈한 혈청을 사용하였다. 교차 중화시험은 2진 희석한 면역혈청과 200 TCID<sub>50</sub>/25 ul 되게 희석한 바이러스를 동량으로 섞어 37 C에서 1시간 반응시킨 재료를 CEF 세포배양에 접종하고 5~7일 후 CPE 관찰에 의한 중화 항체가를 측정하였다. 항원적 관련성은 Archetti and Horsfall formula (1950)를 사용하여 R 값 (%)으로 제시하였다.



$$R (\%) = \sqrt{r_1 \times r_2}$$

$$r_1 = \frac{\text{heterologous titer with virus 2}}{\text{homologous titer with virus 1}}$$

$$r_2 = \frac{\text{heterologous titer with virus 1}}{\text{homologous titer with virus 2}}$$

### 7. Bursal cell (BC) 배양 및 BC 배양에서의 야외분리 IBDV 증식성 시험:

부화 18~21일령 또는 6주령 이하의 SPF 닭으로부터 무균적으로 F낭을 채취하여 gentamycin (10 µg/ml)을 첨가한 PBS (pH 7.2)에 담고 가위로 세절하였다. 5 ml 피펫을 이용하여 10회 sucking-blowing을 반복하여 세포가 분리되도록 한 후 용기를 3분간 기울인 상태로 정치시켜 조직편이 가라앉도록 한 후 상층액을 채취하여 얼음물에 보관하였다. 가라앉은 조직편은 다시 세절과 pipetting을 반복하여 single cell 부유액을 채취하였다. 채취한 single cell 부유액을 1,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 침전된 세포를 phorbol myristate acetate (PMA: 0~10 µg/ml, Sigma)와 fetal calf serum (10%)을 첨가한 RPMI 1640 배지 (Sigma)에  $5 \times 10^6$  cells/ml 되게 부유시켜 flat-bottom microplate에 well 당 100 µl씩 분주하였다. 세포를 분주한 micro-plate는 5% CO<sub>2</sub> 분압이 유지되는 humidified incubator에서 배양하면서 dye exclusion (tryphan blue) test에 의한 생존성을 조사하였다. 세포 생존 정도를 0부터 (90% 이상 사멸) 4까지 (90% 이상 생존) grading하였다. 4PMA 농도를 달리한 BF 배양에서 세포배양과 동시에 10진 희석한 IBDV를 접종하고 CPE 출현에 의한 감염역가를 측정하였다.

### 8. 소독제 효과시험:

시판중인 축사용 소독제중 제제별로 총 19종의 소독제를 대상으로 시험하였다. 소독제를 증류수에 제조회사의 축사 소독 권장농도로 희석하고 IBDV Lukert strain 배양액(CEF 세포 배양)을 1/10로 희석하였다. 실온에서 30분간 처리한 후 소독제로 처리하지 않은 IBDV (대조)와 더불어 10진 희석하여 CEF 배양세포에서 감염역가를 측정하여 대조 바이러스의 감염역가에 비하여  $4\log_{10}$  이상 역가 감소를 보일 때 소독 효과가 있는 것으로 간주하였다. 증류수를 사용한 시험에서 소독효과가 없는 소독제는 이후 시험에서 제외하였으며 효과가

있는 소독제에 대하여는 증류수를 희석액으로 사용하여 최고 유효 희석배수를 측정하였으며 경수 (300 ppm CaCO<sub>3</sub>)와 유기물 (5% yeast) 및 경수-유기물 첨가 조건에서 증류수를 사용한 시험에서와 같은 방법으로 소독 효능을 시험하였다.

## 9. Monoclonal antibody 생산 및 특이성 검사

### 가. 마우스 면역용 바이러스 및 정제

단클론성 항체를 생산하기 위한 마우스 면역용 바이러스는 IBDV 야외분리주 SNU9423 이었으며 다음과 같이 정제하여 사용하였다. 즉 CEF 세포배양에서 증식시킨 바이러스 재료를 2,000 rpm, 15분간 원심한 후, 상층액을 취하여 4°C, 15,000rpm (Beckman, JP20), 2시간 원심하여 상층액을 버리고 침전물을 취하였다. 이들 침전물은 처음 양의 1/200로 TNE buffer (0.01M Tris-Cl, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA, pH 7.4)에 재부유하였다. 20%, 30%, 40%, 50%의 CsCl discontinuous density gradient에 농축된 바이러스를 얻은 후 4°C, 120,000×g (36,000rpm, Hitachi 55RTS), 4시간 초원심하여 예상되는 gradient에 형성된 바이러스를 채취하였다. 채취한 바이러스를 TNE buffer에 재부유시켜 4°C, 15,000rpm, 2시간 원심하였다. 이에서 얻은 침전물을 TNE buffer에 처음양 1/200로 재부유하여 마우스 면역원으로 사용하였다.

### 나. 마우스와 면역

융합세포 (hybridoma) 생산을 위한 면역용 마우스와 세포융합과 클로닝 때 feeder cell source을 위한 마우스는 BALB/C마우스로서 수의과학 연구소로부터 분양받아 사용하였다.

정제된 바이러스를 10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub>/ml로 조정하여 -20°C에 보관하면서 면역에 사용하였다. 1차 면역에는 정제된 항원과 complete Freund adjuvant (Gibco), 2차 면역에는 정제된 항원과 incomplete Freund adjuvant (Gibco)를 동량으로 혼합하였다.

7주령 마우스에 마리 당 0.2ml씩 복강으로 1차 접종하였고, 2~3주 후 복강으로 마리당 0.2ml씩 추가 접종하였다. 융합 3~4일 전에 adjuvant와 혼합하지 않은 면역원을 마리당 0.1 ml씩 복강으로 접종하였다.

### 다. 세포융합

세포융합에 사용한 골수종 세포는 SP2/0-Ag14 (ATCC #CRL-1581)이었다. 이 세포는

배지에  $2 \times 10^5$  cells/ml 수준으로 배양하였다. 배양은 37°C humidified incubator에서 하였으며, CO<sub>2</sub>는 5%로 조정하였다. Splitting은 배양 1~2일 후  $8 \sim 10 \times 10^5$  cells/ml 수준에서 원심 세척하여 새 배지에  $2 \times 10^5$  cells/ml로 하였다. 배지는 D-MEM (Dulbecco's modified eagles medium, Gibco)에 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Gibco)을 10%, gentamycin을 100 µg/ml 및 sodium bicarbonate를 1g/l 되게 첨가한 것이다. 세포융합이나 클로닝 그리고 증식에 사용한 feeder cell은 adult mouse (BALB/C)의 복강 탐식 세포였다. pasteur pipette으로 혈청을 첨가하지 않은 D-MEM 배지를 무균적으로 복강에 주입하여 복강 탐식세포 (macrophage)를 회수한 후 세포 농도가  $3 \times 10^4$  cells/ml 되게 배양하였다. 융합에는 세포의 배지에 HAT supplement (10mM sodium hypoxanthine, 40uM aminopterin, 1.6mM thymidine; Gibco) 를 2%되게 첨가하여 사용하였고, 클로닝과 증식에는 골수종 세포 배양배지에 HT supplement (10mM sodium hypoxanthine, 1.6mM thymidine; Gibco)를 1%되게 첨가한 배지를 사용하였다.

단클론성 항체를 생산하기 위한 세포 융합은 다음과 같이 실시하였다. 최종 면역 3~4일 후 무균적으로 비장을 적출한 다음 가위로 세절하여 나이론 세망으로 거른 후 혈청을 첨가하지 않은 D-MEM배지로 3회 원심, 세척하였다. 그런 다음 융합 2~3일 전에 splitting하여 배양한 골수종 세포를 3회 원심, 세척하였다. 준비된 마우스 비장세포와 골수종세포를 8:1~5:1로 조정하여 혼합하고 혈청을 첨가하지 않은 D-MEM배지로 1회 세척한 후 상층액을 완전히 제거하였다. 그런다음 원심관을 가볍게 쳐서 침전세포를 가볍게 풀었다. 이 혼합 세포에 polyethylene glycol 1500 (PEG, Boehringer mannheim) 0.8ml를 1분에 걸쳐 서서히 점적하였다. 30초 후 혈청을 첨가하지 않은 D-MEM 배지 1ml를 같은 방법으로 점적하는 과정을 30초간격으로 6회 반복하였다. 그 다음 같은 배지 10ml를 첨가하여 원심 세척한 후 HAT 배지로 세포수를 약 10<sup>6</sup> cells/ml되게 조정하여 부유하였다. 부유한 세포는 하루 전 feeder cell을 배양한 96-well flat bottom microplate에 well당 100 µl씩 분주하였다. 배양은 37°C, humidified, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 하였으며 배양 2~3일 후 HAT 배지를 well당 50 µl씩 첨가하였다. 배지 교환은 배양액이 산성으로 변하면 실시하였다. 융합 10일 이후에는 골수종 세포배지에 HT supplement를 첨가한 배지로 교환해 주었다.

#### 라. 융합세포의 IBDV 특이항체 산생 검사

융합세포군의 IBDV 특이항체 생산여부를 검사 (screening)하기 위하여 간접 형광항체 반응법을 실시하였다. Slide glass에 CEF세포를 세포수  $1.5 \times 10^6$  cells/ml로 배양하여 2~3일

72	11-1541000-000766-01	쌀 생산비 조사기준 개선에 관한 연구	11.03.18
----	----------------------	----------------------	----------

후 완전한 단층 (monolayer)을 형성하면 SNU9423주를 102 ~ 103 TCID<sub>50</sub>/25 $\mu$ l 수준으로 감염시켰다. 감염 18시간 후에 배양기에서 꺼내 slide glass를 PBS로 3회 세척한 후 cold acetone으로 5분간 고정하였다. 고정한 세포는 -20°C에 보관하면서 사용하였다. 융합 10일 내지 15일 후 융합 세포군이 well 바닥의 1/3이상 자랐을 때 배양액을 채취하였다. IBDV 감염 CEF 세포에 배양액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS (pH 7.2)로 10분간 세척하고 자연 건조시켰다. 그 후 1:80으로 희석한 anti-mouse IgG goat affinity-purified FITC conjugate (Cappel)를 가하여 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 다시 10분간 세척하고 자연 건조시킨 후 buffered glycerol medium (0.5M carbonate buffer : glycerin = 1:9)으로 봉입하여 형광현미경 (Olympus, AH-RFL)으로 형광유무를 관찰하였다.

마. 융합세포의 클로닝 및 복수 생산

Screening에 의하여 IBDV에 대한 항체를 생산하는 well의 세포는 24 well plate에 옮겨 증식시켰다. 배양액에 대하여 간접 형광항체 반응법으로 항체를 생성하는지 다시 확인한 후 세포를 HT supplement 첨가 D-MEM 배지에 부유하여 cloning하였다. Cloning은 세포가 well 당 0.5~1개가 되도록 희석하여 하루 전날 미리 feeder cell을 배양한 96 well microplate에 분주하였다. Cloning 2~3일 후 도립현미경 (Nikon, FX-35WA)으로 1개의 융합세포군이 형성된 well을 확인하였다. Cloning 10~14일 후 단클론이 형성된 well 중 충분히 자란 clone을 선택하고 간접 형광항체 반응법으로 항체생성 여부를 확인하였다. 양성인 well은 24 well plate에 옮겨 증식시켰다. 이때의 배양 상층액을 IBDV 특성 및 정상 조사에 사용하였다. 마우스에서 복수생산은 융합세포 접종 14일전에 incomplete Freund's adjuvant (Gibco)를 0.1ml씩 접종하여 감각시킨 BALB/C 마우스에 106개 이상의 세포를 접종하여 복수를 생산하였다 (Jones 등, 1990)

바. Western blotting에 의한 단클론성 항체의 반응성 조사

Western blot에 의한 단클론성 항체의 반응성 조사에 사용한 바이러스는 분리주 SNU9423과 SNU91108였다. 분리주 SNU91108은 40% BF유제액을 분리주 SNU9423과 동일한 방법으로 정제하였으며 TNE buffer에 처음 양의 1/100로 재부유하여 사용하였다 [ 3-1) 마우스 면역용 바이러스 및 정제 참조 ]. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 reduced condition에서 실시하였다. 즉 정제된 바이러스를 5 $\times$  sample buffer (60mM Tris-HCl, 2% SDS, 14mM

농산경영과	한태희	○(13.12)	○(13.12)
-------	-----	----------	----------

2-mercaptoethanol, 25% glycerol, 0.1% bromophenol blue)와 1:4의 비율로 혼합하여 100°C에서 5분간 끓인 후 1.5mm 두께의 12% polyacrylamide 겔에 얹고 20mA로 bromophenol blue가 바닥에서 0.5~1.0cm까지 도달할 때까지 전기영동하였다. 사용한 protein molecular markers는 protein molecular weight standards, high range (SIGMA)이었다. 전기영동한 겔을 nitrocellulose (NC) paper (Whatman)에 150mA에서 16시간 전이시켰다. 전이시킨 NC paper를 Ponceau S 염색용액 (0.2% Ponceau S, 3% trichloroacetic acid, 3% sulfosalicylic acid)으로 염색하여 바이러스 구조 단백질을 확인하여 pin으로 표시한 후, TBS (2M Tris-HCl pH 7.5, 4M NaCl)buffer로 탈 염색하였다.

준비된 NC paper를 Vectastain ABC kit (Vector, U.S.A.)으로 다음과 같은 과정으로 처리하여 전이된 단백질과 단클론성 항체와의 반응성을 조사하였다. 먼저 3% 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA)으로 30분 동안 blocking 한 후 Tris-Tween-buffered saline (TTBS: 20mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)으로 조심스럽게 흔들면서 3회 세척하였다. 이것을 0.5% BSA로 1:4로 희석한 단클론 항체 (융합세포 상층액)와 실온에서 40분간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세척하였다. 그 후 biotinylated horse anti-mouse IgG를 1/200배 희석하여 실온에서 40분간 반응시키고 TTBS로 3회 세척하였다. 반응 30분전에 만든 avidin과 biotinylated HRP enzyme 혼합액을 넣고 실온에서 40분간 반응하였다. 반응 후 TTBS로 3회 세척하여 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 4~5분간 발색한 후 TBS buffer로 세척하여 단클론성 항체와 반응하는 IBDV 구성 단백질을 확인하였다.

#### 사. 복수 생산 및 항체 정제

복수를 생산하기 위하여 BALB/C 마우스에 incomplete Freund's incomplete adjuvant 0.1 ml씩을 접종하고 2주 후에 하이브리도마 세포를 마리당 106 cell씩 접종하여 복수를 수확하였다. 수확한 복수는 부피를 측정하여 포화 황산암모늄이 50%가 되도록 교반하며 단계적으로 첨가하였으며, 4°C에서 6시간 동안 정치한 후 3,000g로 30분간 원심하여 상층액을 제거하고, 초기 복수의 1/5양의 인산완충용액에 부유하였으며, 투석용 튜브에 넣어 충분한 양의 10mM Tris (pH8.5)로 3회 투석하였다. 전처리 한 DEAE-sephadex를 충전한 컬럼에 로딩하여 컬럼을 통과시키고, 겔의 10배 부피의 10mM Tris (pH8.5)로 세척한 후 컬럼 부피의 3배에 해당하는 50mM NaCl (in 10mM Tris), 100mM NaCl, 200mM NaCl, 300mM NaCl을 컬럼에 단계적으로 흘려보내면서 분획을 채취하였으며, SDS-PAGE 한후 Coomassie

농산경영과	한태희	○(13.12)	○(13.12)
-------	-----	----------	----------

brilliant blue 염색약으로 겔을 염색하여 25KDa과 55KDa 위치의 밴드를 확인하여 항체 분획을 선별하였다.

### 10. 야외분리 IBDV의 유전자 염기서열 분석

이미 발표된 IBDV STC strain의 염기서열을 바탕으로 VP2 gene의 hypervariable region을 특이적으로 증폭시킬 수 있도록 2쌍의 primer를 합성하였다 (Table 1-3). Primer P3/P4는 nested PCR용으로 제작하였다.

Table 1-3. Oligonucleotide sequences of primers

Primer	Sequences	Locations	Size(bp)
P1	5' -TCACCGTCCTCAGCTTAC-3'	587-604	643
P2	5' -TCAGGATTTGGGATCAGC-3'	1212-1229	
P3	5' -GCCCAGAGTCTACACCATAACTGC-3'	703-726	491
P4	5' -GCGACCGTAACGACAGATCC-3'	1174-1193	

IBDV 감염 BF 유체액으로부터 Chomczynski(1993)의 방법에 따라 RNA를 추출하고 random primer와 Superscript II reverse transcriptase를 첨가하여 25°C 10분, 42°C 50분, 70°C 15분의 cycle로 cDNA를 합성하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다. 합성한 cDNA를 template로 하여 Taq-polymerase, dNTPs, primer P1, P2 첨가한 후 Thermal Cycler에서 94°C 45초, 55°C 30초, 72°C 30초간의 과정을 30회 반복한 후 72°C에서 10분간 반응시켰다. Nested PCR은 상기 1차 PCR product를 template로 하여 primer P3, P4를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 실시하였다. PCR product를 ethanol로 정제하고 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit를 이용하여 96°C 10초, 55°C 5초, 60°C 30초의 과정을 25회 반복하였다. PCR product의 전기영동 및 염기서열 결정은 ABI Primism 377과 염기서열 분석 프로그램 버전 1.01을 사용하였으며, GeneBank 데이터 베이스에 등록된 염기서열과 다중 배열한 상동성은 MegAlign 패키지를 이용하였다. 염기서열을 바탕으로 한 Phylogenetic tree 는 Jukes Cantor distance method와 pairwise deletion에 기초하여 MEGA 프로그램을 사용하였으며, Bootstrap 분석은 100회 반복하였다.

## 11. Competitive ELISA

### 가. 바이러스 항원 분리정제

증균한 바이러스를 5,000g에서 30분간 원심한 후 상층액을 수확하였고, 상층액에 NaCl 2.2% (w/v)와 PEG (polyethylene glycol, MW 4,000, Fluka, Switzerland) 5%가 되도록 첨가하여 4°C에서 2-4시간 교반하였으며 침전물을 3,000g에서 20분간 원심하여 수확한 후 TNE 완충용액 (Tris-HCl, 0.01M, NaCl, 0.1M, EDTA, 0.001M)에 부유하였다. 부유액에 동일한 양의 trichloro-trifluoroethane (Freon, Sigma, USA)을 첨가하여 강하게 교반하여 균질화 하였으며 4°C, 5,000g에서 15분간 원심하여 유기용매층과 수용액층을 분리하였다. 수용액층을 수확하여 동일한 양의 Freon을 첨가하여 교반한 후 수용액층을 수확하였고, 비연속 유당 농도구배 (60%와 30%)에 로딩하여 40,000rpm으로 4°C에서 4시간 초원심분리 하였으며 30%와 60% 유당 사이에 형성된 바이러스 층을 수확하여 TNE 완충용액에 대해 투석하였다.

### 나. 단백질 (정제 항원 및 항체) 정량

BSA (0.1mg/ml) 표준용액 및 정제항원 및 항체용액 100 $\mu$ l에 Bradford 시약 (Bio-Rad) 1ml를 첨가하여 교반한 후 10분 후 OD595에서 흡광도를 측정하여 정제 항원 및 항체의 농도를 측정하였다.

### 다. 항체의 바이오티닐화

0.1M sodium carbonate 완충용액 (pH9.0)에 투석한 항체 농도를 10mg/ml로 조정 한 후 0.1M (34mg/ml) N-hydroxy-succinimido-biotin (in 25% N'-N'-dimethylformamide) 용액 228 $\mu$ l에 항체 1ml를 첨가하여 실온에서 3-4시간 배양한 후 인산완충용액 (pH7.4)으로 투석하였다.

### 라. 항원 코팅

96-well plate (polyvinylchloride)에 웰당 50 $\mu$ l의 항원 (20 $\mu$ g/ml, 인산완충용액, pH7.4)을 첨가하고, 37°C에서 2시간 정치한 후 항원용액을 96-well plate로부터 제거한 후 블로킹 용액 (3% BSA, PBS, pH7.4) 150 $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 1시간 정치하였다.

### 마. Competitive ELISA

각 바이러스의 항혈청을 바이러스 코팅된 96-well plate에 웰당 10진 희석하여 100 $\mu$ l씩 분주하고, 항원이 코팅되지 않은 대조웰에는 블로킹 용액 100 $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨다. 항혈청 및 블로킹 용액을 제거한후 인산완충용액 200 $\mu$ l로 가볍게 웰을 세척한 후 바이오티닐화된 단클론항체 100 $\mu$ l를 항혈청이 처리되지 않은 항원 코팅된 웰, 항혈청이 처리된 항원 코팅된 웰 및 대조웰에 분주하여 실온에서 1시간 정치한 후 제거하며 인산완충용액으로 가볍게 3회 세척하였다. streptoavidin-HRP 접합 용액 100 $\mu$ l를 처리하여 실온에서 1시간 반응한 후 인산완충용액으로 3회 세척하며 기질용액 (DAB + 50mM TE buffer, pH8.0, 30% Hydrogen peroxide) 100 $\mu$ l를 첨가하여 15-20분간 발색하였으며 흡광도를 측정하였고, 아래 식에 의해 경쟁정도를 산출하였다.

$$\% \text{ Competition} = \frac{A_v - A_p}{A_v - A_c} \times 100$$

Av: Absorbance for the binding of each conjugate dilution to viral antigen in the absence of competing antibody

Ac: Absorbance for the binding of each conjugate dilution to control antigen in the absence of competing antibody

Ap: Absorbance for the binding of each conjugate dilution to viral antigen in the presence of competing antibody

## 12. 용혈시험

IBDV의 병원성에 따른 용혈능과 혈액상 변화의 차이를 알아보려고 28일령의 SPF 병아리를 4개군으로 나눠 강병원성 IBDV로 국내 분리주 SNU97-50 및 SNU99-60을 수당 1,000EID50씩 구강으로, 약병원성 백신주로는 Bursine-2 및 IBDL을 수당 1 dose씩 점안으로 각각 접종한 후, 접종 3-10일 사이의 BF 유제액에 대한 용혈 역가와 혈액의 PCV와 ESR을 조사하였다. 통계처리는 Microcal origin software(Ver 5.0)를 사용하여 Student's t test를 실시하여 유의성을 검정하였다.

## 13. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)에 의한 감별진단

Nested PCR 증폭 산물을 염기서열을 참조로 선택한 BstNI, StyI 제한효소(Stratagene,



U.S.A.)를 사용하여 제조사가 제시한 조건에 따라 처리하였다. 소화된 산물은 12%의 polyacrylamide gel에서 전기영동 후 silver stain으로 염색하여 관찰하였다.

## 제 2 절

### 제 2 세부과제: 급성 전염성낭병의 사망기전 규명과 대증치료 법 개발

#### 1. SPF 병아리의 생산, 사육 및 관리

Sun Rise Farms Inc. (Catskill, N.Y., U.S.A.)에서 공급하는 SPF (specific pathogen free) 종란을 실험실에서 부화하면서 사용하였다. 부화한 병아리는 여과된 공기가 양압으로 유지되는 isolator에서 사육하면서 시험에 사용하였다.

#### 2. IBD 바이러스 (IBDV)의 준비

IBDV SNU 91108주를 비롯한 국내 계군에서 분리한 IBDV 총 29주를 사용하였으며 IBDV reference virus로는 세포배양에 적응된 Lukert, SAL, D78 및 S706 strain을 사용하였다. 모든 국내분리 IBDV는 4~5주령의 SPF (specific pathogen free) 닭에 점안으로 접종하고 접종 4~5일 후 죽거나 증상을 보이는 닭으로부터 bursa of Fabricius (BF)를 채취하여 PBS (pH 7.2)에 20% (w/v) 유제액을 만들어 -70° C보관하면서 시험에 사용하였다.

야외 계군에서의 IBDV 분리 및 seed virus의 작성: IBD의 전형적인 증상이나 소견을 보이는 야외 계군으로부터 F낭 (bursa of Fabricius)을 채취하여 IBDV 분리용 재료로 사용하였다. F낭 유제액을 28~39일령의 SPF 닭 4~6수에 점안으로 접종하고 접종 2~4일째 죽은 닭으로부터 채취한 F낭과 죽지 않는 경우 접종 4일째 희생시켜 채취한 F낭을 PBS (pH 7.2)에 20% (w/v) 농도로 유제하여 -70° C에 보관하면서 seed virus로 사용하였다.

#### 3. 야외분리 IBDV의 SPF 닭에 대한 병원성 시험

야외분리 IBDV seed virus를 1/1000로 희석하여 28일령의 SPF 닭에 수당 100 µl씩, 분리주별로 14~20수씩 점안으로 접종하였다. 접종한 닭은 분리주별로 별도의 isolator에 사육

하면서 14일간 폐사율을 조사하였다.

#### 4. Bursa/Body weight ratio 측정

시험기간 중 폐사한 모든 닭과 관찰기간 종료 후 생존한 닭은 희생시켜 B/B [bursa weight (mg)/body weight(g)] ratio를 조사하였다.

#### 5. 나이 및 품종별 감수성 조사

나이에 따른 IBDV에 대한 감수성 시험은 SPF 닭을 1주 간격으로 6회 부화한 후 처음 부화한 닭이 6주령이 됐을 때 IBDV 분리주 SNU 91108 seed virus를 1/10로 희석하여 점안으로 접종하고 (100  $\mu$ l/수) 14일간 폐사율을 조사하였다. 품종별 감수성 시험에는 부화장에서 분양받은 갈색 산란계 수평아리 (Hyline Brown)와 브로일러 병아리 (Arbor Acres)를 시험에 사용하였다. 갈색 산란계와 브로일러의 사육 과 IBDV에 대한 감수성 시험은 SPF 병아리와 같은 방법으로 수행하였으며 접종 전 채혈한 혈청을 대상으로 중화시험을 수행하여 IBDV에 대한 항체 (모체이행항체)가 없음을 확인하였다.

#### 6. 염증반응 조사

시험 1: 32일령 SPF 닭 40수에 IBDV 야외분리주 SNU 1030주 seed virus를 10(-1)으로 희석하여 수당 100  $\mu$ l씩 점안으로 접종하였다. 접종 후 14일까지 경시적으로 체온을 측정하고 폐사계와 더불어 5수씩 희생시켜 B/B ratio를 조사하였다.

체온은 개체 표시를 한 10수를 대상으로 오전과 오후의 같은 시각에 digital thermometer (Agri-Pro Enterprises of Iowa, Inc, Iowa Falls, IA, U.S.A.)를 사용하여 직장에서 측정하였다. 개체 표시한 닭이 죽은 경우에는 추가적으로 표시하여 동일한 개체를 측정하도록 하였다.

시험 2: 실험실에서 사육한 39일령 갈색 산란계 수평아리 (Hyline Brown) 45수를 IBDV 야외분리주 SNU 9818주 seed virus를 10(-5)으로 희석하여 수당 1 ml씩 구강으로 접종하였다. 접종 후 14일까지 경시적으로 폐사한 닭이나 희생시킨 닭을 대상으로 B/B ratio, S/B (spleen/body weight) ratio, L/B (liver/body weight) ratio, packed cell volume (PCV) 및 erythrocyte sedimentation rate (ESR)를 측정하였다. Packed cell volume (PCV)은 heparin 처리된 micro-hematocrit tube에 혈액을 담아 5,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 측정하였다. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) 측정은 75x1 mm micro-hematocrit tube에 60

mm 높이까지 혈액을 채워 실온에서 2시간 동안 수직으로 세워 둔 후 판독하였다. ESR값은 전체 volume당 cell-free volume의 %로 표시하였다.

#### 7. Packed cell volume(PCV) 및 erythrocyte sedimentation rate(ESR) 측정

PCV는 항응고제인 heparin이 처리된 microhaematocrit tube에 혈액을 받아 즉시 5000rpm에서 15분간 원심한 후 측정하였다. ESR은 Jain과 Kono의 방법(1975)에 따라 채혈한 후 75x1mm microhaematocrit tube에 약 60 mm<sup>3</sup>까지 채워 실온에서 2시간 동안 수직으로 세워둔 후 판독하였다. ESR 값은 전체 volume당 cell-free volume의 %로 표시하였다.

#### 8. 혈액의 NO 농도 측정

Nitric oxide는 생성된 후에 nitrite(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 또는 nitrate(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)의 형태로 혈액 내에 존재하게 된다. 따라서, 이와 같은 NO 생성에 따른 부산물을 측정함으로써 간접적으로 혈액내에서의 NO 농도를 측정할 수 있다. NO 농도를 측정하는 보편적인 방법인 Griess reaction은 시료내의 nitrite만을 측정할 수 있기 때문에 시료내의 nitrate를 모두 nitrite로 변환하는 과정이 필요하다. Nitrate reductase 효소를 이용하여 nitrate를 nitrite로 변환한 뒤에 nitrite의 농도를 측정함으로써 혈액내의 nitric oxide의 생성량을 추정할 수 있다. NO측정은 Stressgen Bioreagent의 Nitric Oxide (total) Detection Kit (Cat. No. EKS-310)을 이용하였으며, 간략한 실험절차는 다음과 같다. 100 µL의 혈장시료에 50 µL의 nitrate reductase enzyme과 50 µL의 NADH를 첨가한 후 37°C에서 30분간 incubation 한다. Incubation이 끝난 후 20 µL의 Zinc sulfate (300g/L)를 첨가하고, 10,000g에서 5분간 원심분리하여 deproteinization한다. 200 µL의 상층액을 따내어 tube에 옮긴 후 100 µL의 Griess reagent I 과 100 µL의 Griess reagent II를 첨가하여 발색시킨다. 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

#### 9. 혈액의 corticosterone 농도 측정

혈액내의 corticosterone의 농도는 전남대 호르몬 센터에 분석을 의뢰하였으며, RIA 방법을 이용하여 혈액 내의 corticosterone 농도를 측정하였다.

## 10. IBDV 접종계에서 약물이 닭의 생존율에 미치는 영향 조사

8-9주령의 닭에 IBD 바이러스를 접종한 후 각각의 약물이 닭의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 IBD 발병시 발열 및 창백한 피부 등 닭의 사망기전과 관련 있다고 생각되는 약물을 투여하여 바이러스 접종 후 이러한 약물이 닭의 폐사율을 감소시킬 수 있는지의 여부를 조사하였다. 바이러스 접종 실험은 IBDV 접종 후 약물을 투여하면서 접종 후 6일까지 약물을 투여하면서 약물 투여군과 대조군에서 닭의 폐사율을 비교하였다. 접종 실험은 2회에 걸쳐 반복하였으며, 실험기간동안 매일 닭의 체온을 측정하고 혈액을 채취를 실시하였다. 투여한 약물 및 실험군의 설정은 다음과 같다.

### <1차 접종 실험>

- 1) Normal Control: 무접종/무투약 (9마리)
- 2) Virus 접종군: 바이러스는 접종하지만 약물은 투약하지 않음. (10마리)
- 3) Selenium/Vit.E 투여군 (9마리): Vitamin E 300 mg/kg of diet, Selenium 0.2 mg/kg of diet. IBD 바이러스 접종 일주일 전부터 사료에 섞어서 급여  
(근거: Likoff et al., 1981; Avanzo et al., 2001; Sahin et al., 2002a,b; 용량: 설명서)
- 4) Dexamethasone 투여군 (10마리): Dexamethasone 2 mg/kg을 1일 1회 근육내 투여함.  
(근거: Tatro, 2000; Chai et al., 1996; 근거/용량 Veterinary Drug Handbook)
- 5) Aspirin 투여군 (10마리): Sodium Salicylate 1.25g/L을 음수에 섞어 투여  
(근거: Likoff et al., 1981; Stillborn et al., 1988; Baert & De Backer, 2002)
- 6) S-methylisothiurea (SMT) 투여군 (10마리): SMT 10 mg/kg을 1일 1회 근육내 투여함.  
(근거: Kitaichi et al., 1999)

### <2차 접종 실험>

- 1) 대조군 1 : 무접종/무투약 (10마리)
- 2) 대조군 2 : 바이러스는 접종하지만 약물은 투약하지 않음. (17마리)
- 3) Dexamethasone 투여군 (17마리): Dexamethasone 2 mg/kg을 1일 1회 근육내 투여함.
- 4) Glucocorticoid receptor blocker (RU-486) + Dexamethasone 투여군: Dexamethasone 투여 (2 mg/kg) 30분 전에 RU-486 20 mg/kg을 근육내로 투여  
(근거: Katzung, 2004)

### 제 3 절

#### 협동과제: 전염성낭병의 유전자 재조합 백신 개발

##### 1. 사용한 IBD virus(IBDV), Baculovirus 세포주의 배양 및 배양조건, 항체

본 연구에서 사용한 바이러스 및 백신 주는 표 3-1과 같다.

Table 3-1. Korean isolates and vaccine strains used in this study

Strain	Virulence	Description and origin
SH92	VV	Korean isolate (국립수의과학검역원)
1030	VV	Korean isolate (서울대학교 수의과 대학)
Blen	A	Merial Select Inc. USA
Bur706	A	Merial, France
Bursine plus	I plus	Fort Dodge Animal Health, USA
Bursine 2	I	Fort Dodge Animal Health, USA
Cevac	I plus	Sanofi

VV, very virulent; A, attenuated; I, intermediate

Baculovirus expression system은 Clontech과 Invitrogen회사에서 판매하는 baculovirus expression vector system을 이용하였으며 제조회사내에서 제공하는 방법에 준하여 실시하였다. Baculovirus의 배양은 Sf9과 Sf21 cell을 사용하였다. 세포의 배양은 Grace's insect medium (GibcoBRL)에 1%의 항생제 (GibcoBRL), 10% FBS (GibcoBRL)을 첨가한 growth medium을 사용하였고, 27°C에서 배양하였으며, cell monolayer의 형성이 95%정도일 때 계대 배양하였다.

사용한 혈청은 IBD에 감염되어 회복한 계군에서 채혈한 혈청과 일부 감염시킨 후 사용한 혈청을 사용하였으면 단크론항체는 국립수의과학검역원 조류질병과에서 분양받은 3가지 종류의 단크론항체 (92-38, 149-32, 104-11)를 사용하였다.

## 2. IBDV RNA의 분리 정제

IBDV의 국내 분리주와 백신주에서 RNA를 분리하였다. RNA 분리와 정제는 여러 가지 분리 방법을 시도하여 수많은 시행착오를 거듭한 끝에 Kwon 등이 보고한 RNaid kit (BIO101)를 사용하여 제공된 실험방법에 따라 시행하였다. IBDV sample과 동량의 chloroform을 넣고 상하로 흔들며 5회 혼합한 후, 12000rpm에서 2분간 원심을 돌린 후, 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 여기에 sodium dodecyl sulfate (SDS, final concentration 2% wt/vol) 와 proteinase K (final concentration 250 $\mu$ g/ml)를 첨가한 후 55 $^{\circ}$ C에서 5min간 반응시킨 후 acid phenol(pH 4.0) : chloroform : isoamyl alcohol(49:1)로 추출하였다. 추출된 RNA는 RNaid kit (BIO101)를 사용하여 제공된 실험방법에 따라 시행하였다. 분리된 RNA는 3배의 absolute ethanol과 섞은 후 -70 $^{\circ}$ C에서 3~4시간 혹은 overnight동안 정치시킨 후, 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm으로 25분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 침전된 RNA pellet은 병-neck의 1ml의 70% ethanol로 세척한 후 Speed-Vac에서 건조시킨 후 90% DMSO로 용해시켰다. 분리된 RNA를 98 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리 후, 즉시 얼음에서 2분 이상 처리하여 double-strand RNA virus를 predenaturation시킨 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관하여 PCR의 template로 사용하였다.

## 3. RT-PCR을 이용한 IBDV의 증폭 및 확인

### 가. Primer의 제작

본 연구에서 사용했던 primer는 표 3-2와 같다. IBDV 표준주(STC)의 염기서열과 VP2 유전자와 segA(VP2-VP4-VP3)유전자에 알맞은 forward, reverse primer를 제작하였다. 특히 Baculovirus transfer vector인 pBacPAK8에 사용할 것을 고려하여 VP2유전자의 Forward primer에는 *KpnI* restriction site를 reverse primer에는 *EcoRI* site를 삽입하여 제작하였다. 그리고 segA 유전자의 Forward primer에는 *KpnI* restriction site를 reverse primer에는 *NotI* site를 삽입하여 제작하였다.

Table 3-2. Oligonucleotide sequences used in RT-PCR

Primer	Oligonucleotide sequences	Description
IBDVP2-F1	5'-AGCTGGTACCAATGACAAACCTG-3'	VP2와 segA의 증폭을 위한 forwarding sequence ( <i>KpnI</i> site)
IBDVP2-F2	5'-ATATGGTACCAAACGATCGCAGCGATGACAAAC-3'	VP2와 segA의 증폭을 위한 forwarding sequence ( <i>KpnI</i> site)
IBDVP2-R1	5'-GACTGAATTC TCAGCTTTTCCTGA-3'	VP2의 증폭을 위한 reverse sequence ( <i>EcoRI</i> site)
IBDVP2-R2	5'-GACTGAATTC TCATGCTCTTGCTTTTCCTGACG-3'	VP2의 증폭을 위한 reverse sequence ( <i>EcoRI</i> site)
IBDSegA-R1	5'-TAAGCGGCCGCTTTGGGATGTTGT-3'	SegA의 증폭을 위한 reverse sequence ( <i>NotI</i> site)
IBDSegA-R2	5'-ATTAGCGGCCGCAATTTGGGATGTTGTAAGG-3'	SegA의 증폭을 위한 reverse sequence ( <i>NotI</i> site)

나. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) 및 PCR 생성물 확인

분리된 RNA 5 $\mu$ l에 Random primers 1 $\mu$ l, 0.5mM deoxynucleotide triphosphate(dNTP), 그리고 DDW 5 $\mu$ l을 넣고 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후, 5X buffer, 0.005M DTT, 40U의 RNasin을 넣고 25 $^{\circ}$ C에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시켰다. 200U의 Superscript<sup>TM</sup>II RNase H<sup>-</sup>RT를 넣고 42 $^{\circ}$ C에서 50분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분 반응시킨 후 2U의 Ribonuclease H를 37 $^{\circ}$ C에서 20분, 85 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 시켜 IBVD의 cDNA를 합성하였다.

PCR은 total volume 50 $\mu$ l로 하여 10X PCR buffer 5 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, dNTP 0.4mM, primers 20 pmole, 2U Expand High Fidelity PCR Taq polymerase (Roche), template DNA를 VP2를 증폭시에는 3 $\mu$ l를, SegA 증폭시에는 template DNA를 5 $\mu$ l를 첨가한 후 초기 denaturation은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간하였고, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 51 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간의 amplification을 35회 반복한 후, final extention을 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응시켰다. 단 SegA 증폭시에는 extention을 68 $^{\circ}$ C에서 4분간, 그리고 총 amplification을 37회 반복하였고 final extension역시 68 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켰다. 증폭된 PCR 생성물은 ethidium bromide를 함유한 1% agarose gel에서 전기영동한 후 관찰하였으며  $\lambda$ HindIII ladder(GibcoBRL)를 marker로 사용하였다.

#### 4. VP2 유전자와 SegA 유전자의 baculovirus transfer vector로의 cloning

진술한 바와 같이 RT-PCR에 의해 증폭된 VP2 및 SegA 유전자를 1% agarose gel에서 전기영동한 후 gel상에 나타난 band를 따라 절단한 후 GeneClean turbo kit(BIO 101, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 증폭된 VP2 유전자의 염기서열을 확인하기 위하여 PCR 2.1 TOPO vector system을 이용하여 cloning한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 분석한 후 PCR 2.1 TOPO vector에 삽입된 VP2 또는 segA 유전자를 *KpnI*과 *EcoR I* 제한효소로 처리한 후 동일한 제한 효소로 처리된 pBacPAK8 vector에 cloning하였다. 정확히 cloning된 plasmid를 QIAfilter™ Plasmid Maxi kit를 이용하여 Recombinant Plasmid DNA를 대량으로 확보하였으며, Plasmid DNA의 농도를 알기 위하여  $\lambda$ HindIII와 함께 전기영동하여 density를 비교한 후 transfection의 재료로 사용하였다. 또한 정확히 삽입되었는지를 분석하기 위해 염기서열을 분석하였다.

#### 5. Baculovirus system에서의 VP2와 segA 유전자 발현

##### 가. Sf 21 cell의 배양

Transfection과 plaque assay등을 위하여 Grace's insect medium 배지(GibcoBRL)를 사용하여 27°C에서 Sf 21 cell을 배양하였다.

##### 나. Cotransfection

Sf 21 cell을 3개의 60mm tissue culture plate에 cell density가 50-70%가 되도록 각각  $2 \times 10^6$ 개씩 준비하였다. 그리고 Recombinant Plasmid DNA  $16 \mu\text{l}$  ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $>4 \mu\text{g}$ )와 linear AcMNPV(Bac-N-Blue™ linear transfection kit ; invitrogen) DNA  $10 \mu\text{l}$ , Grace's insect medium(without FBS) 1ml, cellfectin® Reagent(mix well before use and always add last) 20ul를 microcentrifuge tube에 넣고 10초 동안 섞은 뒤 15분간 정치시켰다. 한편 transfection시킬 tissue culture plate에 있는 배지를 버리고 Grace's insect medium(without FBS)로 3번 세척하였다. 위에서 microcentrifuge tube에 담겨 있는 혼합물을 transfection plate에 한 방울씩 떨어뜨리면서 3~5방울마다 가볍게 흔들면서 골고루 섞이도록 하였다. Transfection 시킨 후 4시간 후에 새로운 배지로 갈아주었다. negative control로는 바이러스를 접종하지 않은 세포를, positive control로는 Wild-type AcMNPV virus를  $10 \mu\text{l}$  접종하여 주었다. 27°C의 조건에서 4일간 배양하여 현미경하에서 transfection된 plate의 cell의 morphology와 positive control/negative control의 morphology를 비교하여 바이러스의 증식



유무를 확인하였다. Fig. 3-1은 VP2와 segA 유전자 재조합 단백질의 발현을 도식화한 그림이다.

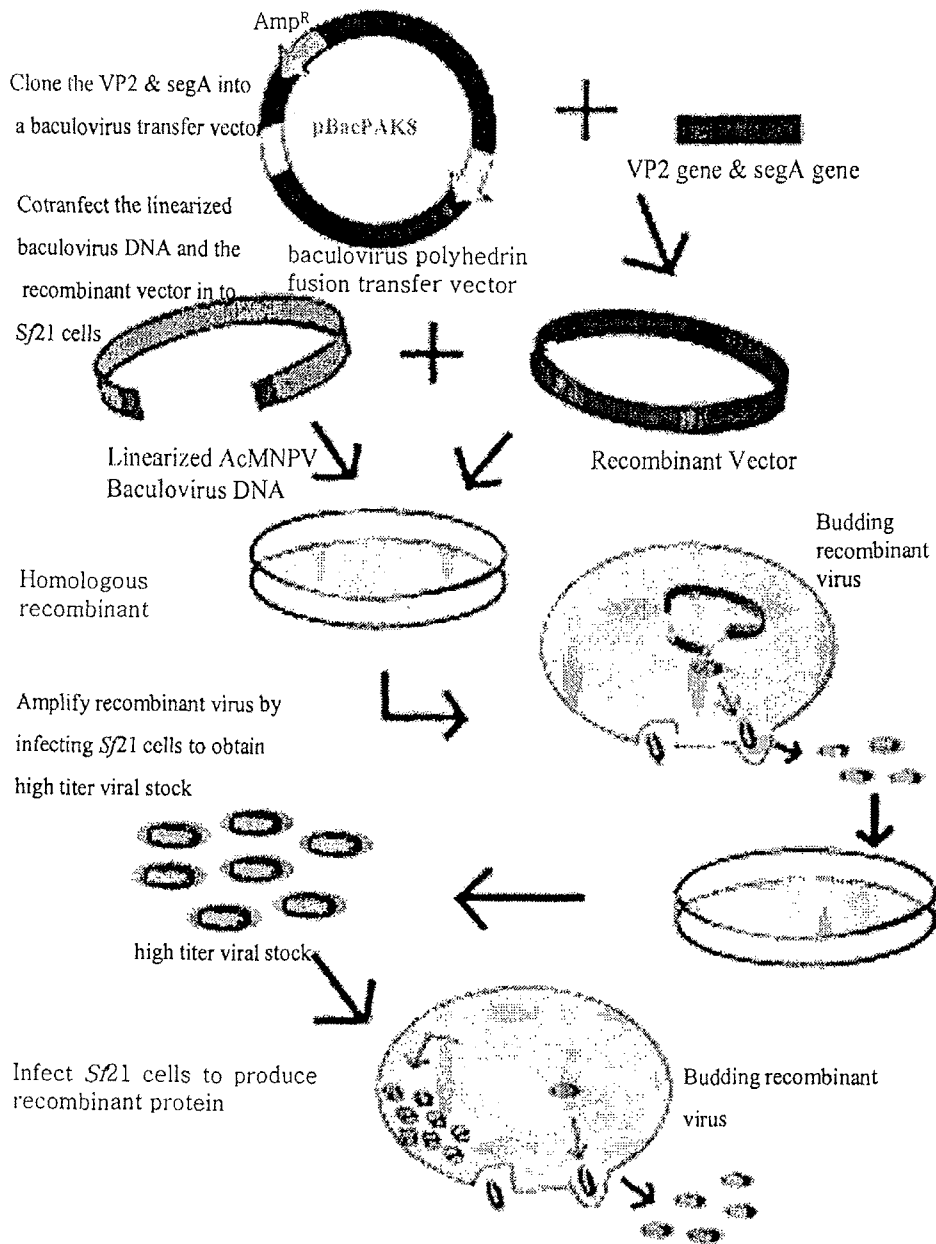


Fig. 3-1. Flow-diagram of generation of recombinant baculovirus containing VP2 & segA gene.

## 6. 발현된 단백질의 확인

가. SDS-PAGE & Western blot hybridization을 통한 발현단백질의 분석

Transfection 후 세포변성효과 (CPE)가 확인되면 세포배양액을 수확한 후 원심분리에 의해 세포와 상층액을 분리한 후 SDS-PAGE와 Western hybridization으로 발현된 단백질의 유무를 확인하였다.

발현된 단백질을 보다 쉽게 확인하기 위하여 바이러스를 대량 배양하기 위해 2개의 F150 flask에 Sf21 cell을 배양시킨 후 80% confluency를 보인 시점에서 recombinant VP2 virus와 recombinant segA virus를 감염시킨 후 27°C에서 배양시킨 후 4일째에 수확하였다.

발현된 단백질의 생성유무를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 이용하였다. 세포 및 상층액을 분리한 후 세포의 경우 PBS로 2회 세척한 후 1/10 농축한 후 sonication하였다. 각각의 sample은 3× SDS-PAGE loading buffer과 혼합한 후 100°C에서 5분간 끓인 후 전기영동을 실시하였다. 또한 recombinant VP2와 recombinant segA의 특이적인 band를 관찰하기 위해 Western hybridization을 실시하였다. Negative control로 BacPAK6 virus를 사용하였다. 전기영동 후 gel을 nitrocellulose membrane으로 blotting한 후 단백질이 membrane에 흡착되었는지를 PonceusS로 염색하였다. 탈색시킨 후 membrane을 blocking시켰다. 일차 항체로는 단클론 항체 (100배 희석)와 polyclonal antibody(1000배 희석)를 사용하였다.. Membrane에서의 band의 검출을 위해 사용한 2차 항체로는 HRP-conjugated anti mouse IgG(whole molecule), 또는 anti-chicken IgG(whole molecule)를 사용하였으며 membrane를 세척한 후 4-chloro-1-naptol을 첨가하여 검출하였다.

나. Fluorescent antibody (FA) 기법에 의한 발현 단백질의 분석

6 well plate에 멸균된 cover glass를 well당 한 개씩 배분한 후, F75 flask에 자란 Sf21 세포를 수확하여 각 well당 Sf21 세포를  $2.5 \times 10^5$ /2ml 정도로 분주하였다. 27°C에서 2시간 배양한 후 media를 제거한 후 10배 희석한 재조합 baculovirus (VP2, SegA) 각 well당 접종한 후 상온에서 1시간 흡착시켰다. Table 2와 같이 각 well에 접종한 후 상온에서 1시간 흡착시켰다. 이때 음성 대조군으로는 배지만을 첨가하여 흡착시켰다. 바이러스액을 제거한 후 각 well당 2ml의 Grace medium을 분주한 후 27°C에서 3-4일 배양하면서 CPE를 관찰하였다. CPE가 관찰되는 시점에서 Sf21 cell을 FA염색을 실시하였다. 우선 세포가 떨어져지 않도록 배지를 제거한 후 상온에서 20분간 건조시켜 완전히 습기를 제거하고 빙냉의 100% methanol로 10분간 실온에서 고정시켰다. Methanol을 제거한 후 공기 건조시킨 뒤

PBS로 500배-1000배 희석한 IBDV 단크론항체 및 양성항체를 well당 1ml씩 떨어뜨린 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 일차 항체를 제거하기 위하여 PBS로 3-5회 세척한 후 PBS로 500배-1000배로 희석한 anti-mouse IgG-FITC conjugate 또는 anti-chicken IgG-FITC conjugate를 커버 글래스 위에 1ml씩 떨어뜨린 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이차 항체를 제거하기 위해 PBS로 커버 글래스를 3-5회 세척한 후 용액을 완전히 제거한 후 커버 글래스에 mounting buffer를 떨어뜨린 후 슬라이드에 올려놓고 confocal 형광현미경으로 촬영을 하였다.

다. Dot blot hybridization을 이용한 배양시간 경과에 따른 발현 단백질의 분석

배양시간에 따른 재조합 단백질의 발현 정도를 관찰하기 위해 dot blot hybridization을 실시하였다. VP2와 SegA유전자가 존재하는 baculovirus를 6 well plate에서 증식한 Sf21 cell에 접종한 후 1, 2, 3, 4일간 배양한 후 각 well에 있는 세포를 수거하였다. 수확한 상층액과 세포를 수확한 후 3000rpm에서 10min동안 원심분리 한 뒤 cell을 수거 한 후 0.5ml의 PBS(0.15M, pH 7.2)로 부유시킨 후 얼음에 방치한 상태에서 sonication(power lever between 4-6, 1min/번, 3번)을 실시하였다. 각각의 cell lysate를 dot blotter를 이용하여 nitrocellulose membrane에 흡착시킨 후 western hybridization과 동일한 방법으로 실시하였다.

## 7. Plaque assay

Transfection후 바이러스의 생성이 확인되면 VP2와 segA유전자를 발현하는 recombinant 바이러스의 역가와 재조합 바이러스의 순수 분리를 위해 Plaque assay를 실시하였다.

본 실험을 위하여 3개의 60mm tissue culture plate에 Sf 21 cell을 각각  $3 \times 10^6$  cell을 분주하고 Viral transfection supernatant를  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ 으로 희석하여 0.5ml씩 접종하였다. 이 때 negative control에는 바이러스를 접종하지 않은 배지를 0.5ml 접종한 후 27°C에서 1시간동안 흡착시켰다. Agarplaque plus<sup>TM</sup> agarose를 Protein-free medium에 2%로 만들어 microwave에서 녹인 후 45°C의 water-bath에서 정치시키고 동량의 Grace's insect medium(50mg/ml X-gal 포함, 2% agarose를 섞고 나서 최종농도가  $12 \mu\text{l}/\text{ml}$ 이 되도록)과 섞어서 최종적으로 1%의 agarose가 되게 하였다. plate에서 배지를 완전히 제거한 후에 앞에서 준비한 agarose gel을 cell위에 overlay한 뒤 Agarose가 다 덮이면 1.5ml의 BacPAK Complete Medium을 agar위에 분주하여 배지가 건조하는 것을 방지 하였다. 27°C

에서 4-5일 동안 배양한 후 파란색의 plaque가 관찰되면 neutral red로 염색하였다. Neutral red를 PBS에 녹여 0.03%로 희석한 후(1ml of 0.33% [w/v] neutral red solution + 10ml of PBS). 0.03% neutral red solution을 well에 분주한 후 27°C에서 2~3시간 반응시켰다. 염색약을 제거한 뒤 상온의 어두운 곳에서 24시간 보관한 뒤 plaque의 수를 측정하였다.

## 8. Recombinant IBDV 백신의 제조

바이러스를 대량 배양하기 위해 4개의 F150 flask에 Sf21 cell을  $6 \times 10^6$  cell/flask로 접종하여 27°C에서 배양시킨 후 80% confluency를 보인 시점에서 recombinant VP2 virus와 recombinant segA virus를 flask씩 감염시킨 후 27°C에서 배양시킨 후 4일째에 CPE가 형성한 것을 확인하였다. 상층액과 세포를 수확한 후 3000rpm 10min 원심분리 한 후 상층액은 4°C에 보관하였다. cell pellet은 멸균된 PBS(0.15M, pH 7.2)로 1회 washing한 후 다시 4ml PBS로 부유시킨 후 얼음에 방치한 상태에서 Sonication(power lever between 4-6, 1min/번, 3번)을 실시한 후 170g/min 5min 동안 원심 하여 cell debris를 제거 하였다. 상층액 3ml과 MONTANIDE ISA70 7ml을 섞은 후 17 gauge needle을 50회 통과 시킨 후 4°C에 보관하였다.

## 9. 유전자 재조합 백신의 방어효과의 측정

IBDV에 대한 vaccine의 방어효과를 확인하기 위하여 4주령과 6주령된 SPF닭 (SPF부화율이 떨어져서 백신비접종 공격접종군과 백신비접종공격비접종군은 4주령을 사용하였음)을 나누어 isolator에 격리사육하면서 실험을 실시하였다. 각 실험군별에 대한 내용은 표 3-3에 나타냈다. 유전자 재조합 vaccine은 6주와 7주령에 각각 0.5ml씩 경부피하에 0.5ml 씩 접종하였다 (수수당 면역세포의 양은  $2 \times 10^6$  cell이다). 양성대조군으로 시판중인 B 약독화 백신을 0.5ml씩 2회 동일한 일령에 접종하였다.

이차 접종 2주 후에 IBDV SH/92 strain을  $1 \times 10^{4.8}$  EID<sub>50</sub>/수 구강으로 공격접종한 후 10일간 폐사율을 관찰하였다.

IBDV에 대한 항체가를 측정하기 위해 백신 접종 전과 공격 접종 후 10일 후에 경정맥을 통해 전혈을 채취하였다. 살아 있는 닭은 모두 도태 시킨 후 체중과 F낭의 무게를 측정한 후 한 후 B:B ratio((bursa weight)/body weight)×1000)를 산출하였다. 적출한 bursa는 10% formalin 용액에 고정시킨 후 Hematoxylin-eosin(H-E)염색을 실시하여 조직학적인 변

화를 관찰하였다.

Table 3-3. Experimental design for efficacy of recombinant IBVD vaccine

Group	Experimental condition	Age (wo)	Total chickens
1	Novaccinated & Nonchallenged	4	3
2	Nonvaccinated & Challenged	4	10
3	Vaccinated with VP2 & Challenged	6	10
4	Vaccinated with SegA & Challenged	6	10
5	Vaccinated with Bursine-plus & Challenged	6	9

#### 10. ELISA를 이용한 anti-IBDV antibody의 측정

백신 접종 전후 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후 IBVD에 대한 항체를 ELISA kit (IDEXX)를 사용하여 측정하였으며 방법은 제조사의 권장 방법에 따라 실시하였다.

#### 11. Statistical analysis

모든 실험의 data 분석은 Statistical package SAS 8.01(SAS Institute, 2000)을 사용하여 분석하였다.

One-way ANOVA를 사용하여 B/B 비율과 ELISA antibody titer 차이를 평가하였다.

## 제 4 장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절

#### 제 1세부과제: 국내 유행 전염성 낭병 바이러스의 특성 규명

##### 1. 야외 계군으로부터의 IBDV 분리

- 1) 야외 병계로부터 총 20주의 IBDV 분리
- 2) SPF 닭에서 바이러스 증폭 완료 (seed virus)
- 3) SPF 닭에서 증폭한 Fabricius Bursa (BF) 유제액을 항원으로하여 IBDV 특이 혈청 사용한 한천침강반응에서 특이적인 반응 확인
- 4) IBDV 특이 primer를 사용한 PCR 반응으로 증폭 확인

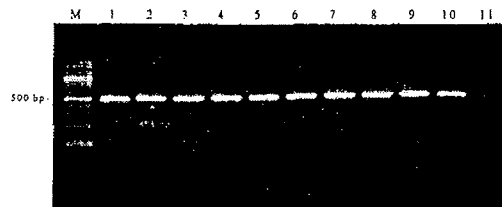


Fig. 1-1. RT-PCR (nested) amplification of the part (491 bp) of the VP2 gene of IBDV  
Lanes M: molecular marker(100bp), 1: SNU 91108, 2: SNU 9414, 3: SNU 9423, 4: SNU 9750, 5: SNU 9818, 6: SNU 9912, 7: SNU 9960, 8: SNU 9993, 9: SNU 99103, 10: SNU 99122, 11: Control(uninfected bursa)

##### 2. 야외분리 IBDV의 4주령 SPF 닭에 대한 병원성

병원성을 조사한 야외분리 IBDV 20주의 4주령 SPF 닭에 대한 치사율은 분리주에 따라 0.0% (SNU 9414)부터 93.3% (SNU 9858)의 치사율을 보였으며, 분리주 SNU 9414 (0.0%), 9423 (13.3%), 9818 (27.0%) 및 99103 (20.0%)을 제외한 나머지 16주는 모두 50%의 높은 치사율을 보였다 (Table 1-4).

Table 1-4. 야외분리 IBDV의 4주령 SPF 닭에 대한 병원성

분리주	91108	9414	9423	9593	9596	9750	9818	9858	9912	9914
유래	L	B	B	B	BB	B	B	L	B	B
치사율 (%)	71.4	0.0	13.3	80.0	58.8	88.7	27.0	93.3	53.3	78.6
분리주	9919	9927	9946	9960	9977	9993	99103	99107	99122	1030
유래	B	B	B	B	B	B	BB	B	B	B
치사율 (%)	60.0	80.0	66.7	85.7	53.3	80.0	20.0	80.0	60.7	52.9

L: layer, B: broiler, BB: broiler breeder

### 3. 야외 분리주의 계대배양

야외분리 IBDV SNU 91108주를 비롯한 20주를 CEF 세포배양과 동시에 바이러스를 접종하고 3~4일 후 배양액을 채취하여 CEF 세포배양과 동시에 접종하는 방법으로 3~9대까지 계대배양 하였으나 어떤 분리주도 CPE는 관찰되지 않았다. 단지 초기 2~3대 계대배양시까지는 세포배양에 혼입된 혈구의 용혈현상이 관찰되었으며 탐식세포의 심한 공포 형성은 계대배양 최종단계까지 지속적으로 관찰되었다. 모든 분리주의 최종 계대배양액에 대한 RT-PCR 결과 IBDV target 크기의 증폭이 이루어지는 것으로 보아 비록 CPE는 일으키지 않으나 최종 계대배양까지 바이러스의 증식은 이루어지는 것으로 추정되었다.

### 4. Bursal cell culture 방법 정립 및 IBDV 정량

부화 18~21령의 발육계란으로부터의 F낭 채취는 극히 작은 크기로 인하여 F낭만 순수하게 채취하기가 어려웠으며 배양 결과도 목표로 하였던 lymphocyte보다도 표면 부착성을 보이는 fibroblast가 월등히 많아 시험재료로서 적합치 않았다. 부화 후 2~4주령의 병아리의 경우에는 F낭 채취는 용이하였으나 배지에 gentamycin을 첨가하는데도 불구하고 세균 오염에 의하여 실패하는 경우가 흔하였다. PMA를 첨가하지 않은 경우 배양 24시간 이내에 50% 이상의 세포가 사멸하였으며 배지에 PMA를 2.5~5.0 µg/ml 농도로 첨가한 조건에서는 배양 4일째까지 70% 이상의 생존성을 보여 IBDV 역가 검사가 가능하였다 (Table 1-5). Bursal cell 배양시 배지에 PMA를 2.5 µg/ml 농도로 첨가하고 세포배양과 동시에 접종하는 방법으로 야외분리 IBDV를 정량한 결과 야외분리 6주 모두가 bursal cell을 사멸시키는 변화를 보였다. 감염역가 ( $\log_{10}TCID_{50}/25\mu l$ )는 2.7 (SNU 9414)부터 4.3 (SNU 9993) 이었으나 RT-PCR에 의한 추정 감염역가보다는 (미 발표)  $2.0\log_{10}$  이상 낮은 것으로 추정되었다

(Table 1-6).

Table 1-5. Phorbol myristate acetate (PMA) 농도별 bursal cell의 생존성

Incubation (days)	Bursal cell viability at PMA concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )							
	0	0.1	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0
1	2	2	2	3	4	4	4	3
2	0	0	0	1	3	3	3	2
3	0	0	0	0	3	3	3	1
4	0	0	0	0	2	3	3	0
5	0	0	0	0	1	2	2	0

0: over 90% cell death, 4: less than 10% cell death

Table 1-6. Bursal cell culture에서의 야외분리 IBVD의 정량

IBDV isolates and infectivity titer ( $\text{TCID}_{50}/25 \mu\text{l}$ )					
SNU 91108	SNU 9414	SNU 9423	SNU 9596	SNU 9993	SNU 1030
3.6	2.7	2.8	3.5	4.3	3.6

### 5. 야외분리 IBVD에 대한 소독제의 효능

7개 chemical group의 19개 시판 소독제의 IBVD (Lukert strain)에 대한 소독효과를 측정한다

- 1) 8개 제품은 증류수에 최고 권장 사용농도(축사 소독)로 희석하여도 효과가 없는 것으로 판명됨
- 2) 최고 권장 사용농도에서 유효한 제품도 유기물(5% yeast) 존재 하에서는 소독효과가 없는 것으로 나타남 (Table 1-7).



Table 1-7. 시판 소독제의 IBDV에 대한 소독효과

분류		4가 압모늄		산성			시안나트륨			차아염소	
소독제제		BA	FS	VS	AC	BC	PC	LJ	CR	AG	HS
희석 배수		400	100	100	500	125	250	250	300	300	200
효과	증류수	없음	없음	있음	없음	있음	있음	있음	있음	있음	없음
	유기물			없음		없음	없음	없음	없음	없음	
유효 희석배수 <sup>1)</sup>				800		500	200	750	1200	300	
분류		염기		이산화 염소		알데히드					
소독제제		SZ	BR	RZ	CZ	CM	GS	MA	LL	TH	
희석 배수		25	25	100	160	50	100	100	100	200	
효과 <sup>1)</sup>	증류수	있음	없음	없음	없음	있음	있음	있음	있음	없음	
	유기물	없음				없음	없음	없음	없음		
유효 희석배수		200						800	800		

<sup>1)</sup> 증류수 조건

## 6. IBD바이러스에 대한 Monoclonal antibody (Mab) 생산

### 가. 단클론성 항체의 작성 및 중화능

IBDV 특이 monoclonal antibody (MAb)를 생산하기 위하여 국내 분리주 SNU 9423으로 면역시킨 마우스의 비장세포와 myeloma 세포를 융합한 후 cloning을 실시한 결과 40개의 IBDV 특이 항체 산생 융합세포주를 작성하였다.

작성된 40개 mcAb의 분리주 SNU9423과 SNU91108 및 SNU9415에 대한 중화능을 조사한 바 13개가 중화능을 가지는 것으로 나타났으며 중화능이 있는 각 mcAb는 세 분리주에 대하여 유사한 중화능을 보여주었다 (Table 1-8).

Table 1-8. Virus neutralization titers of monoclonal antibodies<sup>1)</sup> against IBDV isolates

virus	Virus neutralizing antibody titer (log <sub>2</sub> ) of monoclonal antibody <sup>1)</sup>												
	33/25	23/10	33/29	35/11	23/14	32/12	24/11	23/11	23/12	24/17	35/24	24/19	35/21
SNU 91108	≥12 <sup>2)</sup>	≥12	≥12	11	11	≥12	≥12	8	11	≥12	≥12	≥12	≥12
SNU 9423	8	≥12	12	9	≥12	10	≥12	8	≥12	≥12	11	≥12	10
SNU 9415	10	≥12	≥12	9	≥12	12	≥12	9	≥12	≥12	≥12	≥12	≥12

<sup>1)</sup> Hybridoma cell culture supernatant

나. 단클론성 항체의 IBDV 백신주에 대한 중화능

중화능을 보이는 13개의 MAb중 4개를 선발하여 분리주 SNU9423과 더불어 4주의 IBDV 백신 바이러스에 대한 중화시험을 실시한 결과 4 MAb 모두 D78 및 S706에 대하여는 동종인 SNU9423과 유사한 중화항체가를 보여주었으나 SAL 주에 대하여는 동종에 대한 항체가에 비하여 4~8배 낮은 수준을, 그리고 Lukert 주에 대하여는 16~64배 낮은 수준의 중화능을 보여주었다 (Table 1-9).

Table 1-9. Virus neutralization titers of monoclonal antibodies<sup>1)</sup> against IBD vaccine viruses

Virus	Monoclonal antibody and VN titers (log <sub>2</sub> )			
	33/29	24/19	35/24	23/12
SNU9423	6	≥12	8	≥12
Lukert	2	6	3	6
SAL	4	9	5	9
D78	6	10	8	11
S706	9	≥12	9	≥12

<sup>1)</sup> Hybridoma cell culture supernatant

## 7. 야외분리 IBD바이러스와 IBD 백신바이러스와의 혈청학적 관련성

CEF 세포배양에 적응된 야외분리 IBDV SNU 91108을 포함한 5주와 백신주인 Lukert 및 SAL strain과 각기 면역혈청 (poly-clonal antibody)을 사용하여 교차 중화시험을 수행하여 혈청학적 관련성을 조사한바 야외 분리주들 간에는 70% 이상의 높은 혈청학적 관련성을 보여주었으나 야외 분리주와 IBD 백신주들과는 25% 이하의 낮은 관련성을 보여주었다 (Table 1-10).

Table 1-10. Antigenic relatedness among IBDV local isolates and vaccine viruses

Virus	Antiserum							
	Lukert	SAL	SNU 91108	SNU 9325	SNU 9414	SNU 9423	SNU 9415	SNU 9428
Lukert	10* (100)**	7 (71)	7 (9)	9 (18)	4 (12)	9 (9)	9 (18)	7
SAL	9	5 (100)	5 (12)	8 (25)	4 (25)	8 (12)	9 (25)	8
SNU91108	3	1	7 (100)	8 (141)	4 (283)	10 (100)	NT	10
SNU9325	4	1	8	8 (100)	6 (200)	10 (141)	NT	11
SNU9414	5	2	11	9	5 (100)	10 (141)	11 (200)	11
SNU9423	4	1	7	9	6	10 (100)	9 (70)	
SNU9415	6	2	NT	NT	6	10	10 (100)	

\* VN (virus neutralization) titer (log<sub>2</sub>)

\*\* R value(%)

NT: not tested

## 8. 야외 분리 IBDV의 염기서열과 phylogenetic tree

### 가. 염기서열

국내 분리주의 VP2 hypervariable region의 염기 서열을 외국에서 분리된 IBDV과 비교하였을 때, 국내분리 강병원성주인 SNU 91108은 일본에서 분리된 강병원성 변이주인 90-11주와 99.7%의 높은 상동성을 보였고, 병원성 시험에서 53% 이상의 높은 폐사율을 보인 SNU 9750, SNU 9912, SNU 9993등도 98.1-99.7%의 상동성을 보여 주었다. 또한, 병원성 시험에서 20%의 폐사율을 보인 SNU 99103도 90-11주와 98.3%의 높은 상동성을 나타냈다. 한편 병원성 시험에서 각각 0%, 13%의 낮은 폐사율을 보였던 SNU 9414, SNU 9423은

90-11주와는 86.7-90.8%만의 상동성을 보였다. SNU 9423은 attenuated, apathogenic strain 인 CU1주와 98.6%의 높은 상동성을 보였고, SNU 9414주는 미국의 변이주인 DELE주와 가장 높은 상동성을 보였으나 91.1%만의 일치율을 나타내었다 (Table 1-11, Fig. 1-2).

#### 나. 아미노산 서열

염기 서열의 비교에서 높은 상동성을 나타냈던 SNU 91108주는 90-11과 아미노산 서열에서는 100%의 상동성을 나타냈으며, 병원성이 높았던 분리주 중 SNU 9946만이 1개의 아미노산 차이를 보일 뿐 모두 100%의 상동성을 보였다. SNU 9423주는 CU1주와는 96.7%의 상동성을 보였으며 SNU 9414는 모든 분리주에 대하여 85-90%의 상동성만을 나타냈다 (Table 1-11).

SNU 857, SNU 8615는 추정 아미노산 서열에서 강병원성주의 특징인 Serine-rich heptapeptide인 SWSASGS의 보존과 222번 아미노산이 proline, 256번과 294번이 isoleucine, 330번이 serine을 나타내었다. 한편, SNU 91108 CEF세포 순화주인 SNU 91108F15주는 279번이 aspartate에서 asparagine으로, 284번이 alanine에서 threonine으로 대체된 것으로 나타났다.

#### 다. 아미노산 서열에 의한 phylogenetic tree 분석

국내 강병원성 분리주의 아미노산 서열과 외국에서 밝혀진 표준주, 병원성 변이주, 항원성 변이주의 아미노산 서열을 바탕으로 phylogenetic tree를 그렸을 때 SNU 91108주를 비롯한 대부분의 국내 분리주는 일본의 병원성 변이주인 90-11주와 같은 분지도를 형성하였으며, SNU 9423주는 attenuated, apathogenic strain인 PBG98, CU1과 같은 분지도를 형성하였고, SNU 9414는 미국의 항원적인 변이주인 DELE등과 가깝게 나타내었다 (Fig. 1-2).

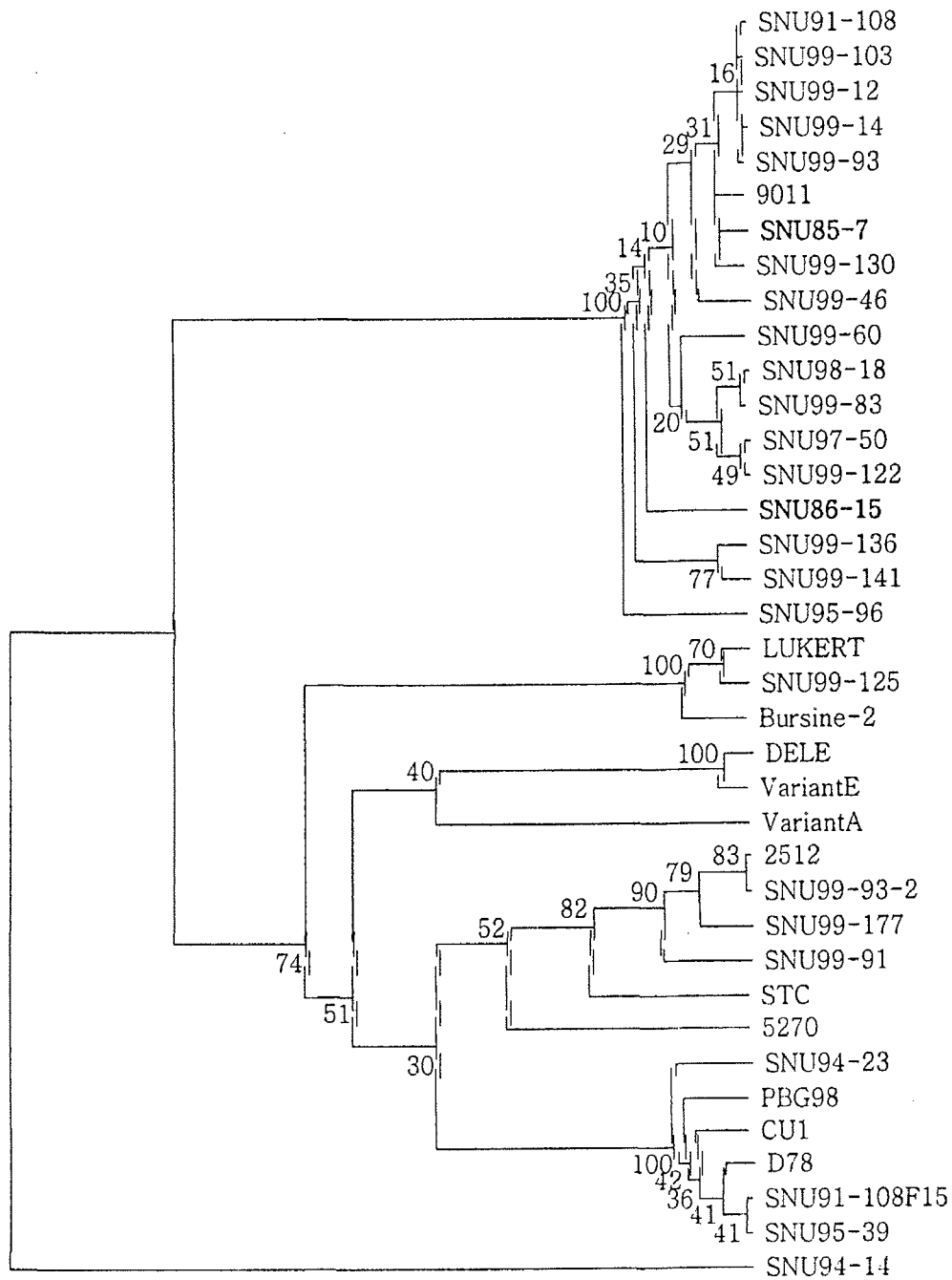
Table 1-11. Percent homology of nucleotide and deduced amino acid sequences of the hypervariable region in the VP2 gene of IBDV strains

(Nucleotide sequence comparison)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1		96.9	95.0	95.0	97.8	94.2	94.7	93.6	92.8	92.7	90.3	95.0	95.8	92.2	92.2	91.4	93.1	92.8	92.8	91.9	97.5	93.1	97.5	93.1	92.2	93.6	1
2	96.7		94.7	94.4	96.9	94.7	96.1	94.4	93.9	94.0	89.7	94.7	95.6	93.3	93.6	92.5	94.2	93.9	93.9	93.3	96.7	94.2	96.7	94.2	93.3	94.2	2
3	94.2	94.2		98.3	95.3	93.1	94.2	94.2	91.1	90.9	88.3	98.6	99.2	90.3	90.6	90.0	91.4	91.1	91.1	90.0	95.3	91.4	95.0	91.4	90.3	92.2	3
4	92.5	92.5	95.8		95.3	92.8	94.2	94.2	91.1	90.9	88.3	98.6	99.2	90.6	90.6	90.3	91.4	91.1	91.1	90.3	95.3	91.4	95.0	91.4	90.6	92.5	4
5	97.5	97.5	95.0	93.3		94.7	95.3	93.9	92.8	92.7	90.8	95.3	96.1	92.2	92.2	91.4	93.1	928	92.8	91.9	99.2	93.1	99.7	93.1	92.2	94.2	5
6	90.8	92.5	91.7	90.8	91.7		93.6	92.2	90.6	90.3	88.9	93.1	93.9	90.3	89.7	90.0	90.8	90.6	90.6	91.1	94.4	90.8	94.4	90.8	90.3	99.2	6
7	91.7	93.3	90.8	90.0	92.5	89.2		95.6	91.9	91.8	91.1	94.2	95.0	91.4	91.4	90.6	92.2	91.9	91.9	91.4	95.0	92.2	95.0	92.2	91.4	94.2	7
8	90.8	92.5	93.3	92.5	91.7	91.7	95.0		90.6	90.9	88.9	94.4	95.0	90.3	90.3	89.4	90.8	90.8	90.3	90.3	93.6	90.8	93.6	90.8	90.3	92.5	8
9	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0		99.7	86.7	90.8	91.9	98.9	98.3	98.1	99.7	99.4	98.9	98.3	93.1	99.7	92.5	99.7	98.9	90.0	9
10	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100		86.1	90.6	91.8	99.4	98.8	98.5	100	100	99.1	98.8	93.1	100	92.4	100	99.4	89.7	10
11	89.2	89.2	88.3	86.7	90.0	84.2	88.3	86.7	88.3	88.3		88.6	89.4	86.9	86.4	86.4	86.9	86.7	86.7	86.7	90.3	86.9	90.6	86.9	86.9	88.3	11
12	94.2	94.2	96.7	95.8	95.0	90.8	90.8	92.5	90.8	90.8	88.3		99.4	90.3	90.3	90.0	91.1	90.8	91.1	90.3	95.0	91.1	95.0	91.1	90.3	92.2	12
13	95.0	95.0	98.3	97.5	95.8	92.5	90.7	94.2	91.7	91.7	89.2	98.3		91.4	91.4	91.1	92.2	91.9	91.9	91.1	96.1	92.2	95.8	92.2	91.4	93.1	13
14	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100	100	88.3	90.8	91.7		98.3	99.2	99.2	99.2	98.3	99.2	92.5	99.2	91.9	99.2	100	89.7	14
15	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100	100	88.3	90.8	91.7	100		97.5	98.6	98.6	97.8	97.8	98.5	98.6	91.9	98.6	98.3	89.2	15
16	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100	100	88.3	90.8	91.7	100	100		98.3	98.3	97.5	98.3	91.7	98.3	91.1	98.3	99.2	89.4	16
17	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100	100	88.3	90.8	91.7	100	100	100		99.7	99.2	98.6	93.3	100	92.8	100	99.2	90.3	17
18	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100	100	88.3	90.8	91.7	100	100	100	100		98.9	98.6	93.1	99.7	92.5	99.7	99.2	90.0	18
19	92.5	95.8	90.0	88.3	95.0	90.0	90.0	89.2	99.2	99.2	87.5	90.0	90.7	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2		98.3	92.8	99.2	92.5	99.2	98.3	90.0	19
20	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100	100	88.3	90.8	91.7	100	100	100	100	100	99.2		91.9	98.6	91.7	98.6	99.2	90.6	20
21	97.5	97.5	95.0	93.3	100	91.7	92.5	91.7	95.8	95.8	90.0	95.0	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.0	95.8		93.3	98.9	93.3	92.5	93.9	21
22	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100	100	88.3	90.8	91.7	100	100	100	100	100	99.2	100	95.8		92.8	100	99.2	90.3	22
23	96.7	96.7	94.2	93.3	99.2	90.8	91.7	90.8	95.0	95.0	89.2	94.2	95.0	95.0	95.0	95.0	95.0	95.0	94.2	95.0	99.2	95.0		92.8	91.9	93.9	23
24	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100	100	88.3	90.8	91.7	100	100	100	100	100	99.2	100	95.8	100	95.0		99.2	90.3	24
25	93.3	96.7	90.8	89.2	95.8	90.8	90.8	90.0	100	100	88.3	90.8	91.7	100	100	100	100	100	99.2	100	95.8	100	95.0	100		89.7	25
26	91.7	93.3	90.8	90.0	92.5	97.5	90.0	90.8	91.7	91.7	85.0	90.8	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	90.8	91.7	92.5	91.7	91.7	91.7	91.7		26
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		

(Deduced amino acid sequence comparison)

- 1: STC      2: 5270      3: CU1      4: PBG98      5: 2512      6: Bursine-2      7: DELE      8: Variant A      9: 90-11  
 10: SNU91108    11: SNU9414    12: SNU9423    13: SNU9539    14: SNU9750    15: SNU9593    16: SNU9596    17: SNU9912    18: SNU9914  
 19: SNU9946    20: SNU9960    21: SNU9991    22: SNU9993    23: SNU9993-2    24: SNU99103    25: SNU99122    26: SNU99125



Scale: each - is approximately equal to the distance of 0.000917

Fig.1-2. Phylogenetic tree of infectious bursal disease viruses on the basis of nucleotide sequence of the VP2 gene. Japanese highly virulent isolate(90-11), classical virulent strains(STC, 5270, 2512), attenuated strains(CU1, Lukert, Bursine-2, PBG98), antigenic variant(DELE, variant A, B), and the Korean IBDV isolates(SNU94-14, SNU94-23, SNU91-108 etc.).

## 9. 야외감염 IBV 진단법 모색

### 가. Competitive ELISA에 의한 감별진단법

가) Lukert 주를 제외한 백신주와 야외주에 높은 중화능을 보이는 단클론 항체 33/25와 24/17와 병원성 변이주인 SNU91108과 백신주인 S706에 대한 항혈청을 사용하여 SNU91108 및 S706이 코팅된 96-웰 plate에 대해 competition ELISA를 수행한 결과 항혈청에 의해 단클론 항체의 결합이 최고 92-95% 억제되어 33/25와 24/17이 인식하는 에피토프를 인식하는 항체가 항혈청에 존재하고 있음을 알 수 있었으나 (Fig. 1-3) 야외주와 백신주에 각각 특이적인 단클론항체가 없어 야외주와 백신주를 구분할 수는 없었다.

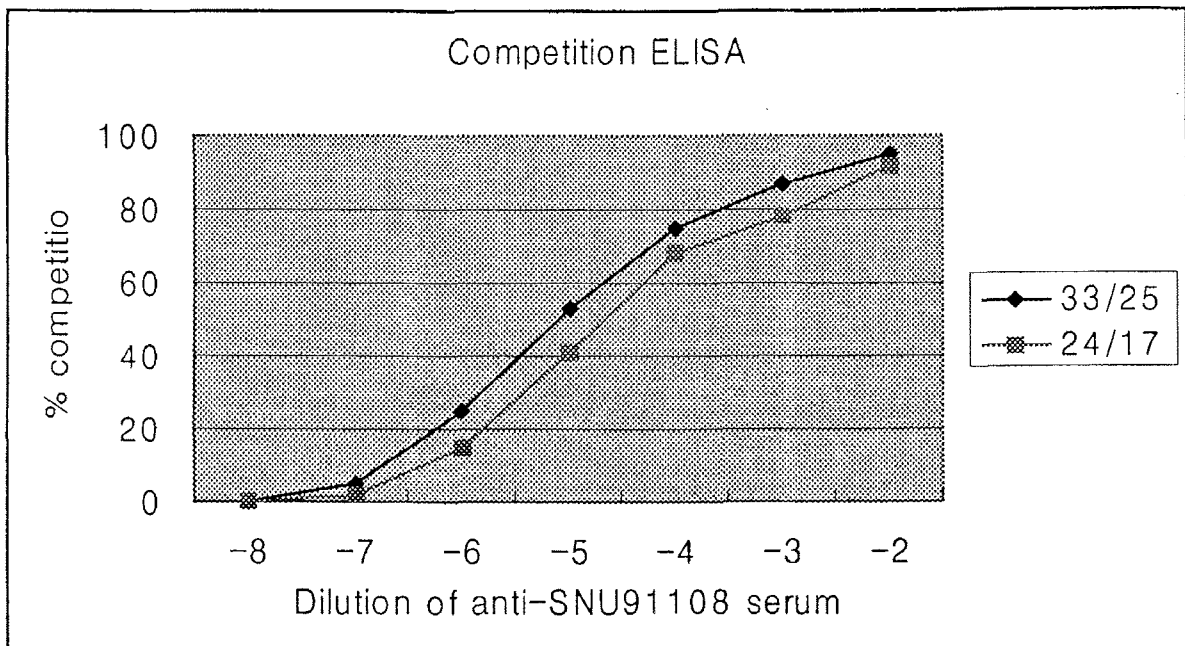


Fig. 1-3. IBV 특이 바이오티닐화 단클론항체 (33/25, 24/17) 및 병원성 변이주 (SNU91108) 항혈청을 이용한 Competition ELISA 결과.

### 나. 용혈시험에 의한 감별진단법

#### 1) 시험관에서의 용혈 현상

CEF 배양과 동시에 IBV 감염 및 비감염된 닭에서 채취한 BF 유제액을 접종한 결과 IBV 비감염된 BF 유제액을 접종한 세포배양에서는 계태아로부터 유래한 적혈구가 잔존하는데 반하여 IBV에 감염된 BF 유제액을 접종한 세포 배양에서는 접종 후 2-3일에 적혈구가 완전히 용혈되어 적혈구 핵만이 남아있는 결과를 보여주었다 (Fig. 1-4).

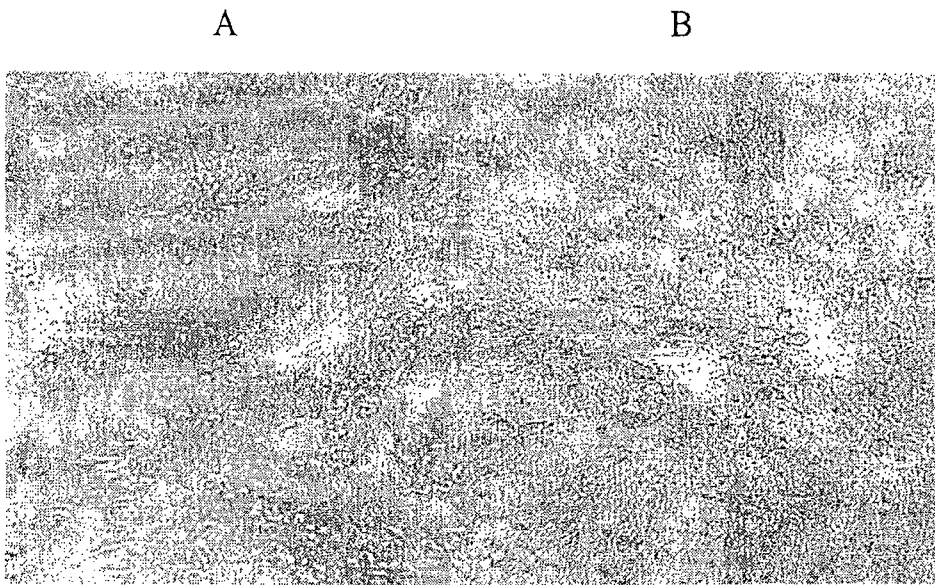


Fig. 1-4. Hemolysis in chicken embryo fibroblast (CEF) culture (2 days post inoculation). The cultures were inoculated with uninfected (A) or IBDV-infected bursal homogenate (B) at the time of cell seeding.

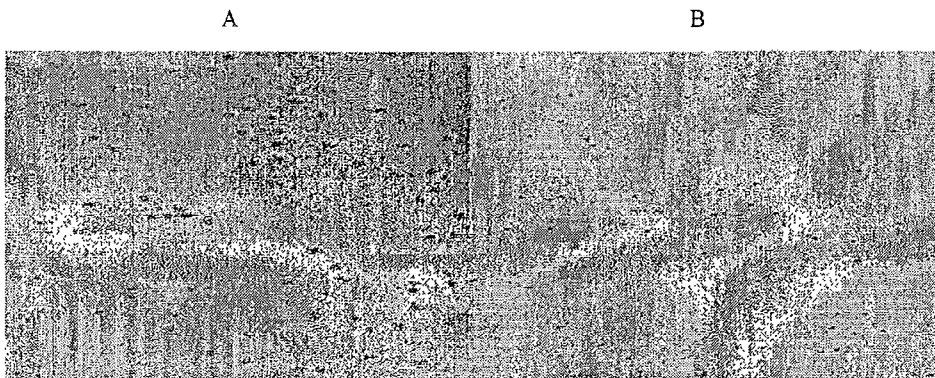


Fig. 1-5. Hemolysis by IBDV-infected bursal homogenate. Two-fold dilutions of uninfected (A) or IBDV-infected (B) bursal homogenates ( $50\mu\ell$ ) were mixed with 0.015% chicken RBC suspension ( $25\mu\ell$ ) and incubated for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$ .



IBDV가 감염된 BF 유제액을 접종한 세포배양에서의 적혈구 소실이 용혈인지 macrophage에 의한 탐식 현상인지를 구별하기 위하여 96 well microtiter plate (flat bottom)에서 0.5%의 혈구 25 $\mu$ l와 BF 유제액 50 $\mu$ l를 혼합하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰을 때, 정상 BF를 사용한 대조군 및 BF 유제액 대신 PBS를 사용한 대조군에서는 전혀 용혈이 관찰되지 않은 반면 IBDV에 감염된 BF 유제액과 반응시킨 well에서는 용혈이 관찰되었다(Fig. 1-5).

## 2) 적정 혈구농도 측정

용혈의 민감도를 향상시키기 위한 적정 닭 혈구농도를 측정하기 위하여 IBDV에 감염된 BF 유제액을 2진 희석한 재료와 0.5%부터 2진 희석한 닭 혈구를 동량으로(50 $\mu$ l) 혼합하고 상기와 동일한 방법으로 반응시켰을 때 RBC 농도에 반비례하여 용혈의 민감도가 증가하는 결과를 보였으며(Table 1-12), 적정 RBC 농도는 0.015%로 결정하여 이후의 실험에 사용하였다.

Table 1-12. Titration hemolytic activity of IBDV-infected bursal homogenates

RBC Conc(%)	Dilution of bursal homogenates									RBC Control
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0.06	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0.03	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0.015	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
0.007	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0.003	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

\* Test was conducted in 96-wells flat bottom microplate by mixing of 50 $\mu$ l of bursal homogenates and 25 $\mu$ l of RBC suspension

## 3) IBDV에 감염된 BF 유제액의 다양한 처리 후 용혈능 조사

IBDV에 감염된 유제액의 용혈현상에 대한 IBDV 면역혈청 및 혈청성분등의 영향을 알아보기 위하여 BF 유제액에 각각 IBDV 항혈청과 보체가 함유된 신선한 닭혈청을 처리하여 용혈 역가를 측정한 결과 면역혈청과 정상혈청의 단일 또는 복합 첨가는 용혈능을 상승시키기 보다는 억제하는 결과를 보여주었으며, 초원심하여 20배 농축정제된 IBDV와 IBDV에 감염된 BF 유제액을 56 $^{\circ}$ C, 30분간 열처리한 경우에는 용혈성이 관찰되지 않았다. 또한, 100,000x g, 1시간 동안 초원심한 상층액은 용혈성을 나타내었고, 강병원성 IBDV를 SPF 중

란의 장노막으로 접종하고 6일만에 채취한 장노막 유제액을 상기와 동일한 방법으로 측정하  
결과 용혈은 관찰되지 않았다(Table 1-13).

Table 1-13. Hemolytic activity of IBDV-infected bursal homogenates (BH) after different  
treatments

Treatment	Hemolytic titer ( $\log_2$ )
Uninfected BH	0
IBDV-infected BH (IBH)	5
IBH, heated (56°C, 30 min.)	0
Purified IBDV(20 × concentrated)	0
IBH, supernatant (100,000 × g, 1 hr.)	5
IBH + IBDV immune serum (1/10, VN titer:1/128)	1
IBH + Fresh normal chicken serum (1/10)	1
IBH + Immune serum + Fresh chicken serum	1
IBH, heated + Immune serum + Fresh chicken serum	0
IBDV-infected chorio-allantoic membrane	0
RBC Control	0

#### 4) 국내 분리 강병원성 IBDV 감염 후 경시별 용혈능 및 혈액의 PCV와 ESR의 변화

39일령 산란 숫병아리에 국내 분리 강병원성 IBDV 분리주 SNU98-18을 접종하고 접종후  
경시별로 BF 유제액의 용혈 역가와 혈액의 PCV 및 ESR를 조사한 바 용혈은 접종 2일부터  
15일까지 관찰되었으며(Fig. 1-6), PCV는 접종 2-4일 사이에 현격히 감소하였으며( $P < 0.01$ )  
5-7일 사이에도 유의성 있게 감소하다가( $P < 0.05$ ) 회복되는 경향을 보였다. ESR은 접종 후  
2-5일 사이에 유의성 있게( $P < 0.05$ ) 증가하였다가 회복되었다(Fig. 1-7).

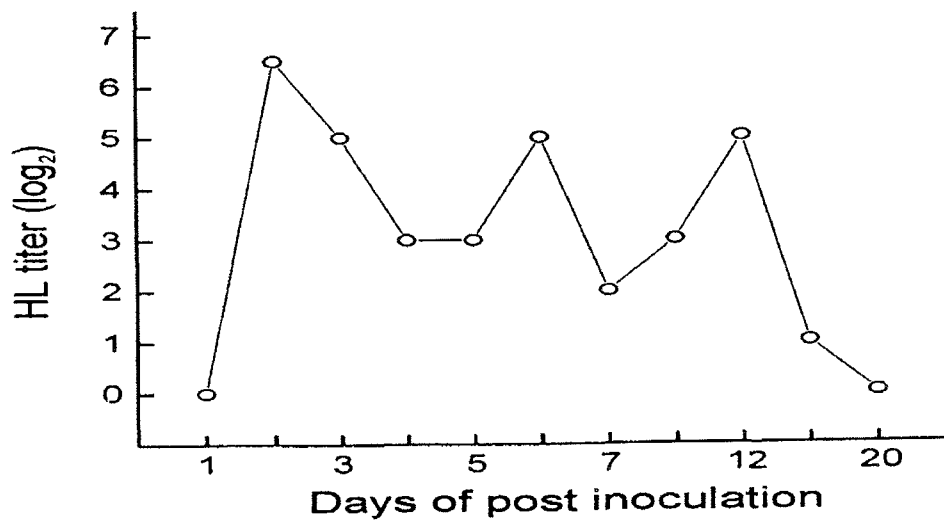


Fig. 1-6. Hemolysis titer (HL) of the pooled bursal homogenates after inoculation with hv IBDV isolate SNU98-18. Thirty nine days old commercial cockerels were inoculated and the bursae from 3 to 5 birds were pooled at each time point.

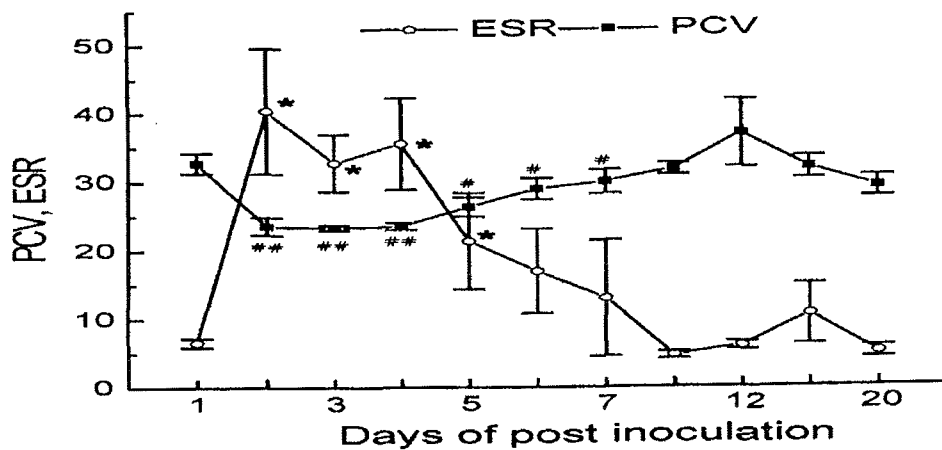


Fig. 1-7. Packed cell volume (PCV) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) of commercial layer chickens after inoculation with hv IBDV isolate SNU98-18. Significantly different from those of 1 day post inoculation : \*, #;  $P < 0.05$ , \*\*, ##;  $P < 0.01$ .

5) 강병원성 IBDV 국내 분리주와 약병원성 백신주간의 용혈능 및 혈액상의 변화 비교

4주령의 SPF 병아리에 병원성을 달리하는 IBDV strains을 접종한 후 용혈역가를 측정된 결과 강병원성주인 SNU97-50과 SNU99-60은 접종 3-5일 사이에 약병원성 백신주인 Bursine-2 나 IBDL에 비하여 유의성 있게 높은 용혈 역가를 보였다( $P < 0.05$ ) (Fig. 1-8).

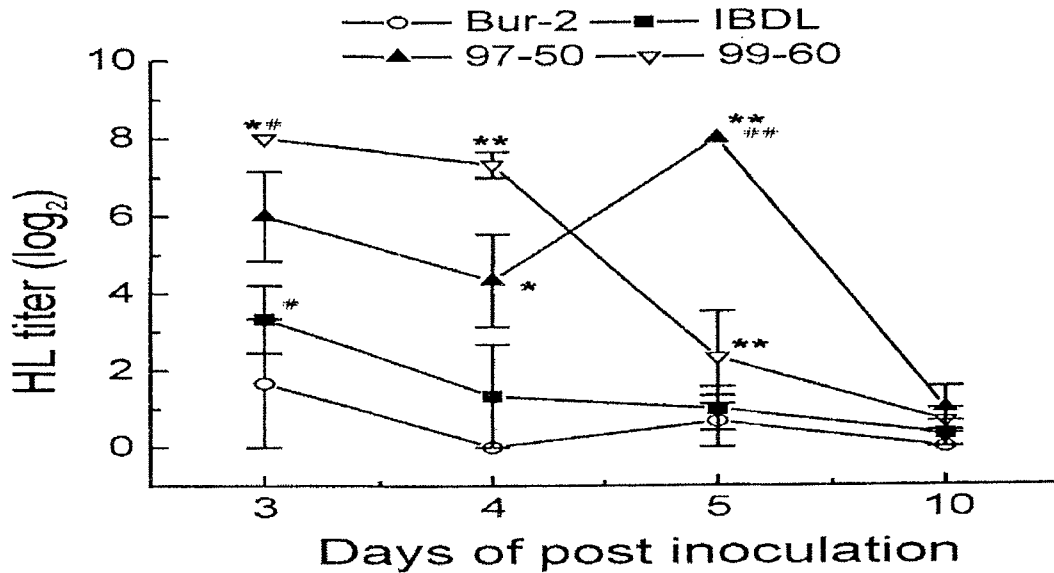


Fig. 1-8. Hemolysis (HL) titer of the bursal homogenate from SPF chickens after inoculation at 28 days old with IBD vaccine strains (Bursine-2, IBDL) or hv IBDV isolates (97-50, 99-60). Significantly different from those of each group :\*, #;  $P < 0.05$ , \*\*, ##,  $P < 0.01$ .

PCV 값에 있어 국내 분리주 SNU99-60은 백신주 Bursine-2에 비하여 감염 2-5일 사이에 현격히 낮게 측정되었으며( $P < 0.01$ ), 접종 후 11일에도 유의성 있게 낮은 값을 보여주었다( $P < 0.05$ ). ESR 값 역시 접종 후 3-4일 사이에 강병원성 분리주를 접종한 군의 심한 상승으로 약병원성 백신주 접종군과는 유의성 있는 차이( $P < 0.05$ )를 보였다(Fig. 1-9).

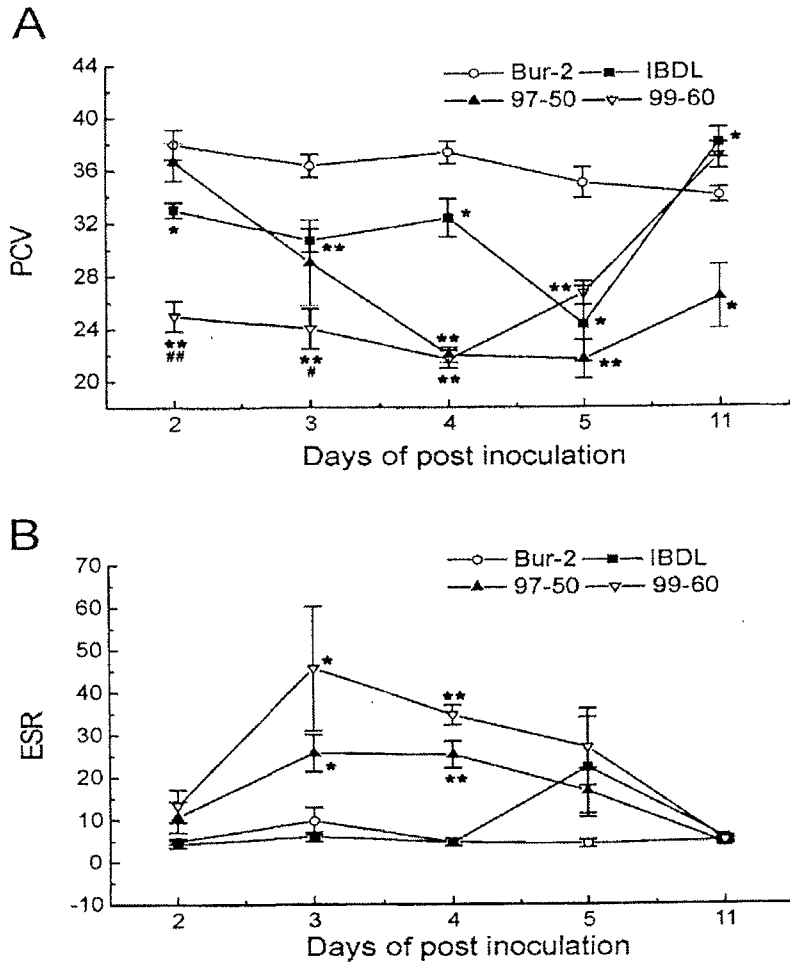


Fig. 1-9. Packed cell volume (PCV), and erythrocyte sedimentation rate (ESR) of SPF chickens after inoculation at 28 days old with IBD vaccine strains (Bursine-2, IBDL) or hv IBDV isolates. Significantly different from those of each group :\*, #; P<0.05, \*\*, ##; P<0.01.

다. RT-PCR 및 nested PCR에 의한 감별진단

1) 국내주 및 백신주의 VP2 변이부 염기서열 분석결과 국내 병원성 변이주와 백신주인 D78, Bursine-2 및 Lukert 주와 차이를 보이는 부분을 확인하였으며, 이 부위의 염기서열을 이용하여 pathotype specific PCR을 수행하는 경우 병원성주 만을 특이적으로 검출할 수 있어 감별진단에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 1-14. 병원성 변이주 특이 프라이머 및 상동성 비교

PRIMER	Forward primer (779-799)	Reverse primer (963-946)
	ACA CTG TTC TCA GCT AAT ATC	TTG TCA GTG CCG GCC GTT
90-11	---	---
SNU91-108	---	---
SNU95-93	---	---
야외주 SNU97-50	---	---
SNU98-18	---	---
SNU99-12	---	---
SNU99-103	---	---
D78	--- --C --C --T	--- --G --- --T- --C
백신주 Lukert	--- --C --C --T	--- --G A-- --- -TA --C
Bursine-2	--- --C --C --T	--- --G A-- --- -TA --C

라. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)에 의한 감별진단

강병원성 IBDV 국내분리주와 국내에서 사용하고 있는 4주의 IBDV 백신주의 RT-nested PCR 증폭 산물에 대한 제한효소 분석을 실시한 결과 StyI과 BstNI 제한 효소에 의하여 강병원성 분리주와 백신주의 구별이 가능하였다 (Fig. 1-10).

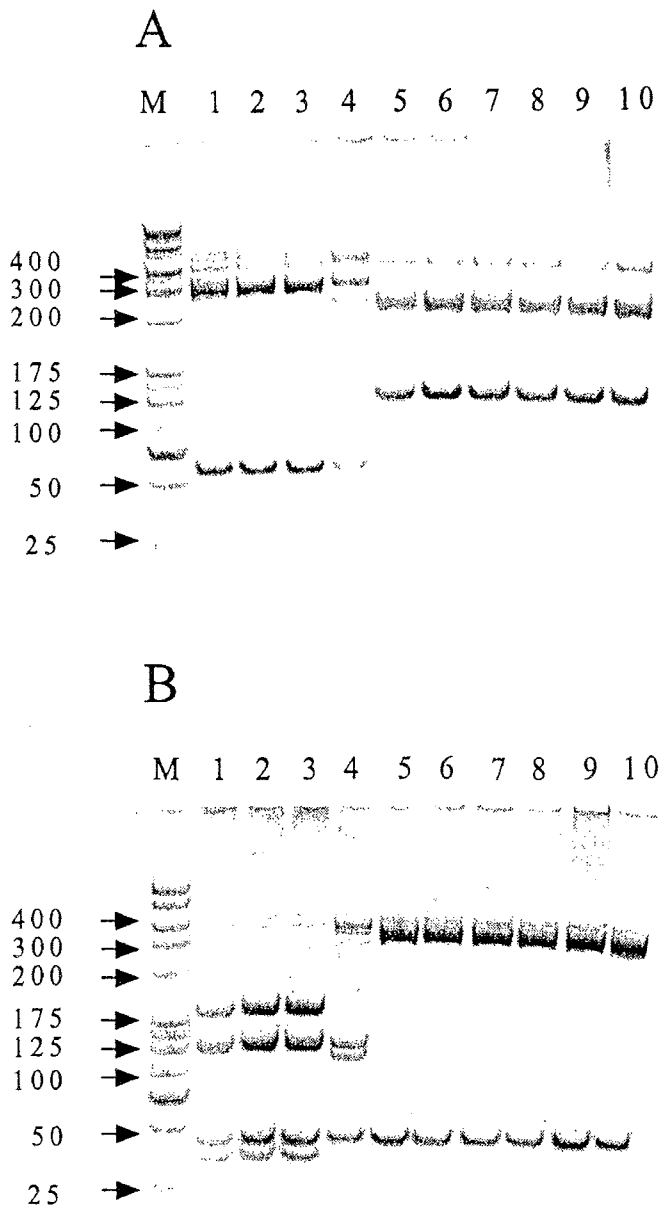


Fig. 1-10. Restriction fragment length polymorphism patterns fragmented by *StyI* (A) and *BstNI* (B) restriction enzymes. Lane M: molecular marker(25/100bp), lane 1: Bursine-2, lane 2: D78, lane 3: S-706, lane 4: 2512, lane 5: SNU91-108 lane 6: SNU99-19, lane 7: SNU99-46, lane 8: SNU99-77, lane 9: SNU99-103, lane 10: SNU99-122.

## 제 2 절

### 제 2 세부과제: 급성 전염성낭병의 사망기전규명과 대증 치료법 개발

#### 1. IBDV 감염 일령별 및 닭의 품종별 감수성

IBDV 야외분리주 SNU 91108주 seed virus를 1/10로 희석하여 1~6주령의 SPF 닭에 접종한 바 나이가 어릴수록 치사율은 낮아지는 경향을 보였으며 4~6주령의 닭에서는 100%의 치사율을 보였다 (Table 2-1). IBDV에 대한 모체항체가 없는 5주령과 6주령의 갈색 산란계에 위 SPF 닭과 동일한 바이러스를 동일한 방법으로 접종한 바 33.3~48.3%의 치사율을 보여 SPF 닭에 비하여 월등히 낮은 감수성을 보였다. 브로일러 닭의 경우에는 폐사가 전혀 없었을 뿐만 아니라 임상증상도 관찰되지 않아 가장 낮은 감수성을 보여주었다 (Table 2-1)

Table 2-1. Sensitivity of chickens of different age and breed to high-virulent field isolate IBDV (SNU 91108)

품종	일령	폐사율	(%)
SPF	7	1/10	(10.0)
	14	3/10	(30.0)
	21	4/10	(40.0)
	28	8/10	(80.0)
	35	10/10	(100)
	42	10/10	(100)
갈색 산란계 <sup>A</sup>	35	4/12	(33.3)
	42	14/29	(48.3)
브로일러 <sup>A</sup>	31	0/12	(0.0)

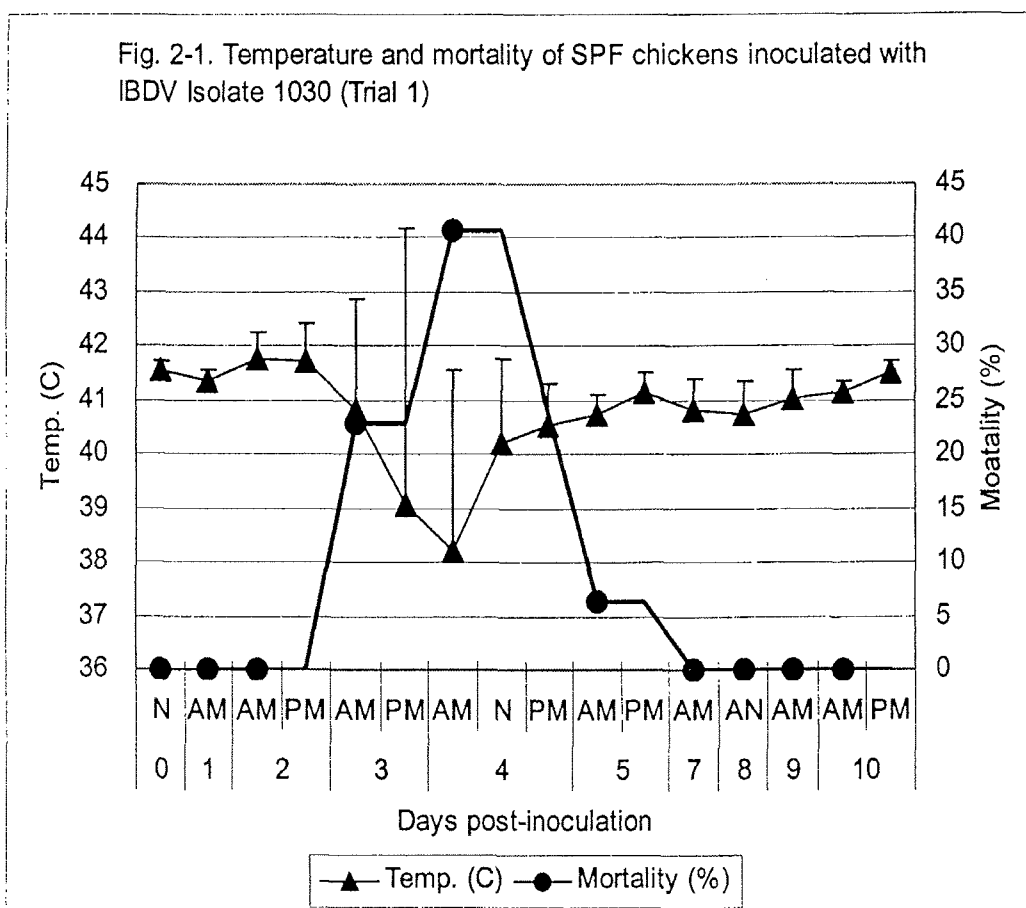
<sup>A</sup> IBDV 접종시 중화시험에 의하여 IBDV에 대한 항체 (모체이행 항체) 부재 확인



## 2. 급성 IBDV 감염계에서의 염증반응

### 가. 야외분리 IBDV 감염계에서의 체온 변화

야외 분리주 SNU 1030주를 접종한 SPF 닭에서 폐사 직전 체온의 급격한 하강이 관찰되었으며 감염 7일 후에는 정상 체온으로 복귀하였다 (Fig. 2-1).



### 나. 야외분리 IBDV 감염계에서 장기/체중의 변화

야외분리 IBDV SNU 9818을 감염시킨 갈색 산란계에서 (시험 2) B/B ratio는 감염 3일째까지 급격하게 감소하다가 감염 4~20일 까지는 비교적 완만하지만 지속적으로 감소하는 경향을 보였다. S/B ratio의 경우 감염 5일째만 상승하는 경향을 보였을 뿐 다른 시기에는 유의적인 변화를 보이지 않았다. L/B의 경우에는 감염 4일째까지 정상보다 상승하다가 이후부터 완만하게 정상으로 복귀하는 경향을 보였다 (Fig. 2-2).

Fig. 2-2. Bursa (B/B), spleen (S/B) and liver (L/B) weight (mg) to body weight (g) ratios in commercial brown layer chickens inoculated with IBDV SNU 9818 (Trial 2)

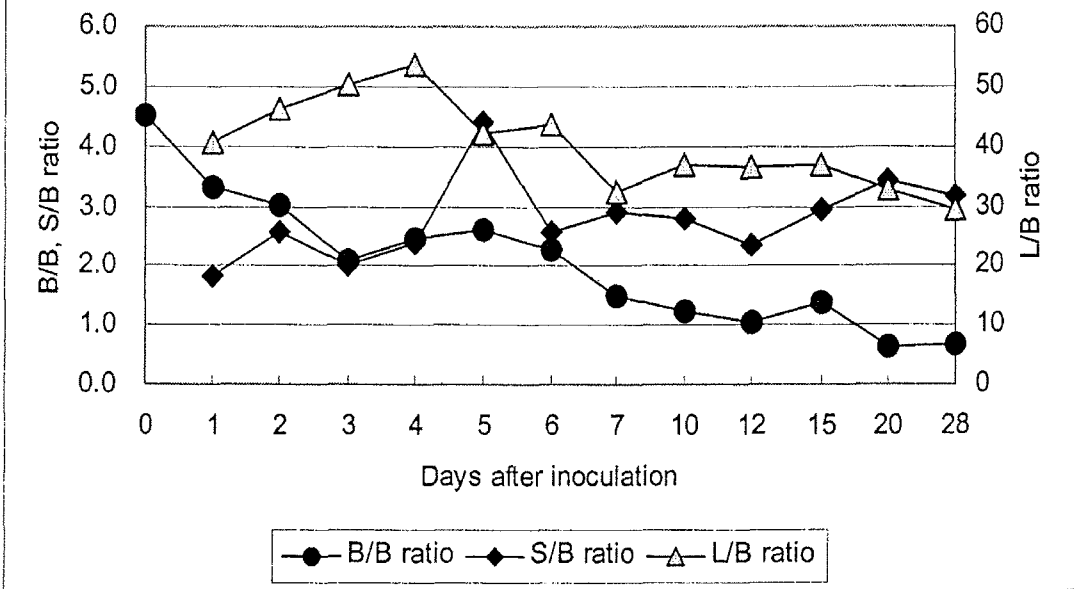
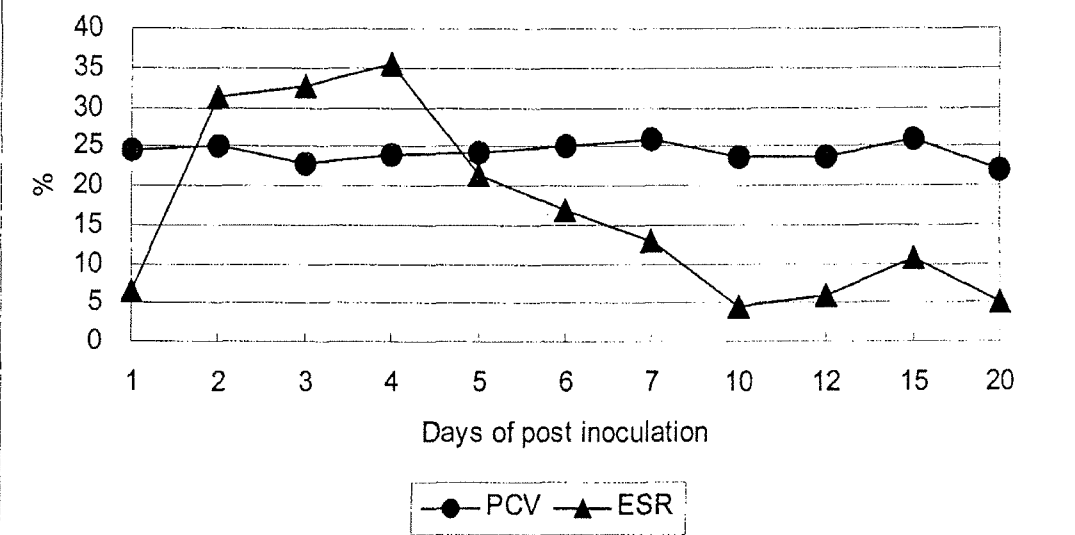


Fig. 2-3. Changes of erythrocyte sedimentation rate (ESR) and packed cell volume (PCV) in 39 days old commercial brown layer chickens inoculated with IBDV SNU 9818 (Trial 2)



### 3. PCV 및 ESR의 변화

야외분리 IBDV 감염계에서 PCV는 감염 전 기간에 걸쳐 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나 ESR은 감염 2~4일 사이에 급격히 상승하였다가 감염 5~10일 사이에 급격하게 감소하여 정상 수준으로 복귀하는 경향을 보여주었다 (Fig. 2-3). 제2차년(2003년)에는 약병원성 (n=20) 과 강병원성(n=10)으로 구분하여 SFP계 닭에 감염시키고, 약병원성 IBDV를 접종한 A group과 강병원성 IBDV를 접종한 B group에서 접종 후 2일째부터 10일째까지 혈액 PCV 및 ESR의 변화를 관찰하였다. 이때 PCV의 경우 A group에서는 접종 후 4일부터 7일까지 유의적으로 감소함을 보였으며, B group은 접종 후 7일부터 9일까지 유의적으로 감소함 ( $P<0.05$ )을 볼 수 있었다(Fig. 2-4). ESR은 A group의 경우 접종 후 4일과 5일에서 접종전 과 비교하여 유의적으로 증가하였고, B group의 경우 접종 후 5일과 6일에서 유의적으로 증가 ( $P<0.05$ )한 것을 볼 수 있었다(Fig. 2-5).

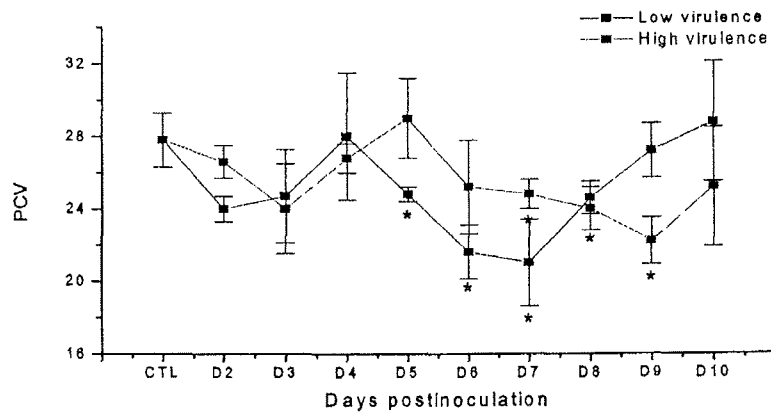


Fig. 2-4. Packed cell volume (PCV) after inoculation with IBDV. The group inoculated with low virulent IBDV (strain 9414) shows significantly decreased PCV from DPI-5 to DPI-7. The group inoculated with high virulent IBDV (strain 1030) shows significantly decreased PCV from DPI-7 to DPI-9. Each points represent mean of 5 chickens  $\pm$  S.D.

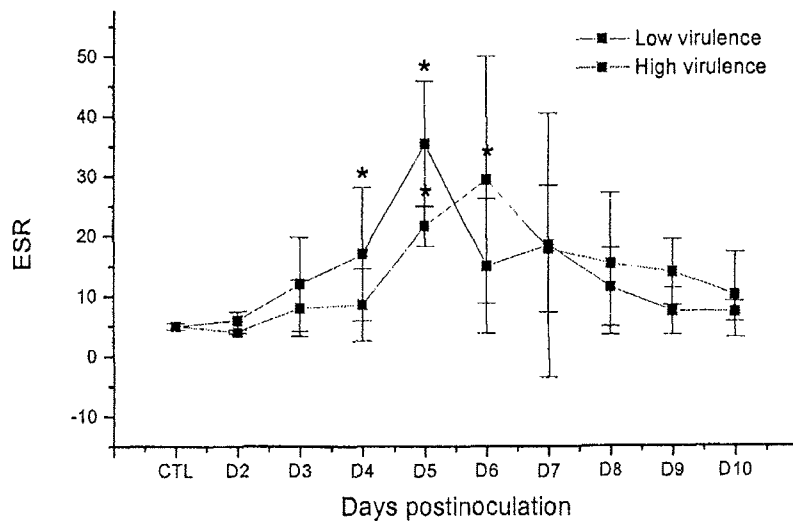


Fig. 2-5. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) after inoculation with IBDV. ESR of low virulent IBDV inoculated group significantly increased on DPI-4 and DPI-5. ESR of high virulent IBDV inoculated group significantly increased on DPI-5 and DPI-6. Each points represent mean of 5 birds  $\pm$ S.D.

#### 4. IBD virus 접종 후 체온의 변화

2003년 제2차 접종시험에서 약병원성 IBDV를 투여한 A group과 강병원성 IBDV를 접종한 B group의 닭에서 접종 후 매일 체온을 측정하여 IBD virus 감염으로 인한 체온 변화를 살펴보고자 하였다. 체온의 변화는 A group과 B group 모두에서 접종 후 1일째부터 증가하여 3일째에 최고조를 이루고 다시 정상체온과 비슷하게 회복되는 양상을 나타내었다. 접종 후 1일째부터 3일째까지 계속 체온이 유의적으로 증가해 있음( $P < 0.05$ )을 확인하였다 (Fig. 2-6).

Fig. 2-7은 제1차 접종시험에서 폐사12시간 전까지 체온이 측정된 3마리의 병아리의 개체별 체온변화이다. 바이러스 접종 후 1일째에 체온이  $41.6 \pm 0.1$  도에서  $42.0 \pm 0.1$ 도로 증가하였다가 차츰 원래로 회복되다가 폐사 12시간 전에  $41.6 \pm 0.24$ 도에서  $38.8 \pm 0.6$ 도로 2.8도나 감소되었다.

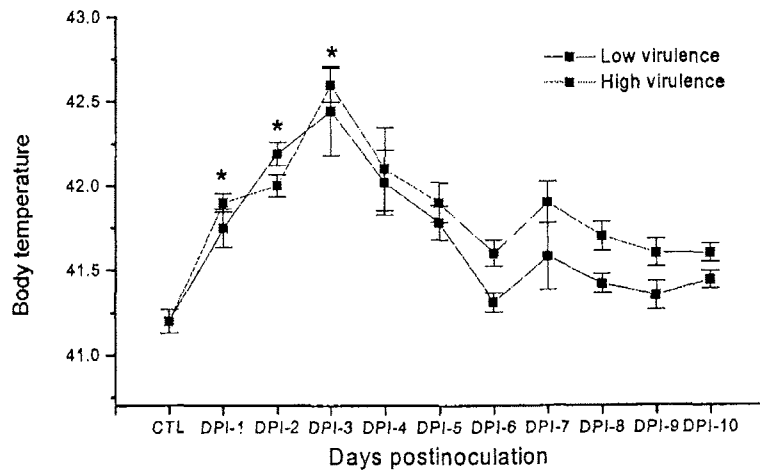


Fig. 2-6. Change of body temperature by inoculation with IBDV. From DPI-1 to DPI-3 body temperature of both group (inoculated with low virulent IBDV and high virulent IBDV) is significantly increased ( $P < 0.05$ ). Each point represent mean  $\pm$  S.E. Sample numbers are 20 for low and 10 for high virulent groups, respectively.

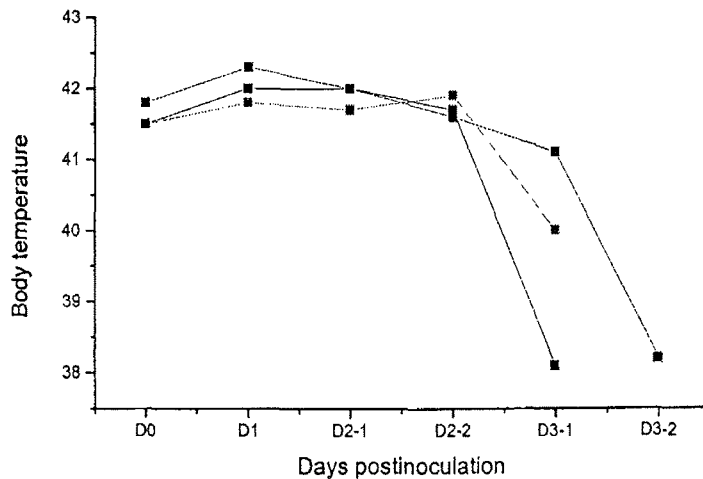


Fig. 2-7. Characteristic change of body temperature of moribund chickens. Body temperature of 3 moribund chickens significantly decreased before death.

### 5. IBDV 접종계의 폐사 양상

2003년도에 실시한 접종실험에서는 약병원성 바이러스를 접종한 그룹에서 접종 후 4일째에 2마리가 폐사하였다. 강병원성 바이러스를 접종한 그룹에서는 접종 후 5-7일 사이에 6마리가 폐사하였다. 2004년도에 실시한 두 번의 접종실험에서는 6월달에 실시한 1차 접종실험에서는 바이러스 접종 후 2-5일 사이에 5마리가 폐사하였으며, 7월달에 실시한 2차 접종실험에서는 접종 후 3-4일 사이에 6마리가 폐사하였다. 3번에 걸친 접종실험에서 닭이 폐사한 시기는 약간씩 차이가 났지만 폐사하는 양상은 모두 2-3일 사이에 많은 수의 닭이 폐사한 뒤 이후에는 폐사하는 개체가 나타나지 않는 spiked mortality 양상을 나타내었다(Table 2-2).

Table 2-2. Mortality of chickens inoculated with IBD virus during 2003-2004

	Age (week)	virulence of IBDV	Days postinoculation (DPI)									Mortality (%)
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	
03.06.02-03.06.12	7	Low	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2/20(10)
	7	High	0	0	0	0	0	3	2	1	0	6/20(30)
04.06.01-04.06.08	8	High	0	0	1	2	1	1	0	0	0	5/10(50)
04.07.26-04.07.31	8	High	0	0	0	2	4	0	0	0	0	6/17(35)

### 6. 약물이 IBDV 접종계의 생존율에 미치는 영향

2004년 1차 접종 실험 결과 각 약물 투여에 따른 IBDV 접종계에서의 폐사율은 Table 2-3에 정리한 바와 같이 나타났다.

Table 2-3. Mortality of the chickens infected with IBDV with drug treatment

	DPI-0	DPI-1	DPI-2	DPI-3	DPI-4	DPI-5	DPI-6	폐사율
Control	0	0	0	0	0	0	0	0/9
Virus	0	0	1	2	1	1	0	5/10
Vit.E+Selenium	0	0	2	4	0	0	0	6/10
Dexamethasone	0	0	0	1	0	0	0	1/10
S-methylthiourea	0	0	2	3	0	0	0	5/10
Aspirin	0	0	3	1	1	1	0	6/10

바이러스를 접종하지 않은 control group (CTL)은 9마리 모두 생존하였으며, virus를 접종하고 약물 투약을 하지 않은 Virus group은 10마리 중 5마리가 폐사하였다. Vitamin E와 Selenium을 투여한 그룹은 10마리 중 6마리가 폐사하였고, Aspirin을 음수에 섞어 투약한 그룹은 10마리 중 6마리가 폐사, SMT를 접종한 그룹은 10마리 중 5마리가 폐사하였다. 그러나, Dexamethasone을 접종한 그룹은 10마리 중 1마리만이 폐사하였다. 이러한 닭의 폐사는 바이러스 접종 후 2일과 3일째에 가장 심하게 나타났다. 전년도의 연구결과, IBD 바이러스를 접종했을 때 닭에서 발열반응이 일어난다는 점에 바탕을 두고 이번 연구에서는 IBDV 접종계에서 Aspirin에 의한 체온상승 억제와 고온환경에서 저항성을 높이는 항산화제인 Vitamin E와 Selenium 혼합제제가 IBDV 감염계에서의 폐사율에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보려고 하였다. 지금까지 연구된 결과로는 닭에서 vitamin E와 selenium을 닭에게 공급하였을 때 serum superoxide dismutase level이 증가한다는 보고가 있으며(Tras B, et al., 2000), Colorectal cancer 환자에게 고용량의 vitamin E를 dietary supplementation하였을 때, T helper 1 cytokine production을 증가시킴으로써 면역기능을 강화한다는 보고가 있다(Malamberg et al., 2002). Japanese quails에서는 vitamin E 250 mg/kg of diet와 selenium 0.2 mg/kg of diet의 용량으로 사료에 첨가하여 급여하였을 때 heat stress-related depression을 완화할 수 있다는 연구가 있으며(Sahin et al., 2002), Aspirin과 vitamin E 300 mg/kg diet를 공급하였을 때 E. coli 감염계에서 폐사율이 낮아진다는 보고가 있다(Likoff RO et al., 1981). 일반적인 해열제로 많이 쓰이고 있는 aspirin은 닭에게 1.25 g/L의 농도로 음수에 섞어 투여하였을 때 치료농도까지 도달한다는 연구결과가 있다(Baert K & Backer PD, 2002). IBD의 발병과정에서 이러한, vitamin E & selenium supplementation과 aspirin의 효과가 닭의 폐사율에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위한 이번 실험에서는, vitamin E 300 mg/kg of diet와 selenium 0.2 mg/kg of diet를 IBDV 접종 일주일전부터 급여한 그룹에서 10마리중 6마리가 폐사하였고, 바이러스 접종 후 aspirin을 음수에 섞어 투약한 그룹에서는 10마리 중 6마리가 폐사함으로써, IBD로 인한 사망의 원인으로 추정하였던 발열반응이 닭의 직접적인 사망원인과는 크게 연관이 없는 것으로 생각되어진다. Aspirin을 투약한 그룹에서는 바이러스만을 접종했던 대조군과 비교하여 체온이 낮아져 있음을 확인할 수 있었으나, 폐사율에 있어서는 차이를 보이지 않았다.

S-methylisothiourrea(SMT)는 선택적으로 inducible NO synthase(iNOS)만을 억제한다고 알려져 있으며(Southan et al., 1995, Hallemeesch et al., 2002), SMT 10 mg/kg을 접종하였

을 때 endotoxin에 의한 혈중 NO농도의 증가를 억제한다는 연구 결과(Kitaichi et al., 1999)가 있다. 또한, 고농도 LPS를 투여한 마우스에서 SMT에 의하여 마우스의 생존률이 증가하였다는 보고(Szabo et al, 1994)와 SMT에 의한 선택적인 iNOS의 억제가 sepsis 상태에서 acute renal failure의 발생을 방지한다는 연구결과가 있다(Arkovits et al., 1996). 이미 알려진 이러한 연구결과와 연구자의 선행 연구에 의하여 IBDV 접종계에서 혈중 NO 농도가 증가하였음을 확인한 것을 통해, 연구자는 IBDV 감염에 의하여 혈중의 NO 농도가 증가하는 것이 닭의 폐사와 관련이 있을 것으로 생각하고, SMT를 통한 NO 농도 증가의 억제가 닭의 폐사율에 어떠한 영향을 미치는 것인지를 알아보았다. IBD 접종 후 1일 1회 SMT 10 mg/kg을 근육내로 주사한 그룹의 폐사율은 10마리중 5마리로, 바이러스를 접종한 대조군과 차이가 없게 나타났다. 이를 통하여, 닭에서는 SMT가 IBD 바이러스 감염에 의한 닭의 폐사율을 낮추는데 크게 영향을 줄 수 없는 것으로 생각된다.

마지막 그룹인 dexamethasone 투여 그룹은 급성으로 IBD에 의하여 닭이 폐사하는 원인이 바이러스 감염에 의해 대식세포가 활성화 되고 대식세포에서 분비되는 tumor necrosis factor와 interleukin 등의 cytokine 분비의 증가로 과도한 면역반응이 일어나 shock으로 사망할 수 있는 가능성을 의심하여 바이러스를 접종한 뒤 dexamethasone을 투여하여 면역반응을 억제하였을 때, IBD의 발병으로 인한 사망률이 어떻게 변화할 수 있는지를 살펴보았다. 바이러스 접종 후 매일 2 mg/kg의 dexamethasone을 투여한 그룹에서는 10마리 중 1마리 많이 폐사하여 10마리 중 5마리가 폐사한 바이러스 접종 대조군과 비교하여 폐사율이 크게 감소한 것을 확인하였다.

2004년 1차 접종실험 결과 dexamethasone이 IBDV 접종계에서 폐사율을 감소시킨 결과를 통해 2차 접종 실험에서는 dexamethasone에 의한 닭의 폐사율 감소의 결과를 보다 확증하기 위하여 glucocorticoid receptor(GR) blocker인 RU-486에 의해 dexamethasone의 효과를 차단하고, dexamethasone만을 투여한 그룹과 폐사율을 비교하여 보았다. 바이러스 접종 후 5일째까지 1일 1회 dexamethasone 2 mg/kg을 투여한 그룹은 17마리 중 한 마리도 폐사하지 않아 1차 접종실험때와 동일한 결과를 보여주었다. 그리고, 또 다른 실험군에서는 dexamethasone을 접종하기 30분 전에 20 mg/kg의 RU-486을 접종하여 GR을 blocking하여 dexamethasone의 효과를 차단해 보고자 하였으나, RU-486을 접종한 실험군 역시 17마리 중 한 마리도 폐사하지 않았다. 이 결과는 RU-486에 의해 dexamethasone의 효과가 완전히 차단되지 않았음을 나타낸다. 이것은 RU-486과 dexamethasone의 용량 설정 문제, 약물의 반감기, 닭에서의 RU-486의 효과 여부등이 밝혀져 있지 않아 이번 실험에서는 이러한 문제



들이 제대로 해결되지 못한 것으로 생각되어진다. 이에 대한 문제는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 2-4. Mortality of IBDV-infected chicken at the second trial 2004

	DPI-0	DPI-1	DPI-2	DPI-3	DPI-4	DPI-5	폐사율(%)
Control	0	0	0	0	0	0	0/10(0)
Virus	0	0	0	2	4	0	6/17(35)
Dexamethasone	0	0	0	0	0	0	0/17(0)
Dexamethasone+ RU-486	0	0	0	0	0	0	0/17(0)
S-methyl-thiourea	0	0	0	2	10	0	12/17(71)

2차 접종 실험에는 1차 실험 때 효과를 나타내지 못했던 SMT의 효과에 대한 재확인을 위하여, 1차 실험때보다 5배 많은 50 mg/kg 의 SMT를 IBDV 접종계에게 투여하여, IBD 발병에서 NO 생성의 억제가 닭의 폐사율과 관련이 있는지의 여부를 다시 한번 살펴보고자 하였다. 그러나, 2차 실험에서도 SMT를 접종한 그룹에서는 17마리 중 12마리가 폐사하여, 17마리 중 6마리가 폐사한 바이러스 접종 대조군보다도 폐사율이 높은 결과를 얻었다. 두 번의 실험결과를 통하여 SMT는 닭에서, 특히 IBD 발병에 있어 치료효과가 없는 것으로 판명되었다. 2차 접종실험의 결과는 Table 2-4에 정리하였다. Virus와 SMT를 접종한 군에서 폐사한 닭은 모두 접종 후 3일과 4일째에 사망하였다.

## 7. 약물투여와 IBDV 접종계의 체온변화

IBD virus 및 투여한 약물에 의한 닭의 체온 변화를 살펴보기 위하여 1차 접종실험에서는 1일 1회 닭의 체온을 측정하였다. 정상 대조군을 제외한 모든 그룹에서 바이러스 접종 후 1일부터 3일까지 체온이 증가되어 있는 경향을 보였다. 그리고, 체온의 증가는 virus 접종군, vitamin E & selenium 투여군, SMT 투여군, Aspirin 투여군에서는 바이러스 접종 후 2일째에 peak를 보이고 감소되는 경향을 나타내었으며, dexamethasone을 투여한 그룹에서는 바이러스 접종 후 3일째까지 체온이 증가하다가 4일째부터 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2-8). Aspirin을 투여한 그룹에서는 체온의 증가가 최고조를 이룬 2일째에 바이러스를 접종한 대조군과 비교하여 체온의 증가가 유의적으로 낮게 나타나 있는 것을 확인하였으나(Fig. 2-8), 이러한 체온 증가의 억제 효과가 IBD에 의한 닭의 폐사율을 감소시키지는 못했다.

IBDV 감염에 의한 체온의 증가가 닭의 폐사율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 live chickens와 moribund chickens 사이에서 체온을 비교하여 본 결과 둘 사이에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2-9). 한편, 고온스트레스를 견디는데 도움이 되는 것으로 알려진 Vit-E와 selenium 합제를 투여한 군에서는 접종후2일째의 온도가 대조군보다 낮았으며, 반면에 NO합성억제제, dexamethasone의 투여군에서는 바이러스접종군과 유사하게 높게 나타났다. 이는 dexamethasone의 작용이 내인성 해열인자로 작용하는 corticosterone과는 다르게 작용함을 보여주고 있다.

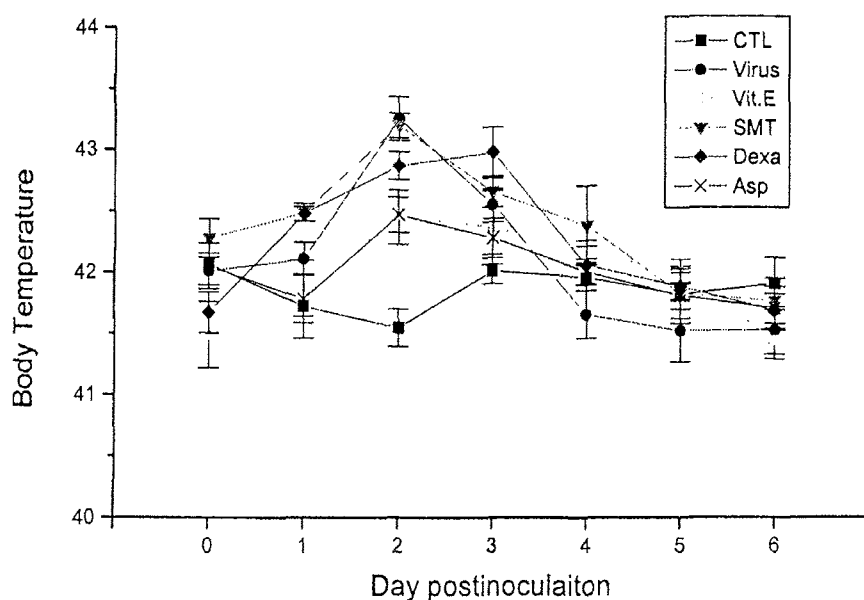


Fig. 2-8. Body temperature of chickens on each day postinoculation. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of each group (n=3-10).

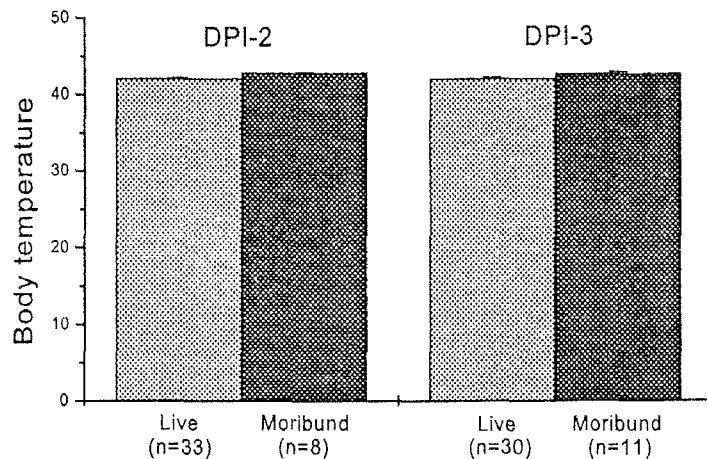


Fig. 2-9. Body temperature of live and moribund chickens on day 2 and day 3 postinoculation (DPI). There was no significant difference between live and moribund chickens.

#### 8. 약물투여와 IBDV 감염계에서의 혈중 NO 농도

2004년 1차 접종시험에서 얻어진 실험계의 혈액에서 NO 농도를 측정하였다. 자료에서는 정상 대조군을 제외한 모든 그룹에서 바이러스 접종 후 혈중 NO 농도가 접종 후 1일째부터 증가하기 시작하여 2일과 3일째에 peak를 이룬 후 4일째부터 다시 정상수준으로 회복되었다(Fig. 2-10). Peak에 도달하였을 때의 NO 농도는 Virus 그룹에서  $81.70 \pm 10.11 \mu\text{M}$ 로 바이러스 접종 전에 비하여 3.28배 증가하였으며, 증가의 정도는 Vit. E & selenium을 투여한 그룹에서 가장 높았고 ( $123.54 \pm 39.11 \mu\text{M}$ , 접종전의 4.96배), Dexamethasone을 투여한 그룹에서 가장 낮았다( $60.84 \pm 10.93 \mu\text{M}$ , 접종전의 2.73배) 한편, SMT를 투여한 그룹에서는  $75.72 \pm 26.06 \mu\text{M}$ 로 접종 전에 비하여 3.06배 증가하였고, aspirin을 투여한 그룹에서는  $80.20 \pm 24.20 \mu\text{M}$ 로 접종 전과 비교해 3.64배 증가하였다. Peak에 도달하였을 때의 혈중 NO 농도는 dexamethasone을 투여한 그룹에서  $60.84 \pm 10.93 \mu\text{M}$ 과 SMT를 투여한 그룹에서  $75.72 \pm 26.06 \mu\text{M}$ 로써 다른 그룹들과 비교해 낮은 수치를 나타내었으나, virus 그룹과 비교하였을 때 유의적인 차이는 보이지 않았다. Dexamethasone의 경우는 iNOS의 활성뿐만 아니라 발현까지도 억제한다는 보고가 있다(Shinoda et al., 2003). 이번 실험 결과에서, dexamethasone을 투여한 그룹에서의 혈중 NO 농도가 가장 낮으며, SMT를 투여한 그룹의 NO 농도보다도 낮게 나타난 것은 이러한 약물의 특성에 의한 것으로 추측되어진다.

IBD 발병에 의한 혈중 NO의 증가가 닭의 사망률과 어떠한 관련이 있는지의 여부를 살펴 보기 위하여 가장 많은 수의 닭이 폐사한 DPI-3일을 기준으로 전날인 DPI-2에 채취한 혈액의 NO농도를 DPI-3일에 사망한 개체(Moribund)와 살아있던 개체로 구분하여 비교하여 보았다(Fig. 2-11). Moribund group에서의 NO 농도의 평균값은 Live group에서의 NO 농도의 평균치보다 2.6배나 높게 나타났으며 유의적으로도 차이가 있었다( $p < 0.05$ ). 또한, virus group내에서도 live와 moribund chickens 사이에서 NO 농도를 비교하여 본 결과 접종 2일과 3일째에 폐사한 닭에서는 혈중 NO 농도의 차이를 관찰할 수 없었으나, 접종 4일과 5일째에 폐사한 닭에서는 폐사직전의 개체에서 NO 농도가 증가해 있는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-12). 폐사 직전의 개체에서 이와 같이 혈중의 NO 농도가 많이 증가해 있다는 것은 혈중의 NO 농도의 증가가 닭의 폐사에 한 요인으로 작용할 것으로 생각할 수 있다. 이것은 dexamethasone도 iNOS를 억제하는 효과를 가지고 있으며, dexamethasone을 투여한 그룹에서의 혈중 NO 농도가 가장 낮게 나타난 것에서도 추측해볼 수 있다.

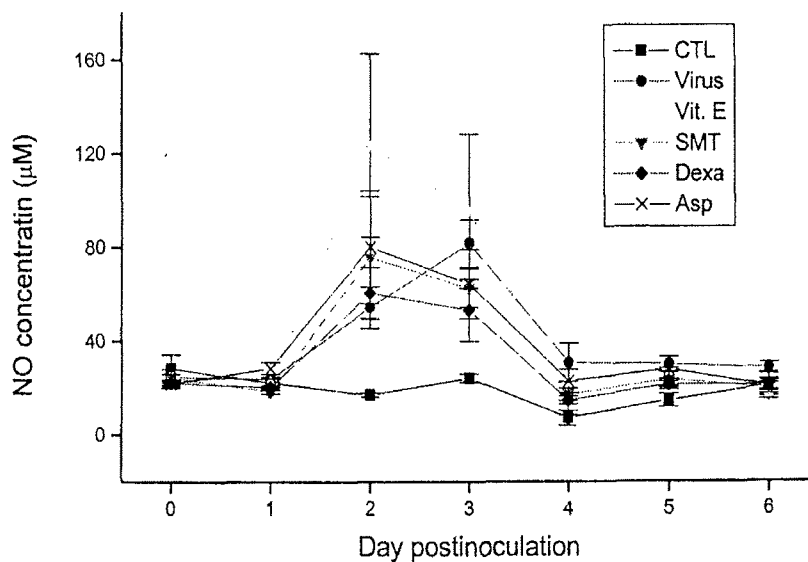


Fig. 2-10. Plasma nitric oxide concentration on each day postinoculation. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of each group (n=3-10).

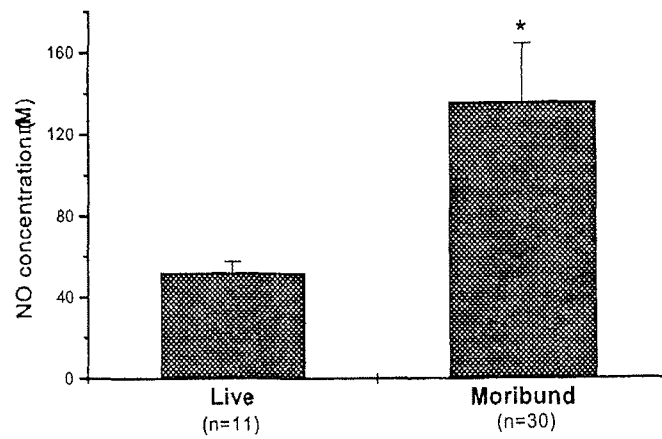


Fig. 2-11. Plasma nitric oxide concentration in live and moribund chickens on DPI-2. Nitric oxide concentration concentration in moribund group is significantly higher than live group (\*,  $p < 0.05$  by t-TEST).

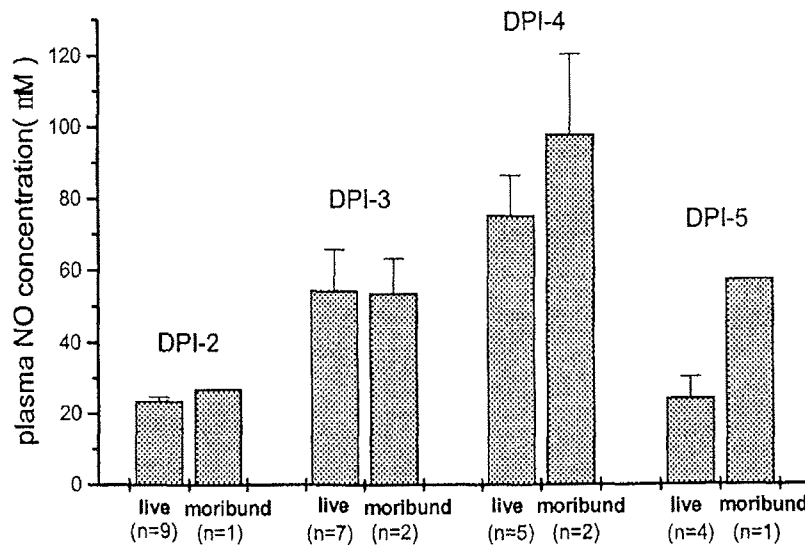


Fig. 2-12. Comparison of NO concentration between live and moribund chickens within the group of virus inoculation without drug treatment.

## 9. IBDV 접종계의 혈중 corticosterone 농도

1차 접종 실험에서 닭의 폐사율을 현저히 낮추었던 dexamethasone 투여군과 정상 대조군(CTL), 바이러스 접종군(Virus)에서의 혈중 corticosterone의 농도를 측정하여 보았다(Fig. 13). 바이러스를 접종한 그룹에서는 접종 후 1일부터 3일까지 혈중 corticosterone level이 증가하여 있었다. Corticosterone의 증가는 접종 후 2일째에 peak를 이루고 감소하는 양상을 나타내어 4일 이후에는 정상 수준으로 떨어졌다. Peak를 이룬 접종 후 2일째의 바이러스 접종군에서의 corticosterone 혈중 농도는 정상 대조군에 비하여 1.7배 가량 높았으나, 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. Dexamethasone을 투여한 그룹에서는 혈중 corticosterone의 농도가 바이러스 접종 후 1일까지는 감소하다가 1일 이후에 증가하여 3일 이후에 다시 감소하는 양상을 나타내었다. 이러한 초기 혈중 corticosterone의 감소는 dexamethasone의 투여로 인하여 내재성 corticosterone의 분비가 negative feedback 현상을 통해 감소되어진 것에 원인이 있을 것으로 생각된다. 이후 1일에서 3일까지 다시 증가하는 양상을 나타내지만, 정상 대조군보다는 낮은 수치로 나타났다. Dexamethasone 투여군에서의 접종 1일과 2일째의 corticosterone 농도는 정상 대조군에 비하여 유의적으로도 낮음을 확인하였다( $p < 0.05$ ). 이 결과는 조류에서도 감염증이 스트레스로 작용하여 시상하부-뇌하수체-부신피질 축 (HPA axis)을 활성화시킴을 보여주는 실험적 결과이다.

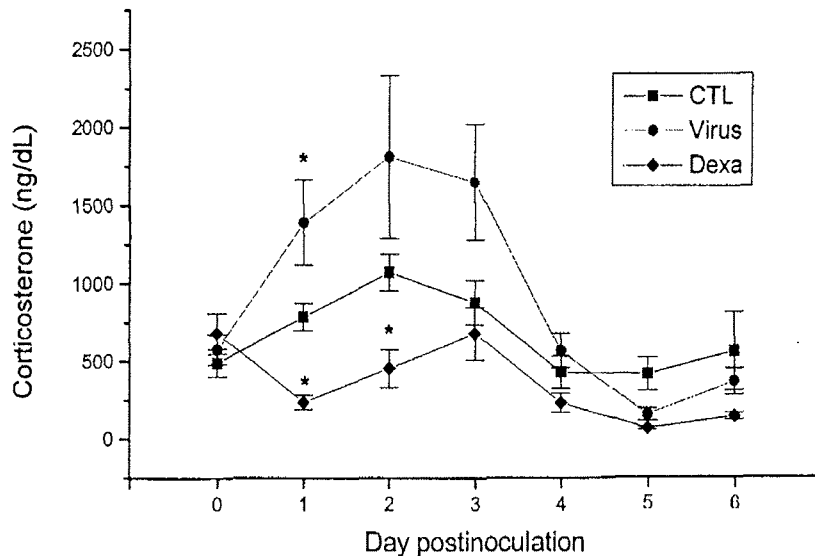


Fig. 2-13. Plasma corticosterone concentration on each day postinoculation. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of each group (\*,  $p < 0.05$  vs CTL by t-TEST).

## 10. 약물투여 IBDV 접종계의 체중대비 F낭의 무게비(Bursa/Body weight ratio)의 변화

감염후 8 주 까지 생존하는 닭의 bursa/body weight ratio는 유의성있게 감소되어 있으나 죽은 닭의 경우에는 무감염 대조군과 유의성있는 차이를 보이지 않았다. Aspirin 투여군을 제외한 시험군에서 bursa의 위축이 관찰되었으며, 특히 더 심한 dexamethasone투여군의 경우 바이러스뿐만 아니라 약물자체도 bursa를 위축시키는 작용이 있기 때문이라 여겨진다 (Fig. 2-14).

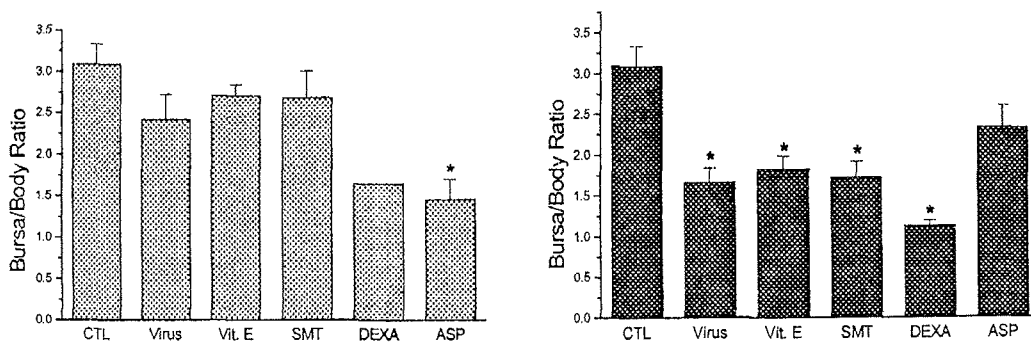


Fig. 2-14. Bursa/Body weight ratio of survived (left) and dead chickens (right) of each treatment groups. (\*,  $p < 0.05$  by t-test).

## 11. 요약, 고찰 및 결론

### 가. 요약

1) 연령별감수성: IBDV(SNU 91108주)를 1-6주령의 SPF 닭에 접종한 바 나이가 어릴수록 치사율은 낮아지는 경향을 보였으며 4-6주령의 닭에서는 100%의 치사율을 보였다.

2) 감염계의 폐사양상: IBDV(야외분리주)감염 SPF 닭에서 감염후 2-4일에 집중적인 폐사가 있었으며 이후에는 폐사가 없었다.

3) 체온의 변화: 감염 후 2-3일에 최고 1.25-1.5℃까지 증가되다 정상으로 회복되는 경향을 보였다. 그러나, 폐사된 닭의 경우 죽기 전 체온이 급격히 감소되는 경향이 있었다.

4) Bursa/Body weight ratio: 야외분리 IBDV SNU 9818을 감염시킨 갈색 산란계에서 B/B ratio는 감염 3일째까지 급격하게 감소하다가 감염 4-20일 까지는 비교적 완만하지만 지속적으로 감소하는 경향을 보였다. IBDV 감염후 생존 SPF 닭의 B/B ratio는 정상닭의 경우보다 유의성있게 낮았다.

5) PCV와 ESR: 감염 5-7일 사이에 PCV는 감소하고 ESR은 증가하는 경향을 보였으며 9-10일에는 정상으로 회복하였다.

6) 약물이 IBDV 감염계의 생존율에 미치는 영향: 조사된 4종의 약물 가운데 dexamethasone은 IBDV 감염계의 폐사를 효과적으로 막는 작용이 있었으나, aspirin, Vit-E와 selenium합제, S-methylthiourea (10 mg/kg)는 폐사를 줄이지 못하였다. 특히, NOS 억제제인 S-methylthiourea를 50 mg/kg로 투여한 경우에는 폐사율이 바이러스만 투여한 경우의 두배로 높았다.

7) 약물이 IBDV 감염계의 체온에 미치는 영향: 약물처리군에서 IBDV 감염계의 체온은 1일째부터 증가하여, 2일째에 가장 높았고 이후 감소하여 3-6일경에는 대조군보다 다소 낮게 유지되다가 생존한 닭의 경우 6일째에는 무감염대조군 수준으로 회복하였다. 접종 2일째의 체온은 IBDV 단독투여군과 S-methylthiourea(10 mg/kg) 투여군은 43.3°C이었으며 dexamethasone 투여군 (약 42.7°C)과 aspirin 투여군과 Vit-E+selenium 투여군(약 42.5 °C)에서는 0.5 - 1 °C 만큼 낮아지는 경향을 보였다.

8) 약물이 IBDV 감염계의 혈중 NO농도에 미치는 영향: IBDV 감염계의 혈중 NO농도는 감염 3일째에 최고(80  $\mu$ M)에 도달한 이후 5일째에 무감염대조군 수준(30  $\mu$ M)으로 회복되었다. 감염 3일째 농도는 aspirin 투여군과 S-methylthiourea (10 mg/kg) 투여군 (60  $\mu$ M), 그리고 dexamethasone 투여군(50  $\mu$ M)에서 낮아지는 경향을 보였다. 그러나, Vit-E+selenium 투여군에서는 IBDV단독투여군에서보다 혈중 NO가 더 높았다(90  $\mu$ M).

9) 약물이 IBDV 감염계의 혈중 corticosterone의 농도에 미치는 영향: 혈중 corticosterone의 농도는 IBDV 감염 후 처음 1-3일에 증가되었다가 4일째에는 정상으로 회복되는 양상을 보이며, 감염후 1-2일의 dexamethasone투여군의 혈중 corticosterone 농도는 무감염대조군의 농도보다 낮았다.

#### 나. 고찰

IBDV 감염계의 증상은 septic shock과 유사하다고 알려져 있다. 따라서, 바이러스에 의한 탐식세포의 파괴로 각종 cytokine의 분비가 증가되고, 이로 NO의 생성이 증가될 것으로 여겨진다. 한편, IBDV 감염계의 면역기능의 억제는 바이러스가 면역세포(B림프구, T림프구, 탐식세포)를 손상시키기 때문으로 여겨지고 있다(Sharma et al., 2000; van den berg, 2000). 그러나, 임상적으로 감염계의 폐사를 유발하는 직접적인 원인이 무엇인지는 규명되어 있지 않다.



본 연구의 기획단계에서 폐사의 직접적인 원인으로 의심하였던 '체온의 변화'는 다 음과 같은 이유로 폐사의 직접적인 원인으로 볼 수는 없다고 사료된다. 체온은 감염후 2일 혹은 3일에 최고조에 도달하나 폐사직전에는 감소하는 경향을 보였으나, 아스피린투여와 Vit-E와 selenium합제 투여로 체온이 떨어진 경우에도 폐사율은 변화가 없었으며, 폐사 하 루전의 체온을 비교한 경우 폐사한 닭과 살아남은 닭의 체온 간에 차이가 없었기 때문이다.

연구의 결과는 IBDV감염으로 인한 폐사의 직접적인 원인은 septic shock syndrome임을 암시하고 있다. 그 이유는 septic shock syndrome의 주요 혈중지표인 NO의 농도의 증가와 폐사율과 상관성이 있기 때문이다. 즉, septic shock 의 치료에 쓰이는 dexamethasone을 투여하였을 때 혈중 NO농도와 체온의 증가가 둔화되며, dexamethasone 을 투여한 군에서는 폐사율이 0에 가깝기 때문이다. 또한, 감염후 4일과 5일을 기준으로 다 음날 죽은 닭과 살아남은 닭의 혈중농도를 비교하였을 때 살아남은 닭의 혈중 NO농도가 높았기 때문이다.

본 연구에서는 소염제로 흔히 패혈증의 치료에 쓰이는 dexamethasone이 IBDV 감 염계의 폐사율을 감소시킴을 두 차례의 감염실험에서 확인하였다. glucocorticoid 수용체를 차단하는 RU486으로 전처치한 경우, dexamethasone의 폐사율에 미치는 작용은 변화되지 않았다. 따라서, glucocorticoid 수용체가 아닌 다른 작용의 가능성도 있으나 이에 대한 결론 은 사용한 RU 486의 농도가 적절하였는지 등에 대하여 추가적인 조사 후에 내려야 할 것이 다.

IBDV 감염계에서는 바이러스에 의한 면역세포의 손상으로 인하여 면역기능이 억 제되어 있음이 잘 알려져 있다. 흥미롭게도 본 연구에서는 IBDV 감염계에서 혈중의 corticosterone의 농도 NO의 증가와 체온증가의 경우와 유사한 양식으로 증가하였다. 일반 적으로 corticosterone은 면역반응을 억제하기 때문에, 이는 IBDV 감염계에서 관찰되는 면 역기능의 억제가 가운데 일부는 corticosterone에 의하여 나타남을 암시하고 있다. 이에 대 하여는 추가적인 연구가 필요하다.

#### 다. 결 론

IBDV감염계에 dexamethasone을 투여한 결과 폐사가 효과적으로 예방되었으며, 감 염계의 폐사율과 혈중의 NO농도의 증가와 상관성이 있었다. dexamethasone이 패혈증의 치료 에 쓰이는 중요한 약물이며 또, NO가 패혈증의 병인과 밀접한 관련이 있음을 고려할 때, IBDV 감염계의 폐사의 직접적인 원인은 바이러스 감염으로 인하여 나타나는 septic shock

syndrome으로 판단된다. 본 연구의 결과는 IBDV 감염계의 폐사를 예방하는 방법이나 약물 요법의 개발에 크게 도움이 될 것이다.

## 제 3 절

### 협동과제: 전염성 낭병의 유전자 재조합 백신의 개발

#### 1. 효과적이고 항원성이 우수한 단백질의 선발

기존의 연구 결과를 조사한 결과 IBDV의 단백질 중 가장 항원성이 있고 유전자 재조합 백신으로 target이 되고 있는 단백질은 VP2인 것으로 나타났다. 본 과제에서는 VP2의 재조합 단백질을 발현시켰고 재조합된 VP2와의 면역원성을 비교하기 위해서는 또 다른 재조합 단백질이 필요하다고 판단되어 VP2-VP4-VP3 (segment A)도 발현시켜 두가지 단백질에 대한 방어능을 비교시험하였다.

IBD 단백질의 발현시스템에 대한 연구로는 Fowl pox virus, herpesvirus of turkey, Fowl adenovirus, Yeast, Baculovirus와 Semliki forest virus를 이용한 연구보고가 있으나 본 연구에서는 Baculovirus system을 이용하여 연구를 수행하였다.

IBDV는 병원성에 따라 여러 가지 pathotype으로 분류되는 바 아래와 같이 4개의 pathotype에 대한 항원을 선택하여 VP2 및 VP2-VP4-VP3(segment A)를 증폭하여 재조합 백신의 후보단백질로 면역원성 검사를 하고자 했다.

- Very virulent field isolate (국내분리주): 1030, SH92
- Intermediate plus vaccine strain: Cevac IBD
- Intermediate vaccine strain: Bursine-2
- Attenuated vaccine strain: Bur-706

#### 2. RT-PCR을 이용한 유전자 증폭 및 염기서열 확인

##### 가. RT-PCR을 이용한 VP2와 SegA의 증폭

RT-PCR을 유전자의 증폭은 double stranded RNA이라서 상당히 어려움이 있었다. 이들 유전자는 일반 PCR에 의해 증폭되는 산물보다 매우 길기 때문에 많은 시행착오가 있었다. Primer의 종류와 RNA 분리방법 및 분리키트에 따른 RNA의 정제와 RT-PCR의 조건확립에 상당한 시간을 소요하였다. *Taq* polymerase의 종류에 따라 RT-PCR의 결과도 크게 달랐다. 길이가 1540 bp의 VP2의 경우 백신주인 Blen, Bur706, Bursine plus, Bursine2 및 Cevac의 VP2를 모두 증폭하였고 강병원성인 국내분리주인 SH92 및 1030주의 VP2도 증폭

하였다 (Fig. 3-2). 그러나 길이가 3148bp인 SegA(VP2-VP4-VP3)의 경우 Bursine2, Cevac, SH92주가 증폭되었고 1030의 경우 매우 약하게 증폭되었다 (Fig. 3-3).

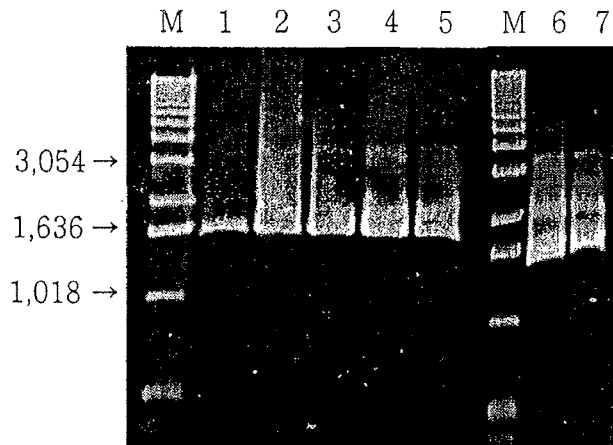


Fig. 3-2. Amplification of VP2 from IBDV vaccine strains and field isolates. Lanes M, 1kbp DNA marker; 1, Blen; 2, Bur-706; 3, Bursine plus; 4. Bursine 2; 5, Cevac; 6, SH-92; 7, 1030.

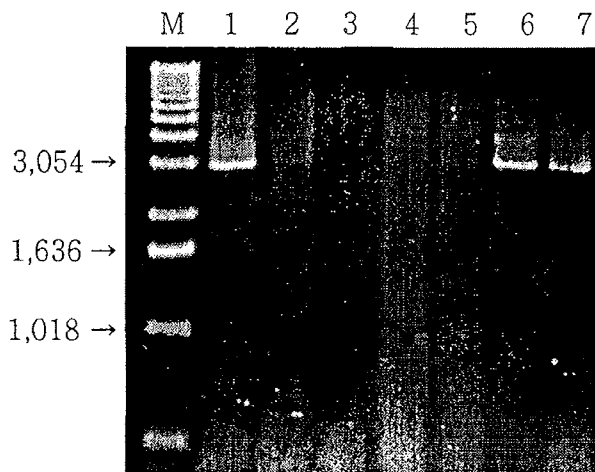


Fig. 3-3. Amplification of IBDV segA DNA fragment from IBDV vaccine strains and field isolates. Lanes M, 1kbp DNA marker; 1, SH-92; 2, 1030; 3, Blen; 4, Bur-706; 5, Bursine plus; 6, Bursine 2; 7, Cevac.

#### 나. IBDV SH/92 strain VP2 와 SegA 유전자 및 아미노산의 염기서열 분석

증폭된 각각의 유전자를 1% agarose gel에서 전기영동한 후 겔에서 각각의 DNA를 gel extraction kit (Qiagen)를 사용하여 추출 하였다. 증폭된 VP2유전자의 경우 제한효소로

처리한 후 pBluescripII vector에 클로닝하였고 증폭된 SegA유전자의 경우 pCR2.1-TOPO vector (TOPO TA cloning kit)에 제공된 방법에 따라 클로닝하였다. VP2 및 segA의 삽입유무는 제한효소인 *EcoRI* digestion에 의해 검사하였고 선발된 각각의 클론에서 plasmid DNA를 miniprep kit (Qiagen)로 추출한 후 염기서열을 분석하였다. 얻어진 염기서열과 아미노산 서열을 DNASIS로 분석하였다. VP2와 SegA의 염기서열 및 아미노산 서열을 Fig. 3-4A와 Fig. 3-4B에 나타내었다. 또한 국내 분리주 SH92와 백신주인 Bur706, Bursine-2 및 Cevac의 VP2의 염기서열과 아미노산 서열을 비교하였다 (fig. 3-5A & B). 국내 분리주 SH92와 백신주인 Bur706, Bursine-2 및 Cevac의 VP2의 염기서열유사성은 각각 96.5, 96.1 및 96.4%로 매우 높게 나타났다. 국내분리주 SH92의 아미노산서열의 유사성은 Bur706, Bursine-2 및 Cevac의 VP2아미노산 서열과 각각 97.2, 96.6 및 97.2%로 높은 유사성을 보였다.

ATATGGTACC AAACGATCGCAGCG

5' ATG ACA AAC CTG CAA GAT CAA ACC CAA CAG ATT GTT CCG TTC ATA CGG AGC CTT CTG ATG 60  
M T N L Q D Q T Q Q I V P F I R S L L M  
CCA ACA ACC GGA CCG GCG TCC ATT CCG GAC GAC ACC CTA GAG AAG CAC ACT CTC AGG TCA 120  
P T T G P A S I P D D T L E K H T L R S  
GAG ACC TCG ACC TAC AAT TTG ACT GTG GGG GAC ACA GGG TCA GGG CTA ATT GTC TTT TTC 180  
E T S T Y N L T V G D T G S G L I V F F  
CCT GGT TTC CCT GGC TCA ATT GTG GGT GCT CAC TAC ACA CTG CAG AGC AAT GGG AAC TAC 240  
P G F P G S I V G A H Y T L Q S N G N Y  
AAG TTC GAT CAG ATG CTC CTG ACT GCC CAG AAC CTA CCG GCC AGC TAC AAC TAC TGC AGG 300  
K F D Q M L L T A Q N L P A S Y N Y C R  
CTA GTG AGT CGG AGT CTC ACA GTG AGG TCA AGC ACA CTC CCT GGT GGC GTT TAT GCA CTA 360  
L V S R S L T V R S S T L P G G V Y A L  
AAT GGC ACC ATA AAC GCC GTG ACC TTC CAA GGA AGC CTG AGT GAA CTG ACA GAT GTT AGC 420  
N G T I N A V T F Q G S L S E L T D V S  
TAC AAT GGG TTG ATG TCT GCA ACA GCC AAC ATC AAC GAC AAA ATC GGG AAC GTC CTA GTA 480  
Y N G L M S A T A N I N D K I G N V L V  
GGG GAA GGG GTA ACC GTC CTC AGC TTA CCC ACA TCA TAT GAT CTT GGG TAT GTG AGA CTC 540  
G E G V T V L S L P T S Y D L G Y V R L  
GGT GAC CCC ATT CCC GCT ATA GGG CTC GAC CCA AAA ATG GTA GCA ACA TGT GAC AGC AGT 600  
G D P I P A I G L D P K M V A T C D S S  
GAC AGG CCC AGA GTT TAC ACC ATA ACT GCA GCC GAT GAT TAC CAA TTC TCA TCA CAG TAC 660  
D R P R V Y T I T A A D D Y Q F S S Q Y  
CAA GCA GGT GGA GTA ACA ATC ACA CTG TTC TCA GCT AAT ATC GAT GCC ATC ACA AGC CTC 720  
Q A G G V T I T L F S A N I D A I T S L  
AGC ATC GGG GGA GAA CTC GTG TTT CAA ACA AGC GTC CAA GGC CTT ATA CTG GGT GCT ACC 780  
S I G G E L V F Q T S V Q G L I L G A T  
ATC TAC CTT ATA GGC TTT GAT GGG ACT GCG GTA ATC ACC AGA GCT GTG GCC GCA AAC AAT 840  
I Y L I G F D G T A V I T R A V A A N N  
GGG CTA ACG GCC GGC ACT GAC AAC CTT ATG CCA TTC AAT ATT GTG ATT CCA ACC AGC GAG 900  
G L T A G T D N L M P F N I V I P T S E  
ATA ACC CAG CCA ATC ACA TCC ATC AAA CTG GAG ATA GTG ACC TCC AAA AGT GGT GGT CAG 960  
I T Q P I T S I K L E I V T S K S G G Q  
CGC GGG GAT CAG ATG TCA TGG TCA GCA AGT GGG AGC CTA GCA GTG ACG ATC CAC GGT GGC 1020  
A G D Q M S W S A S G S L A V T I H G G  
AAC TAT CCA GGG GCC CTC CGT CCC GTC ACA CTA GTA GCC TAC GAA AGA GTG GCA ACA GGA 1080  
N Y P G A L R P V T L V A Y E R V A T G  
TCT GTC GTT ACG GTC GCC GGG GTG AGC AAC TTC GAG CTG ATC CCA AAT CCT GAA CTA GCA 1140  
S V V T V A G V S N F E L I P N P E L A  
AAG AAC CTG GTC ACA GAA TAT GGC CGA TTT GAC CCA GGA GCC ATG AAC TAC ACA AAA TTG 1200  
K N L V T E Y G R F D P G A M N Y T K L  
ATA CTG AGT GAG AGG GAC CGT CTT GGC ATC AAG ACC GTC TGG CCA ACA AGG GAG TAC ACT 1260

I L S E R D R L G I K T V W P T R E Y T  
 GAC TTT CGC GAG TAC TTC ATG GAG GTG GCC GAC CTC AAC TCT CCC CTG AAG ATT GCA GGA 1320  
 D F R E Y F M E V A D L N S P L K I A G  
 GCA TTT GGC TTC AAA GAC ATA ATC CGG GCC CTA AGG AGG ATA GCT GTG CCG GTG GTC TCT 1380  
 A F G F K D I I R A L R R I A V P V V S  
 ACA CTG TTC CCA CCC GCC GCT CCC CTA GCC CAT GCA ATT GGG GAA GGT GTA GAC TAC CTG 1440  
 T L F P P A A P L A H A I G E G V D Y L  
 CTG GGC GAT GAG GCA CAG GCT GCT TCA GGA ACT GCT CGA GCC GCG TCA GGA AAA GCA AGC 1500  
 L G D E A Q A A S G T A R A A S G K A S  
GCA TGAGAA TTC AGT C 3'

A \*

Fig. 3-4A. The nucleotide and the deduced amino acid sequences of VP2 genes of Korean isolate IBDV SH/92.

5' ATG ACA AAC CTG CAA GAT CAA ACC CAA CAG ATT GTT CCG TTC ATA CGG AGC CTT CTG ATG 60  
 M T N L Q D Q T Q Q I V P F I R S L L M  
 CCA ACA ACC GGA CCG GCG TCC ATT CCG GAC GAC ACC CTA GAG AAG CAC ACT CTC AGG TCA 120  
 P T T G P A S I P D D T L E K H T L R S  
 GAG ACC TCG ACC TAC AAT TTG ACT GTG GGG GAC ACA GGG TCA GGG CTA ATT GTC TTT TTC 180  
 E T S T Y N L T V G D T G S G L I V F F  
 CCT GGT TTC CCT GGC TCA ATT GTG GGT GCT CAC TAC ACA CTG CAG AGC AAT GGG AAC TAC 240  
 P G F P G S I V G A H Y T L Q S N G N Y  
 AAG TTC GAT CAG ATG CTC CTG ACT GCC CAG AAC CTA CCG GCC AGC TAC AAC TAC TGC AGG 300  
 K F D Q M L L T A Q N L P A S Y N Y C R  
 CTA GTG AGT CGG AGT CTC ACA GTG AGG TCA AGC ACA CTC CCT GGT GGC GTT TAT GCA CTA 360  
 L V S R S L T V R S S T L P G G V Y A L  
 AAT GGC ACC ATA AAC GCC GTG ACC TTC CAA GGA AGC CTG AGT GAA CTG ACA GAT GTT AGC 420  
 N G T I N A V T F Q G S L S E L T D V S  
 TAC AAT GGG TTG ATG TCT GCA ACA GCC AAC ATC AAC GAC AAA ATC GGG AAC GTC CTA GTA 480  
 Y N G L M S A T A N I N D K I G N V L V  
 GGG GAA GGG GTA ACC GTC CTC AGC TTA CCC ACA TCA TAT GAT CTT GGG TAT GTG AGA CTC 540  
 G E G V T V L S L P T S Y D L G Y V R L  
 GGT GAC CCC ATT CCC GCT ATA GGG CTC GAC CCA AAA ATG GTA GCA ACA TGT GAC AGC AGT 600  
 G D P I P A I G L D P K M V A T C D S S  
 GAC AGG CCC AGA GTT TAC ACC ATA ACT GCA GCC GAT GAT TAC CAA TTC TCA TCA CAG TAC 660  
 D R P R V Y T I T A A D D Y Q F S S Q Y  
 CAA GCA GGT GGA GTA ACA ATC ACA CTG TTC TCA GCT AAT ATC GAT GCC ATC ACA AGC CTC 720  
 Q A G G V T I T L F S A N I D A I T S L  
 AGC ATC GGG GGA GAA CTC GTG TTT CAA ACA AGC GTC CAA GGC CTT ATA CTG GGT GCT ACC 780  
 S I G G E L V F Q T S V Q G L I L G A T  
 ATC TAC CTT ATA GGC TTT GAT GGG ACT GCG GTA ATC ACC AGA GCT GTG GCC GCA AAC AAT 840  
 I Y L I G F D G T A V I T R A V A A N N  
 GGG CTA ACG GCC GGC ACT GAC AAC CTT ATG CCA TTC AAT ATT GTG ATT CCA ACC AGC GAG 900  
 G L T A G T D N L M P F N I V I P T S E  
 ATA ACC CAG CCA ATC ACA TCC ATC AAA CTG GAG ATA GTG ACC TCC AAA AGT GGT GGT CAG 960  
 I T Q P I T S I K L E I V T S K S G G Q  
 GCG GGG GAT CAG ATG TCA TGG TCA GCA AGT GGG AGC CTA GCA GTG ACG ATC CAC GGT GGC 1020  
 A G D Q M S W S A S G S L A V T I H G G  
 AAC TAT CCA GGG GCC CTC CGT CCC GTC ACA CTA GTA GCC TAC GAA AGA GTG GCA ACA GGA 1080  
 N Y P G A L R P V T L V A Y E R V A T G  
 TCT GTC GTT ACG GTC GCC GGG GTG AGC AAC TTC GAG CTG ATC CCA AAT CCT GAA CTA GCA 1140  
 S V V T V A G V S N F E L I P N P E L A  
 AAG AAC CTG GTC ACA GAA TAT GGC CGA TTT GAC CCA GGA GCC ATG AAC TAC ACA AAA TTG 1200  
 K N L V T E Y G R F D P G A M N Y T K L  
 ATA CTG AGT GAG AGG GAC CGT CTT GGC ATC AAG ACC GTC TGG CCA ACA AGG GAG TAC ACT 1260  
 I L S E R D R L G I K T V W P T R E Y T



GAC TTT CGC GAG TAC TTC ATG GAG GTG GCC GAC CTC AAC TCT CCC CTG AAG ATT GCA GGA 1320  
D F R E Y F M E V A D L N S P L K I A G  
GCA TTT GGC TTC AAA GAC ATA ATC CGG GCC CTA AGG AGG ATA GCT GTG CCG GTG GTC TCT 1380  
A F G F K D I I R A L R R I A V P V V S  
ACA CTG TTC CCA CCC GCC GCT CCC CTA GCC CAT GCA ATT GGG GAA GGT GTA GAC TAC CTG 1440  
T L F P P A A P L A H A I G E G V D Y L  
CTG GGC GAT GAG GCA CAG GCT GCT TCA GGA ACT GCT CGA GCC GCG TCA GGA AAA GCA AGC 1500  
L G D E A Q A A S G T A R A A S G K A S  
GCT GCC TCA GGC CGC ATA AGG CAG CTA ACT CTC GCC GCC GAC AAG GGG TAC GAG GTA GTC 1560  
A A S G R I R Q L T L A A D K G Y E V V  
GCG AAT CTG TTT CAG GTG CCC CAG AAT CCT GTA GTC GAC GGG ATT CTC GCT TCA CCT GGG 1620  
A N L F Q V P Q N P V V D G I L A S P G  
ATA CTC CGC GGT GCA CAC AAC CTC GAC TGC GTG TTG AGA GAG GGT GCC ACG CTA TTC CCT 1680  
I L R G A H N L D C V L R E G A T L F P  
GTG GTC ATC ACG ACA GTG GAA GAT GCC ATG ACA CCC AAA GCA CTG AAC AGC AAA ATG TTT 1740  
V V I T T V E D A M T P K A L N S K M F  
GCT GTC ATT GAA GGC GTG CGA GAA GAT CTC CAA CCT CCA TCT CAA AGA GGA TCC TTC ATA 1800  
A V I E G V R E D L Q P P S Q R G S F I  
AGA ACT CTC TCC GGA CAT AGA GTC TAT GGA TAT GCT CCA GAT GGG GTA CTT CCA CTG GAG 1860  
R T L S G H R V Y G Y A P D G V L P L E  
ACT GGG AGA GAT TAC ACC GTG GTC CCA ATA GAT GAT GTC TGG GAC GAC AGC ATT ATG CTG 1920  
T G R D Y T V V P I D D V W D D S I M L  
TCC AAA GAC CCC ATA CCT CCT ATT GTG GGA AAC AGC GGA AAC CTA GCC ATA GCT YAC ATG 1980  
S K D P I P P I V G N S G N L A I A X M  
GAT GTT TTT VGA CCA AAA GTC CCT ATC CAT GTG GCC ATG ACG GGG GCC CTC AAC GCC TAT 2040  
D V F X P K V P I H V A M T G A L N A Y  
GGC GAG ATT GAG AAC GTG AGC TTT AGA AGC ACC AAG CTC GCC ACT GCA CAC CGA CTT GGC 2100  
G E I E N V S F R S T K L A T A H R L G  
CTC AAG TTG GCT GGT CCC GGT GCA TTT GAC GTG AAC ACC GGG TCC AAC TGG GCG ACG TTT 2160  
L K L A G P G A F D V N T G S N W A T F  
ATC AAA CGT TTT CCT CAC AAT CCA CGC GAC TGG GAC AGG CTC CCT TAC CTC AAC CTT CCA 2220  
I K R F P H N P R D W D R L P Y L N L P  
TAC CTT CCA CCC AAT GCA GGA CGC CAG TAC GAC CTG GCC ATG GCC GCT TCA GAG TTC AAA 2280  
Y L P P N A G R Q Y D L A M A A S E F K  
GGG ACC CCC GAA CTC GAG AGC GCC GTC AGA GCC ATG GAA GCA GCA GCC AAC GTG GAC CCA 2340  
G T P E L E S A V R A M E A A A N V D P  
CTG TTC CAA TCC GCG CTC AGC GTG TTC ATG TGG CTG GAA GAG AAT GGG ATT GTG ACT GAT 2400  
L F Q S A L S V F M W L E E N G I V T D  
ATG GCC AAC TTC GCA CTC AGC GAC CCG AAC GCC CAT CGG ATG CGC AAT TTT CTC GCA AAC 2460  
M A N F A L S D P N A H R M R N F L A N  
GCA CCA CAA GCA GGC AGC AAG TCG CAA AGA GCC AAG TAC GGG ACA GCA GGC TAC GGA GTG 2520  
A P Q A G S K S Q R A K Y G T A G Y G V

GAG GCC CGG GGC CCC ACT CCA GAA GAA GCA CAG AGG GAA AAA GAC ACA CGG ATC TCA AAG 2580  
E A R G P T P E E A Q R E K D T R I S K  
AAG ATG GAG ACC ATG GGC ATC TAC TTT GCA ACA CCA GAA TGG GTA GCA CTC AAT GGA CAC 2640  
K M E T M G I Y F A T P E W V A L N G H  
CGG GGG CCA AGC CCC GGC CAG CTA AAG TAC TGG CAG AAC ACA CGA GAA ATA CCT GAT CCA 2700  
R G P S P G Q L K Y W Q N T R E I P D P  
AAC GAG GAC TAC CTA GAC TAC GTG CAT GCA GAG AAG AGC CGG TTG GCA TCA GAA GAA CAA 2760  
N E D Y L D Y V H A E K S R L A S E E Q  
ATC CTA AGG GCA GCT ACG TCG ATC TAC GGG GCT CCA GGA CAG GCA GAG CCA CCC CAG GCC 2820  
I L R A A T S I Y G A P G Q A E P P Q A  
TTC ATA GAC GAA GTC GCC AAA GTC TAT GAA ATC AAC CAT GGG CGT GGC CCC AAC CAA GAA 2880  
F I D E V A K V Y E I N H G R G P N Q E  
CAG ATG AAA GAT CTG CCC TTG ACT GCG ATG GAG ATG AAG CAT CGC AAT CCC AGG CGG GCT 2940  
Q M K D L P L T A M E M K H R N P R R A  
CCA CCA AAG CCC AAG CCA AAA CCC AAT GTT CCA ACA CAG AGA CCC CCT GGT CGG CTG GGC 3000  
P P K P K P K P N V P T Q R P P G R L G  
CGC TGG ATC AGG GCT GTC TCT GAT GAG GAC CTT GAG TGA 3'  
R W I R A V S D E D L E \*

Fig. 3-4 (B) . The nucleotide and the deduced amino acid sequences of SegA of Korean isolate IBDV SH/92.

SH92	ATGACAAACCTGCAAGATCAAACCCAACAGATTGTTCCGTTTCATACGGAGCCTTCTGATG	60
bur706	.....	60
bursine-2	.....A.....	60
CEVAC	.....C.....	60
SH92	CCAACAACCGGACCGGGCGTCCATTCCGGACGACACCCTAGAGAAGCACACTCTCAGGTCA	120
bur706	.....G.....	120
bursine-2	.....G.....	120
CEVAC	.....G.....	120
SH92	GAGACCTCGACCTACAATTTGACTGTGGGGACACAGGGTCAGGGCTAATTGICTTTTTTC	180
bur706	.....	180
bursine-2	.....	180
CEVAC	.....	180
SH92	CCTGGTTCCCTGGCTCAATTGTGGGTGCTCACTACACACTGCAGAGCAATGGGA ACTAC	240
bur706	.....A.....G.....	240
bursine-2	.....A.....	240
CEVAC	.....A.....	240
SH92	AAGTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCAGAACCTACCGGCCAGCTACA ACTACTGCAGG	300
bur706	.....T.....	300
bursine-2	.....T.....	300
CEVAC	.....T.....	300
SH92	CTAGTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAGGTCAAGCACACTCCCTGGTGGCGTTTATGCACTA	360
bur706	.....T.....	360
bursine-2	.....	360
CEVAC	.....	360

SH92	AATGGCACCATAAACGCCGTGACCTTCCAAGGAAGCCTGAGTGAAGTACAGATGTTAGC	420
bur706	..C.....	420
bursine-2	..C.....	420
CEVAC	..C.....	420
SH92	TACAATGGGTTGATGTCTGCAACAGCCAACATCAACGACAAAATCGGGAACGTCCTAGTA	480
bur706	.....T.....	480
bursine-2	.....G.....T...T...G...	480
CEVAC	.....T...T.....	480
SH92	GGGGAAGGGTAACCGTCCTCAGCTTACCCACATCATATGATCTGGGTATGTGAGACTC	540
bur706	.....C.....G..T	540
bursine-2	...G...C.....T.....G..T	540
CEVAC	...G...C.....T.....G..T	540
SH92	GGTGACCCCATTCCTGCTATAGGGCTCGACCCAAAAATGGTAGCAACATGTGACAGCAGT	600
bur706	.....A.....T.....C.....	600
bursine-2	.....T.....C.....	600
CEVAC	.....T.....C.....	600
SH92	GACAGGCCAGAGTTTACACCATAACTGCAGCCGATGATTACCAATTCTCATCACAGTAC	660
bur706	.....C.....	660
bursine-2	.....CC.....T.....	660
CEVAC	.....CC.....T.....	660
SH92	CAAGCAGGTGGAGTAACAATCACAAGTCTCAGCTAATATCGATGCCATCACAAGCCTC	720
bur706	...C.....G.....C..T.....	720
bursine-2	...C.....G.....C..T...T.....	720
CEVAC	...C.....G.....C..T...T.....	720

SH92	AGCATCGGGGAGAACTCGTGTTTCAAACAAGCGTCCAAGGCCTTATACTGGGTGCTACC	780
bur706	...G.T.....G.....G.....C..C...	780
bursine-2	...G.T.....G.....T.....G.....C..C...	780
CEVAC	...G.T.....G.....T.....G.....C..C...	780
SH92	ATCTACCTTATAGGCTTTGATGGGACTGCGGTAATCACCAGAGCTGTGGCCGCAAACAAT	840
bur706	.....C.....AA.....G.....	840
bursine-2	.....A.....T..G.....	840
CEVAC	.....A.....G.....G.....	840
SH92	GGGCTAACGGCCGGCACTGACAACCTTATGCCATTCAATATTGTGATTCCAACCAGCGAG	900
bur706	....G...A.....C.....C.....A.A....	900
bursine-2	....G..TA....TC....T.....C.....A....	900
CEVAC	....G.....C....T.....A....	900
SH92	ATAACCCAGCCAATCACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAG	960
bur706	.....	960
bursine-2	.....C.....	960
CEVAC	.....T.....C...	960
SH92	GCGGGGATCAGATGTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC	1020
bur706	..A.....G...A.....T.....	1020
bursine-2	..A....C.....G.....A....T.....	1020
CEVAC	..A....C.....G.....T.....	1020
SH92	AACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCGTCACACTAGTAGCCTACGAAAGAGTGGCAACAGGA	1080
bur706	.....G...G.....	1080
bursine-2	.....	1080
CEVAC	.....	1080

SH92	TCTGTCGTTACGGTCGCCGGGGTGAGCAACTTCGAGCTGATCCCAAATCCTGAACTAGCA	1140
bur706	..C.....T.....	1140
bursine-2	..C.....	1140
CEVAC	..C.....T.....	1140
SH92	AAGAACCTGGTCACAGAATATGGCCGATTTGACCCAGGAGCCATGAACTACACAAAATTG	1200
bur706	.....T.....C.....	1200
bursine-2	.....T.....C.....	1200
CEVAC	.....T.....C.....	1200
SH92	ATACTGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGCATCAAGACCGTCTGGCCAACAAGGGAGTACACT	1260
bur706	.....	1260
bursine-2	.....	1260
CEVAC	.....C	1260
SH92	GACTTTCGCGAGTACTTCATGGAGGTGGCCGACCTCAACTCTCCCCTGAAGATTGCAGGA	1320
bur706	.....T..A.....	1320
bursine-2	.....T.....	1320
CEVAC	.....T.....T.....	1320
SH92	GCATTTGGCTTCAAAGACATAATCCGGGCCCTAAGGAGGATAGCTGTGCCGGTGGTCTCT	1380
bur706	.....C.....A.....C	1380
bursine-2	.....A.....	1380
CEVAC	.....A.....A.....	1380
SH92	ACACTGTTCCCACCCGCCGCTCCCCTAGCCCATGCAATTGGGGAAGGTGTAGACTACCTG	1440
bur706	...T.....T.....	1440
bursine-2	...T.....T..A.....T.....	1440
CEVAC	.....T.....G.....	1440

SH92	CTGGGCGATGAGGCACAGGCTGCTTCAGGAACTGCTCGAGCCGCTCAGGAAAAGCAAGC	1500
bur706	.....G.....	A 1500
bursine-2	.....	A 1500
CEVAC	.....	A 1500

SH92	GCATGA	1506
bur706	.....	1506
bursine-2	.....	1506
CEVAC	.....	1506

Fig. 3-5A. Nucleotide sequence homology of VP2 of IBDV Korean isolate SH92 vaccine strains bur706, bursine-2 and Cevac.

SH92	MTNLQDQTQQIVPFI RSLLMPTTGPASIPDDTLEKHLRSETSTYNLTVGDTGSGLIVFF	60
bur706	.....	60
bursine-2	....T.....	60
CEVAC	.....	60
SH92	PGFPGSIVGAHYTLQSNNGYKFDQMLLTAQNLPASYNVCRLVSRSLTVRSSTLPGGVYAL	120
bur706	.....G.....	120
bursine-2	.....	120
CEVAC	.....S.....	120
SH92	NGTINAVTFQGSLSSELT DVSYNGLMSATANINDKIGNVLVGEVTVLSLPTS YDLGYVRL	180
bur706	.....	180
bursine-2	.....G.....	180
CEVAC	.....GR.....	180
SH92	GDPIPAIGLDPKMWATCDSSDRPRVYTITAADDYQFSSQYQAGGVTTITLEFSANIDAITS L	240
bur706	.....PD.....	240
bursine-2	.....H.....L.....P.....	240
CEVAC	.....H.....L.....P.....	240
SH92	SIGGELVFQTSVQGLILGATIYVLIGFDGTAVITRAVAANGLTAGTDNLMPFNIVIPTSE	300
bur706	.V.....H.V.....T.....T.....L....N.	300
bursine-2	.V.....V.....T.....SD....T.I.....L....N.	300
CEVAC	.V.....V.....T.....D.....N.	300
SH92	ITQPITSIKLEIVTSKSGGQAGDQMSWSASGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATG	360
bur706	.....R.....	360
bursine-2	.....	360
CEVAC	.....	360



SH92	SVVTVAGVSNFELIPNELAKNLVTEYGRFDPGAMNYTKLILSERDLGIKTVWPTREYT	420
bur706	.....	420
bursine-2	.....	420
CEVAC	.....	420
SH92	DFREYFMEVADLNSPLKIAGAFGFKDIIRALRRIAVPVVSTLFPPAAPLAHAIGEGVDYL	480
bur706	.....I.....	480
bursine-2	.....I.....L.....	480
CEVAC	.....I.K.....	480
SH92	LGDEAQAASGTARAASGKASA*	502
bur706	.....A...R..	502
bursine-2	.....R..	502
CEVAC	.....R..	502

Fig. 3-5B. Amino acid sequence homology of VP2 of IBDV Korean isolate SH92 vaccine strains bur706, bursine-2 and Cevac.

### 3. IBD에 대한 양성 항체 확보

원래의 목표는 재조합된 VP2 및 SegmentA 단백질을 닭에 투여하여 항혈청을 만들 예정이었으나 재조합 단백질의 생산이 늦어지는 이유로 야외에서 도태할 종계군이나 IBD에 감염되어 회복된 계군에서 전혈을 채혈하여 ELISA kit로 스크리닝 측정 다음과 같이 고도의 항혈청을 확보하였다 (Table 3-4). 확보된 항혈청은 재조합 단백질의 분석 (Western blot) 및 ELISA를 이용한 재조합 발현단백질의 항원성 조사에 이용하였다. 또한 3종의 단크론 항체를 확보하여 유전자 재조합 단백질의 분석에 사용하였다.

Table 3-4. ELISA titer of anti-IBDV antibody obtained from chickens which infected with IBDV

No.	ELISA titer
1	6910
2	6482
3	7710
4	5622
5	7362
6	7160
7	5382
8	6764
9	6379
10	5226
11	9570
12	9093

### 4. Sf21cell에서의 recombinantVP2와SegA의 발현

pBluescripII vector에 삽입된 VP2 fragment와 pCR 2.1 TOPO vector에 삽입된 segA fragment를 각각 *KpnI*과 *EcoR I*, *KpnI*과 *Not I* 제한효소로 절단한 후 각각 동일한 효소로 처리한 pBacPAK8 baculovirus transfer vector에 클로닝 한 후 recombinant plasmid를 분리하였다.

가. Sf21cell에서 나타나는 세포변성효과 (CPE)의 관찰

Invitrogen coinfection방법에 따라 IBDV VP2와 SegA유전자가 삽입된 pBacPAK8 transfer vector plasmid와 linearized baculovirus DNA를 cotransfection 시킨 후 CPE를 관찰하였다(Fig. 3-6). 각각의 occlusion body를 에워싸는 polyhedral envelope가 관찰되었고 분열이 중지되고 부착된 세포들이 부유되는 것이 관찰되었다. 이러한 CPE는 보통 감염후 96-120시간에 관찰되는 것으로 나타났다.

나. 간접형광항체를 이용한 재조합 baculovirus의 확인

IBDV에 특이적인 다가항체 및 단클론 항체를 사용하여 recombinant virus의 발현을 확인한 결과 Fig. 3-7과 같이 recombinant virus가 감염된 Sf21세포에서만 강한 형광이 관찰되었다. VP2를 발현하는 재조합 바이러스는 다가항체로 확인한 결과 강한 형광을 나타냈고 (Fig. 3-7A), SegA를 발현하는 재조합 바이러스는 세가지 종류의 단클론 항체로 검출한 결과 모두 강한 형광을 나타냈다 (Fig. 3-7B). 그러나 미 감염된 세포와 baculovirus만을 감염시킨 세포에서는 어떠한 형광도 관찰되지 않았다.

다. 재조합된 VP2와 SegA의 발현분석

유전자 재조합된 바이러스에서 VP2와 SegA의 발현을 보다 직접적으로 확인하기 위해 각각의 바이러스, 즉, VP2와 SegA유전자를 가지고 있는 재조합 baculovirus, wild type AcMNPV를 Sf21 세포에서 접종시킨 후 4일 후에 수확한 후 12% SDS-PAGE을 실시한 후 western hybridization을 실시하여 각각의 band를 관찰하였다 (Fig. 3-8). Western blot hybridization시에는 야외에서 분리된 양성항체와 단클론 항체를 각각 사용하여 실시하였다. 그 결과 상층액에는 존재하지 않고 cytoplasmic fraction에 재조합 단백질이 검출되는 것을 알 수 있었으며 검출 감도는 매우 희미하게 band가 검출되는 것으로 나타났다. VP2의 경우 예상대로 45 kDa의 크기를 지니는 것으로 나타났다. 또한 SegA를 발현시에는 cell lysate에서 45kDa 크기의 band외에 VP3(32 kDa)와 VP4 (28 kDa)의 밴드가 매우 희미하게 나타나는 것이 확인되었다. 이렇게 희미하게 나타나는 것이 Western hybridization의 예민성 때문인지 아니면 baculovirus system에서의 발현정도가 미약하기 때문인지를 간접적으로 확인하기 위해 시중 백신인 Bursine-2 vaccine(1000 dose)를 1000배 농축시킨 후 IBDV 양성혈청과 3가지 IBDV McAb를 이용하여 Western blotting을 실시하였다 (Fig. 3-9). 밴

드의 검출은 IBDV 양성혈청에서만 특이적인 band가 나타났으며 특히 90kDa의 크기를 지니는 VP1이 가장 뚜렷하게 검출되었고 VP2와 VP3, VP4의 경우 baculovirus system에서 발현되는 단백질과 유사한 감도로 검출되었다. 따라서 일반적인 western hybridization보다는 보다 감도가 높은 ECL법을 실시하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

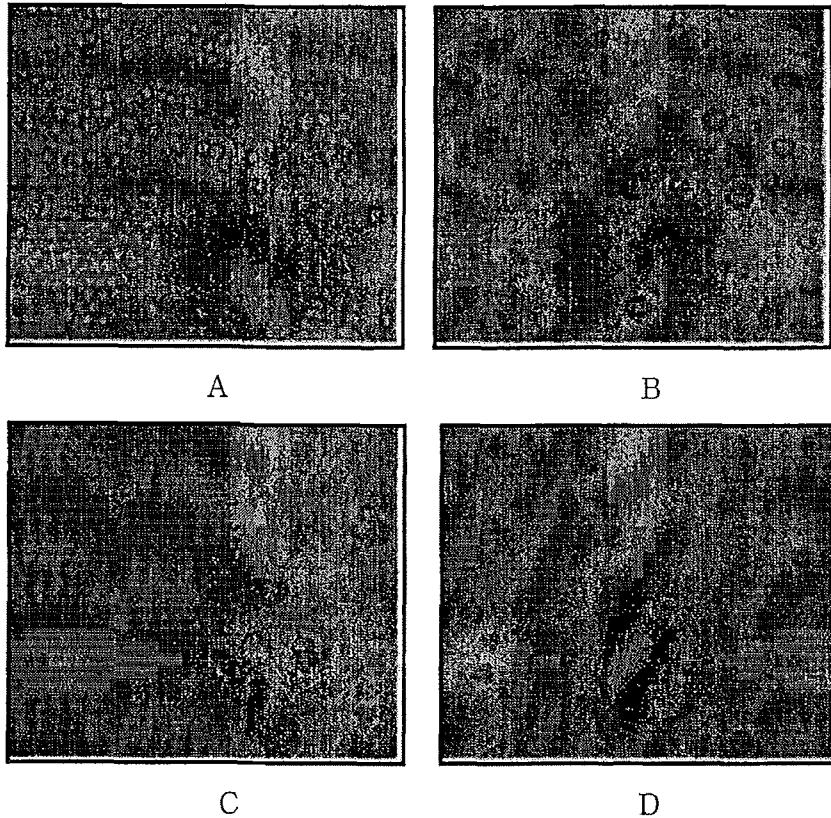


Fig. 3-6. Morphology of infected and non-infected *Sf* 21 cells. The pictures were taken with inverted microscope ( $\times 200$ ). (A), Non-infected cells. Infected, (B), *Sf*21 cells infected with recombinant baculovirus containing the VP2 of IBDV, (C), *Sf*21 cells infected with recombinant baculovirus containing the segA of IBDV, (D), *Sf*21 cells infected with wild-type. AcMNPV. Infected *Sf*21 cells had many occlusion bodies in nuclei.

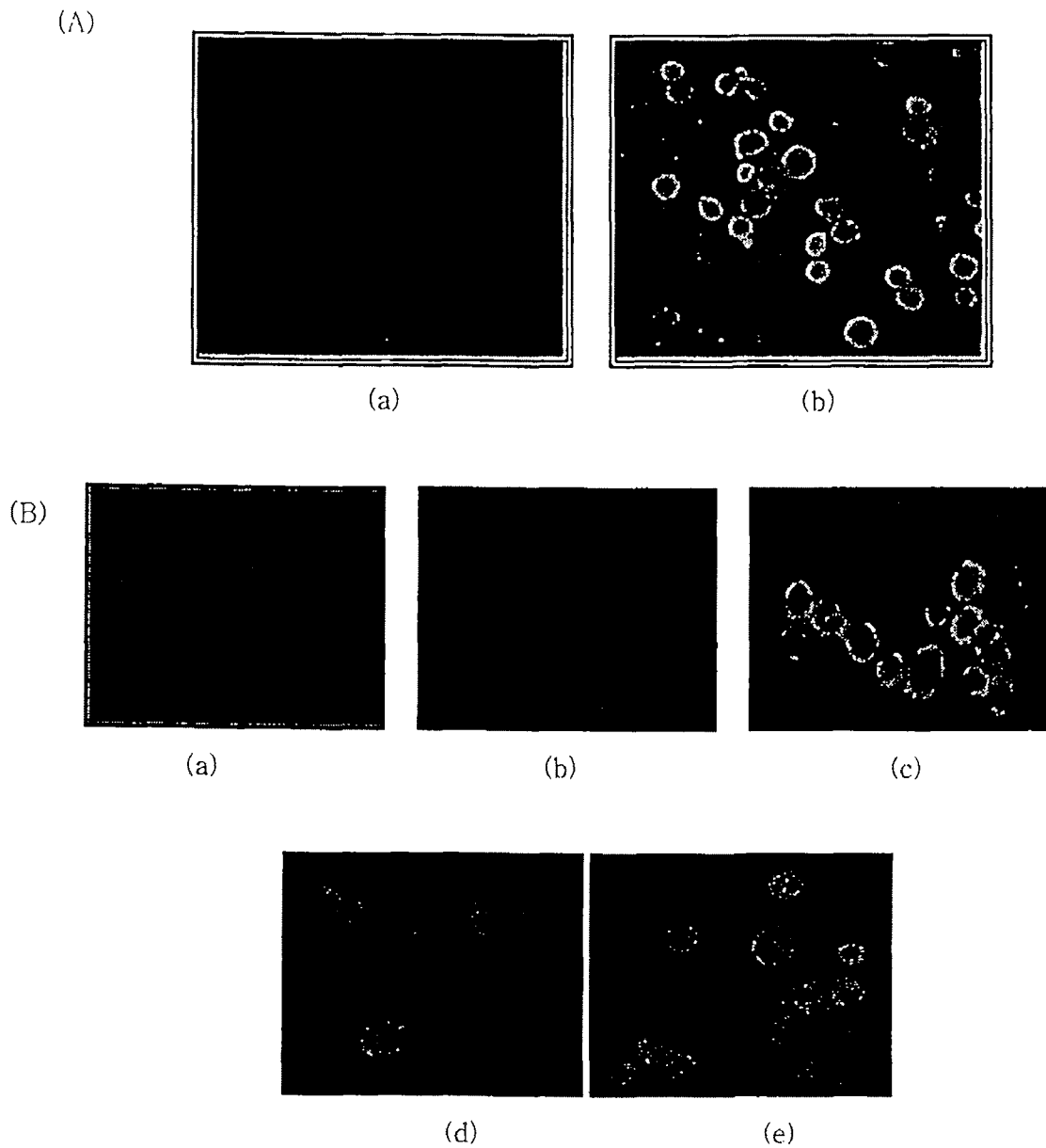


Fig. 3-7. Immunofluorescence of recombinant virus expressing VP2 (A) and SegA infected onto Sf21 cells. (A) Sf21 cells were infected with mock (a) and recombinant virus expressing VP2 (b); (B) Sf21 cells were infected with mock (a), baculovirus (b) and recombinant virus expressing SegA (c-e). Sf21 cells were detected with different monoclonal antibodies. (c), 14-32; (d), 92-38; (e), 104-11 diluted in 1:1000.

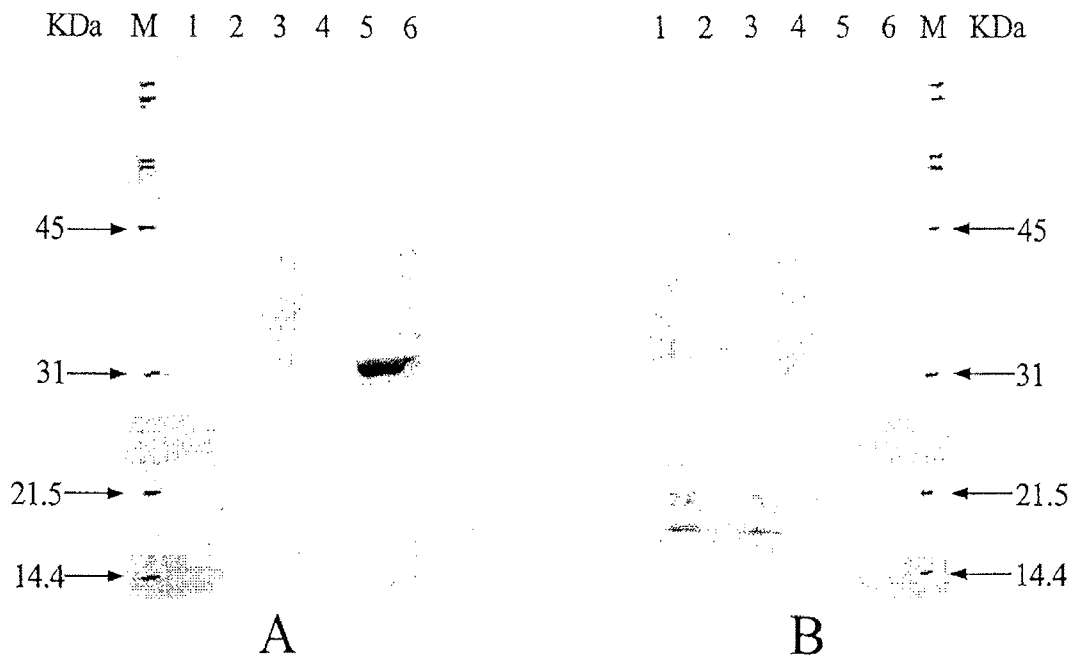


Fig. 3-8. Analysis of the expression of proteins by Western immunoblot probed with chicken anti-IBDV monoclonal antibody (A) and chicken anti-IBDV serum (B). The supernatant and the cells were harvested at 4 days post infection and were separated by SDS-PAGE (12% gel), transferred to nitrocellulose membranes. The proteins were detected with peroxidase-labelled anti-mouse IgG (A) and peroxidase-labelled anti-chicken IgG (B).

(A) lanes M, broad range marker; 1, BacPAK 6 virus (supernatant); 2, BacPAK 6 virus (cytoplasmic fraction); 3, recombinant VP2 (supernatant); 4, recombinant VP2 (cytoplasmic fraction); 5, recombinant segA (supernatant); 6, recombinant segA (cytoplasmic fraction). (B) lanes M, broad range marker; 1, recombinant segA (cytoplasmic fraction); 2, recombinant segA (supernatant); 3, recombinant VP2 (cytoplasmic fraction); 4, recombinant VP2 (supernatant); 5, BacPAK 6 virus (cytoplasmic fraction); 6, BacPAK 6 virus (supernatant).

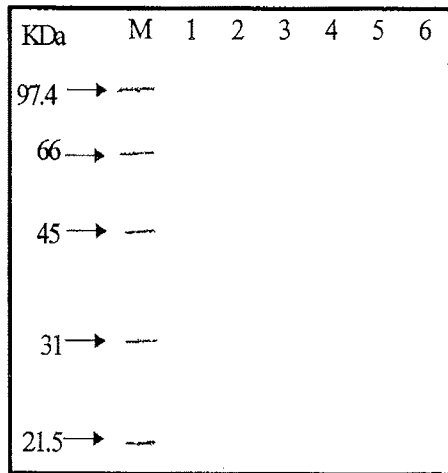


Fig. 3-9. Western hybridization of IBD commercial Bursine-2 vaccine. Vaccine (1000 dose) was diluted in 1 ml of DDW (1000X) and following amounts of diluted vaccine were analyzed by SDS-PAGE. M, broad range marker, 2-6, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ul of diluted vaccine, respectively.

라. 발현된 단백질의 항원성 분석

비록 발현수준이 낮으나 대량 배양을 통해 cell lysate를 항원으로 하여 ELISA를 실시하여 야외 감염혈청을 대상으로 발현된 단백질의 항원성을 조사하였다 (Table 3-5). 사용된 항원의 양은 175 cm<sup>2</sup>10개를 배양한 후 Sf21 cell을 수거한 후 lysis를 시킨후 cell debris를 제거 하였다. 총 5ml로 농축시킨 후 well당 200ul씩 코팅하였다. 각혈청당 3well 씩 분석하여 평균 흡광도를 산출하였다.

항원의 양이 매우 낮아서 Absorbance수치는 매우 낮았으나 whole IBDV를 항원으로 한 일반 ELISA로 측정된 항체가의 수준과 비례해서 Absorbance의 수치가 나타났다. 따라서 발현된 recombinant protein은 야외 IBD감염혈청에 대해 항원성이 있는 것으로 판단되었다.

Table 3-5. Antigenicity of baculovirus-expressed proteins against positive antisera to field IBDV

No.	ELISA titer	92VP2	92SegA
1	6910	0.043±0.023	0.048±0.012
2	7710	0.051±0.014	0.067±0.022
3	5622	0.038±0.043	0.057±0.021
4	7362	0.067±0.055	0.061±0.039
5	5382	0.032±0.026	0.037±0.021
6	6764	0.047±0.027	0.056±0.011
7	6379	0.032±0.026	0.049±0.016
8	9093	0.097±0.045	0.193±0.101
9	9570	0.177±0.082	0.227±0.078
Negative control	-	0.012±0.011	0.019±0.006

마. 배양시간에 따른 재조합 단백질의 발현량 측정

배양시간에 따른 재조합 단백질의 발현량을 측정하기 위해 동량의 세포를 분주한 후 동일한 역가의 recombinant VP2 virus와 recombinant SegA virus를 Sf21 cell에 접종한 후 1, 2, 3, 4일 후에 세포를 수확한 후 동량의 cell lysate를 가지고 dot blot을 실시하였다. 이때 IBDV 양성혈청과 단클론 항체를 이용하여 발현정도를 분석하였다. 양성혈청을 사용한 것과 단클론 항체를 사용한 것 모두에서 SegA와 VP2의 발현정도가 배양 후 4일째에 가장



높은 것으로 나타났다 (Fig. 3-10).

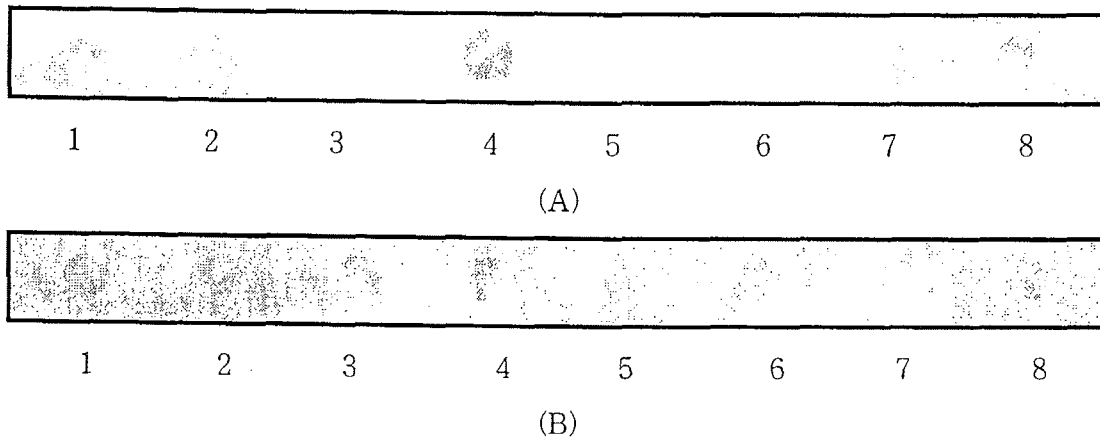


Fig. 3-10. Analysis of recombinant VP2 and SegA protein expression rate by culture time. Same amount of cell lysates were analysed by dot blot hybridization using IBDV positive antisera (A) and IBDV monoclonal antibody (B). Lanes 1-4, recombinant SegA grown for 1, 2, 3, and 4 days, respectively; 5-8, recombinant VP2 grown for 1, 2, 3, and 4 days, respectively.

## 5. 유전자 재조합 단백질의 면역원성 및 방어력의 분석

### 가. 강병원성 IBDV 공격 접종 후의 방어력의 분석

유전자 재조합 VP2와 SegA의 면역원성 및 방어력을 조사하기 위해 SPF닭에 6주령과 7주령에 각각 2회의 백신을 접종한 후 1주 후에 강병원성 IBDV로 공격접종을 실시하였다. 대조군으로는 백신비접종비공격접종군 (Negative control) 과 백신비접종공격접종군 (Challenged control)을 두었으며 이들에게는 백신 대신 PBS를 0.5ml씩 접종하였다. 또한 양성 대조군으로는 시판중인 Bursine-plus를 규정용량에 맞게 음수로 백신접종하였다. 공격접종 후 10일까지의 생존율을 보면 백신비접종공격접종군의 경우 90%의 폐사율을 보인 반면 백신접종군의 경우 모두 0%의 폐사율을 나타냈다 (Table 3-6)

Table 3-6. Protection efficacy of recombinant vaccine determined by mortality and bursa weight/body weight(B/B) ratio at day 10 after challenge with very virulent IBDV SH/92 strain.

Group <sup>A</sup>	mortality <sup>B</sup> (%)	B/B ratio <sup>C</sup> (Mean±S.D.)
Normal control	0/3(0)	4.04±1.00 <sup>a</sup>
Challenge control	9/10(90)	1.03 <sup>c</sup>
Recombinant VP2	0/10(0)	4.69±1.13 <sup>a</sup>
Recombinant SegA	0/10(0)	4.63±1.04 <sup>a</sup>
Bursine-plus vaccine	0/9(0)	1.87±1.14 <sup>b</sup>

<sup>A</sup>normal control: without vaccine and challenge; challenge control: without vaccine but with challenge; recombinant VP2: vaccinated with recombinant VP2 vaccine and challenge; recombinant segA: vaccinated with recombinant segA vaccine and challenge; Bursine-plus vaccine: vaccinated with Bursine-plus vaccine and challenge.

At week 1 after second vaccination, all groups except normal control group were orally challenged with  $1 \times 10^{4.8}$  EID<sub>50</sub> of very virulent IBDV SH/92 strain.

<sup>B</sup>Mortality was recorded during 10 days period and presented as number of dead chickens/total number of chickens in each group.

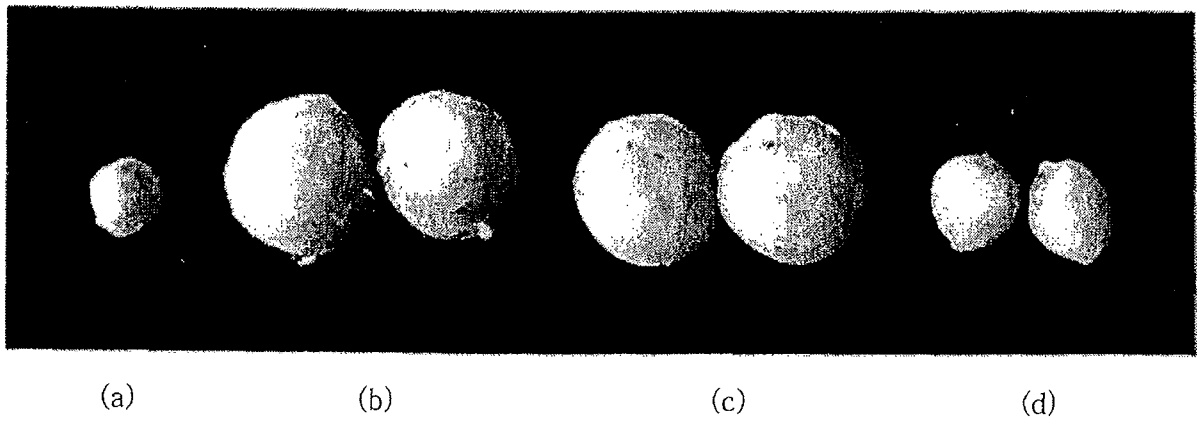
<sup>C</sup>Bursal/body weight ratio was calculated by(bursa weight)/body weight)×1000 and presented as the mean±S.D. from each group. Values followed by different lowercase superscripts are significantly different(P<0.05) as determined by one-way ANOVA followed by multiple rank comparisons with Tukey's test.

#### 나. 공격접종 후 F낭 변화

공격접종 후 살아있는 닭을 도태시킨 후 체중과 F낭을 적출하여 무게를 측정한 후 B:B ratio를 산출하였다 (Table 3-6, Fig. 3-11). VP2와 SegA를 접종한 군의 B:B ratio는 백신 비접종비공격접종 군의 수치와 유사하게 나타나 강병원성 바이러스의 공격접종에도 불구하고 거의 손상을 입지 않는 것으로 나타났다. 그러나 시판되는 Bursine-plus를 접종한 군의 B:B ratio는 유전자 재조합 백신 접종군과 백신비접종비공격접종군에 비해 매우 낮은 B:B ratio를 보였다. 비록 유전자 백신 접종군과 생존율을 유사하게 관찰되었으나 F낭은 공격접종 바이러스에 의해 손상을 받은 것으로 나타났다. 유전자재조합 단백질 VP2와 SegA사이

에서의 폐사율과 B:B ratio의 차이는 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 VP2와 SegA의 유전자 재조합 단백질이 현재 시판되고 있는 백신과 최소한 동등 또는 우월한 방어력을 나타내는 것을 보여주고 있다. 병리조직학적인 소견측면에서도 유전자 재조합 단백질을 접종한 군이 방어력에 있어 탁월한 효과를 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 3-11, Table 3-7). 백신비접종공격접종군에서는 배설강의 위축, 소포간 결체조직의 증가, 수질내 RE세포의 증가, 세포괴사 및 탐식, 표면 상피세포의 출혈등이 심하게 관찰되었다. Bursine-plus vaccine 접종 및 공격접종군에서도 이러한 소견이 부분적으로 미약 또는 중등도로 관찰되었다. 그러나 VP2와 SegA재조합 단백질을 접종한 군에서는 이러한 소견이 거의 나타나지 않거나 일부에서 매우 미약하게 나타남이 관찰되었다. 따라서 유전자 재조합 단백질은 탁월한 방어력을 나타내는 것으로 확인되었다. 이 결과는 기존에 보고된 유전자 재조합 단백질의 효과보다 훨씬 탁월한 것으로 나타났다. 추후 용량결정, 다른 strain간의 교차방어능을 관찰해야 할 필요성이 있는 것으로 사료된다.

(A)



(B)

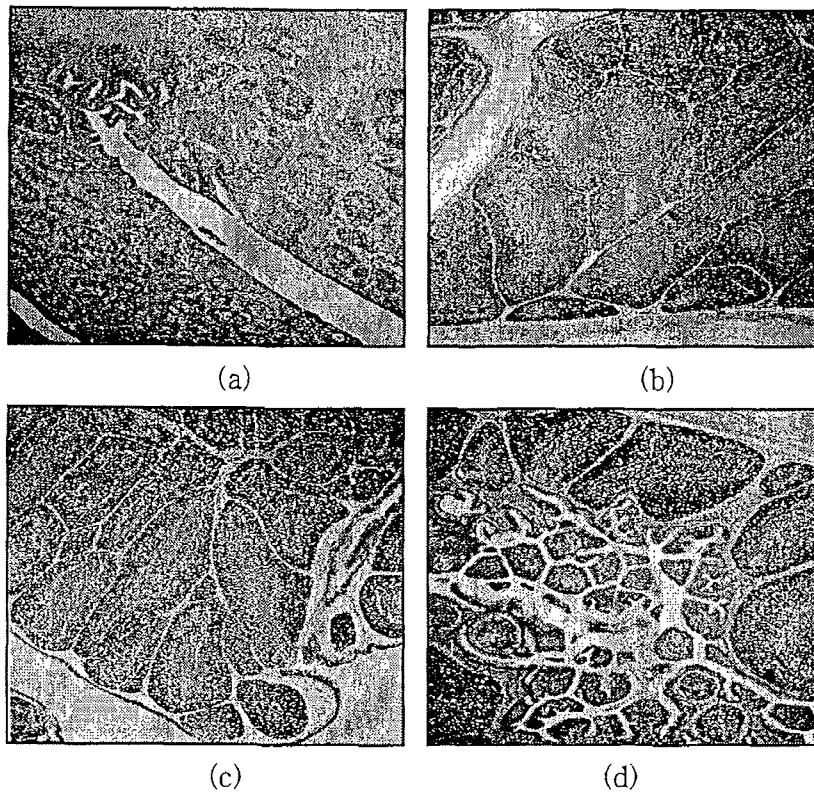


Fig. 3-11. The size (A) and hematoxylin-eosin stained section (B) of the representative bursa of Fabricius and morphology of representative bursa of Fabricius recovered from chickens with or without recombinant vaccines at day 10 postchallenge with very virulent IBDV SH/92 strain: (a) challenge control: No vaccination but challenged; (b) vaccination with recombinant VP2 and challenged; (c) vaccination with recombinant SegA vaccine and challenged; ((d) vaccination with Bursine-plus vaccine and challenged. At week 1 after second vaccination, all groups except normal control group were orally challenged with  $1 \times 10^{4.8}$  EID<sub>50</sub> of very virulent IBDV SH/92 strain.

Table 3-7. Histopathology of cloacal bursa in the chickens infected with infectious bursal disease virus

Group	A	B	C	D
Histopathology/Case No. examined	1	10	10	9
Cloacal atrophy	1/1(100%)	0/10(0.0%)	0/10(0.0%)	7/9(77.8%)
slight				1/9
mild				1/9
moderate				4/9
severe	1/1			1/9
Interfollicular fibroplasia	1/1(100%)	0/10(0.0%)	0/10(0.0%)	7/9(77.8%)
slight				2/9
mild				4/9
moderate				1/9
Medullary reticuloendothelial hyperplasia	1/1(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	9/9(100%)
slight		2/10		
mild		8/10	10/10	2/9
moderate				7/9
severe	1/1			
Necrosis of lymphocytes and phagocytosis	1/1(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	0/9(100%)
slight		4/10		
mild		6/10	10/10	5/9
moderate				4/9
severe	1/1			
Hyperplasia of surface epithelia	1/1(100%)	0/10(0.0%)	0/10(0.0%)	8/9(88.9%)
mild				3/9
moderate	1/1			5/9
hemorrhage	0/10(100%)	0/10(0.0%)	0/10(0.0%)	1/9(11.1%)
moderate				1/9

(A)challenge control; (B)recombinant VP2 vaccine; (C)recombinant segA vaccine; (D)Bursine-plus vaccine. challenge control: without vaccine but with challenge; recombinant VP2: vaccinated with recombinant VP2 vaccine and challenge; recombinant segA: vaccinated with recombinant segA vaccine and challenge; Bursine-plus vaccine: vaccinated with Bursine-plus vaccine and challenge. At week 1 after second vaccination, all groups except normal control group were orally challenged with  $1 \times 10^{4.8}$  EID<sub>50</sub> of very virulent IBDV SH/92 strain.

다. Anti-IBDV ELISA 역가

공격접종하기 전과 공격접종 후 10일째에 채혈을 하여 혈청을 분리한 후 ELISA를 이용하여 IBDV의 항체를 측정하였다 (Table 3-8). 백신비접종공격접종군의 경우 공격접종전에는 항체가 거의 검출되지 않았는데 반해 공격접종 후 생존한 한 마리의 항체는 21,524로 모든 군중에서 가장 높은 항체를 나타냈다. 이는 바이러스가 감염 증식되어 항체생성이 된 것으로 판단된다. VP2재조합단백질 접종군의 경우 공격접종전에는 1,514로 중등도의 역가를 나타냈고 접종후에는 2,218로 역가의 상승이 있었다. 이는 바이러스가 감염되어 증식된 것으로 판단된다. SegA단백질의 경우 공격접종전에는 가장 높은 항체를 보였다가 접종후에는 오히려 역가가 감소하는 것으로 나타났다. Bursine-plus의 경우 SegA접종군과 유사하게 높은 역가를 나타냈고 공격접종 후에는 역가가 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 IBDV에 대한 항체와 F낭의 병변과는 서로 일정한 상관관계가 없는 것으로 암시되며 따라서 체액성 면역은 물론 세포매개성 면역도 IBD의 방어에 중요한 역할을 한다는 기존의 보고와 일치하는 것으로 나타났다.

Table 3-8. Antibody titer to IBDV determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in groups of chickens before challenge(6 week old, pre-C) and at 10 days after challenge(at 52-day old, Post-C) with very virulent IBDV SH/92 strain.

Group <sup>A</sup>	ELISA Antibody titer(Mean±S.D.) <sup>B</sup>	
	Prechallenge	Postchallenge
normal control	64±16(3)	-
Challenge control	44±43 (10)	21524 (1)
Recombinant VP2	1514±1410 (10)	2218±3715 (10)
Recombinant SegA	9196±5351 (10)	5766±3451 (10)
Bursine-plus vaccine	8158±4498 (9)	4463±4585 (9)

<sup>A</sup>At 1 week after second vaccination, all groups except normal control group were orally challenged with  $1 \times 10^{4.8}$  EID<sub>50</sub> of very virulent IBDV SH/92 strain. Blood samples were collected prechallenge and at day 10 day postchallenge.

<sup>B</sup>ELISA antibody titer presented the mean±S.D. from each group were determined by an ELISA kit (IDEXX) following the procedures recommended by manufacturer.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 기대효과

- 국내유행 IBD 바이러스의 성상 파악 => 역학적 특성 규명, 신속.정확한 감별 진단, 효과적인 백신 프로그램 및 백신 개발에 적용 가능
- 야외 IBD 바이러스 시험관내 정량기법 확립
- 유효한 소독제 선정 => 오염 농장에서 차단에 의한 방역효과 제고
- 급성 IBD에 의한 사망 기전 규명
- 한국형 유전자 재조합 IBD 백신 개발
- 국내 유행 IBD 바이러스 특성에 따른 방역대책 수립 및 적용 => 폐사율 감소, 면역형성능(항병력) 향상 및 2차 감염 빈도 저하 => 생산성 향상 및 닭고기 대일 수출을 포함하는 국제 경쟁력 향상
- 대중 치료법 적용에 의한 급성 IBD 폐사 감소
- 유전자 재조합 백신 개발
  - 모체이행항체의 방해할 수 있음 => 융통성 있는 IBD 백신 프로그램 적용 가능 => 생산성 향상
  - 자동화 접종기를 사용 부화 계란내 대량 접종 가능 => 성력화
  - 종계군에서 고가의 오일 백신접종 불요

### 제 2 절 활용방안

- 국내유행 IBD 바이러스의 특성 => IBD 백신 프로그램 작성에 반영 => 양계농가 적용
- 양계농가에 급성 IBD 대중요법 기술홍보
- 백신 제조회사에 IBD 유전자 재조합 백신 생산기술 전수
- 병원성 변이주 분자진단 키트 개발
- 국내 및 국제 특허 출원: 급성 IBD 대중 치료제, IBD 유전자 재조합 백신

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 GenBank에 등록된 IBDV VP2 다변이성 부위 유전자 염기서열 데이터베이스를 확보하여 전세계적으로 발생하고 있는 IBDV의 유전형 연구 및 분자역학연구를 위한 토대를 마련함.

```
#NEXUS
[!Alignment of:]
[Sequence      Start  End  Sequencetype]
[90-11         (15 > 360)  DNA  ]
[5270          (15 > 360)  DNA  ]
[Bur2          (15 > 360)  DNA  ]
[CU1          (15 > 360)  DNA  ]
[DELE         (15 > 360)  DNA  ]
[IBDL         (44 > 389)  DNA  ]
[LUKERT       (1 > 346)   DNA  ]
[PBG98        (15 > 360)  DNA  ]
[IBDVSNU9414  (32 > 377)  DNA  ]
[IBDVSNU9423  (15 > 360)  DNA  ]
[IBDVSNU9460  (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU9539  (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU9570  (15 > 360)  DNA  ]
[IBDVSNU9593  (15 > 360)  DNA  ]
[IBDVSNU9596  (32 > 377)  DNA  ]
[IBDVSNU9912  (32 > 377)  DNA  ]
[IBDVSNU9914  (35 > 380)  DNA  ]
[IBDVSNU9946  (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU9960  (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU9983  (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU9991  (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU9993  (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU91108 (15 > 360)  DNA  ]
[IBDVSNU99103 (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU99122 (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU99125 (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU99130 (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU99136 (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU99141 (44 > 389)  DNA  ]
[IBDVSNU99132 (44 > 389)  DNA  ]
[STC          (15 > 360)  DNA  ]
[VariantA     (15 > 360)  DNA  ]
[VariantE     (15 > 360)  DNA  ]
[00-042-C. seq (71 > 416)  DNA  ]
[00-046-C. seq (71 > 416)  DNA  ]
[1-95. seq    (27 > 372)  DNA  ]
[2-93. seq    (27 > 372)  DNA  ]
[228E. seq    (27 > 372)  DNA  ]
[849VB. seq   (27 > 372)  DNA  ]
[88-13. seq   (244 > 589)  DNA  ]
[88-14. seq   (244 > 589)  DNA  ]
[88-9. seq    (244 > 589)  DNA  ]
[9109. seq    (27 > 372)  DNA  ]
[91247. seq   (27 > 372)  DNA  ]
```



```

[95-003-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[95-008-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[96-005-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[96-086-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[96-090-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[97-010-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[97-011-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[97-078-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[97-102-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[98-009-T. seq      (71 > 416) DNA ]
[98-062-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[98-084-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[99-015-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[99-054-C. seq      (71 > 416) DNA ]
[ABIC-MB71. seq     (27 > 372) DNA ]
[AJ586921. seq      (71 > 416) DNA ]
[Bursaplex. seq     (71 > 416) DNA ]
[F52-70. seq        (87 > 432) DNA ]
[Faragher 52-70. seq (155 > 500) DNA ]
[HD98. seq          (27 > 372) DNA ]
[Henan1. seq        (87 > 432) DNA ]
[Hyd(C). seq        (27 > 372) DNA ]
[IBD L. seq         (27 > 372) DNA ]
[IBDVRF-2-94. seq  (83 > 428) DNA ]
[Indo13. seq        (71 > 416) DNA ]
[Indo14. seq        (71 > 416) DNA ]
[JS30-99. seq       (27 > 372) DNA ]
[K280-89. seq       (244 > 589) DNA ]
[K406-89. seq       (244 > 589) DNA ]
[MB. seq            (27 > 372) DNA ]
[Miss. seq          (86 > 431) DNA ]
[P1. seq            (83 > 428) DNA ]
[P10. seq           (27 > 372) DNA ]
[QV. seq            (27 > 372) DNA ]
[UK-89-661-ref     (131 > 476) DNA ]
[Univax-G603-TW    (211 > 556) DNA ]
[W04                (27 > 372) DNA ]
[Y5. seq            (27 > 372) DNA ]

```

begin data:

dimensions ntax=82 nchar=346;

format datatype=DNA interleave gap=- missing='.';

matrix

```

[          1                                     60]
90-11      AACAAATCACACTGTTCTCAGCTAATATCGATGCCATCACAAGCCTCAGCATCGGGGAGA
5270       AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCTATCACAAGCCTCAGCATTGGGGGAGA
Bur2       AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCTATCACAAGCCTCAGCATTGGGGGAGA
CU1        AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGA
DELE       AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGTCTCAGCGTTGGGGGAGA
IBDL       AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCTATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGA
LUKERT     AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCTATCACAAGCCTCAGCATTGGGGGAGA
PBG98      AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGA
IBDVSNU9414 GACAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGTGTGGGGGAGA
IBDVSNU9423 AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGA
IBDVSNU9460 AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGA
IBDVSNU9539 AACAAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGGAGA

```













IBDVSNU9570  
IBDVSNU9593  
IBDVSNU9596  
IBDVSNU9912  
IBDVSNU9914  
IBDVSNU9946  
IBDVSNU9960  
IBDVSNU9983  
IBDVSNU9991  
IBDVSNU9993  
IBDVSNU91108  
IBDVSNU99103  
IBDVSNU99122  
IBDVSNU99125  
IBDVSNU99130  
IBDVSNU99136  
IBDVSNU99141  
IBDVSNU99132  
STC  
VariantA  
VariantE  
00-042-C. seq  
00-046-C. seq  
1-95. seq  
2-93. seq  
228E. seq  
849VB. seq  
88-13. seq  
88-14. seq  
88-9. seq  
9109. seq  
91247. seq  
95-003-C. seq  
95-008-C. seq  
96-005-C. seq  
96-086-C. seq  
96-090-C. seq  
97-010-C. seq  
97-011-C. seq  
97-078-C. seq  
97-102-C. seq  
98-009-T. seq  
98-062-C. seq  
98-084-C. seq  
99-015-C. seq  
99-054-C. seq  
ABIC-MB71. seq  
AJ586921. seq  
Bursaplex. seq  
F52-70. seq  
Faragher\_52-70. seq  
HD98. seq  
Henan1. seq  
Hyd(C). seq  
IBD\_L. seq  
IBDVRF-2-94. seq

CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGCGGTGAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
TACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGCCAGGCAGGGGACCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGCGGTGAGGCGGGGGACCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
TACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGCCAGGCAGGGGACCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGCCAGGCAGGGGACCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGACCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
TACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGCCAGGCAGGGGACCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT  
CACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGAT





88-14. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
88-9. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
9109. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
91247. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
95-003-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
95-008-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
96-005-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
96-086-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
96-090-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATACACGGTGGC
97-010-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
97-011-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
97-078-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
97-102-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
98-009-T. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
98-062-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
98-084-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
99-015-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATACACGGCGGC
99-054-C. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
ABIC-MB71. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
AJ586921. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
Bursaplex. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
F52-70. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
Faragher_52-70. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
HD98. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
Henan1. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
Hyd(C). seq	GTCATGGTCGGCAAGAGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
IBD_L. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
IBDVRF-2-94. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
Indo13. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
Indo14. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
JS30-99. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
K280-89. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
K406-89. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGAGGC
MB. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
Miss. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
P1. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
P10. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCATGGTGGC
QV. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTACCAGTGACGATCCACGGTGGC
UK-89-661-ref. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
Univax-G603-TW. seq	GTCATGGTCGGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
W04. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC
Y5. seq	GTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGC

;  
endblock;

## 제 7 장   참 고 문 헌

### 제 1 절 제 1세부과제

Adair BM, McNeilly F, McConnell CDG, Todd D, Nelson RT, McNulty MS. Effects of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Diseases* 35:783-792. 1991.

Akin A, Wu CC, Lin TL. Amplification and cloning of infectious bursal disease virus genomic RNA segments by long and accurate PCR. *J. Virological Methods* 82:55-61. 1999.

Bayliss CD, Peters RW, Cook JKA, Reece RL, Howes K, Binns MM, Bournnell MEG. A recombinant fowlpox virus that express the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus. *Archives Virology* 120:193-205. 1991.

Boot HJ, Ter Huurne HM, Peeters BPH. Generation of full-length cDNA of the two genomic dsRNA segments of infectious bursal disease virus. *J. Virological Methods* 84:49-68. 2000.

Brown MD, Skinner MA. Coding sequences of both genome segments of a European "very virulent" infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 40:1-15. 1996.

Bumstead N, Reece RL, Cook JKA. Genetic differences in susceptibility of chicken lines to infectious bursal disease virus. *Poultry Science* 72:403-410. 1993.

Burkhardt E, Muller H. Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to

IBDV. Archives Virology 94:297-303. 1987.

Cao, YC, Yeung WS, Law M, Bi YZ, Leung PC, Lim BL. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. Avian Diseases 42:340-351. 1998.

Cardoso TC, Rahal P, Pilz D, Teixeira MCB, Arns CW. Replication of classical infectious bursal disease virus in the chicken embryo related (CER) cell line. Avian Pathology 29:213-217. 2000.

Cardoso TC, Sousa RL, Alessi AC, Montassier HJ, Pinto AA. A double antibody sandwich ELISA for rapid diagnosis of virus infection and to measure the humoral response against infectious bursal disease on clinical material. Avian Pathology 27:450-454. 1998.

Chen HY, Zhou Q, Zhang MF, Giambrone JJ. Sequence analysis of VP2 hypervariable region of nine infectious bursal disease virus isolates from Mainland China. Avian Diseases 42:762-769. 1998.

Cloud SS, Lillehoj HS, Rosenberger JK. Immune dysfunction following infection with chicken anaemia virus and infectious bursal disease virus. I. Kinetic alterations of avian lymphocytes subpopulations. Vet. Immunology Immunopathol. 34:337-352. 1992.

Cloud SS, Rosenberger JK, Lillehoj HS. Immune dysfunction following infection with chicken anaemia virus and infectious bursal disease virus. II. Alteration of in vitro immune response. Vet. Immunology Immunopathol. 34:353-366. 1992.

Darteil R, Bublot M, Laplace E, Bouquet JF, Audonnet JC, Riviere M. Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. Virology

211:481-490. 1995.

Dybing JK, Jackwood DJ. Antigenic and immunogenic properties of baculovirus-expressed infectious bursal disease viral proteins. *Avian Diseases* 42:80-91. 1998.

Etteradossi N, Arnauld C, Toquin D, Rivallan G. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Archives Virology* 143:1627-1636. 1998.

Etteradossi N, Toquin D, Rivallan G, Guittet M. Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus. *Archives of Virology* 142:255-270. 1997.

Etteradossi N. Progress in the Diagnosis and Prophylaxis of Infectious Bursal Disease in Poultry. Comprehensive reports on technical items presented to the International Committee or to regional Commissions (;. 75-82). Paris: OIE. 1995.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and <sup>15</sup>Nnitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126:131-138. 1982.

Haddad EE, Whitfill CE, Avakian AP, Ricks CA, Andrews PD, Thoma JA, Wakenell PS. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Diseases* 41:882-889. 1997.

Heine HG, Boyle DB. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. *Archives Virology* 131:277-292. 1993.

Hiraga M, Nunoya T, Otaki Y, Tajima M, Saito T, Nakamura T. Pathogenesis of highly virulent infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomized chickens. *J. Vet. Sci.* 56:1057-1063. 1994.

Hirai K, Funakoshi T, Nakai T, Shimakura S. Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens. *Avian Diseases* 25:484-496. 1981.

Inoue M, Fujita A, Maeda K. Lysis of myelocytes in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Vet. Pathol.* 36:146-151. 1999.

Jackwood DJ, Sommer SE. Restriction fragment length polymorphism in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Diseases* 43:310-314. 1999.

Kaiser P, Hughes S, Bumstead N. The chicken 9E3/CEF4 CXC chemokine is the avian orthologue of 11.8 and maps to chicken chromosome 4 syntenic with genes flanking the mammalian chemokine cluster. *Immunogenetics* 49:673-684. 1999.

Karaca K, Kim IJ, Reddy SK, Sharma JM. Nitric oxide inducing factor as a measure of antigen and mitogen-specific T cell responses in chickens. *J. Immunological Methods* 10:97-103. 1996.

Kataria RS, Tiwarii AK, Butchaiah G, Kataria JM. Development of probes for differentiation of infectious bursal disease virus strains of various virulence by dot-blot hybridization. *Acta Virologica* 44:259-263. 2000.

Kibenge FSB, Dhillon AS, Russel RG. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. gen. Virol.* 69:1757-1775. 1988

Kim IJ, Karaca K, Pertile TL, Erickson SA, Sharma JM. Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. *Vet. Immunology Immunopathol.* 61:331-341. 1998.

Klasing KC, Peng RK. Monokine-like activities released from a chicken macrophage line. *Animal Biotechnology* 1:107-120. 1990.

Lam KM. Alteration of chicken heterophil and macrophage functions by the infectious bursal disease virus. *Microbiological Pathogenesis* 25:147-155. 1998.

Lim BL, Cao Y, Yu T, Mo CW. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *J. Virol.* 73:2854-2862. 1999.

Lin Z, Kato A, Otaki Y, Nakamura T, Sasmaz E, Ueda S. Sequence comparison of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Diseases* 37:315-323. 1993.

Liu X, Giambone JJ, Dormitorio. Simplified sample processing combined with a sensitive nested polymerase chain reaction assay for detection of infectious bursal disease virus in the bursa of Fabricius. *Avian Diseases* 42:480-485. 1998.

Lowenthal JW, Digby MR, York JJ. Production of interferon-gamma by chicken T cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 15:933-938. 1995.

McNeilly F, Walker I, Allan GM, Adair BM. Bursal lymphocyte proliferation in the presence of phorbol myristate acetate: effect of IBDV strains on the proliferation response. *Avian Pathol.* 28:301-303. 1999.

Moody A, Sellers S, Bumstead N. Measuring infectious bursal disease virus RNA in

blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR. *J. Virological Methods* 84:55-64. 2000.

Nielsen OL, Sorensen P, Hedemand JE, Laursen SB, Jorgensen PH. Inflammatory response of different chicken lines and B haplotypes to infection with infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 27:181-189. 1998.

Nieper H, Muller H. Susceptibility of chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus does not correlate with the presence of specific binding sites. *J. gen. Virol.* 77:1229-1237. 1996.

Nieper H, Teifke JP, Jungmann A, Lohr CV, Muller H. Infected and apoptotic cells in the IBDV-infected bursa of Fabricius studied by double-labelling techniques. *Avian Pathology* 28:279-285. 1999.

Nunoya T, Otaki Y, Tajima M, Hiraga M, Saito T. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens. *Avian Diseases* 36:597-609.1992.

Ogawa M, Yamaguchi T, Setiyono A, Ho T, Matsuda H, Furusawa S, Fukushi H, Hirai K. Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. *Archives Virology* 143:2327-2341. 1998.

Rodenberg J, Sharma JM, Belzer SW, Nordgren RM, Naqi S. Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Diseases* 38:16-21. 1994.

Samad F, Bergtrom G, Eissa H, Amrani DL. Stimulation of chick hepatocyte fibronectin production by fibroblast-conditioned medium is due to interleukin 6. *Biochim Biophys. Acta* 19:207-213. 1993.



Schnitzler D, Bernstein F, Muller H, Becht H. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J. gen. Virology* 74:1563-1571. 1993.

Schroder A, Van Loon AAWM, Goovaerts D, Mundt E. Chimeras in noncoding regions between serotypes I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens. *J. gen. Virol.* 81:533-540. 2000.

Schroder A, Van Loon AAWM, Goovaerts D, Teifke JP, Mundt E. VP5 and the N terminus of VP2 are not responsible for the different pathotype of serotype I and II infectious bursal disease virus. *J. gen. Virol.* 81:159-169. 2000.

Sekellick MJ, Ferrandino AF, Hopkins DA, Marcus PI. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *J. Interferon Res.* 14:71-79. 1994.

Tsukamoto K, Kojima C, Komori Y, Tanimura N, Mase M, Yamaguchi S. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marburg's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. *Virology* 257:352-362. 1999.

Valot S, Edert D, Faou AL. A simple method for the in vitro study of the virucidal activity of disinfectants (Title only). *J. Virological Methods* 86:21-21. 2000

van den Berg TP, Gonze M, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathology* 20:133-143. 1991.

van den Berg TP, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathology* 20:409-421. 1991.

Vervelde L, Davison TF. Comparison of the in 나셔 changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages. *Avian Pathology* 26:803-821. 1997.

Weining KC, Sick C, Kaspers B, Stachell P. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur. J. Biochem.* 15:994-1000. 1998.

Yamaguchi T, Iwata K, Kobayashi M, Ogawa M, Fukushi H, Hirai K. Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 141:1493-1507. 1996.

Yamaguchi T, Kondo T, Inoshima Y, Ogawa M, Miyoshi M, Yanai T, Masegi T, Fukushi H, Hirai K. In vitro attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: some characteristics of attenuated strains. *Avian Diseases* 40:501-509. 1996

Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y, Miyoshi M, Fukushi H, Hirai K. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology* 223:219-223. 1996.

Yao K, Goodwin MA, Vakharia VN. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J. Virol.* 72:2647-2654. 1998.

## 제 2 절 제 2세부과제

Baert K, Backer PD (2002) Disposition of sodium salicylate, flunixin and meloxicam after intravenous administration in broiler chickens. *J Vet Pharmacol Therap* 25:449-453

Balk RA (2004) Optimum treatment of severe sepsis and septic shock: evidence in support of the recommendations. *Dis Mon* 50: 163-213.

Chai Z, Alheim K, Lundkvist J, Gatti S, Bartfai T. (1996) Subchronic glucocorticoid pretreatment reversibly attenuates IL-1b induced fever in rats; IL-6 mRNA is elevated while IL-1a and IL-1b mRNAs are suppressed, in the CNS. *Cytokine* 8: 227-237.

Hallemeesch MM, Cobben DCP, Soeters PB, Deutz NEP (2002) Differential effects of selective and non-selective NOS inhibition on renal arginine and protein metabolism during endotoxemia in rats. *Clinical Nutrition* 21(2):111-117

Katzung BG (2004) *Basic & Clinical Pharmacology*. 9th ed. McGraw Hill, Boston.

Kim IJ, Karaca K, Pertile TL, Erickson SA, Sharma JM (1998) Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 61: 331-341

Kitaichi K, Wang L, Takagi K, Iwase M, Shibata E, Nadai M, Takagi K, Hasegawa T. (1999) Decreased antipyrine clearance following endotoxin administration: In vivo evidence of the role of nitric oxide. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2697-2701.

Likoff RO, Guptill DR, Lawrence LM, McKay CC, Mathias MM, Nockels CF, Tengerdy RP (1981) Vitamin E and aspirin depress prostaglandins in protection of chickens against *Escherichia coli* infection. *Am J Clin Nutr* 34: 245-251.

Malmberg KJ, Lenkei R, Pertersson M, Ohlum T, Ichihara F, Glimelius B, Frodin JE, Masucci G, Kiessling R (2002) A short-term dietary supplementation of high doses of vitamin E increase T helper 1 cytokine production in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 8(6):1772-1778

Sahin K, Sahin N and Yaralioglu S (2002a) Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation, blood serum metabolites, and mineral concentrations of laying hens reared at high ambient temperature. *Biol Trace Elem Res* 85: 35-45.

Sahin K, Sahin N, Yaralioglu S, Onderci M (2002b) Protective role of supplemental vitamin E and selenium on lipid peroxidation, vitamin E, vitamin A, and some mineral concentrations of Japanese quails reared under heat stress. *Biol Trace Elem Res* 85(1):59-70

Sharma JM, Kim IJ, Rautenschlein S, Yeh HY (2000) Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Develop Comp Immunol* 24: 223-235.

Shinoda J, McLaughlin KE, Bell HS, Swaroop GR, Yamaguchi SI, Holmes MC, Whittle IR. (2003) Molecular mechanisms underlying dexamethasone inhibition of iNOS expression and activity C6 glioma cells. *Glia* 42: 68-76

Southan GJ, Szabo C, Thiemermann C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. *Br J Pharmacol* 114:510-516

Stillborn HL, Harris GC, Bottje WG, Waldroup PW (1988) Ascorbic acid and acetylsalicylic acid (aspirin) in the diet of broilers maintained under heat stress conditions. *Poult Sci* 67: 1183-1187.

Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C (1994) Beneficial effects and improved survival in

rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA 91:12472-12476

Tatro JB (2000) Endogenous antipyretics. Clin Infect Dis 31: S190-201.

Tras B, Inal F, Bas AL, Altunok V, Elmas M, Yazar E (2000) Effects of continuous supplementations of ascorbic acid, aspirin, vitamin E and slenium on some hematological parameters and serum superoxide dismutase level in broiler chickens. Br Polut Sci. 41(5):664-666

Van den Berg TP (2000) Acute infectious bursal disease in poultry: a review. Avian Pathol 29:175-194

### 제 3 절 협동과제

Azad, A.A., Barret,t S.A. & Fahey, K.J. (1985). The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology* 143, 35-44.

Azad AA, Jacadish MN, Brown MA, Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Viol*, 161:145-152, 1987.

Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgiou A, Muller H, Bournnell MEG. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol* 1990;71:1303-12.

Becht H, Muller H, Muller HK. Cmparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 59:631-640, 1988.

Brown MD, Green P, Skinner MA. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J Gen Virol* 1994;75:675-80.

Cao YC, Yeung WS, Law M, Bi YZ, Leung FC, Lim BL. Molecular characterization of seven chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis* 1998;42:340-51.

Chettle N, Stuart JC, Wyeth PJ. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Angila. *Vet Rec* 1989;125:271-272.

Cummings TS, Broussard CT, Page RK, et al. Infectious brsal disease virus in turkeys. *Vet Bull*, 56:757-762, 1986.

Heine HG, Haritou M, Failla P, Fahey K, Azad A. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. *J Gen Virol* 1991;22:1835-43.

Hua-Cuen Chang, Tsang-Long Lin, Ching-Ching Wu. DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. *Vaccine* 2003;21:507-513.

Hudson, P.J., Mckern, N.M., Power, B.E. & Azad, A.A. (1986). Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Research* 14, 5001-5012.

Isamail NM, Saif YM, Moorhead PD. Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, 32:757-759, 1988.

Ismail NM, Saif YM, Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chicks. *Avian Dis*, 35: 460-469, 1991.

Izawa H, Eiguchi Y, Nagabayashi T. Attenuation of infectious bursal disease virus by serial passage through chicken embryonated eggs and chicken and duck embryonic fibroblasts (author's translation). (*Japanese*) *Uirusu*, 28:41-45, 1978.

Jackwood DJ, Saif YM. Antigenic diversity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 31:766-770, 1987.

Jackwood DJ, Saif YM, Hughes JM. Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious disease virus in turkeys. *Avian Dis*, 26:871-882, 1982.

Jagadish MN, Station VJ, Hudson PJ, et al. birnavirus precursor polyprotein is processed

in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J Virol*, 62:1084-1087, 1988.

Dybing, J.K. Jackwood, D.J. Expression of MD infectious bursa disease viral roteins in baculovirus. *Avian Dis*, 41:617-626, 1997.

Pitcovski, J. D. Di-Castro, Y. Shaaltiel, A. Azriel, B. Gutter. Insect cell derived VP2 of infectious bursal disease virus confers protection against the disease in chickens. *Avian Dis*, 40:753-761, 1996.

Kibenge FSB, Jackwood DJ, Mercado CC. nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* 712:569-577, 1990.

Kwon HM, Jackwood MW, Gelb Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis* 1993;37:194-202.

Lana DP, Beisel CF, Silva RF. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus. *Virus Gene*, 3:247-259, 1992.

Lin Z, Kato A, Otaki Y, et al. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis*, 42:340-351, 1998.

Lin Z. Kato A, Otaki Y, et al. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis*, 37:315-323, 1993.

Lukert PD, saif YM, infectious bursal disease. In: diseases of poultry, 9th ed. (Calnek, B.W. ed) Iowa State University Press, Ames, Iowa, 648-663, 1991.



Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease. In: Disease of poultry, 10th ed., Calnek, BW et al., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1997. pp.721-38.

Macreadie IG, Vaeghan PR, Chapman AJ, et al. Passive protection agaainst infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. *Vaccine*, 8:549-552,

McFerran JB, McNulty MS, Mckilhop ER, et al. Isolation and serological studies with infectious bursal desease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of second serotype. *Avian Patho*, 9:395-404.1980.1990.

Morgan MM, Macreadie IG, Harley VR, et al. Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-KDa product. *Virology*, 163:240-242, 1988.

Mundt E, Beyer J, Muller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol*, 76:437-443, 1995.

Murphy FA, Fauquer CM, Bishop DHL, Virus taxonomy. Classification and nomenclature of virus. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, New York(Arch. Virol. Suppl. 10). pp. 240-244, 1995.infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 1988;32:757-9.

Muller H, Becht H. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal desease virus and their significance as structural elements for infectious bursal desease virus and incomplete particles. *J Virol*, 44:384-392, 1982.

Okoye JOA. Infectious bursal disease of chickens. *Vet Bull*, 54:425-436, 1984.

Pitcovski J, Goldberg D, Levi BZ. Coding region of segment A sequence of a very virulent isolate of IBDV comparison with isolates from different countries and virulence.

Avian Dis. 42: 497-506, 1998.

Rosenberger JK, Cloud SS, Metz A. Use of infectious bursal disease virus variant vaccines in broilers and broiler breeders. proceeding of 36th West Poultry Dis Con, pp.105-109, 1987.

Snyder DB, Lana DP, Savage PK, Yancey FS, Mengel SA. Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis 1988;32:535-9.

Van den Berg TP, Gonze M, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterisation of a highly virulent strain. Avian Pathol 1991;20:133-4.

Vakharia VN, He J, Ahamed B, Snyder DB. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. Virus Res 1994;31:265-73.

Weyth PJ, Cullen GA. Transmission of immunity from inactivated infectious bursal disease oil-emulsion vaccinated parent chickens to their chicks. Vet Rec, 102:362-363, 1978.

권용국, 모인필, 성환우, 강문일, 고흥범, 이정길, 양창근. 傳染性 F囊病 바이러스 國內 分離株 SH/92의 病原性 研究. 農業科學論文集 1995;37:637-47.

모인필, 김재홍, 권준현 등. 최근의 강독형 IBD발생 양계단지에 대한 IBD 예방접종프로그램 작성 및 현지적용 연구. 가축위생연구소 시험연구보고서(가축위생). pp.305-310, 1993.

이영옥, 김순재, 최정옥 등. 국내종계의 infectious bursal disease virus의 감염상황 및 분리주의 생물학적 특성. 농사시험연구보고서(가축위생).23:136-142, 1981.