최 종
연구보고서

난항체를 이용한 주요 가금질병 조기 및 감별진단 기술 개발

Development of early and differential diagnosis techniques by using egg antibody

연구기관
서 울 대 학 교

농 림 부

편집순서 2

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “난항체를 이용한 주요 가금질병 조기 및 감별진단 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 5월 24일

주관연구기관명 : 서울대학교
총괄연구책임자 : 김 선 중
세부연구책임자 : 김 선 중
세부연구책임자 : 류 판 동
연 구 원 : 권 혁 준

편집순서 3

요 약 문

Ⅰ. 제 목

난항체를 이용한 주요 가금질병 조기 및 감별진단 기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

조류의 특정 전염성 병원체에 대한 항체의 유무와 백신 전후의 항체 수준을 측정하기 위한 재료로는 주로 혈액을 응고시켜 얻은 혈청이나 항응고제를 처리하여 얻은 혈장을 사용하여 왔으며, 최근에는 난황 항체 추출 기술의 개발로 난황을 이용한 항체 검사도 실시되고 있다. 혈청이나 혈장을 이용한 항체검사법은 채혈이 필요하므로 숙련된 기술을 요하며, 피검 조류를 보정하는 과정에서 스트레스를 유발하는 단점이 있음. 이에 반해 계란의 난황 항체검사법은 검사재료 채취에 숙련된 기술이 필요하지 않으며 스트레스가 없다는 장점이 있으나 **혈액과 난황 항체는 모두 IgG로서 혈액중의 면역 수준을 나타내는 것으로 점막면역의 수준의 지표로는 이용할 수 없으며, 난황항체는 혈액항체보다 3-6일 정도 늦게 검출되고, 역가도 유의적으로 낮은 것으로 알려져 진단시기가 오히려 늦는 단점이 있음** (Ling et al., *Avian Dis.* 1998 42:186-189).

점막은 외계와 접하고 있어 다양한 병원성 미생물이 침입하는 경로로서, 점막 고유의 면역계가 분포해 있으며 면역반응이 최초로 이루어지는 장소임. 조류의 점

막 면역계는 소화기, 생식기 및 호흡기의 점막하층에 산발적으로 분포하는 림프양 조직과 맹장과 결장사이의 맹장편도 1쌍 및 안구 뒤쪽에 위치하는 하데리안선(Harderian gland)으로 이루어져 있으며 (Toivanen and Toivanen, 1987), **최근 점막면역의 수준을 측정하기 위해 조류의 눈물이나 기관 및 장관 세척액을 이용한 항체측정법이 개발되었으나 역시 피검 개체에 대한 스트레스가 심하고, 재료 채취가 용이하지 못하다는 단점이 있음.**

계란의 난황에는 혈액에서 주로 관찰되는 IgG가 분포하며, **난백에는 초기 항체인 IgM과 점막항체인 IgA가 주로 분포한다고 알려져 있으므로** (Rose et al., 1974; Rose and Orlans, 1981) **난백으로부터 추출한 항체를 사용하는 경우 스트레스 없이 점막면역 수준을 측정할 수 있음.** 현재까지 난황항체를 추출하여 특정 질병을 진단하는 시도는 살모넬라, 전염성기관지염 등에서 이루어져 왔으나, 난백을 이용한 IgA 검출은 뉴캐슬병 (Ewert *et al.*, 1979) 또는 *Salmonella typhimurium* 감염증 (Schiemann and Montgomery, 1991)에 대한 생독백신을 접종한 후 항체의 유무와 분포를 확인하는 수준에 그치고 있는 실정임.

따라서 기존의 혈청을 이용하는 경우보다 조류질병의 조기진단, 모계-후대병아리 백신항체의 동시 모니터링 및 백신-감염항체의 감별 면에서 우월할 것으로 예상되는 난황 및 난백 항체 검사법의 확립 및 그 응용은 세계 최초이며, 국내 양계산업의 생산성 향상 및 소비자 신뢰도 제고에 있어 획기적인 전기를 마련할 것으로 기대됨.

기존의 혈청검사법은 재료 채취를 위해 채혈이 필요하므로 숙련된 기술이 필요하고, 채혈을 위해서는 숙련된 외부 인력의 농장방문 및 가금과의 접촉이 불가피하므로 잠재적인 질병의 전파위험에 노출되기 쉽고, 빈번한 방문의 어려움 및 전염병 전파의 위험성 때문에 정기적으로 채혈 검사가 이루어지지 못하고 농장에 문제가 발생하는 경우에만 검사를 실시하여 사전진단 및 차단방역에 어려움을 겪고 있음. 그러나 계란 항체법의 경우 숙련된 기술이 필요치 않아 농장 종사자 누구나 재료 채취가 가능하고, 가금과의 직접적인 접촉이 필요하지 않으므로 전

염병의 전파 위험 및 스트레스를 피할 수 있다는 장점이 있음.

따라서, 본 과제는 난항체를 이용한 주요 조류질병의 신속 및 감별진단 기술을 개발하고, 차단방역 프로토콜과 맞춤백신 프로그램을 개발하며, 체액성 면역의 분자표지로서 면역글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자 염기서열 변화 평가를 목적으로 수행하였음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

○ 조류독감의 신속진단 및 차단방역 기반기술 연구

- 약병원성 (H9N2) 바이러스의 병원성조사
- 바이러스 감염 후 계란항체 및 혈청항체 조사
- 국내 식란 및 종란 내 조류독감 항체조사

○ 뉴캐슬병의 감별진단 및 차단방역 기반기술 연구

- 약독주 및 야외주 오일백신 접종 후 계란 및 혈청 항체조사
- 약독주 오일백신 및 생독백신 접종 후 계란 및 혈청 항체조사
- 약독주 오일백신 및 생독백신 접종 후 면역글로부린 유전자 다양성 분석
- 상용 오일백신의 방어능력 평가 및 감염 후 계란 및 혈청 항체조사
- 종란 내 뉴캐슬병바이러스 항체조사 및 부화병아리의 야외주 감염에 대한 방어능 조사
- 보존방법에 따른 계란항체의 역가변화 조사
- 계란 및 혈청을 이용한 야외주-백신주 감별법 개발
- 차단방역 프로토콜 확립

○ 면역 장기별 (정상 및 뉴캐슬병 생독백신접종 닭) 면역 글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자 염기서열 변화 연구

- 하데리안선, 맹장편도, F낭, 비장, 골수내 면역글로부린 단쇄 유전자 증폭
- RFLP (restriction enzyme fragment length polymorphism) study
- 주요 유전자 클로닝 및 염기서열 결정

○ 가금티푸스의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구

- 야외주 감염 후 계란 및 혈청항체 조사
- 백신 (생독 및 사독) 접종 후 계란 및 혈청 항체조사 및 야외주 감염 후 계란 및 혈청 항체 변화 조사
- 계란항체역가 측정 후 부화한 병아리의 야외주에 대한 방어능력 조사
- 계란 내 (식란 및 종란) 가금티푸스 항체조사
- 야외주-백신주 항체 감별법 확립
- 차단방역 프로토콜 확립

○ 마이코플라스마 감염증의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구
- MG 생독백신 접종 및 MS 야외주 감염 후 계란 및 혈청 항체조사
- 계란 내 (식란 및 종란) MG, MS 항체조사

○ 전염성낭병에 대한 모계 및 후대병아리 백신항체수준 모니터링 및 백신 프로토콜 연구
- 종란 내 항체조사 및 부화병아리의 야외주 감염에 대한 방어능력 비교
- 모계 보강백신방법 및 후대병아리 백신방법 개발

◯ 면역 장기별 (정상 및 전염성 낭병 생독백신 접종 닭) 면역 글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자 염기서열 변화 연구
- 하데리안선, 맹장편도, F낭, 비장, 골수내 면역글로부린 단쇄 유전자 증폭
- RFLP (restriction enzyme fragment length polymorphism) study
- 주요 유전자 클로닝 및 염기서열 결정

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

국내 식란 및 종란의 난황항체를 이용한 H9N2 아형 조류 인플루엔자 바이러스 감염실태를 조사한 결과 여전히 국내에서 높은 양성률 (22%)을 보이고 있음을 알 수 있었으며, 산란중인 닭에 감염되는 경우 뚜렷한 산란율의 감소를 초래한다는 사실을 확인하였음. 난백의 경우 비특이적인 sialoprotein 인 ovomucoid와 ovomucin에 의해 혈구응집억제법을 이용한 조류 인플루엔자 바이러스와 뉴캐슬병바이러스의 조기 진단에는 활용할 수 없었으나 H9N2 아형의 조류 인플루엔자 바이러스와 H1N1 및 H3N2 아형의 인간 인플루엔자 바이러스 그리고, 뉴캐슬병

바이러스에 대해서도 혈구응집억제능을 보여 sialic acid를 수용기로 하는 인간, 반려 및 중대형 동물의 *Orthomyxoviridae* 및 *Parmyxoviridae* family에 속하는 바이러스 감염증 예방 및 전파 완화 효능이 있는 항바이러스 식품으로 개발 및 홍보가 가능할 것으로 기대됨. 또한 면역혈청 및 난황항체에 대한 교차 혈구응집억제법을 통해 백신주와 뚜렷한 차이를 보이는 바이러스들의 염기서열을 분석한 결과 HN 단백질의 선형항원에 변이를 보이는 유전형 VII 형 바이러스를 최초로 확인하였음.

가금티푸스 감염률을 조사하기 위해 42개 농장 59계군 유래의 236개 계란으로부터 난황 및 난백을 분리하여 평판응집법으로 조사한 결과 농장 11.9%, 계군 8.5%, 계란 3.0%, 난황 1.3%, 난백 1.7%에서 양성을 보임. 국내 산란계 농장의 경우 가금티푸스 사독오일백신이나 생독백신 (SG 9R)을 접종하고 있어 백신에 의한 난황 및 난백 항체의 변화를 확인하기 위해 산란중인 SPF 닭에 생독백신과 사독오일백신을 접종한 결과 접종 11일에 혈청에서는 강력한 양성을 보인 반면 난황과 난백에서는 음성을 보여 난황의 경우 혈청에 비해 반응이 늦다는 점을 확인하였음. 난백의 경우 음성을 보인 것은 점막을 통한 자연감염이 아닌 인공적인 체내 접종 때문인 것으로 사료되나 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료됨. 모체이행항체가 전혀 없는 산란계 수평아리와 육용계의 야외 *S. gallinarum* (SG) 주에 대한 감수성 실험에서 SG의 호흡기 감염 가능성을 시험한 결과 구강을 통한 감염에 비해 적은 수의 세균으로도 가금티푸스의 전형적인 병변을 재현하였으며, 이는 기존에 정립된 살모넬라의 분변에서 구강-장을 통한 전염 경로의 또 다른 전염경로를 밝힌 것으로 야외 발병 상황을 이해하는데 도움이 될 것으로 기대됨.

Mycoplasma gallisepticum (MG)의 감염률을 조사하기 위해 61개 농장 81계군의 324개 난황 및 308개의 난백에 대해 평판응집법으로 항체 유무를 조사한 결과 45.9%의 농장과 34.6%의 계군, 7.4%의 난황 및 50.0%의 난백에서 양성을 보임. 2000년부터 2006년까지 260개 농장, 2,596계군, 28,602개의 혈청에 대해 MG 항체 양성률을 조사한 결과 51.6%의 계군과 22.8%의 혈청에서 양성을 보였음.

Mycoplasma synoviae (MS)의 감염률을 조사하기 위해 52개 농장 72계군의

296개 난황 및 281개의 난백에 대해 평판응집법으로 항체 유무를 조사한 결과 34.6%의 농장과 25.0%의 계군, 4.1%의 난황 및 23.8%의 난백에서 양성을 보임. 2000년부터 2006년까지 260개 농장, 2,493계군, 18,307개의 혈청에 대해 MS 항체 양성률을 조사한 결과 71.8%의 계군과 38.5%의 혈청에서 양성을 보임. MG의 경우 생독백신 접종에 의해 양성률이 증가한 것으로 판단되나 MS의 경우 백신을 하지 않음에도 불구하고 양성률이 높으am로 MS의 전염경로와 피해양상 및 그 규모에 대해 보다 높은 관심이 필요함.

IBDV에 대한 난황 내 중화항체 수준은 혈청 내 중화항체 수준 대비 0.95 높았으며 난황항체 검사시 4.0이하인 경우 모계 및 후대병아리에 대해 신속한 백신 접종이 권장되었음.

뉴캐슬병바이러스와 전염성 기관지염바이러스를 접종하고 각 면역장기에 분포하는 B-세포의 다양성 변화를 조사한 결과 기존에 보고된 프라이머에 의해 면역글로부린 단쇄 유전자 mRNA의 다양성 부위 증폭에 문제가 없었으며, 염기서열 분석결과 면역장기에서 동일한 염기서열을 갖는 클론이 발견되어 본 방법으로 항원자극과 관련된 면역글로부린 유전자를 동정할 수 있을 것으로 기대됨.

편집순서 4

SUMMARY

(영문요약문)

In egg yolk and egg white immunoglobulin isotypes are present in separate. IgG is present in egg yolk and IgA and IgM are present in egg white. IgM is the earliest antibody in humoral immunity and IgA play major role in mucosal immunity. Natural infection of pathogens start on the mucosal surface, therefore IgA antibody reaction may precede IgG antibody. To test IgA tears and tracheal or intestinal washes have been used but in case of breeder and layer egg white is preferable. In this study we tested egg yolk, egg white and serum antibodies to Newcastle disease virus (NDV), avian influenzavirus (AIV), *Salmonella gallinarum* (SG), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) and infectious bursal disease virus (IBDV) and compared the presence and the titre of specific antibodies. In this research we aimed at application of egg antibodies to early and differential diagnosis of poultry diseases.

We tested anti-avian influenzavirus (H9N2) antibody in egg yolks from fifty-nine poultry flocks and the positive rate was 22%. Experimental challenge with SNU-AIV-1035C caused egg drops by 40%. Considering high positive rate and clear egg drops, vaccine program aganist H9N2 subtype virus should be considered.

To differentiate antigenicity of La Sota (vaccine strain) and field virulent viruses (SNU-NDV-0202 and SNU-NDV-4152) we performed cross-hemagglutination inhibition test with anti-sera, field serum samples and egg yolk. In case of anti-sera vaccine strain and field viruses showed

apparent two to three HI titre differences and we could conclude antigenic changes in hemagglutinin-neuraminidase (HN) of field virulent viruses. To demonstrate the antigenic change we determined the Fusion (F) and HN nucleotide sequences and found various amino acids changes. Out of the amino acids changes we found E347K substitution related to HN linear epitope change and additional substitution M354K. Such amino acid changes might cause HI-titre in cross-HI test. Differentiation of vaccine and natural infection with egg white antibody was failed but we found anti-viral activity of egg white to NDV and influenza viruses (avian H9N2, human H1N1 and H3N2 viruses) and different HI-titre to different viruses. That is, SPF egg white showed three to four higher HI-titre to La Sota than field virulent isolates and also to H9N2 virus than human H1N1 and H3N2 viruses. Therefore we our findings may be useful in development of functional food and differentiation of NDV vaccine and field strains.

According to the plate agglutination test with *S. pullorum* antigen and eggs 11.9% (5/42) of farms, 8.5% (5/59) of flocks were fowl typhoid positive. The positive rate of egg white and egg yolk were 1.7% (4/236) and 1.3% (3/236), respectively. After vaccination with live vaccine (SG 9R) and killed oil vaccine egg yolk and egg white were negative at 11 day post vaccination (DPV) but sera from oil (strong-positive, 3/3) and live (1/2) vaccines inoculated chickens were positive. Serum antibody appeared earlier than egg yolk but considering availability of egg yolk it is good specimen for antibody monitoring. The absence of antibody in egg white until 11 DPV may be caused by direct inoculation of vaccines, therefore, to evaluate egg white in differential diagnosis further studies are required. Reproduction of fowl typhoid by respiratory inoculation is very important finding and it may help understanding field outbreaks of fowl typhoid and developing efficient prevention measures.

According to the plate agglutination test with MG antigen and eggs 45.9% (28/61) of farms, 34.6% (28/81) of flocks were MG positive. The positive rate of egg white and egg yolk were 50.0% (154/308) and 7.4% (24/324), respectively. The sero-positivity between 2000 and 2006 were tested with 28,601 sera from 2,571 flocks (260 farms). The results revealed that 51.6% of flocks and 22.8% of sera were positive. Just before ts-11 strain vaccination we detected MG antibody in egg white then after 11 days MG antibody was detected in sera (2/6). Therefore egg white antibody test may be useful for rapid diagnosis in the field situation.

The positive rate of MS was tested with 296 of eggs from 72 of flocks (52 of farms) and resulted in 34.6% (18/52) of farms and 25.0% (18/72) of flocks. The positive rate of egg white and egg yolk were 23.8% (67/281) and 4.1% (12/296), respectively. The sero-positivity between 2000 and 2006 were tested with 18,307 sera from 2,493 flocks (260 farms). The results revealed that 71.8% of flocks and 38.5% of sera were positive. The unexpected high positive rate of MG could be explained by vaccination of breeder farms but that of MS urged to further studies on the way of transmission and economic losses caused by MS.

We compared serum antibody of 1-day old chicks and egg yolk with IBDV neutralization test. Egg yolk antibody titre was 1.9-fold higher than serum. Maternal antibody at titre 4.5 and at 3.1 couldn't defense BF atrophy and mortality, respectively.

Immunoglobulin light chain hypervariable region gene could be used to compare B-cell repertoire of vaccinated and unvaccinated lymphoid tissues.

In conclusion egg antibody test may be useful for routine monitoring of avian diseases and especially egg white may be proper for rapid diagnosis of bacterial infections.

편집순서 5

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter I. Outline of Research Project ---------- 14

Chapter II. Present Situation of Research ---------- 21

Chapter III. Methods and Results ---------- 26

Chapter IV. Achievement and Contribution in Relevant Research Field---- 82

Chapter V. Plan of Practical Use ---------- 83

Chapter VI. Data Collection during Project ---------- 86

Chapter VII. References ---------- 88

편집순서 6

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ---------- 13

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ---------- 20

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ---------- 25

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ---------- 81

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ---------- 82

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ---------- 85

제 7 장 참고문헌 ---------- 87

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 과제는 난항체를 이용한 주요 조류질병의 신속 및 감별진단 기술을 개발하고, 차단방역 프로토콜과 맞춤백신 프로그램을 개발하며, 체액성 면역의 분자표지로서 면역글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자 염기서열 변화 평가를 목적으로 수행하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

조류의 특정 전염성 병원체에 대한 항체의 유무와 백신 전후의 항체 수준을 측정하기 위한 재료로는 주로 혈액을 응고시켜 얻은 혈청이나 항응고제를 처리하여 얻은 혈장을 사용하여 왔으며, 최근에는 난황 항체 추출 기술의 개발로 난황을 이용한 항체 검사도 실시되고 있다. 혈청이나 혈장을 이용한 항체검사법은 채혈이 필요하므로 숙련된 기술을 요하며, 피검 조류를 보정하는 과정에서 스트레스를 유발하는 단점이 있다. 이에 반해 계란의 난황 항체검사법은 검사재료 채취에 숙련된 기술이 필요하지 않으며 스트레스가 없다는 장점이 있다. 그러나 **혈액과 난황 항체는 모두 IgG로서 혈액중의 면역 수준을 나타내는 것으로 점막면역의 수준의 지표로는 이용할 수 없다. 또한 난황항체는 혈액항체보다 3-6일 정도 늦게 검출되고, 역가도 유의적으로 낮은 것으로 알려져 진단시기가 오히려 늦어지는 단점이 있다** (Ling et al., *Avian Dis.* 1998 42:186-189).

점막은 외계와 접하고 있어 다양한 병원성 미생물이 침입하는 경로로서, 점막 고유의 면역계가 분포해 있으며 면역반응이 최초로 이루어지는 곳이다. 조류의 점

막 면역계는 소화기, 생식기 및 호흡기의 점막하층에 산발적으로 분포하는 림프양 조직과 맹장과 결장사이의 맹장편도 1쌍 및 안구 뒤쪽에 위치하는 하데리안선(Harderian gland)으로 이루어져 있다 (Toivanen and Toivanen, 1987). **최근 점막면역의 수준을 측정하기 위해 조류의 눈물이나 기관 및 장관 세척액을 이용한 항체측정법이 개발되었으나 역시 피검 개체에 대한 스트레스가 심하고, 재료 채취가 용이하지 못하다는 단점이 있다.**

계란의 난황에는 혈액에서 주로 관찰되는 IgG가 분포하며, **난백에는 초기 항체인 IgM과 점막항체인 IgA가 주로 분포한다고 알려져 있다** (Rose et al., 1974; Rose and Orlans, 1981). **따라서, 난백으로부터 추출한 항체를 사용하는 경우 스트레스 없이 점막면역 수준을 측정할 수 있음을 알 수 있다.** 현재까지 난황항체를 추출하여 특정 질병을 진단하는 시도는 살모넬라, 전염성기관지염 등에서 이루어져 왔으나, 난백을 이용한 IgA 검출은 뉴캐슬병 (Ewert *et al*., 1979) 또는 *Salmonella typhimurium* 감염증 (Schiemann and Montgomery, 1991)에 대한 생독백신을 접종한 후 항체의 유무와 분포를 확인하는 수준에 그치고 있는 실정이다.

조류 인플루엔자는 negative-sense RNA 바이러스로서, 이 중 hemagglutinin H9 형은 근년 국내 계군에서 유행하는 혈청형으로 병원성은 높지 않지만 종계나 산란계에 감염되는 경우 산란율을 저하시키며, 조류 유래의 홍콩 독감 발생 사례에서 보듯이 공중보건학적으로 잠재적인 위험요인이 될 수 있다. 상기 **인플루엔자 감염을 진단하기 위하여 혈청을 사용하여 혈구응집억제법으로 항체검사를 실시하고 있으나 통상 감염 후 10일 후에나 항체가 검출되므로 조기진단에 의한 차단 방역의 어려움이 있다**. 또한 최근 발생한 강독 조류독감의 경우 초기진단 이전에 전염원의 이동으로 전염이 확산된 것으로 추정된다. 따라서 전국적인 이동이 빈번하게 일어나는 종란 및 어린병아리(오리)의 전염성 질병 오염(감염) 여부를 사전에 모니터링 할 수 있는 기술의 개발이 절실하다.

뉴캐슬병 예방을 위해 B1, La Sota, Ulster, VG/GA주 등을 백신주로 사용하고 있으나 최근 유행하는 야외바이러스는 선형(線形) 항원과 구조(conformational) 항원에서 변이가 일어나 완벽한 방어가 이루어지지 않는 것으로 의심되고 있다. 뉴캐슬병의 혈청학적 진단은 혈청에 대한 혈구응집 억제반응을 실시하여 역가가 비정상적으로 높을 경우 야외주 감염으로 판정하고 있으나 판정기준이 주관적일 뿐만 아니라 백신 접종에 의한 항체와 야외주 감염에 의한 항체를 구분할 수 있는 방법이 없다.

마이코플라스마는 닭에서 만성 호흡기 질병과 관절염을 야기한다. 마이코플라스마에 대한혈중 항체는 감염 후 2주 이상이 지난 후에야 검출되므로 계군에 만연한 이후에 인지하게 되는 문제점이 있어 조기진단의 중요성이 제기되고 있다.

가금티푸스는 국내 양계산업의 질병피해의 주요원인중의 하나로 1991년 국내 최초 발생이 보고 된 이후로 전국적인 발병 양상을 보이고 있으며 예방을 위해 사균 백신과 생균 백신을 접종하고 있다. 혈청학적 진단법으로 주로 혈청평판응집법이 사용되고 있으나 백신항체와 감염항체를 구분할 수 있는 방법이 없는 문제점이 있다.

전염성낭병은 전염성낭병 바이러스 (Infectious bursal disease virus: IBDV)에 의한 급성적인 폐사 및 면역억제에 의한 2차 감염 및 백신효과 저하를 특징으로 하는 질병으로서 양계 생산성 저하의 주된 요인 중의 하나이다. 현재 종계군에서는 후대병아리의 모체이행항체 수준을 높이기 위해 3-5회의 생바이러스 백신접종 외에 불활화 오일 백신까지 예외 없이 접종하고 있으며 실용계 (육계 및 산란계)에서도 2-3회씩 생백신을 접종하고 있으나 거의 모든 계군들이 전염성낭병의 피해를 입고 있다. 이는 1) IBDV의 강한 생존성으로 인한 광범위한 농장 오염, 2) 모체 이행항체에 의한 백신면역의 방해현상이 꼽히고 있다. 모체 이행항체는 나이가 들면서 점차 소실되며 동일한 계군 내에서도 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 현상을 초래하며 때로는 폐사까지 발생하는 부작용이 있다. 따라서 모체의 항체수준과 균일도 뿐만 아니라 후대병아리의 항체수준과 균일도를 먼저 파악하여 최적의 백신시기와 방법을 결정한다면 무차별적 백신접종에 의한 경제적 부담을 덜 수 있고, 최적의 백신 접종 프로그램으로 최고의 예방효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 기존의 혈청을 이용하는 경우보다 조류질병의 조기진단, 모계-후대병아리 백신항체의 동시 모니터링 및 백신-감염항체의 감별 면에서 우월할 것으로 예상되는 난백 항체 검사법의 확립 및 그 응용은 세계최초이며, 국내 양계산업의 생산성 향상 및 소비자 신뢰도 제고에 있어 획기적인 전기를 마련할 것으로 기대된다.

2. 경제·산업적 측면

기존의 혈청검사법은 재료 채취를 위해 채혈이 필요하므로 숙련된 기술이 필요하고, 채혈을 위해서는 숙련된 외부인력의 농장방문 및 가금과의 접촉이 불가피하므로 잠재적인 질병의 전파위험에 노출되기 쉽다. 또한 빈번한 방문의 어려움 및 전염병 전파의 위험성 때문에 정기적으로 채혈 검사가 이루어지지 못하고 농장에 문제가 발생하는 경우에만 검사를 실시하여 사전진단 및 차단방역에 어려움을 겪고 있다. 그러나 계란 항체법의 경우 숙련된 기술이 필요치 않아 농장 종사자 누구나 재료 채취가 가능하고, 가금과의 직접적인 접촉이 필요하지 않으므로 전염병의 전파 위험 및 스트레스를 피할 수 있다는 장점이 있다.

국내 양계산업의 전염병에 의한 직접적인 피해액은 양계 총생산액 1조 4,000억원 중 약 25%인 3,550억원으로 추정되며, 품질저하, 상품화 효율저하 및 수급차질에 의한 소비자 부담 등의 간접적인 피해액을 포함하는 경우 약 4,000억원에 이르는

것으로 추산되고 있다.

최근 국내에서 발생한 조류독감의 전국적인 확산과 그에 따른 소비자들의 양계산물에 대한 소비 기피 및 맹목적 불신을 회복하기 위해서는 기존의 방법에 비해 신속 정확한 조기진단법의 확립이 중요하며, 확립된 조기진단법의 소비자에 대한 적극적인 홍보를 통해 어떠한 질병이 발생하더라도 지속적인 소비가 이루어질 수 있는 신뢰 기반 구축이 절실하다. 이런 측면에서 기존의 진단방법과 차별화되며 세계적으로도 실용화된 바 없는 난백 항체진단법의 확립이 절실하다.

3. 사회·문화적 측면

최근 국내에서 발생한 조류독감의 전국적인 확산과 그에 따른 국민들의 불안심리는 관련업체, 학계 및 정부부처의 종합적인 방안도출의 압력으로 작용하고 있다. 따라서 국민들이 안심하고 먹을 수 있는 동물성 단백질의 안정적인 공급과 잠재적으로 국민건강에 위해를 초래할 수 있는 조류유래 인수 공통 전염병의 만연을 근원적으로 차단하기 위한 정기적인 검사 (사전진단)와 조기진단을 위한 기반기술의 개발이 절실한데, 난백 항체검사법이야말로 샘플링의 용이성, 민감성, 구별성 및 창의성을 고르게 갖춘 신규 조기진단 기술로써 국민적인 불안심리를 일소할 수 있을 것으로 기대되므로 기술개발 지원이 절실하다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 제 1 세부과제: 난항체를 이용한 주요 가금질병 조기 및 감별진단법 개발

○ 조류독감의 신속진단 및 차단방역 기반기술 연구
- 약병원성 (H9N2) 바이러스의 병원성조사
- 바이러스 감염 후 계란항체 및 혈청항체 조사

- 국내 식란 및 종란 내 조류독감 항체조사

○ 뉴캐슬병의 감별진단 및 차단방역 기반기술 연구
- 약독주 및 야외주 오일백신 접종 후 계란 및 혈청 항체 조사
- 약독주 오일백신 및 생독백신 접종후 계란 및 혈청 항체조사
- 상용 오일백신의 방어능력 평가 및 감염후 계란 및 혈청 항체조사
- 종란내 뉴캐슬병바이러스 항체조사 및 부화병아리의 야외주 감염에 대한 방어능력 조사
- 보존방법에 따른 계란항체의 역가변화 조사
- 계란 및 혈청을 이용한 야외주-백신주 감별법 개발
- 차단방역 프로토콜 확립

○ 가금티푸스의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구
- 야외주 감염후 계란 및 혈청항체 조사
- 백신 (생독 및 사독) 접종후 계란 및 혈청 항체조사 및 야외주 감염후 계란 및 혈청 항체 변화 조사
- 계란항체역가 측정후 부화한 병아리의 야외주에 대한 방어능력 조사
- 계란내 (식란 및 종란) 가금티푸스 항체조사
- 야외주-백신주 항체 감별법 확립
- 차단방역 프로토콜 확립

○ 마이코플라스마 감염증의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구
- MG 생독백신 접종 및 MS 야외주 감염후 계란 및 혈청 항체조사
- 계란내 (식란 및 종란) MG, MS 항체조사

○ 전염성낭병에 대한 모계 및 후대병아리 백신항체수준 모니터링 및 백신 프로토콜 연구

- 종란내 항체조사 및 부화병아리의 야외주 감염에 대한 방어능력 비교
- 모계 보강백신방법 및 후대병아리 백신방법 개발

2. 제 2세부과제: 면역 장기별 백신전후 면역글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자 염기서열 변화연구

○ 면역 장기별 (정상 및 뉴캐슬병 생독백신접종 닭) 면역 글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자 염기서열 변화 연구
- 하데리안선, 맹장편도, F낭, 비장, 골수내 면역글로부린 단쇄 유전자 증폭
- RFLP (restriction enzyme fragment length poly-morphism) study
- 주요 유전자 클로닝 및 염기서열 결정

○ 면역 장기별 (정상 및 전염성 낭병 생독백신 접종 닭) 면역 글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자 염기서열 변화 연구
- 하데리안선, 맹장편도, F낭, 비장, 골수내 면역글로부린 단쇄 유전자 증폭
- RFLP (restriction enzyme fragment length poly-morphism) study
- 주요 유전자 클로닝 및 염기서열 결정

제 2 장　국내외 기술개발 현황

제 1절 국내·외 관련분야의 기술개발현황

1. 국내·외 진단분야의 기술개발 현황

가. 국내·외 타연구기관에서는 병원체감염 유무 및 백신항체수준을 측정하기 위해 일반적으로 혈청이나 혈장을 사용하고 있음.

나. 난황으로부터 항체추출법이 확립된 이후 난황을 이용한 항체검사도 이루어지고 있으며 최근 국내 연구자에 의해 난황항체역가를 혈청역가로 환산할 수 있는 방법이 개발되었음.

다. 질병의 조기진단을 위해 대부분의 연구자들은 항체검출법의 민감도를 높이기 위한 노력에 주로 치중해 왔음.

라. 현재 점막의 면역수준을 측정하기 위해 눈물, 기관 세척액, 분변 및 담즙을 채취하여 항체수준을 측정하고 있으며, 난백의 경우 일부연구자들에 의해 백신후 항체수준을 측정하는데 사용된바 있으나 질병의 조기진단 및 백신과의 감별에는 사용된 바 없음.

마. 감염항체와 백신항체 구분을 위해 백신주와 야외주간의 에피톱 구조를 비교하여 서로 다른 에피톱을 항원으로 사용하여 백신주 혹은 야외주 특이적인 항체를 검출하거나 백신항원 중 일부 항원을 결손 시켜 결손부위에 대한 항체의 유무로 감별진단 하는 연구가 활발히 이루어지고 있음.

바. 백신접종 후 질병에 대한 방어여부 및 백신 재접종 시기 결정을 위해 혈액항체의 수준만을 측정하고 있음.

2. 국내 뉴캐슬병 관련

가. 전국적인 백신접종에도 불구하고, 뉴캐슬병 발생에 의한 산란율 감소 및 바이러스 분리는 지속적으로 이루어지고 있으나 그에 대한 원인은 정확히 밝혀져 있지 않고 있음.

나. NDV에 대한 항체는 라소타주를 이용한 혈구응집억제검사법으로 수행하고 있으며, 야외주를 포함한 교차 혈구응집억제검사법은 제대로 이루어지고 있지 않음. 또한 항체의 역가가 높은 경우는 B-세포에서 affinity maturation이 충분히 일어난 상태이므로 백신주와 야외주에 대한 억제정도에 차이를 보일 수 있어 특히 이러한 혈청에 대해서는 교차 혈구응집억제법을 적용해야 하나 이에 대한 시도가 활발치 않음.

3. 인플루엔자 바이러스

가. 일본이나 미국 등 선진국의 경우 난황항체 검사를 통한 인플루엔자 감염 여부를 조사하고 있으나 국내에서는 활발하지 않은 실정임.

나. 인플루엔자 바이러스 감염 후 난백항체의 출현 유무에 대한 연구는 전무한 실정임.

4. 난백의 항바이러스 효능

가. 난백에는 sialoproteins (ovomucoid와 ovomucin)이 존재하는데 이 들은 sialic acid에 결합하는 뉴캐슬병바이러스의 HN과 인플루엔자 바이러스의 HA 등에 결합함으로써 혈구응집을 억제함. 따라서 이러한 단백질들은 항바이러스 효능을 가지고 있다는 것이 알려져 있음.

나. 주요 sialoproteins 중 ovomucoid는 계란 알레르기와 관련되어 있다 알려져 있으며, 열처리를 하는 경우 알레르기원으로서의 능력이 감소하는 것으로 알려져 있음.

4. 가금티푸스 관련

가. 가금티푸스는 오염된 분변을 먹는 경우 장관을 통해 감염되는 것으로 알려져 있으나 인공적으로 구강을 통해 감염시키는 경우 질병의 재현이 불규칙적인데 이는 근위의 위산에 의해 SG가 쉽게 불활화 되며 시험 중 시험계의 생리상태에 따라 위의 산도에 차이가 있기 때문임.

나. 가금티푸스 예방을 위한 생독백신과 사독백신 접종 시 항체가 형성되나 그 항체가 난백에도 존재하는 지에 대해서는 알려져 있지 않으며 난백 항체를 이용한 감별진단 사례는 없음.

5. 마이코플라스마 (MG와 MS) 감염증 관련

가. MG와 MS 감염에 의해 2주내지 3주 후에 혈청에 특이항체가 형성된다는 것이 알려져 있으며, 난황에서의 특이항체는 3내지 5일 후에나 검출되는 것으로 알려져 있음.

나. 자연감염이나 백신 접종에 의한 항체가 난백에 존재하는가에 대해서는 전혀 알려져 있지 않으며 따라서, 난황이나 혈청항체 대비 출현 시기에 대해서도 전혀 밝혀져 있지 않음.

6. 전염성 낭병 바이러스

가. 전염성 낭병 바이러스에 대한 혈청과 난황 내 중화항체 역가 수준에 대해서는 비교된 바 없음.

나. 난황항체 수준에 의한 후대 병아리와 모계의 백신 시기 예측을 위한 시도가 활발하지 않음.

7. 닭 면역글로부린 유전자의 진단 활용 연구

가. 닭 면역글로부린의 장쇄와 단쇄 유전자는 각각 1종류 밖에 없으며 장쇄의 경우 80-100개, 단쇄의 경우 25개의 pseudogene을 가지고 있음. 닭의 면역글로부린 유전자의 재배열 (장쇄: V-D-J; 단쇄: V-J)은 계태아 발생 10일-18일 사이에 일어나며, 부화 후 Fabricius낭과 그 외의 조직에서 재배열된 장쇄 및 단쇄 다양성 부분과 pseudogene의 다양성 부분과의 conversion이 활발히 일어나 다양한 B-세포 레퍼토리를 형성하는 것으로 알려져 있음. 닭의 경우 면역 글로부린의 다양성부분을 얻기 위해 한 쌍의 프라이머만 필요하므로 생쥐나 사람에서처럼 다양한 프라이머가 필요하지 않아 B-세포 면역글로부린 다양성 연구가 비교적 용이하다고 알려져 있음.

나. 항원자극이 있는 경우 특이적인 B-세포는 증식하여 germinal center를 형성하며, 세포수는 1,000배 증가하고, 항원에 의해 활성화된 경우 면역글로부린 mRNA가 자극을 받기 전보다 100배 이상 copy 수가 증가하는 것으로 알려져 있어 결과적으로 특이적인 유전자의 copy 수가 100,000배 이상 증가한다는 것이 알려져 있음. 그러나 면역장기에는 다양한 B-세포 레파토리가 존재하고 있어 항원자극 후 면역장기에서 유전자를 무작위로 클로닝 하였을 때 동일하거나 유사한 유전자 (주요 유전자, 항원 관련 면역글로부린 유전자)를 발견할 수 있는가에 대해서는 알려져 있지 않고, 면역장기에 분포하는 면역글로부린 유전자 간의 관련성이 알려져 있지 않음.

제 2절 연구개발 결과의 의미

1. 조류 인플루엔자 바이러스 감염 후 난황항체 및 혈청항체 비교 결과와 바이러스 감염에 의한 산란율 저하 결과: 혈청항체의 경우 난황항체에 비해 조기에 검출되었으며 이는 혈청의 양성진단 시기가 더 빠르다는 것을 의미하지만 난항체 검사의 용이성을 감안하여 두 가지 시료에 대한 항체조사를 병행하는 것이 조류 인플루엔자 진단 효율 개선에 도움이 될 것으로 사료됨. 실험적인 H9N2 바이러스의 감염으로 인한 산란율 저하가 확인되었으므로 산란계 농장의 피해 최소화를 위해 적절한 백신 대책이 강구되어야 할 것으로 사료됨.

2. 항원성 변이 뉴캐슬병바이러스 동정 및 교차-혈구응집억제법을 이용한 항원성 차이 규명: 현재 야외에서 유행하는 뉴캐슬병바이러스는 유전형 VII형의 바이러스로 선형항원에 돌연변이를 가지고 있으며 이러한 돌연변이는 백신주와 야외주의 항혈청으로 교차-혈구응집억제법을 수행하는 경우 그 차이를 뚜렷이 구분할 수 있음. 야외 농장으로부터 의뢰된 혈청들 중에는 라소타주와 야외주 간에 혈구응집억제 역가 2이상의 차이를 보이는 혈청과 함께 차이를 보이지 않는 혈청이 있는데 차이를 보이지 않는 혈청의 경우 야외주 감염이 의심되나 실험적인 데이터가 부족하여 최종 결론을 내릴 수 없으므로 이에 대한 추가연구가 필요함.

3. 난백의 항바이러스 효과와 바이러스에 따른 혈구응집억제능의 차이: 난백은 리소자임, 트랜스페린 등 기능성 단백질이 다량 함유되어 있음에도 부가가치가 낮은 상태임. 따라서 난백의 항바이러스 효과 홍보를 통해 부가가치를 높이고, 계란 전체의 소비를 증대시키는데 활용할 수 있음. 또한 난백의 바이러스에 따른 혈구응집억제능의 차이를 보이는 것은 sialic acid를 수용기로 하는 바이러스들의 진화과정을 이해하는데 중요한 실마리를 제공할 것으로 사료됨.

4. *S. gallinarum*의 호흡기 감염에 의한 가금티푸스 재현: 가금티푸스의 호흡기 전염은 알려져 있지 않으며 본 실험을 통해 세계 최초로 제시되었으며, 이외 다른 살모넬라에서도 호흡기 전파가 이루어진다면 이를 차단하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 관련 산업발전에 기여할 것으로 기대됨.

5. 가금티푸스 생독백신과 오일백신 접종 후 난백항체 무검출과 식란 난항체 조사 결과: 본 과제 수행 전 수립한 가설을 뒷받침하는 결과로서 점막을 통한 자연감염에 의해서만 난백항체가 생성된다는 가설이 사실이라면 백신면역과 자연감염을 감별할 수 있을 것으로 기대되나 이를 확증하기 위해서는 추가적인 연구가 필요함.

6. 난백에서의 MG 및 MS 항체 검출 후 혈청 항체 검출 결과: 난백과 난황항체 검사 시 난백에서 강력한 양성을 보인 후 11일 후 혈청시료에서 양성을 보인 것은 난백항체 검사법이 난황이나 혈청검사법보다 조기에 MG나 MS를 진단할 수 있다는 가설을 뒷받침 함. 따라서 보다 대규모의 실험을 통한 확인과정이 필요할 것으로 사료됨.

7. 혈청, 식란 및 종란 내 MG 및 MS 항체 조사 결과: 종계에서 생독백신을 하고 있는 MG의 경우 백신 항체가 합쳐진 결과로 보이나 MS의 경우 백신을 전혀하고 있지 않은 상황에서 높은 양성률을 보이고 있다는 사실은 MS에 의한 피해 사례 및 규모에 대한 추가적인 연구가 절실함을 의미함.

8. 혈청 및 난황 내 IBDV 중화항체 비교실험 결과: 종란 내 IBDV 중화항체 검사를 통해 모계 항체수준을 모니터링 할 수 있고, 부화 전 후대병아리의 항체수준을 알 수 있으므로 부화 후 백신 프로그램을 최적화 할 수 있어 맞춤형 양계시대를 열 수 있을 것으로 기대됨.

9. 면역글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자를 이용한 바이러스 감염 후 면역장기 내 B-세포 변화 연구 결과: 항원자극 후 면역장기에서 동일하거나 관련성이 높은 클론들이 발견된 사실은 본 과제에서 수행한 방법에 의해서도 주요 B-세포에서 유래하는 면역글로부린 단쇄 유전자를 골라낼 수 있음을 의미함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 실험방법 및 연구내용

1. 제 1세부과제: 난항체를 이용한 주요 가금질병 조기 및 감별진단법 개발

가. 조류 인플루엔자의 신속진단 및 차단방역 기반기술 연구

1) 약병원성 (H9N2) 바이러스의 병원성조사

○ 산란중인 SPF 닭 10마리에 개체당 10^7 EID_{50} 국내분리 약병원성 (H9N2) 조류독감바이러스 공격.

○ 공격후 4주간 채란하며 임상증상 관찰 및 대조군과 산란율 비교.

2) 바이러스 감염후 계란항체 및 혈청항체 조사

○ 채란한 계란으로부터 난황 및 난백항체 분리

- 계란의 난황과 난백을 분리한 후 각각에 동일 부피의 인산완충용액이나 식염수를 첨가하여 강하게 교반한 후 난백은 그대로 사용하고, 난황은 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 수확하여 4℃에서 보관하며 실험에 사용.
- 난백 및 난황항체의 경우 비특이 반응을 배제하기 위해 30-40% 황산암모늄염으로 면역 글로부린을 침전시키고, 투석하여 탈염한 후 실험에 사용함.

○ 혈구응집억제법을 이용한 계란항체 검사

- 국내 야외에서 분리된 SNU0051(H9N2) 조류독감바이러스를 계태아의 요막강 내로 접종하고, 요막강 액을 수확한 후 포르말린 0.5%를 첨가하여 실온에서 서서히 교반하며 15시간 동안 불활화시킴. 불활화 된 바이러스의 혈구응집역가 (hemagglutination titre)를 측정하여 8-혈구응집 단위 (hemagglutination unit: HAU)로 희석한 후 혈구응집 억제검사를 실시함.
- 혈구응집역가 측정은 96-웰 플레이트(96-well plate) 각각의 웰에 인산완충용액 50 $\mu\ell$ 씩을 분주하고, 첫번째 웰에 바이러스 50 $\mu\ell$를 첨가하여 혼합한 후 다시 50 $\mu\ell$를 채취하여 다음 웰에 첨가하여 섞어주는 과정을 반복하며

마지막 웰에서는 50 ㎕를 채취해 제거하는 방법으로 연쇄 희석(serial dilution)을 실시함.

- 바이러스가 2배 단위로 희석된 각 웰에 0.5% 닭 적혈구(v/v) 50 ㎕를 첨가하여 혼합한 후 4℃에서 30분 동안 반응시킨 후 완벽한 혈구응집이 일어난 웰의 희석배수(2n, n=희석배수)를 혈구응집 역가로 정함.
- 혈구응집 억제역가는 8-혈구응집단위의 바이러스 25 ㎕와 혈청, 난황 또는 난백 25 ㎕를 혼합하여 실온에서 30분 간 반응시킨 후 0.5% 닭 적혈구 50 ㎕를 첨가하여 4℃에서 30분 경과 후 혈구응집이 완전히 억제된 웰의 수를 혈구응집 억제 역가로 결정.

○ Immunoblotting을 이용한 계란항체 검사

- 요막강액에서 증균한 바이러스 재료를 고속원심분리 (10,000g, 30분) 하여 응괴를 제거하고, 초고속원심분리 (20,000g, 3시간)하여 바이러스를 침전시키며 인산완충용액으로 세척한 후 적당량의 인산완충용액에 부유함.
- Nitrocellulose막에 항원 1ul (50-100ng)를 점적한 후 건조시키고, 탈지분유(5%)-인산완충용액에 담가 비특이 반응을 차단하며, 1차항체와 실온에서 1시간 반응시켜 인산완충용액으로 3회 세척함.
- 2차항체 (HRP conjugated goat anti-chicken IgG or IgA)를 실온에서 1시간 처리하여 인산완충용액으로 3회 세척한 후 DAB 용액에서 발색하여 결과를 판독 함.

3) 국내 식란 및 종란내 조류 인플루엔자 항체조사

- 식란 및 종란으로부터 난황 및 난백항체 분리 후 혈구응집억제검사법 및 Immunoblotting 법으로 측정

4) 차단방역 프로토콜 확립

- 상기 실험의 결과에 따라 최적의 차단방역 프로토콜 확립

나. 뉴캐슬병의 감별진단 및 차단방역 기반기술 연구

1) 약독주 및 야외주오일백신 접종후 계란 및 혈청 항체조사

○ 오일백신 제조

- 바이러스 분리 (고속원심분리 10,000g, 1시간; 초원심분리 30,000g 3시간)
  약독주인 라소타주와 최근 야외분리주 불활화 (10^9TCID$_{50}$/ml)
  정제 콩기름 : 불활화 바이러스 = 최적의 비율 (water-in-oil)
- 16-18주 SPF 닭의 목피하에 수당 500ul 접종
- 접종후 초기 일주일은 일별로 계란항체를 다항원 혈구응집억제검사로 검사하고 4일과 7일에 채혈하여 혈청항체 검사. 이후에는 1주일 간격으로 계란항체의 동태 파악하며 4주마다 채혈하여 혈청검사
- 다항원 혈구응집억제검사 (뉴캐슬병관련 항체검사는 모두 실행)
  상기와 동일한 방법으로 실시하나 각 재료에 대해 백신주인 라소타주와 야외주로 각각 혈구응집억제검사를 실시하여 역가 비교
- Immunoblotting (비특이 반응에 대비하여 실시함)

2) 생독백신 접종후 계란 및 혈청 항체조사
- 16-18주령 SPF 닭에 구강으로 생독백신 라소타주 (10^8TCID$_{50}$/ml)를 수당 1ml 접종
- 접종후 초기 일주일은 일별로 계란항체를 다항원 혈구응집억제검사로 검사하고 4일과 7일에 채혈하여 혈청항체 검사. 이후에는 1주일 간격으로 계란항체의 동태 파악하며 4주마다 채혈하여 혈청검사
- 다항원 혈구응집억제검사 실시
- Immunoblotting (비특이 반응에 대비하여 실시함)

3) 약독주오일백신의 방어능력 평가 및 감염후 계란 및 혈청 항체조사
- 상기 약독주오일백신군에 최근 국내 야외주 공격 (구강경로, 10^6TCID$_{50}$/ml)
- 산란율 및 폐사율 조사
- 감염후 상기와 같이 채란 및 채혈하여 항체조사

4) 종란내 뉴캐슬병바이러스 항체조사 및 부화병아리의 야외주 감염에 대한 방어능력 조사
- 난황 및 난백항체의 수준에서 차이가 나는 종란을 3개군으로 분류함.
  1군: 높은 난황항체 (6이상 혈구응직억제 역가), 높은 난백항체 (8이상 역가)
  2군: 높은 난황항체 (6이상), 낮은 난백항체 (4미만)

3군: 낮은 난황항체 (3미만), 높은 난백항체 (8이상)

- 3개종란군에서 부화된 병아리를 3개 군으로 나누어 야외주 (구강경로, 10^4TCID_{50}/ml) 공격.
- 폐사율 측정.
- 생존한 병아리의 혈청을 2주간격으로 채취하여 다항원 혈구응집억제검사.

5) 보존방법에 따른 계란항체의 역가변화 조사

- 실온 및 저온 보존에 따른 역가변화 조사

6) 계란 및 혈청을 이용한 야외주-백신주 감별법 개발

- 상기 실험결과에 따라 감별을 위한 실험방법, 혈구응집항원 및 역가 결정.

7) 차단방역 프로토콜 확립

- 상기 실험의 결과에 따라 최적의 차단방역 프로토콜 확립.

다. 가금티푸스의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구

1) 야외주 감염후 계란 및 혈청항체 조사

○ 평판응집항원제조

- 국내 분리 가금티푸스균 (108 CFU/ml) 200ul를 BHI (Brain Heart infusion) 한천배지에 도말한 후 24시간 배양후 인산완충용액 (pH7.2) 10ml를 첨가하여 부유시켜 3,000g 15분간 원심분리 하여 상층을 버리고, 다시 10ml 인산완충용액에 부유 및 원심분리하여 세균을 수확함. 1% 포르말린으로 서서히 교반하며 18시간 동안 실온에서 불활화시킴. 원심분리 하여 세균을 수확한 후 Crystal violet을 포함하는 인산완충용액 1ml에 부유하여 사용.
- 산란중인 SPF 닭 10수에 최근 국내 분리 가금티푸스 구강 접종 (106TCID50/ml).
- 동일한 방법으로 혈청 및 계란항체를 준비하여 평판응집항원 10ul와 샘플 10ul를 유리 평판에서 섞어 응괴형성 유무를 1분 이내에 판독함.

○ 백신 (생독 및 사독) 접종후 계란 및 혈청 항체조사 및 야외주 감염 후 계란 및 혈청 항체 변화 조사

- SPF 닭 5마리를 한 그룹으로 세 그룹을 만들고, 생독백신(9R)과 사독백신을 각 그룹에 접종하여 상기의 방법으로 계란과 혈청을 수확하여 평판응집법으로 항체조사.

○ 계란항체역가 측정후 부화한 병아리의 야외주에 대한 방어능력 조사

- 종란의 항체검사 (평판응집법)를 통해 항체가 전혀 없거나 1분 이내에 큰 응괴를 형성하는 종란을 부화시켜 2일령 10마리를 한 그룹으로 두 그룹으로 만든 후 각 병아리에 100ul (106CFU/ml)씩 공격접종 하여 1주일간 관찰하여 폐사율을 측정하고, 생존한 개체는 부검하여 병변을 관찰하고 비장과 간장으로부터 세균분리 및 동정.
- 세균의 분리 및 동정: Mac Conkey 한천배지에 비장과 간장재료 도말하여 18시간 이상 37℃에서 배양하여 유당 비발효 집락을 취해 MIO 및 TSI 배지에 접종하여 생화학성상을 관찰하고 이후 당분해 검사 등 정밀 생화학검사를 실시하고, 신선하게 한천배지에서 배양한 세균을 10^{9}-10^{10}CFU/ml로 인산완충용액에 부유해 살모넬라 그룹혈청으로 평판응집검사를 실시해 혈청형을 결정하고 RNA polymerase beta subunit 유전자를 증폭하여 염기서열을 결정하고, 데이터베이스 (국내 주요 인체 및 동물 유래 혈청형 45종에 대한 염기서열)와 비교하여 동정함.

○ 계란 내 (식란 및 종란) 가금티푸스 항체조사

- 상기의 방법으로 난황 및 난백항체를 분리하여 평판응집법으로 검사.
- 종란의 경우 종계의 임상증상, 산란율, 부화율을 비교하고, 가능한 경우 후대병아리의 초기 폐사율, 증체율 및 생산성을 조사.

○ 야외주-백신주 항체 감별법 확립

- 상기의 결과에 따라 백신의 종류, 접종경로 및 횟수에 따른 난황, 난백 및 혈청 내 특이적인 항체의 변화를 종합하여 감별을 위한 프로토콜 개발.

○ 차단방역 프로토콜 확립

- 상기 실험의 결과에 따라 최적의 차단방역 프로토콜 확립.

라. 마이코플라스마 감염증의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구

1) MG 생독백신 접종 및 MS 야외주 감염후 계란 및 혈청 항체조사

○ MG 생독백신 접종후 계란 및 혈청항체 조사

- MG 생독백신 (Merial Co.)을 산란중인 SPF 닭 5마리에 접종하여 상기의 방법으로 계란항체와 혈청을 분리하여 평판응집검사를 실시함.
- 마이코플라스마 평판응집검사

  MG 평판응집검사용 항원 ([obilis MG angigen (Intervet Inc, Boxmeer, Holland)]을 사용하여 상기의 방법에 따라 검사 수행.

○ MS 야외주 감염후 계란 및 혈청항체 조사

- MS 야외주를 산란중인 SPF 닭 5마리에 접종하여 상기의 방법으로 계란항체와 혈청을 분리하여 평판응집검사를 실시함.
- 마이코플라스마 평판응집검사

  MS 평판응집검사용 항원 ([obilis MS angigen (Intervet Inc, Boxmeer, Holland)]을 사용하여 상기의 방법에 따라 검사 수행.

2) 계란내 (식란 및 종란) MG, MS 항체조사

- 동일한 방법으로 식란 및 종란으로부터 난황 및 난백항체를 분리하여 평판응집법에 의해 MG와 MS에 대한 항체를 조사.
- 종란의 경우 종계의 임상증상, 산란율, 부화율을 비교하고, 가능한 경우 후대 병아리의 초기 폐사율, 증체율 및 생산성을 조사.

마. 전염성낭병에 대한 모계 및 후대병아리 백신항체수준 모니터링 및 백신 프로토콜 연구

1) 종란내 항체조사 및 부화병아리의 야외주 감염에 대한 방어능력 비교

○ 바이러스중화시험법에 의한 항체검사

- 희석용 96-well microplate에 혈청을 2진 희석한 후 새로운 96-well microplate에 100ul씩 옮기고 동량의 바이러스 (200 $TCID_{50}$/25ul)를 첨가한 후 37℃에서 1시간 동안 중화.
- 계태아섬유아세포 (1.5 x 10^6 cells/ml)를 96-well microplate의 각 well에 세포 100ul씩 분주하고, 중화시킨 재료 25ul를 접종한 후 37℃ 배양기에서

4-5일간 배양하여 중화역가를 측정.

- 역가는 완전한 중화가 일어난 최고 희석배수의 역수로 함.

○ 계란 항체수준에 따른 야외주 감염에 대한 방어능력 비교

- 항체수준에 따라 10마리씩 고난황-고난백항체 그룹, 고난황-저난백항체 그룹 또는 저난황-저난백항체 그룹으로 나누어 부화한 병아리에 대해 국내분리 강병원성 전염성 낭병바이러스 (4-5주령 SPF 닭에 접종하여 폐사한 닭의 BF 70%유제액)를 점안 및 경구로 50ul 접종하여 1주간 폐사율 및 2주간 1주 간격으로 말초혈액 및 면역장기의 B세로 면역글로부린 단쇄 다양성 비교.

2) 모계 보강백신방법 및 후대병아리 백신방법 개발

- 측정된 종란의 난황 및 난백항체에 기초하여 최소 상기의 세 가지 항체역가를 갖는 모계군 10마리씩 세그룹을 두개 만들어 각각 사독오일백신과 생독백신을 접종하여 계란 내 항체의 변화를 1주일 간격으로 측정함.
- 최소 세 가지 항체역가를 갖는 후대병아리에 대해 생독백신을 접종하여 1주일씩 3주일에 걸쳐 혈청항체 측정함.
- 상기의 결과에 따라 최적의 모계보강백신 및 후대병아리 백신방법 확립.

2. 제 2세부과제: 면역 장기별 백신전후 면역글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자 염기서열 변화 연구】

가. 뉴캐슬병 생독백신 접종 및 무접종 닭 면역글로부린 유전자 다양성 변화 연구

- 2주령 SPF 닭 20수를 뉴캐슬병 생독백신 접종 및 무접종군 두개로 나누어 각각 접종 후 1주일과 4주일 후에 각 실험군에서 5수씩 희생하여 면역조직(하데리안 선, 맹장편도, F낭, 비장, 골수)을 채취하며 같은 군 재료는 조직별로 혼합하여 DNA 및 RNA추출-cDNA합성.
- 닭의 단쇄 다양성부분을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR.

- 다양한 제한효소를 이용한 RFLP 및 최적의 제한효소 선발.
- 면역조직 간 및 백신 전후 및 시기별 차이 비교.
- 주요 RFLP형에 대한 염기서열 결정 및 계통분석.

나. 전염성 낭병 생독백신 접종 및 무접종 닭 면역글로부린 유전자 다양성 변화 연구

- 2주령 SPF 닭 20수를 전염성 낭병 생독백신 접종 및 무접종군 두개로 나누어 각 각 접종 후 1주일과 4주일 후에 각 실험군에서 5수씩 희생하여 면역조직 (하데리안선, 맹장편도, F낭, 비장, 골수)을 채취하며 같은 군 재료는 조직별로 혼합하여 DNA 및 RNA추출-cDNA합성.
- 닭의 단쇄 다양성부분을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR.
- 다양한 제한효소를 이용한 RFLP 및 최적의 제한효소 선발.
- 면역조직 간 및 백신 전후 및 시기별 차이 비교.
- 주요 RFLP형에 대한 염기서열 결정 및 계통분석.

제 2 절 연구결과

1. 제1세부과제: 난항체를 이용한 주요 가금질병 조기 및 감별진단법 개발

가. 조류인플루엔자의 신속진단 및 차단방역 기반기술 연구

1) 약병원성 (H9N2) 바이러스의 병원성조사

SNU-AIV-1035C 공격전 대조군과 접종군은 80-85%의 산란율을 보였으나 공격 (202DO) 후 4-5DPI (day post inoculation) 부터 산란율이 서서히 감소하여 14-16DPI에 40%의 최저 산란율을 보였으며 이후 34DPI에 정상적인 산란율로 돌아옴 (그림 1).

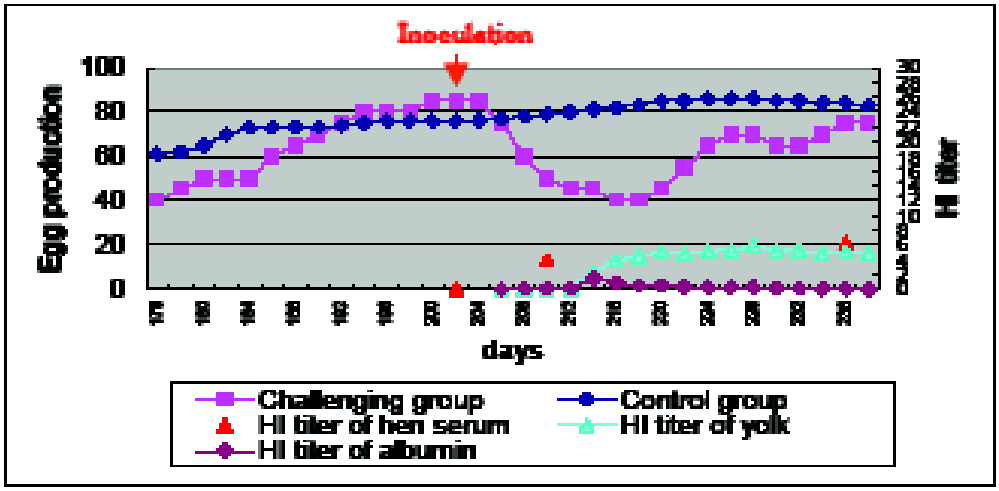


그림 1. 국내 조류 인플루엔자 바이러스 (SNU-AIV-1035C)의 병원성 및 감염후 혈청 및 난항체 추이 조사.

2) 바이러스 감염 후 계란항체 및 혈청항체 조사

SNU-AIV-1035C 공격후 혈청내 특이항체 수준은 접종 9일째에 HI 역가 4가 검출되었으며, 난황항체의 경우 그 보다 6일 뒤인 접종 15일째에 HI역가 4가 검출되었음. 난백항체의 경우 7일째에 HI 역가 2가 검출되었으나 이후 검출되지 않았음 (그림 1).

3) 국내 식란 및 종란 내 조류인플루엔자 항체조사

가) 계란을 이용한 국내 저병원성 (H9N2) 인플루엔자 감염상황 모니터링

(1) **총 59계군 590시료의 난황에 대해 HI 검사결과 13계군에서 양성 (22%)을 보여 여전히 높은 감염율을 보였으며, 야외계군에서의 높은 감염율은 변이주 및 유전자 재배열 주의 출현 위험성을 의미하므로 이에 대한 대책이 시급함.**

(2) 본 방법은 농장방문 및 계군과의 접촉 없이 안전하게 수행할 수 있으며, 농

장주인이나 인부 등 전문기술이 없이도 샘플링이 가능하여 산란계와 종계의 질병 및 백신항체 모니터링 방법으로 유용할 것으로 기대됨.

나) 난백을 이용한 인플루엔자 HI 검사법

(1) 난백에는 함량이 높은 순에 따라 오브알부민 (54%), 오보트랜스페린 (12%), 오보뮤코이드 (11%), 오보뮤신 (3.5%), 리소짐 (3.4%) 등이 존재하며, 이 중 오보뮤신은 분자량이 5.5-8.3 x 10^3 KDa에 이르는 거대 sialo-protein으로 바이러스의 Hemagglutinin의 수용체가 다량 존재하여 그 자체로도 바이러스 중화능이 있어 특이항체와의 구분이 어려움.

(2) 종란 및 식란으로부터 난백을 분리하여 HI를 실시한 결과 난황항체역가가 0인 상황에서 4-6정도의 HI 역가를 보였으며, 난황항체 역가가 중간정도이거나 비교적 높은 상황에서도 난황항체 역가와 유의적인 관련성을 보이지 않음. 그러나 시료 간 난백의 HI 역가 차이가 관찰되는데 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요함 (표 1).

표 1. 난황항체의 HI 역가수준과 난백 HI 역가와의 관련성.

시 료		시 료 번 호										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PS
1	난황	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	난백	6	5	5	4	5	5	4	5	6	6	
2	난황	5	4	5	**4**	4	4	4	**0**	4	5	2
	난백	6	6	6	**7**	6	6	6	**7**	6	6	
3	난황	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	난백	**1**	5	5	5	5	6	6	6	**2**	3	

다) 항바이러스 기능성을 갖는 난백의 활용

(1) 난백 단백질의 대부분을 차지하는 오브알부민의 바이러스 중화효과를 알아본 결과 완전하지는 않으나 어느 정도의 중화효과를 보였는데 이는 오브알부민의

만노스에 의한 것으로 판단됨 (그림 2).

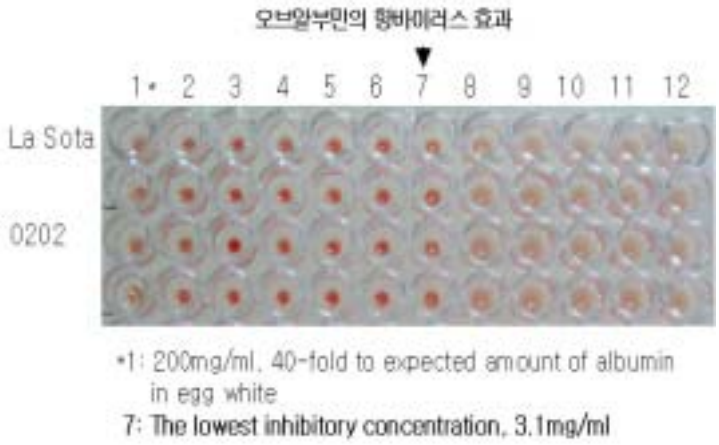


그림 2. 오브알부민의 항 바이러스 효과.

(2) 난황항체가 0인 SPF 및 상용계, 메추리, 청둥오리 난백을 이용하여 H9N2형의 조류인플루엔자바이러스와 뉴캐슬병 야외주 및 백신주 바이러스에 대한 방어효과를 HI로 측정한 결과 오브알부민보다 완전한 혈구응집을 보였으며 4-7정도의 비교적 높은 바이러스 억제능력을 보임 (그림 3A). SPF 종란 난백의 바이러스 중화능력을 야외 항원성 변이주인 SNU4152와 계태아 섬유아세포배양법으로 확인한 결과 뚜렷한 중화능을 보이지 않았으나 플라크감소법으로 확인한 결과 2배 이상의 플라크 감소능력을 보임 (그림 3B).

흥미로운 사실은 닭, 메추리, 청둥오리 **난백이 항바이러스 효과를 가지고 있으나 그 효과가 모든 바이러스에 동일하지 않다는 점**인데 뉴캐슬병의 백신주인 라소타주에 대해서는 6-7정도의 HI 역가를 보였지만 SNU-NDV-0202에 대해서는 그 보다 2-3계단 낮은 HI 역가를 보여 ND 야외주의 경우 오보뮤신의 자연면역 능력을 일정정도 회피할 수 있어 병원성이 증가하는 것으로 생각됨. 닭에서 비교적 병원성이 낮은 것으로 알려진 H9N2 조류인플루엔자 바이러스에 대해서는 5내지 8 정도의 비교적 높은 HI 역가를 보였으며, H1N1(PR8), H3N2

(A/HK/8/68) 및 H9N2 (SNU0028) 바이러스의 경우 난백에 의한 혈구응집억제 정도에 차이를 보임. 즉, SPF 난백은 H9N2에 대해 8이상의 완벽한 혈구응집억제역가를 보인반면 인체 인플루엔자 바이러스인 H1N1과 H3N2에 대해서는 3내지 5정도의 혈구응집억제 역가를 보임. 따라서 난백은 그 자체로 조류 뿐 아니라 인체 인플루엔자 바이러스에 대한 항 바이러스 효능을 가지고 있어 기능성 식품으로서 활용 가능함. H3N2 바이러스는 국내 H9N2 양성 혈청 (PS1, PS2)에 대해 반응성을 보였는데 이는 두 바이러스 간 항원의 유사성 때문이거나 H3N2 바이러스가 국내 계군에 감염되고 있다는 것을 의미하므로 이에 대한 연구가 시급할 것으로 사료됨. SPF 난백을 이용한 혈구응집억제검사법은 H9N2 바이러스와 인체 유래 인플루엔자 바이러스와 1차적으로 구분하는데 활용할 수 있을 것으로 기대되며, 뉴캐슬병바이러스의 경우도 백신주가 야외 병원성주에 비해 난백에 의해 혈구응집억제가 높게 나타나므로 백신주와 야외주 감별에 활용할 수 있을 것으로 사료됨.

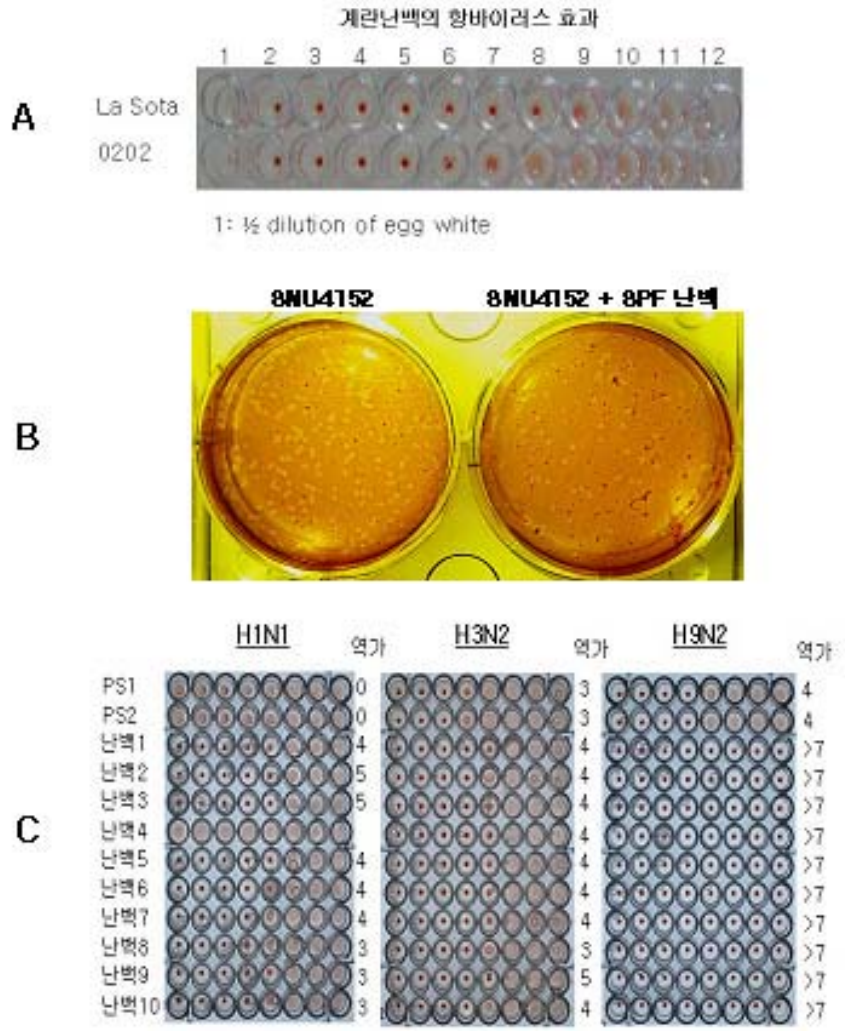


그림 3. 계란난백의 항바이러스 효과 및 바이러스에 따른 반응성의 차이.

(3) 열처리에 의한 조류 인플루엔자 바이러스 (H9N2) 중화효과의 안정성

국가마다 난백 액란에 대한 살균 조건에 차이가 있으나 **56℃와 65℃에서 충분한 시간 동안 처리한 결과 예상한대로 바이러스 중화효과 (HI 역가)의 급격한 감소는 관찰되지 않았으며, 조리과정 중에도 바이러스의 수용체인 sialic acid의 변성이 적을 것으로 예상되므로 알레르기를 초래하는 성분은 충분히**

불활화 하여 항바이러스 효과를 갖는 성분을 섭취할 수 있어 훌륭한 항바이러스 음식으로 계란을 홍보할 수 있을 것으로 기대되며, 사료 첨가제로 사용이 가능할 것으로 사료됨 (표 2).

표 2. 열처리에 의한 난백의 조류 인플루엔자 바이러스 (H9N2)에 대한 항바이러스 효과의 변화.

난백	무처리		56℃								65℃							
			10분		20분		30분		60분		10분		20분		30분		60분	
	1*	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
W1	5**	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	5	6	4	4	4	5	4
W2	6	4	5	5	5	-	5	-	6	5	6	7	6	6	8	7	8	8
W3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	8	5	8	6	5	4	4	4
W4	5	5	6	5	5	4	6	6	6	5	4	4	6	4	5	5	5	3

*: 반복수

**: HI 역가

라) Immunoblotting 법에 의한 계란항체 조사

(1) 10일령 SPF 계태아에 바이러스를 접종하여 14일령에 수확한 바이러스를 사용하여 난황과 난백재료를 일차항체로 하여 immunoblotting을 수행한 결과 난황이나 난백을 처리하지 않고 2차항체 (a-IgG 및 a-IgA) 만을 처리한 재료에서도 발색이 일어나 요막액 중에 항체가 존재한다는 사실이 밝혀졌으며 이러한 문제를 해결하기 위해 바이러스를 정제하는 작업을 진행하였으나 정제 바이러스에서도 항체가 검출되어 더 이상 진행하지 않음.

나. 뉴캐슬병의 감별진단 및 차단방역 기반기술 연구

1) 종란 내 뉴캐슬병바이러스 항체조사 및 부화병아리의 야외주 감염에 대한 방어능력 조사

가) 종란 및 식란 내 뉴캐슬병바이러스 항체조사: 46개 농장 60계군 유래 600시료의 종란 및 식란에 대해 계란항체를 cross-HI로 수행한 결과 12농장 13계군에서 0202에 대한 항체가 검출되었으며 모든 경우 라소타 대비 낮은 항체역가를 보여주었고, 일부 0202 항체 양성계군에서 역가가 0인 것과 7인 것이 섞여 있어 계군 내 전파가 서서히 일어나고 있는 것으로 예상되었으며 한 농장에 두개의 계사가 있는 경우 한 곳만 항체가 검출되어 계사 간 전파도 상당한 시간이 걸리는 것으로 판단되었음 (표 3).

표 3. Cross-HI를 이용한 계란항체 검사.

시 료		시 료 번 호										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PS
1	LaS	6	8	6	6	6	6	5	6	5	7	5
	0202	4	**0**	5	**0**	**7**	4	**0**	**0**	**0**	5	0
2	LaS	6	6	7	6	6	8	7	8	7	7	5
	0202	2	3	**5**	**1**	3	**5**	2	4	5	3	0
3	LaS	7	7	6	9	7	8	7	8	6	11	3
	0202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

나) 야외주 감염에 대한 방어능력 조사: 라소타 주에 대한 난황항체 역가가 6이상이고 난백 역가가 7내지 8정도인 종란 (1군)을 부화하여 공격군과 대조군에 15수씩 할당하여 2일령에 SNU-NDV-0202 (VII 형 HN 항원 변이주)를 공격 접종한 결과 53% (8/16)의 폐사가 관찰되었으며, 생존한 개체들의 혈청항체를 조사한 결과 2주부터 공격바이러스에 특이적인 항체가 검출되었으며 이 후 일부 병아리에서 torticolis를 보이는 개체가 관찰되어 야외 상황과 일치하는 결과를 얻을 수

있었음.

2) 보존방법에 따른 계란항체의 역가변화 조사

가) 저온 보존한 계란항체의 역가변화 조사: 난황과 난백을 분리하여 항체를 분리한 후 4℃에서 보존하며 1주일 간격으로 4주간 라소타 주에 대한 HI 역가의 변화를 측정한 결과 난황과 난백 모두 역가의 차이가 없었음 (결과 생략).

나) 실온 보존한 계란항체의 역가변화 조사: 난황과 난백을 분리하여 항체를 분리한 후 실온에서 보존하며 1주일 간격으로 4주간 라소타 주에 대한 HI 역가의 변화를 측정한 결과 난황과 난백 모두 2주부터 역가의 감소가 뚜렷하여 4주째에는 3계단 이상의 역가 차이를 보임 (결과 생략).

3) 계란 및 혈청을 이용한 야외주-백신주 감별법 개발

가) 라소타 주와 최근 야외 분리주인 SNU-NDV-0202와 SNU-NDV-4152의 난백에 의한 혈구응집억제 정도의 차이를 보였으며 이는 HN (Hemagglutinin-Neuraminidase)의 수용기 친화도 면에서 백신주와 야외주간의 차이가 있음을 의미하는 결과임 (그림 4).

나) 종란 및 일반식란의 난황항체를 이용하여 cross-HI를 수행한 결과 라소타 주에 대해서는 높은 HI 역가를 보였으나 SNU-NDV-0202에 대해서는 거의 0에 가까운 HI 역가를 보임. 그러나 이러한 결과는 예상보다 큰 차이로서 그 원인 규명을 위해 분석 중 임.

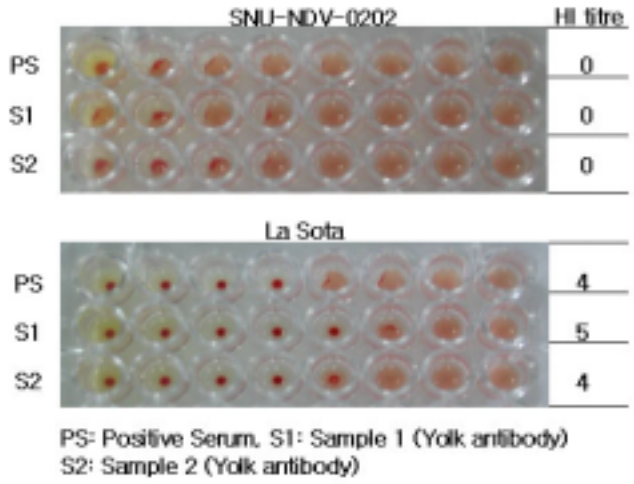


그림 4. Cross-HI를 이용한 백신주와 야외주 항원성 차이 규명.

다) 난황항체 중 중간 및 높은 HI 역가를 보이는 재료에 대해 cross-HI를 실시한 결과 두 가지 모두에서 SNU-NDV-0202에 대해서는 HI 역가 0을 보였으며 이는 Clone 30주로 제조한 상용오일백신에 의한 항체인 것으로 생각되었으며 야외주 감염에 의한 항체역가는 아닌 것으로 판단되었음.

표 4. 계란항체의 Cross HI를 이용한 백신 항체 및 감염항체 구분.

농장 1	난황 항체										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PS
라소타	5	8	10	6	8	8	8	9	6	8	5
0202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
농장 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
라소타	10	10	10	11	11	12	9	11	11	0	5
0202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

라) 이러한 결과가 난황항체에서만 관찰되는 특수한 경우인지를 확인하기 위해 서울대학교 조류질병학교실에 병성감정 의뢰된 야외 혈청재료 중에서 라소타 주에 대한 HI 역가가 중간인 재료 (HI 역가 5-6)와 높은 재료 (10이상)로 cross-HI를 수행한 결과 중간역가인 경우 모두 SNU-NDV-0202에 대해서는 HI 역가 0을 보였으나 높은 재료에서는 0에서 7까지의 역가를 보여 야외주 감염이 계군 내에서 서서히 진행되고 있는 것으로 생각되었으며 이로 인해 라소타에 대한 HI 역가 상승 (10 이상)도 일어난 것으로 판단됨 (표 5).

표 5. 혈청의 cross-HI를 이용한 백신 항체 및 감염항체 구분.

농장 1	혈 청										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PS
라소타	5	5	4	5	5	5	6	5	6	6	4
0202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
농장 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
라소타	11	>12	11	10	10	>12	11	11	11	11	5
0202	3	4	5	4	6	3	5	3	7	**0**	0

마) 이러한 변이주의 출현은 국내에서 만연했던 유전형 VI형 바이러스의 경우와 유사하나 cross-HI 결과 면에서 기존 VI형 항원성 변이주 (선형항원 변이주)가 라소타주 대비 고 혈청역가 재료에서만 2-3계단의 역가 차이를 보인 것에 비하면 대단한 차이이며, 1995년 최초로 분리되어 현재까지 전국적인 ND 발생의 원인인 VII 형 계통의 바이러스에서 이와 같은 항원성의 차이는 관찰된 바 없었음. 상황의 시급성으로 인해 최근 분리된 야외 NDV 중 SNU-NDV-0202와 SNU-NDV-4152의 F 및 HN 유전자의 전체 염기서열을 결정하였으며, 아미노산으로 번역하여 그 서열을 백신주와 비교하였음. 그 결과 HN의 주요 선형항원 (345번 -352번 아미노산)이 SNU-NDV-4152에서 변이가 일어난 사실 (E347K)이

밝혀졌으며, 인접한 354번 아미노산이 메티오닌 (M)에서 리신 (K)으로 치환되어 있었음 (그림 5, 6). SNU-NDV-0202의 HN 선형항원은 보존되어 있었으나 단백질의 구조에 영향을 줄 수 있는 아미노산의 변화가 확인되었으며, 야외주들의 F는 라소타 주와 뚜렷한 차이를 보였음 (그림 7, 표). 두 야외주 간에는 시스틴의 위치와 N-linked glycosylation 위치가 보존되어 있었음. SNU-NDV-0202에 비해 SNU-NDV-4152에서 항원변이가 크게 나타난 것으로 미루어보아 교차-혈액응집억제법에서 관찰된 결과가 일치하지 않아 이에 대한 확인작업을 진행 중 임.

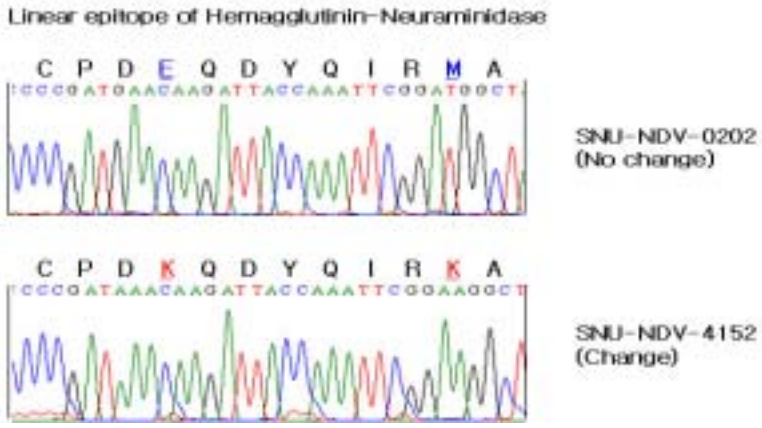


그림 5. 최근 야외 NDV HN 선형항원 (347번 및 354번 아미노산)의 변화: 선형항원 변이주 출현.

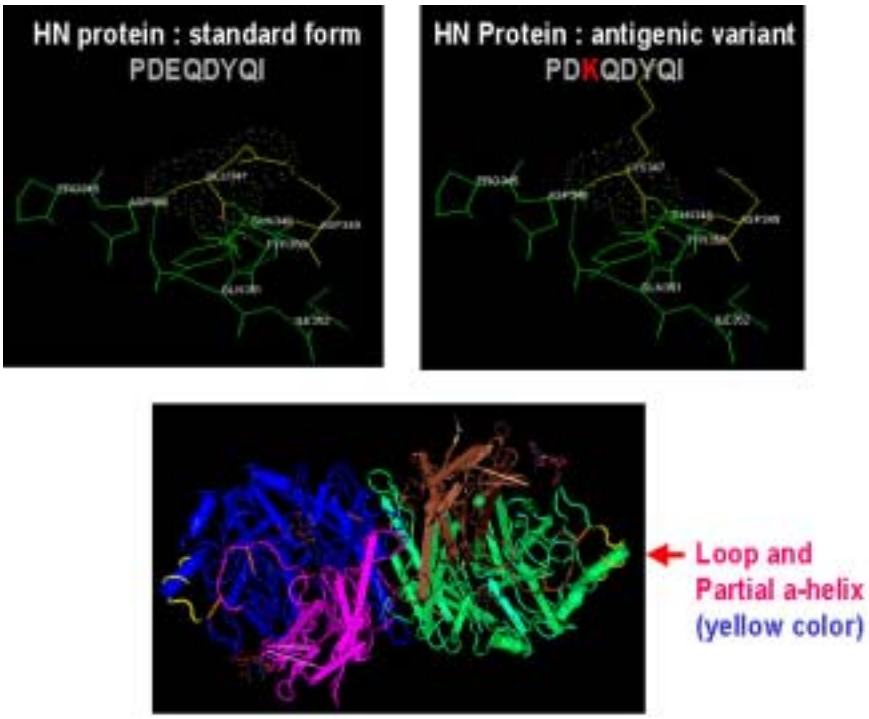


그림 6. 선형항원 변이에 따른 항원구조의 변화.

HN 아미노산 서열 비교

	1	Leucine zipper	60
SNU0202	MDRAVNRVVLENEEREAKNTWRLVFRIAVLLLMVMTLAISAAALAYSTGASTPHDLAGIS		
SNU4152	MDRAVNRVVLENEEREAKNTWRLVFRIAVLLLMVMTLAISSAALAYSTGASTPHDLASIL		
La Sota	MDRAVSQVALENDEREAKNTWRLIFRIAILFLTVVTLAISVASLLYSMGASTPSDLVGIP		
JS/3/98/GO	MDRAVNRVVLENEEREAKNTWRLVFRIAVLLLMVMTLAISAAALAYSTGASTPHDLAGIS		
Taiwan95	MDRAVNRVVLENEEREAKNTWRLIFRIAVLILMVMTLAISAAALAYSMGASTPRDLAGIS		
YN-PA01	MDRAVNRVVLENEEREAKNTWRLVFRIAVLLLMVMTLAISAAALAYSAGASTPHDLAGIS		
ZJ/1/00/GO	MDRAVNRVVLENEEREAKNTWRLVFRIAVLLLMVMTLAISSAALAYSTGASTPHDLAGIS		

```
            61                                                      G1 120
SNU0202     TVISKTEDKVTSLLSSSQDVMDRIYKQVALESPLALLNTESVIMNAITSLSYQINGAANN
SNU4152     TVISKTEDKVTSLLSSSQDVIDRIYKQVALESPLALLNTESVIMNAITSLSYQINGAANN
La Sota     TRISRAEEKITSTLGSNQDVVDRIYKQVALESPLALLNTETTIMNAITSLSYQINGAANN
JS/3/98/GO  TVISKTEDKVTSLLSSSQDVIDRIYKQVALESPLALLNTESIIMNAITSLSYQINGAANN
Taiwan95    TVISKTEDKVTSLLSLSQDVIDRIYKQVALESPLALLNTESIIMNAITSLSYQINGAANN
YN-PA01     TVISKTEDKVTSLLSSSQEVIDRIYKQVALESPLALLNTESIVMNAITSLSYQINGAANN
ZJ/1/00/GO  TVISKTEDKVTSLLSSSQDVIDRIYKQVALESPLALLNTESIIMNAITSLSYQINGAANN

          121 C1                                                C2      180
SNU0202     SGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDISDVTSFYPSAYQEHLNFIPAPTTGSGCTRIPSFDM
SNU4152     SGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDISDVTSFYPSAYQEHLNFIPAPTTGSGCTRIPSFDM
La Sota     SGWGAPIHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLNFIPAPTTGSGCTRIPSFDM
JS/3/98/GO  SGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDISDVTSFYPSAYQEHLNFIPAPTTGSGCTRIPSFDM
Taiwan95    SGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDTSDVTSFYPSAYQEHLNFIPAPTTESGCTRIPSFDM
YN-PA01     SGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDISDVTSFYPSAYQEHLNFIPAPTTGSGCTRIPSFDM
ZJ/1/00/GO  SRCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDISDVTSFYPSAYQEHLNFIPAPTTGSGCTRIPSFDM

          181    C3         C4                                      C5 240
SNU0202     STTHYCYTHNVILSGCRDHSHSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDTQNRKSCSV
SNU4152     STTHYCYTHNVILSGCRDHSHSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDTQNRKSCSV
La Sota     SATHYCYTHNVILSGCRDHSHSYQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDTQNRKSCSV
JS/3/98/GO  STTHYCYTHNVILSGCRDHSHSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDTQNRKSCSV
Taiwan95    STTHYCYTHNVILSGCRDHSHSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDTQNRKSCSV
YN-PA01     STTHYCYTHNVILSGCRDHSHSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSV
ZJ/1/00/GO  STTHYCYTHNVILSGCRDHSHSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDTQNRKSCSV
```

```
          241      C6 C7                                                  300
SNU0202     SATPLGCDMLCSKVTGTEEEDYKSVAPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTTVLFKDWVANYP
SNU4152     SATPLGCDMLCSKVTGTEEEDYKSVAPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTTVLFKDWVANYP
La Sota     SATPLGCDMLCSKVTETEEEDYNSAVPTRMVHGRLGFDGQYHEKDLDVTTLFGDWVANYP
JS/3/98/GO  SATPLGCDMLCSKVTGTEEEDYKSVAPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTTVLFKDWVANYP
Taiwan95    SATPLGCDMLCSKVTETEEEDYKSVTPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTTVLFKDWVANYP
YN-PA01     SATPLGCDMLCSKVTETEEEDYKSVAPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTMVLFKDWVANYP
ZJ/1/00/GO  SATPLGCDMLCSKVTETEEEDYKSVAPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTTVLFKDWVANYP

          301                                          G2 C8              360
SNU0202     GAGGGSFIDDRVWFPVYGGLKPNSPSDTAQEGKYVIYKRHNNTCPDEQDYQIRMAKSSYK
SNU4152     GAGGGSFIDDRVWFPVYGGLKPDSPSDTAQEGKYVIYKRHNNTCPDKQDYQIRKAKSSYK
La Sota     GVGGGSFIDSRVWFSVYGGLKPNSPSDTVQEGKYVIYKRYNDTCPDEQDYQIRMAKSSYK
JS/3/98/GO  GAGGGSFIDDRVWFPVYGGLKPNSPSDTAQEGKYVIYKRHNNTCPDEQDYQIRMAKSSYK
Taiwan95    GVGGGSFIDDRVWFPVYGGLKPNSPSDTAQEGKYVIYKRYNNTCPDEQDYQIRMAKSSYN
YN-PA01     GAGGGSFIDDRVWFPVYGGLKPNSPSDTVQEGKYVIYKRHNNTCPDEQDYQIRMAKSSYK
ZJ/1/00/GO  GAGGGSFIDDRVWFPVYGGLKPNSPSDTAQEGKYVIYKRHNNTCPDEQDYQIRMAKSSYK

          361                                                            420
SNU0202     PGRFGGKRVQQAILSIKVSTSLGKDPVLTIPPNTITLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSY
SNU4152     PGRFGGKRVQQAILSIKVSTSLGKDPVLTIPPNTITLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSY
La Sota     PGRFGGKRIQQAILSIKVSTSLGEDPVLTVPPNTVTLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSY
JS/3/98/GO  PGRFGGKRVQQAILSIKVSTSLGKDPVLTIPPNTITLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSY
Taiwan95    PGRFGRKRVQQAILSIKVSTSLGTDPVLTIPPNTITLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSY
YN-PA01     PGRFGGKRVQQAILSIKVSTSLGKDPVLTIPPNTITLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSY
ZJ/1/00/GO  PGRFGGKRVQQAILSIKVSTSLGKDPVLTIPPNTITLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSY
```

```
            421            G3                      C9     C10 C11            480
SNU0202     FSPALLYPMTVNNKTATLHSPYTFNAFTRPGSVPCQASTRCPNSCITGVYTDPYPLIFHR
SNU4152     FSPALLYPMTVNNKTATLHSPYTFNAFTRPGSVPCQASARCPNSCITGVYTDPYPLIFHR
La Sota     FSPALLYPMTVSNKTATLHSPYTFNAFTRPGSIPCQASARCPNSCVTGVYTDPYPLIFYR
JS/3/98/GO  FSPALLYPMTVNNKTATLHSPYTFNAFTRPGSVPCQASARCPNSCITGVYTDPYPLIFHR
Taiwan95    FSPALLYPMTVYNKTATLHNPYTFNAFTRPGSVPCQASARCPNSCITGVYTDPYPLIFHR
YN-PA01     FSPALLYPMTVNNKTATLHSPYTFNAFTRPGSVPCQASARCPNSCITGFYTDPYPLIFHR
ZJ/1/00/GO  FSPALLYPMTVNNKTATLHSPYTFNAFTRPGSVPCQASARCPNSCITGVYTDPYPLIFHR


            481 G4                      G5                      C12    G6 540
SNU0202      NHTPRGVFGTMLDDEQARLNPVSAVFDNISRSRVTRVSSSSTKAAYTTSTCFKVVKTNKA
SNU4152      NHTLRGVFGTMLDDEQARLNPVSAVFDNVSRSRVTRVSSSSTKAAYTTSTCFKVVKTNKT
La Sota      NHTLRGVFGTMLDGVQARLNPASAVFDSTSRSRITRVSSSSTKAAYTTSTCFKVVKTNKT
JS/3/98/GO   NHTLRGVFGTMLDDEQARLNPVSAIFDNISRSRVTRVSSSSTKAAYTTSTCFKVVKTNKA
Taiwan95     NHTLRGVFGTMLDDEQARLNPVSAVFDNISRSRVTRVSSSSTKAAYTTSTCFKVVKTNKV
YN-PA01      IIILRGVFGTMLDDEHARLTLVSAVFDNISRSRVTRVSSSSTKAAYTTSTCFKVVKTNKA
ZJ/1/00/GO   NHTLRGVFGTMLDDEQARLNPVSAVFDNISRSRVTRVSSSSTKAAYTTSTCFKVVKTNKT

           541 C13
SNU0202      YCLSIAEISNTLFGEFRIVPLLVEN
SNU4152      YCLSIAEISNTLFGEFRIVPLLVE
La Sota      YCLSIAEISNTLFGEFRIVPLLVEILKDDGVREARSG
JS/3/98/GO   YCLSIAEISNTLFGEFRIVPLLVEILKDDRD
Taiwan95     YCLSIAEISNTLFGEFRIVPLLVEILRDNRD
YN-PA01      YCLSIAEISNTLFGEFRIVPLLVEILKDDRVKEARLD
ZJ/1/00/GO   YCLSIAEISNTLFGEFRIVPLLVEILKDDRV
```

그림 7. 국내 야외주와 백신주 및 외국 야외주의 HN 아미노산 서열 비교.

Fusion protein (F)

```
            1                          C1 C2                                  60
SNU0202     MGSKPSTRIPAPLMLITRITLILSCIRPTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNVYTSSQAGS
SNU4152     MGSKLSTRIPAPLMLTTRITLILSCIRPTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNVYTSSQTGS
La Sota     MGSRPSTKNPAPMMLTIRVALVLSCICPANSIDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGS
AY337464    MGSKPSTRIPAPLMLITRIMLILGCIRPTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNVYTSSQTGS
GPMY/QY97/1 MGSKPSTRIPAPLMLITRIMLILSCIRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNVYTSSQTGS
Taiwan95    MGSEPSTRVPVPLMLITRIMLILNCICLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGS
YN-PA01     MGPRSSTRIPAPLMLITRIMLILGCIRPTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNVYTSSQTGS

            61              C3         G1                                 120
SNU0202      IIVKLLPNMPRDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGSVSTSGGRRQKRFIGA
SNU4152      IIVKLLPNMPRDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGSVSTSGGRRQKRFIGA
La Sota      IIVKLLPNLPKDKEACAKAPLDAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGGRQGRLIGA
AY337464     IIVKLLPNMPRDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGSVSTSGGRRQKRFIGA
GPMY/QY97/1  IIVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGSVSTSGGRRQKRFIGA
Taiwan95     IIVKLLPNMPKDKEACAKTPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGSVSTSGGRRQKRFIGA
YN-PA01      IIVKLLPNMPRDKEACANAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGSVSTSGGRRQKRFIGA

           121 Fusion-inducing domain                                     180
SNU0202      VIGSVALGVATAAQITAAAALIQANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLSVAVG
SNU4152      VIGSVALGVATAAQITAAAALIQANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLSVAVG
La Sota      IIGGVALGVATAAQITAAAALIQAKQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVG
AY337464     VIGSVALGVATAAQITAAAALIQANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLSVAVG
GPMY/QY97/1  VIGSVALGVATAAQITAAAALIQANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSRLSVAVG
Taiwan95     VIGSVALGVATAAQITAAAALIQANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLSVAVG
YN-PA01      VIGSVALGVATAAQITAAAALIQANQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLSVAVG
```

```
          181          G2      C4                                          240
SNU0202      KMQQFVNDQFNNTARELDCIKITQQVGVELNLYLTELTTVFGPQITSPALTQLTIQALYN
SNU4152      KMQQFVNDQFNNTARELDCIKITQQVGVELNLYLTELTTVFGPQITSPALTQLTIQALYN
La Sota      KMQQFVNDQFNKTAQELDCIKIAQQVGVELNLYLTELTTVFGPQITSPALNKLTIQALYN
AY337464     KMQQFVNDQFNNTARELDCIKITQQVGVELNLYLTELTTVFGPQITSPALTQLTIQALYN
GPMY/QY97/1  KMQQFVNDQFNNTARELDCIKITQQVGVELNLYLTELTTVFGPQITSPALTQLTIQALYN
Taiwan95     KMQQFVNDQFNNTARELDCIKITQQVGVELNLYLTELTTVFGPQITSPALTQLTIQALYN
YN-PA01      KMQQFVNDQFNNTARELDCIKITQQVGVELNLYLTELTTVFGPQINSPALTQLTIQALYN

             241                                                      300
SNU0202      LAGGNMDYLLTKLGIGNNQLSSLIGSGLITGYPILYDSQTQLLGIQVNLPSVGNLNNMRA
SNU4152      LAGGNMNYLLTKLGIGNNQLSSLIGSGLITGYPILYDSQTQLLGIQVNLPSVGNLNNMRA
La Sota      LAGGNMDYLLTKLGVGNNQLSSLIGSGLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMRA
AY337464     LAGGNMDYLLTKLGIGNNQLSSLIGSGLITGYPILYDSQTQLLGIQVNLPSVGNLNNMRA
GPMY/QY97/1  LAGGNMDYLLTKLGIGNNQLSSLIGSGLITGYPILYDSQTQLLGIQVNLPSVGNLNNMRA
Taiwan95     LAGGNMDYLLTKLGVGNNQLSSLIGSGLITGYPILYDSQTQLLGIQVNLPSVGHLNNMRA
YN-PA01      LAGGNMDYLLTKLGIGNNQLSSLIGSGLITGYPILYDSQTQLLGIQVNLPSVGNLNNMRA

             301                                    C5       C6          360
SNU0202      TYLETLSVSTTKGYASALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIESDLDLYCTRIVTFPMSPGIY
SNU4152      TYLETLSVSTTKGYASALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIESDLDLYCTRIVTFPMSPGIY
La Sota      TYLETLSVSTTRGFASALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIY
AY337464     TYLETLSVSTTKGYASALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIESDLDLYCTRIVTFPMSPGIY
GPMY/QY97/1  TYLETLSVSTTKGYASALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIESDLDLYCTRIVTFPMSPGIY
Taiwan95     TYLETLSVSTTKGFASALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIESDLDLYCTRIVTFPMSPGIY
YN-PA01      TYLETLSVSTTKGYASALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIESDLDLYCTRIVTFPMSPGIY
```

```
          361 C7   G3 C8                          C9 C10 C11                 420
SNU0202      SCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMALKGSVIANCKITTCRCTDPPGIISQNYGEAVSLID
SNU4152      SCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMALKGSVIANCKITTCRCTDPPGIISQNYGEAVSLID
La Sota      SCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMTIKGSVIANCKMTTCRCVNPPGIISQNYGEAVSLID
AY337464     SCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMALKGSVIANCRITTCRCTDPPGIISQNYGEAVSLID
GPMY/QY97/1  SCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMALKGSVIANCRITTCRCADPPGIISQNYGEAVSLID
Taiwan95     SCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMALKGSVIANCKITTCRCADPPGIISQNYGEAISLID
YN-PA01      SCVSGNTSACMYSKTEGALTTPYMALKGSVIANCKITTCRCTDPPGIISQNYGEAVSLID

                         421    C12                                    G4
  G5       480]
SNU0202      RHSCNVLSLDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDR
SNU4152      RHSCNVLSLDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDS
La Sota      KQSCNVLSLGGITLRLSGEFDVTYQKNISIQDSQVIITGNLDISTELGNVNNSISNALNK
AY337464     RHSCNVLSLDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDR
GPMY/QY97/1  RHSCNVLSLDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDR
Taiwan95     RHSCNVLSLDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNTLDK
YN-PA01      RHSCNVLSLDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDK

          481     Leucine-zipper                      C13                540
SNU0202      LAESNSKLEKVNVRLTSTSALITYIVLTVISLVFGAFSLGLACYLMYKQKAQQKTLLWLG
SNU4152      LAESNSKLEKINVRLTSTSALITYIVLTVISLVFGAFSLGLACYLMYKQKAQQKTLLWLG
La Sota      LEESNRKLDKVNVKLTSTSALITYIVLTIISLVFGILSLILACYLMYKQKAQQKTLLWLG
AY337464     LAESNSKLEKVNVRLTSTSALITYIVLTVISLVFGALSLGLACYLMYKQKAQQKTLLWLG
GPMY/QY97/1  LAESNSKLDKVNVRLTSTSALITYIVLTVISLVFGALSLVLACYLMYKQKAQQKTLLWLG
Taiwan95     LAESNSKLDKVNVRLTSTSALITYIVLTVISLVFGALSLVLACYLMYKQKAQQKTLLWLG
YN-PA01      LAESNSKLEKVNVRLTSTSALITYIVLTVISLVFGALSLGLACYLMYKQKAQQKTLLWLG
```

```
                    541 G6          553
SNU0202             NNTLDQMRATTRA
SNU4152             NNTLDQMRATTRA
La Sota             NNTLDQMRATTKM
AY337464/CHINA/GO   NNTLDQMRATTRA
GPMY/QY97/1         NNTLDQMRATTRA
Taiwan95            NNTLDQMRATTRA
YN-PA01             NNTLDQMRATTRA
```

그림 8. 국내 야외주와 백신주 및 외국 야외주의 F 아미노산 서열 비교.

표 6. HN 및 F 단백질의 시스틴 및 N-linked glycosylation 위치의 변화.

	HN			F
	C1 (123)	G5 (508)	G6 (538)	C2 (27)
La Sota	- (W)	-	+	+
SNU-NDV-4152	+	+	+	-(R)
SNU-NDV-0202	+	+	-	-(R)

표 7. HN의 구조 및 극성에 영향을 줄 수 있는 아미노산의 변화.

	아미노산 번호												
	60	256	269	293	310	323	340	384	432	479	484	494	495
LaS	P	E	R	G	S	N	Y	E	S	Y	L	G	E
4152	L	G	S	K	D	D	H	K	N	H	L	D	E
0202	S	G	S	K	D	N	H	K	N	H	P	D	V

표 8. F의 구조 및 극성에 영향을 줄 수 있는 아미노산의 변화.

	아미노산 번호														
	30	104	117	231	247	272	288	403	422	430	451	479	480	482	486
LaS	N	E	L	N	D	N	T	N	Q	G	Q	N	K	E	R
4152	S	G	F	T	N	Y	N	D	H	D	L	D	S	A	S
0202	S	G	F	T	N	Y	N	D	H	D	L	D	R	A	S

4) 생독백신 접종 후 항원성 변이주 (SNU-NDV-0202) 공격실험

가) 43일령 SPF 닭을 접종군 (4수)과 대조군 (6수)으로 나누어 접종군은 라소타 주를 점안과 구강으로 개체 당 10,240 HAU을 접종하였으며 백신 접종 24일 후에 SNU-NDV-0202 2,048 HAU을 눈, 비공, 구강으로 공격하였으며 5일 후에 각 군의 1수를 희생시켜 병변을 관찰하였고, 일부 시험계로부터 혈청을 채취해 cross-HI를 수행한 결과 접종군에서 폐사 및 증상을 보이는 개체는 없었으나 사료 섭취가 크게 줄었으며 부검결과 선위의 출혈이 심하였고, F낭, 맹장편도, 췌장, 신장에서 충혈 및 출혈이 관찰되었으며 라소타 주에 대한 HI 항체는 검출되었으나 0202에 대한 항체는 검출되지 않았음 (그림 9).

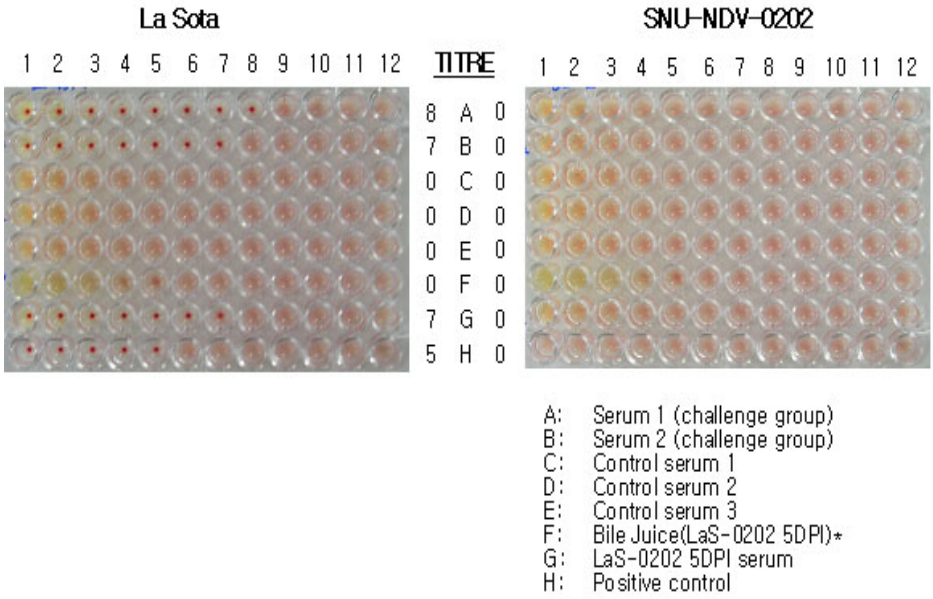


그림 9. 생독백신 접종계에서 공격접종 5일후 cross-HI에 의한 야외주 특이 항체 검출 실험.

나) 야외주 공격 후 14일에 대조군과 공격군으로부터 채혈하여 cross-HI를 수행한 결과 라소타 주에 대한 항체 뿐 아니라 공격주 (0202)에 대한 항체도 검출됨 (그림 10).

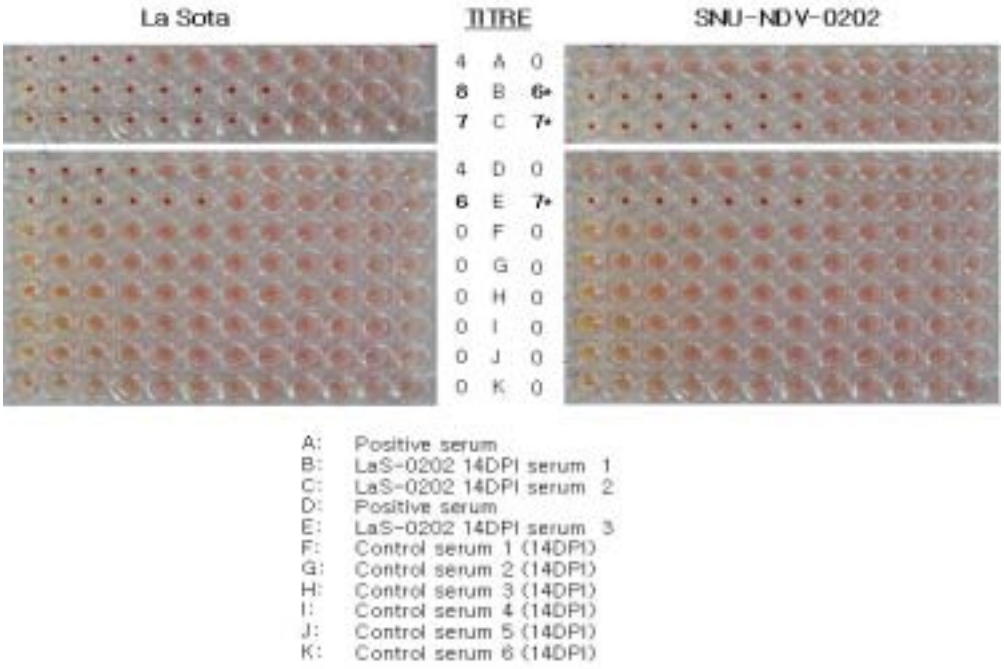


그림 10. 생독백신 접종계에서 공격접종 14일후 cross-HI에 의한 야외주 특이 항체 검출 실험.

5) 상용오일백신의 방어능력 평가 및 감염 후 계란 및 혈청 항체조사

본 실험을 위해 현재 NDV에 대한 항체음성인 SPF 닭들을 사육 중에 있으며 본 연구과제의 기간 내에 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각됨.

6) 약독주오일백신 및 야외주 오일백신 접종 후 계란 및 혈청 항체조사

1. 본 실험을 위해 현재 NDV에 대한 항체음성인 SPF 닭들을 사육 중에 있으며 본 연구과제의 기간 내에 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각됨.

7) 차단방역 프로토콜 확립

가) 실험결과 및 야외상황 관련 결과에 기초한 현재 야외상황 및 차단방역 프로토콜 확립을 위한 기반 데이터: 야외에는 HN 항원의 변이가 일어난 **두 가지 형**

의 NDV가 유행하고 있고, **백신항체가 충분히 높은 경우에도 장관 내에서 증식 및 병변을 초래**하며 단독 또는 2차적인 세균이나 바이러스 감염이 일어나는 경우 폐사 및 산란저하를 초래하는 것으로 판단됨. 주요 조직에서의 **뚜렷한 병변에도 불구하고 바이러스 분리 성공률은 매우 낮으며 기존의 single PCR로는 바이러스 RNA를 검출할 수 없어 진단 상의 어려움**이 있음. 또한 **계군 내 및 계사 간 전파 속도가 전형적인 뉴캐슬병에 비해 매우 느리나** 상당기간 (1주 또는 2주 이상) 경과 후에는 두드러진 증상 (산란율의 급격한 감소 등)을 보여 ND 이외의 다른 질병으로의 오진 가능성이 높아 감별진단의 중요성이 대두됨.

나) 차단방역 프로토콜 (계란항체 검사법을 이용한 산란계 및 종계 사전 모니터링 및 실험실 진단법 개선안)

▷ 계란 시료 채취

○ 계군 당 10개 이상 채취

○ 농장 내부인만 채취

▷ 항체 검사법

○ 라소타 주와 야외주 (SNU-NDV-0202)에 대해 난황항체로 cross-HI 실시

○ 라소타 주에 대한 항체만 양성이면서

- **HI 역가가 평균 8-9이고, 시료 간 역가 차이가 아래로 1-2계단 이하인 경우.**

  > 2-3주후 재검사하여 야외주 감염여부 확인 및 추가백신 시기 결정.

- **HI 역가가 평균 8-9이고, 시료 간 역가 차이가 아래로 4-5계단 이상인 경우.**

  > 1-2주 내 생독백신 추가접종 권장.

- **HI 역가가 평균 5-6이고, 시료 간 역가 차이가 아래로 1-2계단인 경우.**

  > 2-3주내 생독백신 추가접종.

- **HI 역가가 평균 5-6이고, 시료 간 역가 차이가 아래로 3계단인 시**

료가 10% 이상인 경우.

> 당장 생독백신 접종 권장.

○ 라소타 주 및 야외주에 대한 항체 양성이면서

- 야외주에 대한 HI 역가가 0-3인 경우.

> 감염 초기이므로 음성 계군에 대해 생독백신 접종 (진단 기간 중 바이러스 증식 및 전파 억제).

> 계사 간 모든 이동 통제 및 2일 내 확진을 위해 폐사계나 총배설강 시료 채취 .

> nested-PCR을 통한 분자진단 (1차진단) 및 SPF 계태아 접종 (2차진단).

> 1차진단 양성인 경우 방문자 차단 및 오염이 의심되는 사물의 농장 밖 이동 차단.

- 야외주에 대한 HI 역가가 모든 시료에서 양성 (3이상)이며 가장 높은 역가가 5이상인 경우.

> 농장 차단 및 nested-PCR을 통한 분자진단 (1차진단) 및 SPF 계태아 접종 (2차진단), 2차진단 결과를 얻기 전 1차진단 양성인 경우 농장소독 및 차단 (폐쇄).

다. 가금티푸스의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구

1) 야외주 감염 후 계란 및 혈청항체 조사

가) 백신 (생독 및 사독) 접종 후 계란 및 혈청 항체조사 및 야외주 감염 후 계란 및 혈청 항체 변화 조사

(1) SPF 닭 3마리를 한 그룹으로 세 그룹을 만들고, 생독백신(9R)과 사독 오일백신을 각 그룹에 접종하여 상기의 방법으로 계란의 난황과 난백을 수확하여 평판응집법으로 항체를 조사함. 그 결과 생독백신 및 오일백신 접종계의 난황과 난백에서 11일까지 항체가 검출되지 않았으나 사독백신을 접종한 3수의 혈청 시료에서 모두 강력한 응집반응이 관찰되었고, 9R 접종계 2수 중 1수에서 약

한 응집이 관찰됨. 사독백신 접종계 혈청에서의 강력한 응집은 IgM과 IgG에 의한 것으로 판단되었음. 혈청에서의 항체 존재에도 불구하고 난황에서의 음성반응은 난황에 분포하는 주요 항체가 IgG이기 때문인 것으로 생각되며, 알려진 대로 혈청항체가 난황에서 검출되기까지 며칠이 더 걸린다는 보고를 재확인하였음.

표 9. 가금티푸스 생독백신 (9R) 및 사독 오일백신 접종 후 난황 및 난백 항체의 변화.

		Day Post Inoculation							
		1	2	3	4/5	6	7	8/9	10/11
생독백신	난황	0/3	0/3	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/4
	난백	0/3	0/3	0/3	0/1	0/1	0/2	0/3	0/4
	혈청	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1/2
오일백신	난황	0/2	0/3	0/3	0/3	0	0/2	0/2	0/3
	난백	0/2	0/3	0/3	0/3	0	0/2	0/2	0/3
	혈청	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	3/3[a]

[a] 강력한 응집 반응(직경0.7-0.8mm 응집괴 형성).

나) 계란항체역가 측정후 부화한 병아리의 야외주에 대한 방어능력 조사

종란의 항체검사 (평판응집법)를 통해 항체가 전혀 없거나 1분 이내에 큰 응괴를 형성하는 종란을 부화시켜 1-16일령 10-15수를 그룹으로 두 그룹으로 만든 후 공격접종 하여 2주일간 관찰하며 폐사율을 측정하려 하였으나 양성계군이 확보되지 않아 음성을 보인 갈색산란계 수평아리와 육용계 (Ross)를 대상으로 공격접종 하였고, 생존한 개체는 부검하여 병변을 관찰하고 비

장과 간장으로부터 세균을 분리동정 함. 본 실험에서는 일반적인 구강경로로의 공격뿐 아니라 호흡기를 통한 가금티푸스의 전파 가능성을 알아보기 위해 기관내 접종법으로 호흡기 공격도 병행하여 그 결과를 비교한 결과 (표 10) 놀랍게도 호흡기를 통해 공격한 실험군에서 폐사와 간장, 비장 종대 및 괴사소 등의 병변이 관찰되었으며, 간장에서 SG가 분리됨. 또한 호흡기를 통한 공격시 구강을 통한 공격에 비해 적은 수의 SG로도 폐사와 감염이 확인됨 (표 10). 호흡기를 통한 SG의 전파는 향후 가금티푸스 예방 및 방역 프로그램 개발 시 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료됨.

표 10. 구강 및 호흡기를 통한 Salmonella gallinarum 공격실험.

Exp	Age Chicken	Route	Dose (cfu/ck)	Mortality	Bacteria isolation
I	1DO[a]	IT	1.0×10^2	20.0% (2/10)	20.0% (2/10)
	Layer[b]	PO	1.0×10^2	10.0% (1/10)	10.0% (1/10)
II-1	7DO	IT	5.75×10^3	13.3% (2/15)	80% (8/10)
	Layer	PO	5.75×10^3	6.7% (1/15)	33.3% (5/15)
II-2	7DO	IT	5.75×10^5	66.7% (10/15)	80% (8/10)
	Layer	PO	5.75×10^5	20.0% (3/15)	71.4% (5/7)
III	8DO	IT	1.16×10^5	73.3% (11/15)	100% (15/15)
	Layer	PO	1.16×10^5	0% (0/15)	20.0% (3/15)
IV	16DO	IT	3.39×10^4	30% (3/10)	100% (10/10)
	Broiler[c]	PO	3.39×10^4	30% 3/10	60.0% (6/10)

[a] day old; [b] brown layer female; [c] Ross

다) 계란 내 (식란 및 종란) 가금티푸스 항체조사

2004년부터 2006년까지 42농장 59계군으로부터 236개의 계란으로부터 난황과 난백을 분리하여 항체를 조사한 결과 5개 농장 (11.9%), 5개 계군 (8.5%)의 7개 시료 (3%)에서 양성이 나왔으며, 난황에서만 양성이 나온 경우는 3개 농장이었고, 난백에서만 양성이 나온 경우는 2개 농장이었다. 난황과 난백 모두에서 양성이 나온 농장은 없었음. 따라서 난황이나 난백만을 검사하는 것보다 모두를 검사하는 것이 위음성률을 낮출 수 있을 것으로 판단됨. 난황과 난백 내 항체 분포의 차이가 생기는 원인은 난백에 분포하는 항체가 초기항체인 IgM과 점막항체인 IgA라는 점에서 추론할 수 있음.

표 11. 계란의 난황 및 난백 내 *S. gallinarum* 항체 조사

	농장	계군	계란	난황	난백
검사수	42	59	236	236	236
양성수	5	5	7	3	4
양성률	11.9%	8.5%	3.0%	1.3%	1.7%

라) 야외주-백신주 항체 감별법 확립

사독백신과 9R을 접종한 시험계의 난황과 난백에서 항체가 검출되지 않았으나 혈청에서 항체가 검출된 사실은 자연감염 (점막) 경로가 아닌 근육주사나 피하주사를 통해 항원이 제시된 결과 점막항체가 주로 분포하는 난백에서 항체가 검출되지 않는 것으로 사료되며, 이러한 사실이 추가적인 연구를 통해 증명된다면 자연감염과 백신에 의한 항체 구분이 난백항체 검사를 통해 가능할 것으로 기대됨.

마) 차단방역 프로토콜 확립

종계장과 산란계 농장의 검사 난수는 3,000수당 10개 이상이며, 종계장의 경우 2주내지 4주 산란계 농장의 경우 최소 4주에 한 번씩은 난항체 검사를 수

행할 것을 권장함. 종계장에서 가금티푸스 양성이 나오는 경우 우선적으로 계사출입 통제 및 동선변경 조치를 취하고, 문제계사의 폐사계 를 포함하여 10수 이상에 대해 SG 분리/동정 및 혈청검사를 실시함. 혈청 양성인 경우에는 부화장에서 발생중인 발육란을 폐기하고, 기 분양된 경우에는 분양농장의 질병상황을 파악함. 양성 종계군을 도태하고, 계사를 소독하며, 타 계사의 전염유무를 모니터링하고, 비산먼지 제거와 소독을 병행함. 4주 이상까지 타 계사에서의 항체음성인 경우 모든 조치를 해제함.

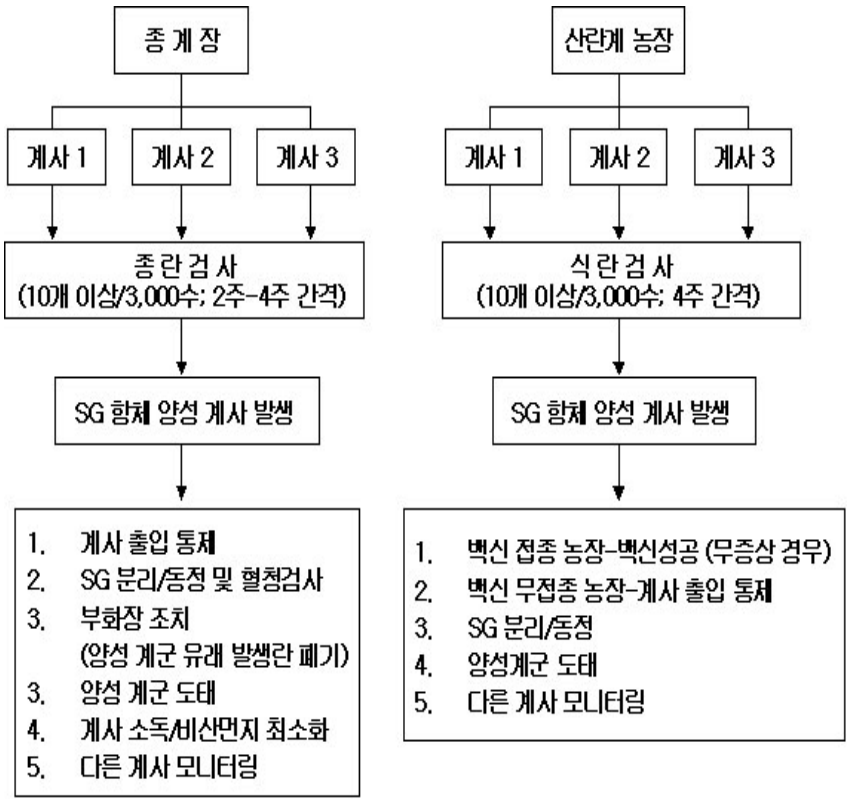


그림 11. 가금티푸스 농장 차단방역 프로토콜.

라. 마이코플라스마 감염증의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구

1) MG 생독백신 접종 및 MS 야외주 감염후 계란 및 혈청 항체조사

가) MG 생독백신 접종 후 계란 및 혈청항체 조사

(1) MG 생독백신 (Merial Co.)을 산란중인 SPF 닭 5마리에 접종하여 상기의 방법으로 계란항체와 혈청항체를 검사하려 하였으나 실험계의 난백에서 항체양성을 보였고, MS에 대해서도 강력한 양성을 보임. 따라서 백신주 접종 후 11일째에 SG 오일백신 접종한 3수, 9R 백신을 접종한 2수 그리고 MG 생독백신주 접종한 1수의 혈청에 대해 항체를 조사한 결과 SG 오일백신과 9R 백신을 접종계 각 1수에서 양성을 보임. 따라서 난백을 이용한 진단이 조기진단으로서 유용하다는 사실을 재확인함.

표 12. MG 생독백신 (TS-11) 및 사독 오일백신 접종 후 난황 및 난백 항체의 변화.

		Day Post Inoculation							
		1	2	3	4/5	6	7	8/9	10/11
생독백신	난황	0/1	0/5	0/3	0/6	0/1	0/1	0/3	0/4
	난백	1/1	5/5	3/3	6/6	0/1	1/1	3/3	4/4
	혈청[a]	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	2/6

[a] SG 오일백신과 9R 백신 접종한 5수와 MG 생독백신 접종한 1수에 대해 조사함.

(2) 야외 MG 감염항체 조사

2000년부터 2006년 3월까지의 260개 농장, 2571계군의 28,602개의 혈청에 대해 MG 항체를 조사한 결과 6,519개의 혈청에서 양성률 (22.8%)을 보임.

표 13. 야외 MG 혈청항체 양성률 조사.

	농장	계군	혈청
검사수	260	2,595	28,602
양성수	-	1,336	6,519
양성률	-	51.6%	22.8%

나) MS 야외주 감염후 계란 및 혈청항체 조사

MS 야외주 분리를 지속적으로 시도하였으나 MG는 분리에 성공한 반면 MS 분리에는 실패함. 따라서 인공적인 감염 후 계란 및 혈청항체 조사 실험을 수행하지 못함. 그러나 야외에서 백신을 하고 있지 않으므로 식란 및 종란에서의 양성 결과는 감염에 의한 것으로 판단됨. 국내 계군에서 MS 양성률을 조사하기 위해 2000년부터 2006년 3월까지의 260개 농장, 2493계군의 18,307개의 혈청에 대해 MG 항체를 조사한 결과 7,045개의 혈청에서 양성률 (22.8%)을 보임.

표 14. 야외 MS 혈청항체 양성률 조사.

	농장	계군	혈청
검사수	260	2,493	18,307
양성수	-	1,791	7,045
양성률	-	71.8%	38.5%

2) 계란 내 (식란 및 종란) MG, MS 항체조사

61개 농장 81계군으로부터 식란 및 종란 324개로부터 난황 324개와 난백 308재료를 분리하여 MG의 양성률을 조사한 결과 28개 농장 (45.9%)과 28개 계군 (34.6%)에서 양성을 보였고, 총 난황 및 난백재료에서 24개 (7.4%)와 154개 (50.0%)가 양성을 보임.

표 15. 계란의 난황 및 난백 내 *M. gallisepticum* 항체 조사.

	농장	계군	난황	난백
검사수	61	81	324	308
양성수	28	28	24	154
양성률	45.9%	34.6%	7.4%	50.0%

52개 농장 72계군으로부터 식란 및 종란 296개로부터 난황 296개와 난백 281개를 분리하여 MS의 양성률을 조사한 결과 18개 농장 (34.6%)과 18개 계군 (25.0%)에서 양성을 보였고, 총 난황 및 난백재료에서 12개 (4.1%)와 67개 (23.8%)가 양성을 보임.

표 16. 계란의 난황 및 난백 내 *M. synoviae* 항체 조사.

	농장	계군	난황	난백
검사수	52	72	296	281
양성수	18	18	12	67
양성률	34.6%	25.0%	4.1%	23.8%

마. 전염성낭병에 대한 모계 및 후대병아리 백신항체수준 모니터링 및 백신 프로토콜 연구

1) 종란 내 항체조사 및 부화병아리의 야외주 감염에 대한 방어능력 비교

가) 바이러스 중화시험법에 의한 항체검사

종란 일부에서 난황과 난백을 분리하고, 나머지는 부화시켜 1일령 병아리의 혈청을 분리하여 IBDV 중화시험을 2회 실시한 결과 혈청항체 대비 난황항체의 역가가 평균 0.95 높았고, 난황의 경우 원재료가 2배 희석액이므로 실제로는 역가가 1.95정도 (4배 차이) 높은 것으로 판단되었음. 이러한 결과는 난

황과 난백 (난황의 3배 부피정도 됨)의 부피를 합치는 경우 4배 정도 희석되므로 결과적으로는 종란과 병아리에 분포하는 항체의 양은 비슷한 것으로 사료됨. 난황을 이용한 IBDV 중화항체가를 혈청항체가로 환산하려면 난황 항체가에서 역가 1정도를 빼면 됨. 난백에서는 중화항체가 전혀 검출되지 않았으며, 이러한 결과는 대부분 오일백신을 통해 면역이 이루어져 점막항체의 유도가 일어나지 않기 때문인 것으로 판단됨.

표 17. 난황, 난백 및 혈청의 IBDV 중화항체 비교.

시료	No.	역가별(log2) 마릿수													평균	편차
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
혈청	20				1			4	5	6	4				7.3	1.5
난황	10						1			3	4	2			8.5	1.4
난백	10	10													0.0	

표 18. 난황 및 혈청의 IBDV 중화항체 비교.

시료	No.	역가별(log2) 마릿수														평균	편차
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
혈청	13										4	2	3	2	2	10.7	1.5
난황	21											3	7	11		11.4	0.7

2) 계란 항체수준에 따른 야외주 감염에 대한 방어능력 비교

대부분의 종란 난황항체의 수준이 매우 높아 역가별로 차이가 나는 종란을 부

화시켜 실험에 사용할 수 없었음. 따라서 주령에 따라 모체이행항체가 감소하므로 주령별로 야외주 (SNU91-108)를 공격하여 중화항체 별 방어수준을 폐사율, F-낭 위축 정도 및 B/B 율을 통해 평가하였고, 접종 후 항체수준을 측정하였음. 그 결과 중화항체역가가 7.2인 경우 F-낭 위축과 폐사가 모두 방어되었으나 4.5인 경우 F-낭 위축은 방어되지 못하였고, 3.1이하인 경우 폐사 및 F-낭 위축을 방어하지 못하였으나 공격 후 중화항체의 급격한 증가가 관찰되었음.

표 19. 모체이행항체 수준에 따른 야외주 감염에 대한 방어능력 비교.

접종 주령	계군	시험계수	중화항체역가 (log_2)	Results after inoculation				
				DPI	폐사율	F-낭위축	B/B 율	중화항체역가
0	대조군	15	8.5		NT	NT	NT	NT
1	대조군	10	7.2	8	0	0/10	3.63	4.5
	접종군	10			0	0/10	3.71	4.4
2	대조군	10	4.5	12	0	0/10	5.16	1.8
	접종군	10			0	10/10	1.24	2.5
3	대조군	10	3.1	12	0	0/10	3.04	1.0
	접종군	10			10	9/9	1.16	6.0
4	대조군	10	0.9	13	0	0/10	4.77	0.2
	접종군	10			30	7/7	0.93	8.4
5	대조군	12	0.6	12	0	0/10	4.57	0.0
	접종군	12			33	8/8	0.97	8.5

3) 모계 보강백신방법 및 후대병아리 백신방법 개발

가) 평균역가가 4이하인 경우

신속한 모계 보강백신을 필수 권장하며, 후대 병아리의 경우 부화 후 바로 분무나 점안 등의 IBD 생독백신 접종을 권장함.

나) 평균값이 5이상인 경우라도 검사 난황에 따라 4이하가 관찰되는 경우 모계 보강백신을 권장하며, 부화 직후 생독백신 접종을 권장함.

다) 평균역가가 8이상인 경우

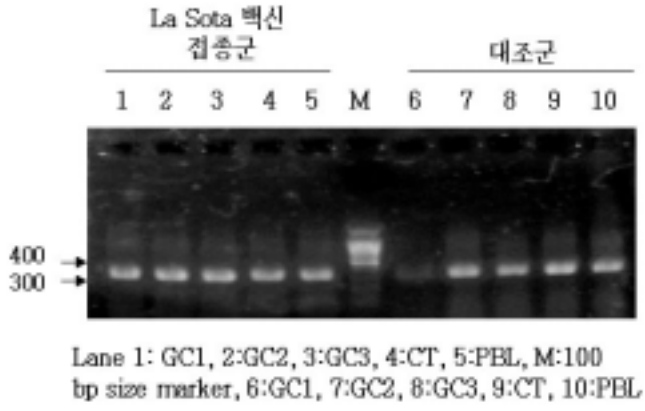
2주내지 4주 간격으로 난황항체 역가 측정하며 후대 병아리의 경우 1주내지 2주 사이에 생독백신을 권장함.

2. 제 2세부과제: 면역 장기별 백신전후 면역글로부린 단쇄 다양성 부위 유전자 염기서열 변화 연구.

가. 뉴캐슬병 생독백신 접종/무접종 닭 Ig 유전자 다양성 변화 연구

- 하데리안선, 맹장편도, F낭, 비장, 골수내 면역글로부린 단쇄 유전자 증폭

1. Primer set: L5B (5′-GACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAG-3′)와 LCNotI (5′-TGATGGT- GGCGGCCGCATTGGGCTG-3′)을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시한 결과 특이적인 증폭산물이 검출됨.
2. 반응조건: [45℃-30분, 94℃-5분, (94℃-20초, 52℃-15초, 72℃-30초)x35, 72℃-7분] 조건에서 Single-tube RT-PCR을 수행한 결과 특이적인 중폭산물을 one-step으로 확보할 수 있었음.

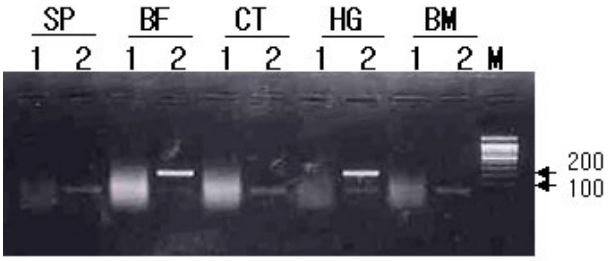


Lane 1: GC1, 2:GC2, 3:GC3, 4:CT, 5:PBL, M:100
bp size marker, 6:GC1, 7:GC2, 8:GC3, 9:CT, 10:PBL

그림 1. One-step RT-PCR법을 이용한 면역조직내 단쇄 면역글로부린 다양성 부분 (V_L) 검출.

- 면역장기 내 뉴캐슬병 바이러스 분포조사

1. 라소타주를 점안과 구강으로 접종한 후 21일후 항원성 변이주인 SNU-NDV-0202를 공격한 후 5일째에 면역장기를 채취하여 모든 NDV를 검출할 수 있는 프라이머로 1차 PCR을 수행한 결과 특이적인 증폭산물을 검출할 수 없었으나 병원성 NDV 특이 프라이머로 semi-nested-PCR을 수행한 결과 BF와 안검 (및 하데리안선) 재료에서 특이적인 증폭산물이 검출됨.



1: 1st PCR for NDV
2: 2nd nested PCR for virulent NDV
SP: spleen, BF: Bursa of Fabricius, CT: cecal tonsil
HG: Harderian gland (+eyelid lymphoid tissue),
BM: bone marrow

그림 2. nested-PCR 법을 이용한 면역조직 내 NDV 검출.

- RFLP(restriction enzyme fragment length polymorphism) study

1. 각 면역조직의 면역글로부린 단쇄 다변성 부위 (V_L)의 염기서열 결정 후 그 염기서열에 근거한 제한효소 선발을 위해 실험 진행 순서를 염기서열 결정 후로 미루었으며, 결정된 염기서열에 기초하여 DNAssist 프로그램 (ver 2.0)을 이용하여 제한효소 인식위치 및 분별성이 가장 좋은 제한효소를 선발하였으며 신속한 PCR-RFLP를 통해 상당부분의 V_L을 구분할 수 있을 것으로 기대됨 (표 1).

표1.제한효소를이용한V_L 유전자PCR-RFLP분석.

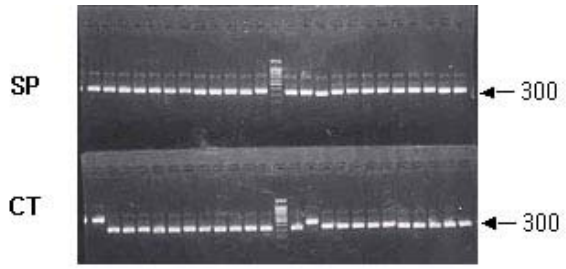
RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	V_L gene
Alu0*	Xma0	Kpn0	Mbo2	Taq0	BM1, CT2, CT22
				Taq1	CT16
				Taq2	GC10
		Kpn1	Mbo2	Taq0	BM6, GC2
	Xma1	Kpn0	Mbo1	Taq0	CT21
			Mbo2	Taq0	CT6, GC5, BM5, CT3, CT8, CT18
		Kpn1	Mbo2	Taq0	CT20
Alu1	Xma0	Kpn0	Mbo1	Taq0	CT5
				Taq1	GC1
			Mbo2	Taq0	GC15
				Taq1	GC7, GC18
			Mbo3	Taq0	CT17
				Taq1	GC12
		Kpn1	Mbo2	Taq0	CT19, GC17
				Taq1	BM2, GC6
	Xma1	Kpn0	Mbo1	Taq0	CT23
			Mbo2	Taq0	GC13
			Mbo3	Taq0	GC11
		Kpn1	Mbo2	Taq0	CT4
				Taq1	GC14
Alu2	Xma0	Kpn0	Mbo2	Taq0	CT24,GC4,GC8
		Kpn1	Mbo2	Taq0	GC16
				Taq2	BM3,BM4
Alu3	Xma0	Kpn0	Mbo2	Taq0	GC3

*Alu0: no cut by *AluI*

Alu:*AluI*, Xma: *XmaI*, Kpn:*KpnI*, Mbo:*MboI*, Taq:*TaqI*.

- 주요 유전자 클로닝 및 염기서열 결정

1. 비장, 맹장편도 및 골수 유래의 증폭산물을 TOPA-TA 클로닝 키트를 이용하여 클로닝 하여 colony-PCR로 insert를 확인하였음 (그림 3).



Colony-PCR for chV_L-positive clones

그림 3. Colony-PCR 법을 이용한 인서트 확인.

2. V_L 양성인 대장균 클론으로부터 플라스미드를 정제하여 비장, 맹장편도, 골수 유래 V_L 유전자 각각 17개, 15개, 6개의 염기서열을 결정하였으며 프라이머 서열을 제외한 부분을 번역하여 CDR1, CDR2, CDR3 부분을 결정하였음 (그림 4).

	CDR1	CDR2
BM1	NPGETVKITCSGGSG---N-NYGWCQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSKSGST
BM2	NLGGTVEITCSGG---YSSSYYGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSKSGST
BM3	NPGETVKITCSGGGSYDGSYYYGWYQQKSPGSALVTVIYDNTNRPSNIPSRFSGSLSGST
BM4	NPGETVKITCSGGGSYDGSYYYGWYQQKSPGSALVTVIYDNTNRPSNIPSRFSGSLSGST
BM5	NPGETVKITCSGGGSGYG---YGWYQQRSPGSAPVTLIYSNNQRPSDIPSRFSGSKSGST
BM6	NLGGTVEITCSGG---SNN--YGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSKSGST
CT16	NLGGTVEITCSGG---YNN--YGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPPDIPSRFSGSKSGST
CT17	NPGETVKITCSGGSSSY-----GWFQQKSPGSGPATLIYESNKRPSDIPSRFSGSASGST
CT18	NPGETVKITCSGGGSGYG---YGWYQQKSPGSAPVTLIYSNNQRPSDIPSRFSGSKSGST
CT19	NPGETVKIACSGGSNNYGSY-YGWYQQKSPGSAPVTLINVNTKRPSDIPSRFSGSLSGST
CT2	NLGGTVKITCSGGGG---D--YGWFQQRSPGSAPVTLIYSNDKRPSDIPSRFSGSKSGST
CT22	NLGGTVKITCSGGGG---D--YGWFQQRSPGSAPVTLIYSNDKRPSDIPSRFSGSKSGST
CT20	NPGETVKITCSGSSSGYG---YGWYQQKSPGSAPVTVIYGSTSRPSNIPSRFSGSGSGST

```
CT23    NPGETVKLTCSGGGSGYG---YGWYQQKSPGSAPVTVIYSNNQRPSDIPSRFSGALSGPT
CT24    NLGGTVKITCSGSSGSY----YGWYQQKSPGSAPVTVIYFNDKRPSDIPSRFSGSKSGST
CT3     NPGETVKITCSGGGSGYG---YGWYQQKSPGSAPVTLIYSNNQRPSDIPSRFSGSKSGST
CT6     NPGETVKITCSGGGSGYG---YGWYQQKSPGSAPVTLIYSNNQRPSDIPSRFSGSKSGST
CT8     NPGETVKITCSGGGSGYG---YGWYQQKSPGSAPVTLIYSNNQRPSDIPSRFSGSKSGST
CT21    NPGETVKITCSGGGSGYG---YGWYQQKSPGSAPVTLVYSNNQRPSDIPSRFSGSKPGST
CT4     NPGETVKITCSGGGSSSY---YGWYQQKAPGSAPVTLIYADAYRPSDIPSRFSGSKSGST
CT5     NLGGTVKVTCSGG------YNYGWFQQKSPGSAPVTLIYNDNKRPSDIPSRFSGSTSGST
GC1     NLGGTVEITCSGSSGSYG-----WFQQKSPGSAPVTVVYNNNNRPSDIPSRFSGSKSGST
GC10    NLGGTVKITCSGSSS---GYAYGWHQQKSPGSAPVTVIYSNDKRPSDIPSRFSGALSGST
GC11    NPGETVKITCSGSSG-----DYGWIQQKSPGSAPVTVIYQNNQRPSDIPSRFSGSKSGST
GC12    NLGGTVKITCSGGGSWYGSYYYGWIQQKSPGSAPVTLIYENDKRPSDIPSRFSGSLSGST
GC13    NPGETVKITCSGGYSGY-----GWYQQKSPGSAPVTVIYESNQRPSDIPSRFSGSASGST
GC14    NPGETVEITCSGGDSSSY---YGWYQQKAPGSAPVTLIYNNNNRPSNIPSRFSGSTSGST
GC16    NPGETVRITCSGG----SSY-YGWYQQKSPGSAPVILINTNTNRPSDIPSRFSGSKSGST
GC17    NPGETVKITCSGGGS-----YYGWYQQKSPGSAPVTVIYNYNKRPSDIPSRFSGALSGST
GC18    NPGETVKITCSGS-----DNSYGWYQQKSPGSALVTVIYESTKRPSNIPSRFSGSKSGST
GC2     NPGETVKITCSGGDNWYG---YGWYQQKSPGSAPVTLIYDNTDRPSDIPSRFSGSKSGST
GC3     NPGETVKITCSGG-----SYSYGWFQQKSPGSALVTVIYWDDERPSGIPSRISGSTSGST
GC4     NPGETVKITCSGG---SYS--YGWHQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSTSGST
GC5     NPGETVKITCSGG---YSN--YGWYQQKSPGSAPVTVIYWDDERPSDIPSRFSGSTSGST
GC6     SLGGTVEITCSGSDINE----YGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSLSGST
GC7     NPGGTVEITCSGGSNN-----YGWYQQKSPGSAPVTLIYYNDNRPSDLPSRFSGSTSGST
GC8     NPGETVKITCSGG-SYS---YYGWFQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSNIPSRFSGSLSGST
GC15    NPGETVKITCSGG----GSY-YGWYQQKSPGSAPVTLIYANTNRPSNIPSRFSGSKSGST
```

CDR3

BM1 GTLTTTGVRAEDEAVYFCGAWESSSNP---GIFGAGTTLTVLG

BM2 ATLTITGVQADDEAVYFCGSADSN----YIGIFGAGTTLTVLG

BM3 NTLTITGVQADDEAVYYCGGFDSS----YVGIFGAGTTLTVLG

BM4 NTLTITGVQADDEAVYYCGGFDSS----YVGIFGAGTTLTVLG

BM5 ATLTITGVQADDEAVYYCGSGDSSTA-----IFGAGTTLTVLG

BM6 GTLTITGVQADDEAVYFCGGYDSS----SAGIFGSGTTLTVLG

CT16 GTLTITGVQAEDEAAYFCGSGDSS----SSAIFGAGTTLTVLG

CT17 GTLTTTGVQAEDEAVYFCGSRDRSNR--S-SIFGTGTTLTVLG

CT18 ATLTITGVQADDEAAYYCGSGDSRTA-----IFGAGTTLTVLG

CT19 ATLTITGVQADDEAVYFCGGYDGSTD--T-AIFGAGTTLTVLG

CT2 GTLTITGVQAEDEAVYFCGAYDSITNP---GIFGAGTTLTVLG

CT22 GTLTITGVQAQDEAVYFCGAYDSITNP---GIFGAGTTLTVLG

CT20 ATLTITGVRAEDEAVYYCGSGDSSVA-----IFGAGTTLTVLG

CT23 ATLTITGVQADDEAVYFCGSGVSSTS-----IFGAGTTLTVLG

CT24 ATLTITGVQAEDEAVYFCGSYDSS-AG-YVGIFGAGTTLTVLG

CT3 ATLTITGVQADDEAVYYCGSGDSSTA-----IFGAGTTLTVLG

CT6 ATLTITGVQADDEAVYYCGSGDSTTA-----IFGAGTTLTVLG

CT8 ATLTIIGVQADDEAVYYCGSGDSSTA-----IFGAGTTLTVLG

CT21 ATLTITGVQADDEAVYYCGSGDSSTA-----IFGAGTTLTVLG

CT4 ATLTITGAQAEDEAVYYCGSKDSSAG--YVGIFGAGTTLTVLG

CT5 ATLTITGVQAEGEAVYFCGSYDSS-NA---GIFGAGTTLTVLG

GC1 ATLTITGVQAEDEAVYYCGSTDSS-T--YVGIFGAGTTLTVLG

GC10 ATLTITGVQVEDEAVYFCANFDSSTNA---GIFGAGTTLTVLG

GC11 ATLTITGVQADDEAVYLCGSYDSNN----DDMFGAGTTLTVLG

GC12 NTLTITGVQVEDEAVYFCGSIDSS-AG-YVGIFGAGTTLTVLG

GC13 STLTITGVQAEDEAVYFCGSYDSTDS--S-AIFGAGTTLTVLG

GC14 ATLTITGVQAEDEAVYFCGSADSSS-----GIFGAGTTLTVLS

GC16 ATLTITGVRAEDEAVYYCGSYDSSAG--Y-AAFGAGTTLTVLG

GC17 ATLTITGVQADDEAVYFCGAYDSSDAG-YDGIFGAGTTLTVLS

GC18 LTLTITGVQAEDEAVYFCGGWEDS-SS-YAGIFGAGTTLTVLG

GC2 ATLTITGVQADDEAVYFCGSSDSSNT-----SFGAGTTLTVLG

GC3 GTLTITGVRAEDEAVYLCGT-IDS-ST-DADIFGAGTTLTVLG

GC4 STLTITGVQADDEAVYYCGSADSS-ST---GIFGAGTTLTVLG

GC5 NTLTITGVQADDEAVYYCGSGDSS-AG-YVGIFGAGTTLTVLG

GC6 NTLTITGVQAEDEAVYFCGGYDSSS---YVGMFGAGTTLTVLG

GC7 GTLTITGVRAEDEAVYYCGSYEGSTSAGYIGLFGAGTTLTVQ-

GC8 STLTITGVQAEDEAVYFCGGYDNN-----VGIFGAGTTLTVLG

GC15 GTLTITGVQAEDEAVYFCGNLE----------FGAGTTLTVLS

그림 4. V_L 유전자 아미노산 서열 다중배열 및 CDR1, 2, 3 서열 확인.

3. 유전적인 관련성을 알아보기 위해 클러스탈 방법으로 염기서열을 다중배열 하였고, Neighbor-Joining 법에 따라 계통도를 작성한 결과 비장 유래의 V_L 유전자들은 77.9%- 89.8%의 상동성을 보여 항원자극과 관련이 없는 것으로 판단되었으나 맹장편도와 골수 유래의 일부 유전자들은 95.4%-100%의 높은 상동성을 보여 직접적인 관련성을 보였음. 즉, 클러스터 I을 형성하는 CT3, 6, 8, 18, 21은 서로 94.7%-99.6%로 높은 상동성을 보여 최근 제시된 항원에 의해 somatic mutation이 활발하게 일어나고 있는 것으로 판단되었으나 memory B cell과 plasma cell이 주로 분포하는 것으로 알려진 골수유래의 BM5가 이 들 유전자와 95.4%-99.3%의 높은 상동성을 보인 것은 BM5가 초기 라소타 백신주에 의해 affinity maturation (친화도 성숙)이 일어난 후 골수로 이동한 memory B cell 또는 plasma cell 유래일 것으로 판단됨. BM3와 BM4의 염기서열이 100% 상동성을 보인 것은 이들이 골수에서 주요 유전자임을 의미하는 것으로 최근 항원에 대한 반응인 것으로 사료됨.

CT2와 CT22가 99.6%의 염기서열과 CDR1, 2, 3 부분에서 100%의 아미노산 상동성을 보인 것은 최근 제시된 항원에 의해 affinity maturation이 일어나고 있음을 의미하며 비장유래 V_L 유전자에서 이러한 현상이 관찰되지 않은 것은 맹장편도가 점막면역 조직으로서 최근 공격한 SNU-NDV-0202에 제일 먼저 반응하기 때문인 것으로 사료됨 (그림 5). 따라서 항원자극 후 시기별로 면역조직으로부터 면역글로부린 유전자를 증폭하여 염기서열을 분석함으로써 각 면역조직의 반응을 추적할 수 있을 것으로 기대됨. 향후 항원 반응성이 인정되는 V_H와 V_L 유전자로 이루어진 single chain variable region fragment (scFv)를 제작하고 재조합 단백질을 만들어 항원에 대한 반응성을 확인하면 이러한 유전자들의 특이성이 증명될 수 있을 것으로 기대되며 이러한 연구는 병원성 미생물에 대한 닭의 체액성 면역반응을 이해와 효과적인 백신개발에 결정적인 정보를 제공할 것으로 기대됨.

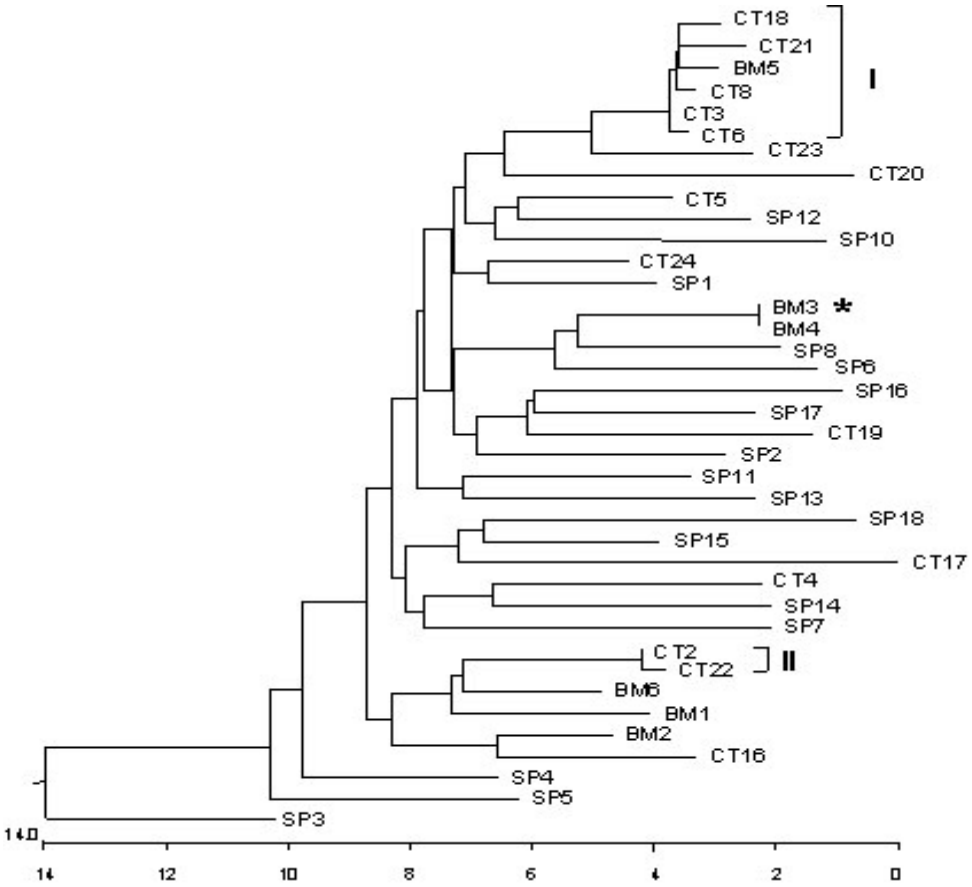


그림 5. V_L 유전자 염기서열을 이용한 계통도.

나. 전염성 낭병 생독백신 접종 및 무접종 닭 면역글로부린 유전자 다양성 변화 연구

1) 29일령 SPF 닭 9수와 6수를 전염성 낭병 생독백신 (IBD-BLEN) 접종 및 무접종군 두개로 나누어 각 각 접종 후 1주일에 각 3수와 2수로부터 면역장기를 적출하여 종류별로 pooling 함. F-낭의 경우 백신 접종계에서 병변 및 위축이 관찰되었으나 대조군에서는 정상이었음.

2) 상용 백신 접종후 침울 등의 증상과 F-낭의 위축이 비교적 심하게 나타난 이유는 접종계가 SPF 닭으로 모체이행 항체를 전혀 가지고 있지 않기 때문인 것

으로 판단됨.

3) F-낭, 골수, 맹장편도, 비장으로부터 RNA를 추출하여 면역글로부린 단쇄 유전자를 증폭한 결과 대부분에서 특이적인 증폭산물이 관찰되었으나 백신 접종계의 경우 F-낭과 맹장편도의 증폭정도 (3회 반복시)가 대조군에 비해 낮아 백신주에 의한 B-세포 감소와 관련이 있는 것으로 판단되었으나 이에 대한 결론을 얻기 위해서는 정량적인 RT-PCR이 필요할 것으로 사료됨.

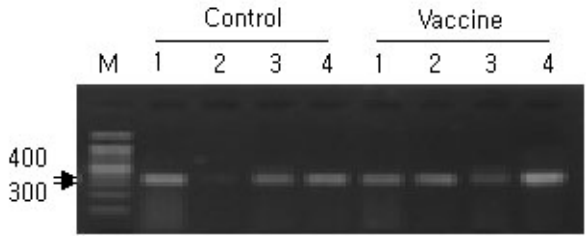


그림 6. IBDV 백신주 접종 1주후 면역장기로부터 면역글로부린 단쇄 유전자 다양성 부위 증폭. Lanes: M, molecular size marker (iNtRON biotechnoology Co.); 1, F-낭; 2, 골수; 3, 맹장편도; 4, 비장.

4) 상용백신 접종 1주후 F-낭에 분포하는 B-세포의 유전자 다양성의 변화를 확인하기 위해 F-낭에서 증폭된 단쇄 유전자를 클로닝하여 대조군과 백신접종군의 염기서열을 분석하였음. 그 결과 백신 접종군의 경우 확연한 위축에도 불구하고, 다양한 염기서열을 보여주어 대조군과의 차이를 규명하지 못하였음. 즉, F-낭에는 충분히 다양한 미성숙 B-세포 레파토리가 존재하므로 백신주에 의해 일부의 세포가 무작위적으로 사멸하더라도 클로닝하여 얻은 유전자의 수가 적으므로 동일한 유전자 서열이 관찰될 가능성이 매우 낮은 것으로 사료됨. 이러한 결과는 뉴캐슬병바이러스 면역 후 맹장편도에서 상동성이 매우 높은 염기서열이 관찰되었던 이전 결과와는 다른 결과임.

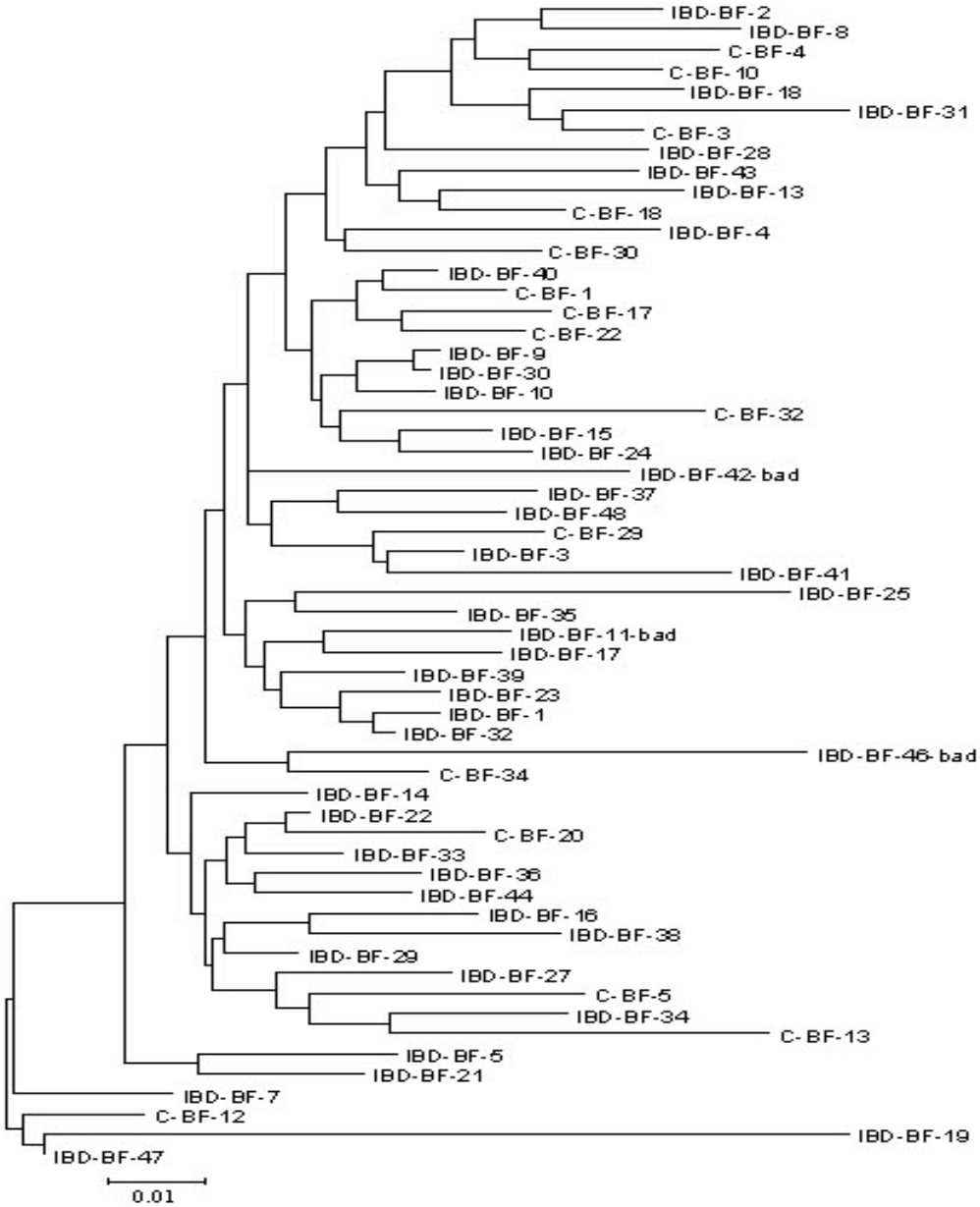


그림 7. IBD 백신 접종 1주일 후 접종계와 대조군 F-낭 B-세포 V_L 다양성 비교.

	CDR1	CDR2
IBD-BF-1	NLGGTVKITCSGSSS---GYGYGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-2	NLGGTVEITCSGGSSG--C-GYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNTNRPSNIPSRFSGSLSGST	
IBD-BF-3	NPGGTVEITCSGGGGS-----YGWFQQKSPGSAPVTLIYNNNNRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-4	NPGETVEITCSGDSSY-----YGWYQQKAPGSAPVSLIYDNTKRPSNIPSRFTGSKSGST	
IBD-BF-7	NLGETVKITCSGGSNNY-----GWYQQKSPGSAPVTVIYSNNQRPSDIPSRFSGSTSGST	
IBD-BF-8	NLGGTVKITCSGGSSG--C-GYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSNIPSRFSGSLSGST	
IBD-BF-9	NPGETVKITCSGDRNN-----YGWFQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-10	NPGETVKITCSGGGSS--YGYYGWYQQKSPGSAPVTVIYANTNRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-11	NLGGTVKITCSGSDSS---YGYSWHHQKSPGSAPVTLIYSNDKRPSNIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-13	NPGETVEITCSGDISG---CGYGWYQQKSPGSAPVTLIYNN-KRPSNIPSRFSGSASGST	
IBD-BF-14	NPGGTVKITCSGGYSG-----YGWHQQKSPGSAPVTLIYDNDKRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-15	NPGETVKITCSGGSSS--Y--YGWYQQKSPGSAPVTVIYANTNRPSNIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-16	NPGETVKITCSGGGSN-----NYGWYQQKSPGSALVTVIYWNDKRPSNIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-17	NLGGTVKITCSGGSSS---YGYSWHQQKSPGSAPVTVIYSNDKRPSNIPSRFSGSASGST	
IBD-BF-18	NPGETVEITCSGGSS-----YYGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSNIPSRFSGSLSGST	
IBD-BF-19	NPGEAVKITSSGDGSW-----YGWYQQKTPGSAPVTVMYSNNQRPSDILSRLSGSTSGST	
IBD-BF-21	NLGGTVKITCSGGDSG---CGYGWYQQKSPGSAPVTVIYSNNQRPSDIPSRFSGSLSGST	
IBD-BF-22	NPGETVKITCSGSSGN--YGSYGWYQQKAPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-23	NLGGTVEITCSGSS-----GSYGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-24	NPGETVKITCSGGSG-----SYGWFQQKAPGSAPVTLIYANTNRPSNIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-27	NPGETVKITCSGGGS---SSYYGWHQQKSPGSAPVTLIYSNDKRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-28	NPGETIKITCSGGGGS--Y--YGWYQQKAPGSAPVTVIYDNTNRPSNIPSRFSGSGSGST	
IBD-BF-29	NPGETVKITCSGGGGS-----YGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-30	NPGETVKITCSGDRNE-----YGWYQQKAPGSAPVTVIYQNNNRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-32	NLGGTVKITCSGSS----GNGYGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-33	NPGETVEITCSGGSG-----SYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNDKRPSDIPSRFSGSKSGST	
IBD-BF-34	NPGETVKITCSGGGS---SSYYGWYQQKSPGSAPVTVIYDDTKRPSNIPSRFSGSTSGST	

IBD-BF-35 NLGGTVKLTCPGGGGSY----YGWFQQKSPGSAPVTVIYNNDNRPSDIPSRFSGSESGST

IBD-BF-36 NPGETVKITCSGS-SG---YGYGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSNIPSRFSGSKSGST

IBD-BF-37 NLGGTVEITCSGGGYGQ---WYGWYQQKSPGSVPVTVIYDSSSRPSDIPSRFSGSKSGST

IBD-BF-38 NPGETVKITCSGGSSGC--G-YGWYQQKAPGSAPVTVIYWNDKRPSNIPSRFSGSKSGST

IBD-BF-39 NPGGTVKLTCSGSSGN----YYGWYQQKSPGSAPVTVIYNNDKRPSDIPSRFSGSKSGST

IBD-BF-40 NPGETVEITCSGGGS---SSYYGWYQQKSPGSAPVTLIYQNTKRPSDIPSRFSGSKSGST

IBD-BF-41 NLGGTVEITCSGG-YS-------------G-----CDYDSNNRPSDIPSRFSGSKFGST

IBD-BF-42 NPGGTVKITCSGSSGS-----YGWYQQKSPGSAPVTVIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGST

IBD-BF-43 NLGETVKITCSGSSD-----AYGWYQQKAPGSAPVTLIYDNTNRPSNIPSRFSGALSGST

IBD-BF-44 NLGETVKITCSGGGGS-----YGWYQQKSPGSAPVTVIYYNDKRPSGIPSRFSGSTSGST

IBD-BF-46 NLGGTVEITCSGGSG-----SYGWFQLKATGSAPVTLIYESSNKPSDIPSRFSGSKSGST

IBD-BF-47 NPGETVKITCSGGSGSYNY-YYGWHQQKAPGSAPVTVIYSNNQRPSDIPSRFSGSTSGST

IBD-BF-48 NLGGTVEITCSGSSGN-----YGWFQQKSPGSAPVTVIYQNTNRPSDIPSRFSGSKSGST

C-BF-1 NPGETVKITCSGGGS---SSYYGWYQQKSPGSAPVTLIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGST

C-BF-3 NPGETVKITCSGDDSW-----YGWFQQKSPGSAPVTVIYQNTKRPSNIPSRFSGSLSGST

C-BF-4 NLGETVKITCSGGGSYDGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYDNTNRPSNIPSRFSGSLSGST

C-BF-5 NPGETVKITCSGGSN-----NYGWYQQKAPGSAPVTLIYANDKRPSNIPSRFSGSTSGST

C-BF-10 NLGGTVKITCSGGGS---SSYYGWFQQKSPGSAPVTLIYESNKRPSNIPSRFSGSLSGST

C-BF-18 NPGETVEITCSGGYS-----GYGWYQQKSPGSAPVTVIYQNTNRPSNIPSRFSGSASGST

C-BF-20 NPGETVKITCSGSSSG--Y-SYGWYQQKSPGSAPVTVIYSNDKRPSDIPSRFSGSKSDST

C-BF-29 NLGETVEITCSGDSS-----YYGWYQQKSPGSAPVTLIYDNNNRPSNIPSRFSGSKSGST

C-BF-30 NPGETVKLTCSGGSG-----SYGWFQQKAPGSAPVTLIYDNTNRPSDIPSRFSGSKSGST

C-BF-32 NPGETVKITCSGGGQW-----HGWYQQKSPGSVPVTVINANTRRPSDIPSRFSGSKSGST

C-BF-34 NLGGTVKITCSGGSGS-----YGWFQQKSPGSAPVTLIYSNDKRPSDIPSRFSGSKSGST

CDR3

IBD-BF-1 GTLTITGVQAEDEAVYFCASADSSS----KGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-2 NTLTITGVRAEDEAVYYCANEDSST---GAGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-3 ATLTITGVQVEDEAVYYCASAD-SS---GDGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-4 ATLTITGVQADDEAVYFCGSRDSSY----VGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-7 STLTITGVQVEDEAVYYCGDYDS-S-----GAFGAGTTLTVLG

IBD-BF-8 NTLTITGVQVEDEAVYYCGGYDSIT---YASIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-9 ATLTITGVQADDEAVYFCGSYDSSY---VTGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-10 ATLTITGVQADDEAVYYCGSGDSSG----AGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-11 ATLTITGVQAEDEAVYYCGSRGSN---TYVGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-13 ATLTITGVRAEDEAVYYCGSADSS----SVGIFGAGTTLTVLS

IBD-BF-14 GTLTITGVQAEDEAVYYCGSYDSSGTGAYVGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-15 GTLTITGVQADDEAVYYCGNEDSSG-----AAFGAGTTLTVLG

IBD-BF-16 GTLTITGVQAEDEAVYFCGRYDSSAG-----IFGAGTTLTVLG

IBD-BF-17 ATLTITGVQADDEAVYYCGSEDSS---SGAGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-18 NTLTITGVRAEDEAVYFCGTYDSSAG--YAGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-19 STLTIIGVLADEEAVYFCGRYDSSGG--YAGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-21 GTLTITGVRAEDEAVYYCGSADSSTD--SGAIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-22 GTLTITGVQAEDEAVYFCGSEDSSGA-----IFGAGTTLTVLG

IBD-BF-23 ATLTITGVQAEDEAVYFCGGYDSSTY---ASTFGAGTTLTVLG

IBD-BF-24 GTLTITGVQADDEAVYFCGSADS-----SSGIYGAGTTLTVLG

IBD-BF-27 GTLTITGVQAEDEAVYFCASTDS-----SSAIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-28 STLTITGVQADDEAVYYCGNADSSG-----AIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-29 ATLTITGVQAEDEAVYFCGSYDSSAG--YVGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-30 ATLTITGVQADDEAVYFCGSYDSSAG--YVGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-32 ATLTITGVQAEDEAVYFCGSGDSSG----AGIFGAGTTLTVLG

IBD-BF-33 GTLTITGVRADDEAVYFCGSFDSSGA-----AFGAGTTLTVLG

IBD-BF-34 GTLTITGVQAEDEAIYYCAITQST----TSAVFGAGTTLTVLG

```
IBD-BF-35    ATLTITGVQAEDEAVYYCGSRDSS----SVGIFGAGTTLTVLG
IBD-BF-36    GTLTITGVRAEDEAVYYCGSADSSN---SAGIFGAGTTLTVLG
IBD-BF-37    ATLTITGVQADDEAVYYCGSVDGSS---TA-TFGAGTTLTVLG
IBD-BF-38    NTLTITGVQADDEAVYYCGSFDSSS---NAGIFGAGTTLTVLG
IBD-BF-39    ATLTITGVQADDEAVYYCGSADSSS---TTAIFGAGTTLTVLG
IBD-BF-40    ATLTITGVQADDEAVYYCGSEDSS----SDVVFGAGTTLTVLG
IBD-BF-41    ATLTITGVQVEDEAVYYCASADTNS---YAGIFGAGTTLTVLG
IBD-BF-42    GTLTITGVQAEDEAVYYCGSTDRSD---DADIFGGGTTLIVLR
IBD-BF-43    ATLTITGVRAEDEAVYYCGNEDSST---YAGIFGAGTTLTVLG
IBD-BF-44    GTLTITGVRAEDEAVYYCGNEDSRT---YAGIFGAGTTLTVLG
IBD-BF-46    GTLTITGVGAEDEADYFCGSADSST----DSIFGVGTTLTVLG
IBD-BF-47    STLTITGVQAEDEAVYFCGSADSST---NSGIFGAGTTLTVLG
IBD-BF-48    ATLTITGVQADDEAVYYCGSIDSN----YVGIFGAGTTLTVLG
C-BF-1       ATLTITGVQADDEAIYYCGSTDN-----TEAVFGAGTTLTVLG
C-BF-3       NTLTITGVQADDEAVYFCGSYDSSAG--YAGIFGAGTTLTVLG
C-BF-4       NTLTITGVQADDETVYYCGSIDSTS---TTTIFGAGTTLTVLG
C-BF-5       STLTITGVQAEDEAIYFCGSADST----YADIFGAGTTLTVLG
C-BF-10      NTLTITGVQADDEAVYFCGNGDSTS---YDGIFGAGTTLTVLG
C-BF-18      ATLTITGVQVEDEAVYYCGNADSSG-----AAFGAGTTLTVLG
C-BF-20      GTLTITGVQADDEAVYFCGSYDSSGTG-YNDMFGAGTTLTALG
C-BF-29      ATLTITGVQVEDEAVYYCANFDSSG------IFGAGTTLTVLG
C-BF-30      ATLTITGVRAEDEAVYFCGAWESSS---NSGIFGAGTTLTVLG
C-BF-32      NTLTITGVQADDEAVYFCGSFDSNT---YNGIFGAGTALTVLG
C-BF-34      GTLTITGVRADDEAVYYCGNEDSS----YAGIFGAGTTLTVLG
```

그림 8. V_L 유전자 아미노산 서열 다중배열 및 CDR1, 2, 3 서열 확인.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	평가 (점수)
1차년도 (2004)	○ 조류독감의 신속진단 및 차단방역 기반기술 연구		
	- 약병원성 (H9N2) 바이러스의 병원성조사		
	- 바이러스 감염 후 계란항체 및 혈청항체 조사	5	5
	- 국내 식란 및 종란 내 조류독감 항체조사	5	5
	○ 뉴캐슬병의 감별진단 및 차단방역 기반기술 연구	10	10
	- 약독주 및 야외주오일백신 접종 후 계란 및 혈청 항체조사		
	- 약독주오일백신 및 생독백신 접종 후 계란 및 혈청 항체조사	10	5
	- 상용오일백신의 방어능력 평가 및 감염 후 계란 및 혈청 항체조사	5	2
		5	3
	- 종란 내 뉴캐슬병바이러스 항체조사 및 부화병아리의 야외주 감염에 대한 방어능력 조사	15	10
	- 보존방법에 따른 계란항체의 역가변화 조사	5	5
	- 계란 및 혈청을 이용한 야외주-백신주 감별법 개발	5	2
	- 차단방역 프로토콜 확립	5	2
	○ 뉴캐슬병 생독백신 접종/무접종 닭 Ig 유전자 다양성 변화 연구	30	25
	- 주요 유전자 클로닝 및 염기서열 결정		
총 점		100	74
2차년도 (2005)	○ 가금티푸스의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구		
	- 야외주 감염 후 계란 및 혈청항체 조사		
	- 백신 (생독 및 사독) 접종 후 계란 및 혈청 항체조사 및 야외주 감염 후 계란 및 혈청 항체 변화 조사	5	0
	- 계란항체역가 측정 후 부화한 병아리의 야외주에 대한 방어능력 조사	5	3
	- 계란 내 (식란 및 종란) 가금티푸스 항체조사	10	5
	- 야외주-백신주 항체 감별법 확립	10	10
	- 차단방역 프로토콜 확립	5	3
	○ 마이코플라스마 감염증의 신속(감별)진단 및 차단방역 기반기술 연구	5	5
		20	20
	○ 전염성낭병에 대한 모계 및 후대병아리 백신항체수준 모니터링 및 백신 프로토콜 확립	20	20
	○ 전염성낭병 생독백신 접종/무접종 닭 Ig 유전자 다양성 변화 연구	20	10
	- 주요 유전자 클로닝 및 염기서열 결정		
총 점		100	76
최종평가	○ 조사 전염병에 대한 혈액, 난황 및 난백 항체 수준간의 관련성	20	13
	○ 조사 전염병에 대한 혈액, 난황 및 난백 항체의 출현 속도 및 지속성	15	11
	○ 야외 감염과 각종 백신 면역 항체간의 감별성	20	16
	○ 계란 항체 수준과 후대 병아리 혈중 항체간의 관련성	15	15
	○ 신속진단, 감별진단 및 차단 방역에서의 활용성	20	10
	○ Immunoglobulin 유전자의 다양성	10	10
총 점		100	75

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

1. 현행 ND 백신 프로그램에 의한 난백항체 수준이 난황항체 수준보다 현저히 낮은 현상 규명을 위한 연구.

   난백에는 고농도의 IgA가 존재하나 그 중 NDV에 대한 항체 수준이 원액을 2배 희석한 난백을 처리하여도 바이러스 중화능이 나타나지 않고, 플라크 검사법으로만 SPF 난백대비 2배 이상의 중화능을 보이는 정도로 난황대비 현저한 차이를 보임. 따라서 이에 대한 원인 규명을 위한 연구가 필요함.

2. 항원성 변이 NDV에 의한 산란율 감소 확인 실험.

   항원성 변이 NDV에 의한 상용백신 접종한 산란계의 산란율 저하 정도를 확인하기 위한 연구가 필요할 것으로 사료됨.

3. 난백 내 sialoprotein이 NDV 백신주와 병원성주 그리고 AIV의 아형에 대한 혈구 응집 능력의 차이를 보이는 현상 규명을 위한 연구.

4. 난백의 항-바이러스 효능 평가 대상 바이러스 확대 연구.

가. 인간, 반려동물 및 중대형 산업동물의 병원성 파라믹소 바이러스들과 인플루엔자 바이러스에 대한 항 바이러스 효능 평가.

나. 알러지 반응을 최소화 시키며 항 바이러스 효능을 유지할 수 있는 난백 처리 방법 연구.

5. 가금티푸스의 호흡기 감염 가능성이 확인 된 바 *S. enteritidis*나 *S. typhimurium* 등 주요 살모넬라의 호흡기 감염가능성에 대한 연구가 필요함.

6. SG, MG, MS의 점막을 통한 야외감염과 피하나 근육주사에 의한 백신 접종에 의한 난백 내 항체분포의 차이를 확정짓기 위해서는 보다 대규모의 실험이 필요할 것으로 사료됨.

7. 점막면역계 B-세포의 분포 연구

항원자극 후 면역장기에서 주요한 면역 글로부린 단쇄 유전자 확인이 가능하므로 항원을 코팅한 plate에서 B-세포를 panning 하였을 때 항원 특이 B-세포와 그 유전자를 수확할 수 있는지에 대한 연구가 필요함.

제 2 절 타연구에의 응용

1. 현행 ND 백신 프로그램에 의한 난백항체 수준이 난황항체 수준보다 현저히 낮은 현상 규명을 위한 연구.

조류 점막면역 반응을 유발하기 위한 면역보조제 개발 활성화 및 실험모델로서 활용.

2. 난백 내 sialoprotein이 NDV 백신주와 병원성주 그리고 AIV의 아형에 대한 혈구 응집 능력의 차이를 보이는 현상 규명을 위한 연구.

조류 및 인체 인플루엔자바이러스의 수용기 친화성 연구에 활용.

3. 가금티푸스의 호흡기 감염 가능성.

기존의 생독백신의 호흡기 접종에 의한 효능평가 등 관련 백신 개발에 활용가능.

4. 점막면역계 B-세포의 분포 연구

닭 단클론항체 생산에 활용.

제 3 절 기업화 추진방안

1. 계군의 선제적인 분자관리 시스템 (Pre-emptive Molecular Management System: PMMS) 현장적용.

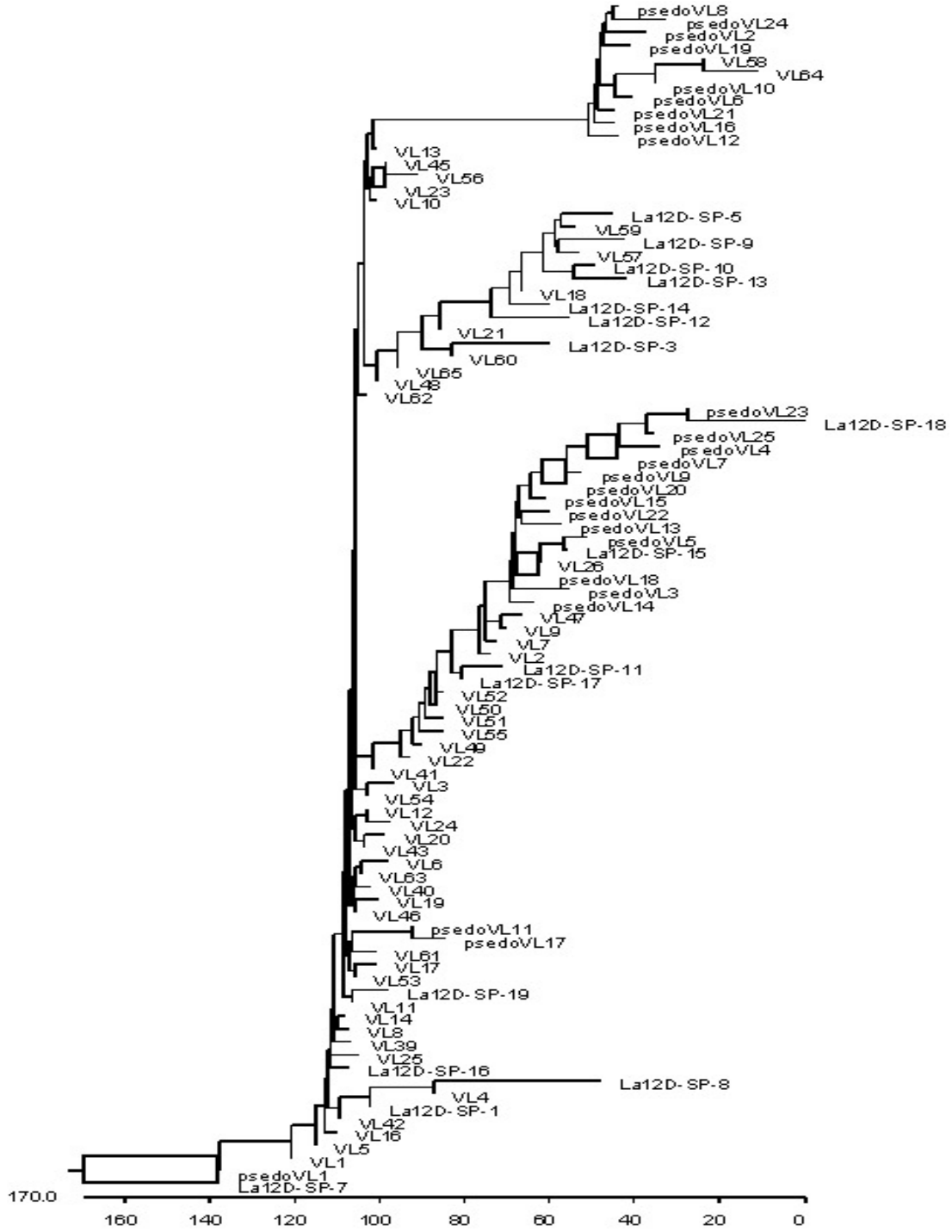
2. 난백의 항바이러스 효능을 이용한 식품첨가제 및 기능성 식품 및 사료첨가제 개발.

3. 선형항원 변이주를 이용한 백신주 개발.

4. 선형항원을 이용한 감별진단 키트 개발.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

면역글로부린 단쇄 유전자 다양성 부분 유전자 염기서열 데이터베이스 구축 완료함. 조류 면역글로부린 다양성에 중요한 pseudogenes 서열 확보함.


psedoVL8
psedoVL24
psedoVL2
psedoVL19
VL58
VL64
psedoVL10
psedoVL6
psedoVL21
psedoVL16
psedoVL12
VL13
VL45
VL56
VL23
VL10
La12D-SP-5
VL59
La12D-SP-9
VL57
La12D-SP-10
La12D-SP-13
VL18
La12D-SP-14
La12D-SP-12
VL21
La12D-SP-3
VL60
VL65
VL48
VL62
psedoVL23
La12D-SP-18
psedoVL25
psedoVL4
psedoVL7
psedoVL9
psedoVL20
psedoVL15
psedoVL22
psedoVL13
psedoVL5
La12D-SP-15
VL26
psedoVL18
psedoVL3
psedoVL14
VL47
VL9
VL7
VL2
La12D-SP-11
La12D-SP-17
VL52
VL50
VL51
VL55
VL49
VL22
VL41
VL3
VL54
VL12
VL24
VL20
VL43
VL6
VL63
VL40
VL19
VL46
psedoVL11
psedoVL17
VL61
VL17
VL53
La12D-SP-19
VL11
VL14
VL8
VL39
VL25
La12D-SP-16
La12D-SP-8
VL4
La12D-SP-1
VL42
VL16
VL5
VL1
psedoVL1
La12D-SP-7
170.0
160
140
120
100
80
60
40
20
0

제 7 장 참고문헌

Clare RA, Strout RG, Taylor RL, Aeed PA. Bile and serum immunoglobulin levels during primary and secondary infections with eimeria tenella in chickens. Vet Parasitol. 25:33-38. 1987.

Ewert DL, Barger BO, Eidson CS. Local antibody response in chickens: analysis of antibody synthesis to Newcastle disease virus by solid-phase radio-immunoassay and immunofluorescence with class-specific antibody for chicken immunoglobulins. Infec Immun. 24:269-275, 1979.

Ewing ML, Cookson KC, Phillips RA, Turner KR, Kleven SH. Experimental infection and transmissibility of Mycoplasma synoviae with delayed serologic response in chickens. Avian Dis. 42:230-238. 1988.

Goudswaard J, Noordzij A, van Dam RH, vander Donk JA, Vaerman JP. The immunoglobulins of the turkey (Meleagris gallopavo). Isolation and characterization of IgG, IgM and IgA in body fluids, eggs and intraocular tissues. Poult Sci. 56:1847-1851. 1977.

Kwon HJ, Park KY, Kim SJ, Yoo HS. Application of nucleotide sequence of RNA gene (*rpoB*) to of serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Vet Microbiol. 82:121-129. 2001.

Kwon HJ, Park KY, Yoo HS, Park JY, Park YH, Kim SJ. Differentiation of Salmonella serotype gallinarum biotype pullorum from biotype gallinarum by analysis of flagellin C (*fliC*). J Microbiol Methods. 40:33-39. 2000.

Kwon HJ, Cho SH, Ahn YJ, Choi KS, Seo SH, Kim SJ. Molecular epidemiology of Newcastle disease in Republic of Korea. Vet. Microbiol95:39-48. 2003.

Lee CW, Song CS, Lee YJ, Mo IP, Garcia M, Suarez DL, Kim SJ. Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korea avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96. Avian Dis. 44:527-535. 2000.

Lebacq-Verheyden AM, Vaerman JP, Heremans JF. Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. Immunology. 27:683-692. 1974.

Lukert PD, Davis RB. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. Avian Dis. 18:243-250. 1974.

McCormack WT, Tjoelker LW, Thompson CB. Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. Annu Rev Immunol. 9:219-241. 1991.

Rose ME, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. Eur J Immunol. 4: 521-523, 1974.

Reynaud CA, Anquez V, Dahan A, Weill JC. A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. Cell. 40:283-291. 1985.

Reynaud CA, Dahan A, Anquez V, Weill JC. Somatic hyperconversion diversities the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D

region. Cell 59:171-183. 1989.

Schiemann DA, Montgomery AL. Immune responses in chickens against Salmonella typhimurium monitored with egg antibodies. Vet Microbiol. 27:295-308. 1991.