

최 중
연구보고서

닭 전염성 기관지염 (IB) 바이러스에 대한
유전자백신 개발과 인공지능망을 이용한
IB 위험인자 관리 기법 개발

Development of genetic vaccine against infectious
bronchitis (IB) virus and technique controlling IB risk
factor using neural network

연구기관
강원대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “닭 전염성 기관지염 (IB) 바이러스에 대한 유전자백신 개발과 인공신경망을 이용한 IB 위험인자 관리 기법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 12일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 권 혁 무

세부연구책임자 : 박 선 일

연 구 원 : 성 환 우

요 약 문

I. 제 목

닭 전염성 기관지염 (IB) 바이러스에 대한 유전자백신 개발과 인공신경망을 이용한 IB 위험인자 관리 기법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 현행 사독 혹은 약독 생독백신에 의한 IB 관리대책의 한계를 극복하기 위한 대안으로 유전자 백신개발과 질병발생에 관여하는 위험요인 관리 모형을 탐색함으로써 국내 양계산업에서 기여하고자 수행되었다. 다양한 혈청 형이 유행하고 있는 최근의 세계적 발생상황을 고려할 때 전통적인 백신에 의한 질병관리는 한계가 있을 것으로 판단하여 본 연구에서는 (1) IB 발생농장의 역학적 특성 조사 (2) 닭에서 분리한 IB 바이러스의 유전적 특성 (3) 항원 결정 부위를 클로닝한 유전자 백신제조 기법 확립 (4) 제조된 백신의 방어효과 확인 (5) pooling 혈청을 이용한 IB 유병률 추정 (6) 감염에 기여하는 위험요인 분석 (7) 인공신경망 모형 구축을 목적으로 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. IB 발생농장의 역학적 특성 조사

1차년도 조사에서 유병률을 추정하기 위하여 연구 대상 농장과는 별도로 395개 계군에서 계군당 10수씩 3,950개의 혈청에 대하여 항체역가를 측정하였다. 추정 유병률은 HI 역가 11 이상 (기준 1)이 적어도 하나 검출되는 경우 양성으로 판정할 때 14.2% (56 계군), 역가 10 이상 (기준 2)에서 40.8% (161 계군)로 나타났다. 2차년도 조사에서는 1차년도와 동일한 기준으로 볼 때 기준 1에서 39.4% (109개 중 52 계군), 기준 2에서 42.4% (56 계군)의 유병률을 보였다. 유병률은 양성결과를 판단하는 역가의 기준설정, 산란 이후의 경과시점, 백신접종 상태, 농가의 특수성 등에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다. 특히 경

시적 모니터링이 가능했던 31개 계군의 경우 기준 1로 볼 때 1개 농장을 제외하고 산란기간 중 적어도 한번은 감염되는 것으로 조사되었다.

2. 국내에서 유행하는 IBV의 유전적 특성

IB로 의심되는 닭으로부터 모두 12주의 IB 바이러스 (IBV)를 분리하였으며 기관에서 3주, 신장에서 5주, 맹장 (cecal tonsil)에서 4주를 분리하였다. 분리한 IBV의 S1 유전자를 RT-PCR을 이용하여 증폭하여 RFLP 패턴을 분석하였다. RT-PCR로 증폭한 S1 glycoprotein gene을 제한효소인 *Hae*III로 처리한 후 RFLP pattern을 조사하였다. 10주의 분리주 중 6주 (K748-01, K058-02, K117-02, K234-02, K514-03, K044-02)는 KM91 type으로 나타났고, 1주 (K434-01)는 Arkansas type으로 나머지 5주 (K545-02, K10217-03, K1255-03, K3-3, K2-6)는 기존의 RFLP type과는 다른 변이형으로 나타났다. 변이형 중 K2-6는 다른 3 바이러스와 다른 RFLP type을 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때 국내에는 다양한 유전자적 특성을 갖는 IBV가 공존하며 지속적인 유전자적 변이를 일으키는 것으로 추정된다.

결정된 아미노산 서열을 기초로 작성된 phylogenetic tree 분석결과 국내에서 분리된 12주는 3 branch로 분류되었다. 최근 분리주들 (K10207-03, K3-3, and K1255-03)이 독립적인 branch를 형성하였고, 6 IBV (K514-03, K044-02, K058-02, K234-02, K117-02, and K748-01)가 두 번째 branch로 분류되었는데 이들은 이전 분석에서 KM91 type으로 분류된 바이러스 (K069-01, K774-01, K507-01)와 동일한 그룹으로 분류되었다. 그리고 K2-6, K434-01와 K545-02 등은 IBV Ark99과 Gray strain 계열로 분류되었다. 이와 함께 본 연구에서는 IBV S1 gene과 함께 방어에 관여하는 것으로 N gene을 분석하였다. IBV 국내분리주의 N gene을 RT-PCR로 증폭시킨 다음 증폭된 유전자를 클로닝하였고 염기서열을 결정하였다. 결정된 N gene의 염기서열은 GenBank database에 등록되었다. 결정된 아미노산 서열을 기초로 작성된 phylogenetic tree 분석 결과 IBV 국내 분리주는 3 cluster로 분류되었다. 국내 분리주 IBV K069-01, K281-01, K434-01, K507-01, K774-01, K748-01, K044-02, K058-02, K161-02, K203-02와 K234-02는 독립적인 cluster를 형성하였다. 다른 분리주인 IBV K210-02는 미국과 중국에서 분리되는 IBV 바이러스 그룹으로 분류되었고, 최근 IBV 분리주인 IBV K514-03와 K1255-03은 중국 IBV strain과 관련 있는 cluster로 분류되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 특정 IBV strain의 경우 서로 다른 기원을 갖는 IBV strain의 recombination에 의하여 유래된 것으로 추정된다. 또한 새로운 백신을 개발할 경우 S1 glycoprotein gene과 함께 nucleocapsid gene도 함께 고려하여야 할 것으로 보인다.

3. 유전자백신 제조

IBV중에서 RT-PCR-RFLP 분석과 염기와 아미노산 서열 결정과 phylogenetic tree 분석을 통하여 유전자 백신후보주를 선발하였는데 백신후보주 선발 시 본 연구실에서 기 분석된 IBV strain도 함께 고려하였다. IBV 백신후보주는 S1과 N gene을 함께 분석한 결과로 선발하였다.

백신후보주로 현재 국내에서 가장 많이 분리되는 있는 혈청형인 KM91 type (K507-01등)을 중심으로 하여 선발하였고, Arkansas type (K210-02)과 최근에 분리되고 있는 KM91 type의 variant type으로 추정되는 K1255-03을 유전자 백신을 제조하기 위한 백신 후보 바이러스주로 선발하였다. 백신후보주로 선발된 IBV의 S1과 N gene을 RT-PCR로 증폭 후 정제한 다음 eukaryotic expression vector인 pcDNA3.1/V5/His-TOPO (Invitrogen)에 클로닝하여 유전자백신을 제조하였다. IBV 백신후보주의 S1과 N gene을 eukaryotic expression vector에 클로닝하여 염기서열 결정과 orientation을 확인한 결과 올바르게 삽입된 것으로 결정된 recombinant plasmid를 준비하여 유전자 발현을 검증하였다. 본 연구에서 제조한 유전자백신인 recombinant plasmid를 발현시킨 결과 예상된 결과인 약 57 kDa의 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 IBV의 N gene으로 만든 유전자백신인 recombinant plasmid를 발현시킨 결과 예상한 약 51 kDa의 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있어 N gene이 올바르게 expression vector에 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

4. 유전자 백신의 방어효과 조사

최종적으로 유전자 발현이 확인된 유전자 백신 중 S1 gene과 N gene의 분석결과와 phylogenetic tree 분석결과를 토대로 선발한 IBV K507-01 strain으로 제조한 pcDNA507-S1과 pcDNA507-N을 SPF 닭에 접종하고 IBV K507-01 strain으로 공격접종을 실시하였다.

체액성면역은 혈구응집억제반응을 이용하여 IBV 특이 항체를 검출하였다. 공격접종 전에 각 그룹은 유의한 항체역가 차이를 나타내지 않았다. 공격접종 5일 후 측정된 항체 역가 검사에서 공격접종군 (CC)과 pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N군이 유의한 역가차이를 나타내었지만 나머지 그룹사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 공격접종 9일 후 측정된 항체 역가 검사에서 normal control군을 제외한 나머지 그룹 간에 유의한 역가 차이는 나타나지 않았다. 그러나 공격접종 후 pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N군에서 비교적 고르고 높은 항체 역가가 확인되었다. 세포매개성 면역반응은 공격접종 전에 채혈한 말초혈액을 이용한 lymphocyte proliferation assay를 이용하여 검사하였다. 분석결과 pcDNA-K507-S1군이 가장 높은 stimulation activity를 나타내었으나 pcDNA-K507-N군과 pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N군과 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 그러나 NC, CC, 및 VC군과는 유의한 차이가 있었다.

유전자백신을 접종한 후 백신의 실질적인 방어효과를 기관과 신장에서 공격접종한 바이러스를 검출로 하는 방법으로 확인하였다. 공격접종 5일 후 기관에서 pcDNA-K507-N군과 pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N군 (50% 방어율)은 다른 군에 비하여 유의성 있는 방어율의 차이를 보였고 신장에서는 pcDNA-K507-S1군 (50% 방어율)이 다른 군과 비교하였을 때 유의성 있는 방어율의 차이를 나타내었다. 공격접종 9일 후 기관의 경우 모든 실험군이 유의성 있는 차이를 보이지 않았고 신장에서는 pcDNA-K507-N군이 가장 높은 방어율을 (66.7%) 나타내었고 pcDNA-K507-S1군은 50%의 방어율을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 S1 gene과 N gene을 cloning하여 제조한 유전자백신의 방어효과를 인정할 수 있으나 완전한 방어효과는 얻을 수 없었다. 앞으로 유전자백신을 *in ovo*로 1차 백신하고 부화된 병아리에 attenuated vaccine으로 2차 백신하는 prime-boosting method와 면역조절에 관여하는 cytokine gene을 genetic adjuvant로 이용하는 방법 등 다양한 백신접종 방법을 개발하는 것이 필요하다고 판단된다.

5. pooling 혈청을 이용한 IB 유병률 추정

2005년 1월부터 2006년 2월까지 강원대학교 수의학과에 IB 혈청검사로 의뢰된 총 5,000수의 혈청을 분석하였다. 합병혈청 역가에 대한 개별혈청 평균역가의 설명력은 87%로 높게 나타났다. 특히 개별역가가 높을 때 두 변수의 관련성이 높는데 이는 국내 IB의 유병률이 높다는 점에 비추어 볼 때 활용 가능성이 매우 높음을 시사한다. 최적 기준점에서 민감도는 0.836-0.954, 특이도는

0.843-0.967 범위를 보여 비교적 높은 정확도를 나타냈다. 한편, 최적 기준점에서 개별혈청 유병률과 합병혈청 유병률은 2-9.2%의 범위를 보였는데 이러한 결과는 양성판정 기준에 따라 유병률의 차이가 있음을 시사한다. 본 연구에서 개별역가에 대한 합병역가의 AUC는 0.946-0.975 범위로 매우 높은 정확도를 보여 대규모 혈청역학 조사에서 합병혈청을 이용한 유병률 추정은 적절할 것으로 사료된다.

6. 위험요인 분석

1차년도 연구에서 IB 발생의 위험요인은 연속입추, 부적절한 환기 시스템, 계사운영 년수의 장기화가 관여하는 것으로 나타났으며 다변량분석에서는 계사 운영 년수만이 유의성을 보였다. 즉 5년 이상 경과된 계사에 비하여 5년 미만인 계사 즉 비교적 운영기간이 짧은 계사일수록 IB에 감염될 위험이 감소하는 것으로 나타났다. 환기시스템의 효과를 보정할 경우 계사 운영년수가 5년 미만일 때 IB 감염의 위험은 92.1% 감소하는 것으로 분석되었다. 운영년수가 1년일 경우 IB 발생의 위험확률이 11.1%이고 3년을 상회하면 약 95%의 위험확률을 갖는 것으로 나타났다. 계사의 운영 년수가 짧을수록 IB 감염확률이 감소한다는 것은 계사 운영 년수는 환기시스템, 스트레스, 복합감염 등과 밀접한 연관성이 있을 것이고 이러한 위험요인들은 노후계사에 비해서 신계사에서 요인음성일 가능성이 높기 때문일 것으로 사료된다.

한편, 2차년도 연구의 단변량분석 결과 계사 운영 연수가 길수록, 농장 내 계군의 수가 많을수록, 연속입추방법, 계분처리 기간이 길수록 IB 발생위험이 증가하는 것으로 나타났다. 다변량분석에서 다일령 계군이 없을 때 IB 발생 위험은 96.1% 감소하며, 전년도 뉴캐슬병 발생이 없을 때 IB 발생 위험은 65.7% 감소하는 것으로 나타났다. 계분처리 기간이 길수록, 농장내 계군의 수가 많을수록 IB 발생 위험은 감소하지만 유의하지는 않았다. 기타 환기시스템의 효율적 관리, 사료급여 방법, 계란수거 방법, 사체처리 방법, 방문객 관리, cold 스트레스 여부, 직전 파스에서 환우 여부, 온도 및 습도 관리 등은 IB 발생위험과 관련이 없는 것으로 나타났다.

7. 인공신경망 모형 개발

16개 입력 neuron으로 구성된 신경망모형은 77개의 훈련자료 중 73건을 올

바르게 판단하여 94.8%의 정확도 (AUC)를 보였다. ROC 곡선에서 기준을 0.7149 이상으로 판단할 때 진단의 정확도가 88.9%로 가장 높았으며 100%의 민감도를 달성하였다. 44%의 IB 유병률을 가정할 때 최적 신경망 모형은 80%의 양성예측도와 100%의 음성예측도를 보였다. 이러한 결과에 근거할 때 본 연구에서 구축한 신경망 모형은 산란계군에서 IB의 존재를 확인하기 위한 목적에 성공적으로 응용될 수 있을 것으로 판단되었다.

최적 인공신경망 모형으로 위험요인을 분석한 결과 계사의 운영년수가 오래 될수록, 총 사육수수가 클수록, 다일령계군의 존재, 연속입추방법을 적용하는 농장에서 IB 감염위험은 증가하는 것으로 나타났다. 또한 농장에서 발생하는 계분을 처리하기 위해 외부에서 차량이 방문하거나 계분 처리 간격이 길수록, cold stress가 존재하는 농장일수록 IB 감염의 위험이 증가하였다. 사체처리 방법에서 매몰하거나 사료화를 시행하는 경우, 외부인이 농장 방문할 때 소독을 시행하지 않을 때 IB 감염위험은 증가하는 것으로 나타났다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. IBV 유전적 특성에 관한 정보의 활용

본 연구결과 국내에서 유행하는 IBV의 유전적 특성은 백신제조를 위한 백신주 선발시 역학적인 자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 유전자 백신 제조 방법의 활용

유전자백신 제조 방법은 면역원성을 향상시킬 수 있는 추가적인 연구를 실시한 후 상용화 방법을 모색해야 할 것으로 판단된다.

3. 유병률 추정을 위한 합병혈청의 활용

국가단위에서 대규모의 개별혈청을 검사할 경우 비용과 인력소요가 큰 만큼 본 연구에서 확인된 합병혈청의 유용성은 IB에 대한 국가 방역사업 수립에 적용할 수 있다. 또한 이 방법은 다른 질병의 혈청학적 모니터링에 응용할 수 있으며 이 방법을 사용할 때 예산절감 효과는 매우 클 것으로 판단된다.

4. 혈청역학 조사에서 적정 표본크기 산출 기법의 활용

국가 방역사업에서 질병검출 혹은 질병의 부재 (disease-freedom)를 증명하는 방역사업을 수립할 때 본 연구사업에서 획득한 최소 검사수를 계산하는 방안을 응용할 수 있으며 특히 정기적인 혈청검사 사업에서 위험수준에 근거한 (risk-based) 표본크기를 산출함으로써 예산절감 효과를 거둘 수 있을 것으로 판단한다.

5. 인공지능망 모형의 상용화 방안

본 연구에서 구축된 인공지능망 모형을 양계 농가에 보급하기 위해서는 첫째, 향후 대규모의 추가 역학조사를 병행하여 광범위한 자료가 구축 둘째, 확진을 위한 실험실 진단결과 셋째, 개선된 모형에 대한 대규모 현장 적용시험이 선행되어야 할 것으로 판단한다. 이러한 선행연구를 통하여 완성된 모형에 대하여 검증 작업을 거친다면 전문가 시스템 (expert system)이 완성될 것으로 사료된다.

Summary

1. Characterization of IBV isolates

Twelve Korean field infectious bronchitis viruses (IBVs) were isolated from IB suspected chickens between 2001 and 2003 years. The S1 glycoprotein genes of these IBV isolates were amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. These Korean IBV isolates were classified into 3 groups by their RFLP patterns using restriction enzyme *Hae*III. Half of twelve isolates were similar to KM91 RFLP pattern which was a representative pattern in Korea. Three isolates corresponded to Arkansas pattern, but they had unique patterns. The others showed variant RFLP patterns.

1) Sequence comparison

To be compared with published sequences for non-Korean IBV strains, amplified PCR products were cloned and sequenced. Korea IBV field isolates had 71.2–99.7% with each other and 45.9–80.7% nucleotide sequence similarities compared to non-Korean IBV strains. And these Korean IBV isolates had 71.5–99.3% with each other and 44.9–80.3% amino acid sequence similarities compared to non-Korean IBV strains. By phylogenetic tree analysis, some of IBV isolates were branched into different groups from non-Korean IBV or previously isolated Korean IBV strains. Particularly, recent Korean IBV isolates (K10217-03, K3-3 and K1255-03) formed a separate group. The Korean IBVs seemed to be evolved continuously.

2) Phylogenetic analysis

Fourteen infectious bronchitis viruses (IBVs) were isolated in Korea between 2001 and 2003 from chickens suspected to be infected with IBVs. The nucleocapsid (N) protein genes of the various IBVs were amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and were cloned

and sequenced, and the nucleotide and deduced amino acid sequences were compared with published sequences for non-Korean IBV strains. The Korean IBV isolates shared amino acid sequence similarity of between 89.2% (K203-02 and K1255-03) and 98.3% (K434-01 and K281-01) with each other and exhibited amino acid sequence similarity between 57.0% (K774-01 and V18/91) and 96.6% (K507-01 and JP8147) with non-Korean IBV strains. Phylogenetic analysis of the deduced N protein amino acid sequences resulted in the segregation of Korean IBV isolates into three different clusters, with cluster assignments differing for some of the isolates from those obtained with analysis of the S1 glycoprotein. Korean IBV isolates K069-01, K281-01, K434-01, K504-01, K774-01, K748-01, K044-02, K058-02, K161-02, K203-02, and K234-02 formed an independent cluster comprised only of Korean IBV isolates. Another Korean IBV isolate, K210-02, belonged to a cluster that included IBV strains isolated in USA, the Netherlands and China. Recent Korean IBV isolates K514-03 and K1255-03 grouped into a third distinct cluster related to a Chinese IBV strain. As deduced from phylogenetic analysis, some IBV isolates appear to have arisen from the recombination of IBV strains with different origins.

2. DNA vaccine preparation

Seven strains (K507-01, K161-02, K210-02, K774-01, K117-02, K1255-03, K514-03) of infectious bronchitis virus (IBV) isolated in Korea were used to construct DNA vaccines in this study. S1 glycoprotein (S1) and nucleocapsid (N) genes of IBV were amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). To construct plasmid DNA vaccines, each PCR product of S1 and N genes was purified and cloned into eukaryotic expression vector (pcDNA 3.1/V5-His TOPO vector) and transformed into competent *E coli*. Cells carrying recombinant plasmid were selected on LB plates containing ampicillin. The nucleotide sequence and orientation of each constructed plasmid were verified by DNA sequencing. Verified plasmids were prepared and used to confirm the expression of cloned S1 and N gene. The expression of S1 and N proteins from constructed DNA vaccines were confirmed by an in vitro transcription /

translation system.

3. Protective effect of the vaccine

The protective immunity of constructed plasmids was tested in chickens. To investigate the protective efficacy of these DNA vaccines, 1-week-old chickens were injected intramuscularly with pcDNA-K507-S1 and/or pcDNA-K507-N DNA vaccines twice at 2-week intervals. On week 3 after the second immunization, chickens were challenged intraocularly with the $1 \times 10^{4.5}$ EID₅₀ of IBV K507-01 strain. Antibodies specific to IBV were not detected by hemagglutination inhibition test in DNA vaccination groups before challenge but were induced after challenge. The immunized groups exhibited a lower virus detection rate in trachea and kidney compared with the non-immunized groups after challenge. In the ConA induced lymphocyte proliferation assay of peripheral blood lymphocytes, the immunized group with pcDNA-K507-S1 showed significantly higher proliferation response than non-immunized groups. These results suggest that our plasmid DNA vaccines induced partial protective immunity against IBV, in which cell-mediated immune response rather than humoral immune response seemed to contribute to the protection of chickens against IBV infection. Genetic characteristics Korean IBV isolates obtained in this research can be used to select the vaccine candidate for development of new IBV vaccine and techniques for making genetic vaccine can be transferred to company after completing additional experiment to enhance immunogenicity of genetic vaccines.

4. Risk factors for IBV infection in laying flocks

1) 2003-2004 study result

To analyze and identify selected risk factors for infectious bronchitis virus (IBV) infection in the growing and laying period of laying-hen flocks, a longitudinal field study was conducted with 27 commercial flocks reared in three provinces of Korea during the period from May 2003 to April 2004.

Using monitored data for IBV infection status among study flocks we computed the multivariate odds ratios (ORs) and their corresponding confidence intervals (CIs), and population attributable risks (PARs). Multivariate logistic regression showed significant risk increments for: continuous entry of chick (OR=1.9, 95% CI, 0.7-69.1) and operation years of the layer house greater than or equal to 5 years (OR=3.2, 95%CI, 1.6-389.9). No significant interaction was found between variables. The PAR suggested that continuous entry of chick (PAR=32%) and more than 5 years of house operation (PAR=84%) had the highest impacts on IB presence in laying-hen flocks under study. Of the two significant factors, however, operation year of the layer house lacks an easy applicability in preventing IB control strategies, and the possibility of confounder cannot be ruled out.

2) 2004-2005 study result

To describe the epidemiology of IB in laying flocks a total of 86 flocks were investigated during the 2004-2005 period. In each flock, a batch of laying hens housed in the same room was followed until finished. Logistic regression was used to assess the association between managerial and hygiene practices and health status and the shedding risk at the end of the laying period. No single risk factor was significant in the univariate analysis. However, the risk for IB infection was increased when carcasses were destroyed in a manner of burial within farm or use of feed stuffs. Farms without implementation of biosecurity program for visitors, farms neighbouring main road, farms with longer period in operation (year) was positively associated with IB infection. All-in-all-out management system was protective. Without considering interaction effect of 9 factors, the overall attributable fraction of IB infection was estimated at approximately 99.9%. In other words, about 99.9% of all IB infection results from exposure to 9 risk factors. A reduced model removed MTD_YN variable from full model did fit the observed data well (Hosmer-Lemeshow Chi-square=7.42, df=7, p=0.4922), with the area under the curve (AUC) of 0.734 (c-statistic). To estimate the risk of being infected with IB we

applied this model to study farms without missing record (n=69). The risk was ranged minimum of 2.6% and maximum of 71.3%. Ten (14.4%) of study farms were classified as less than 10% probability of being infection, whereas 38 farms (55%) were as greater than 30% of being infection. This result showed that the majority of study farms was being higher probability of IB infection during the laying period.

5. Prevalence of HI titer against IB

1) 2003-2004 study

A total of 3,950 samples from 395 flocks (10 samples from each flock) were collected to estimate prevalence of hemagglutination inhibition (HI) antibody titer against IB. Based on the serological testing, we used two arbitrary criteria for IB infection status: criteria 1 for HI titer of greater than equal to 11 and criteria 2 for HI titer of greater than equal to 10. Using these 2 cut-off values, the prevalence of IB was 14.2% (56 flocks) and 40.8% (161 flocks), respectively. The prevalence varied depending on the farms studied, HI cut-off values, vaccination program, and time point of after laying (54-634 days). Of 31 flocks which were periodically monitored, all but one flock were infected once during the observation period.

2) 2004-2005 study

Further studies were conducted to determine prevalence of IB. A total of 132 laying flocks (31 and 101 flocks for the year-1 and year-2 study, respectively) were tested for the presence of HI antibodies against IB. Of these 109 flocks (82.6%) were used in prevalence estimation, using the same criteria used in the year-1 study. The seroprevalence was 39.4% (52 of 109 flocks) and 42.4% (56 flocks) for the criteria 1 and 2, respectively. The prevalence in year-2 study was much higher than year-1 study at the criteria 1, while the prevalence at the criteria 2 was comparable to both studies.

6. Comparison of pooled versus individual sera in prevalence estimation

This study was to determine the relationship between individual sera and pooled sera titers for detection of avian infectious bronchitis virus (IBV) and to evaluate suitability of pooled sera by comparing prevalences estimated from both samples. A total of 5,000 individual samples were collected from 500 flocks in Chungcheong, Gyunggi, and Kangwon provinces between January 2005 and February 2006. Ten samples were randomly selected from each flock. Five-hundred pooled sera were prepared by mixing equal amount of each 10 individual serum from the original samples. IBV antibody titers were measured by HI test. The least squares regression analysis was performed to construct equation between pooled and mean individual titers. To determine whether the flock is infected 4 arbitrary criteria were used: detection of at least 1 chicken with HI titer ≥ 9 (criterion 1), detection of at least 2 samples with HI titer ≥ 9 (criterion 2), detection of at least 1 sample with HI titer ≥ 10 (criterion 3), and finally detection of at least 1 sample with HI titer ≥ 11 (criterion 4). The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to examine the cut-off points of pooled titers showing optimal diagnostic accuracy. The area under the curve (AUC), sensitivities (Se), specificities (Sp), and positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were calculated. The regression equation between pooled titers (pool) and mean individual titers (mean) was: $\text{pool} = 1.2498 + 0.8952 \times \text{mean}$, with coefficient of determination of 87% ($p < 0.0001$). The optimal cut-off points of pooled titers were titer 8 for criterion 1 (AUC=0.975, Se=0.883, Sp=0.959, PPV=0.985, NPV= 0.728), titer 8 for criterion 2 (AUC=0.969, Se=0.954, Sp=0.855, PPV=0.926, NPV=0.907), titer 9 for criterion 3 (AUC=0.970, Se=0.836, Sp=0.967, PPV=0.978, NPV=0.772), and titer 9 for criterion 4 (AUC=0.946, Se=0.928, Sp=0.843, PPV=0.857, NPV=0.921). The difference of prevalence estimated by individual and pooled sample showed a minimum of 2% for criteria 2 and a maximum of 9.2% for criteria 3. These results indicate that the use of pooled sera in HI test for screening IBV infection in laying hen flocks is considered as a cost-effective method of testing large numbers of samples with high diagnostic accuracy.

7. Development of artificial neural network

A three-layer, feed-forward artificial neural network (ANN) with sixteen input neurons, three hidden neurons, and one output neuron was developed to identify the presence of IB infection as early as possible in laying hen flocks. Retrospective data from flocks that enrolled IB surveillance program between May 2003 and November 2005 were used to build the ANN. Data set of 86 flocks was divided randomly into two sets: 77 cases for training set and 9 cases for testing set. Input factors were 16 epidemiological findings including characteristics of the layer house, management practice, flock size, and the output was either presence or absence of IB. ANN was trained using training set with a back-propagation algorithm and test set was used to determine the network's capability to predict outcomes that it has never seen. Diagnostic performance of the trained network was evaluated by constructing receiver operating characteristic (ROC) curve with the area under the curve (AUC), which were also used to determine the best positivity criterion for the model. Several different ANNs with different structures were created. The best-fitted trained network, IBV_D1, was able to predict IB in 73 cases out of 77 (diagnostic accuracy 94.8%) in the training set. Sensitivity and specificity of the trained neural network was 95.5% (42/44, 95% CI, 84.5 - 99.4) and 93.9% (31/33, 95% CI, 79.8 - 99.3), respectively. For testing set, AUC of the ROC curve for the IBV_D1 network was 0.948 (SE=0.086, 95% CI 0.592-0.961) in recognizing IB infection status accurately. At a criterion of 0.7149, the diagnostic accuracy was the highest with a 88.9% with the highest sensitivity of 100%. With this value of sensitivity and specificity together with assumed 44% of IB prevalence, IBV_D1 network showed a PPV of 80% and an NPV of 100%. Based on these findings, the authors conclude that neural network can be successfully applied to the development of a screening model for identifying IB infection in laying hen flocks.

Contents

Chapter 1. Introduction	19
1. Research background	19
2. Research objectives	21
3. Research scope	22
Chapter 2. Current status of domestic and foreign development technology ..	24
1. Studies in foreign countries	24
2. Domestic perspectives	25
3. Current level of technology	26
4. Implication of research results and future prospects	27
Chapter 3. Development of genetic vaccine against IB virus	29
1. Materials and Methods	29
2. Characterization IBV isolates	35
3. RT-PCR for S1 gene and RFLP patterns	35
4. Sequencing of S1 gene and phylogenetic tree	37
5. Sequencing of N1 gene and phylogenetic tree	42
6. DNA vaccine	49
7. Protective efficacy of DNA vaccine	55
Chapter 4. Development of neural network model to manage risk factors for IB ..	59
1. Seroepidemiologic study on the study farms	59
2. Construction of analytical model	113
3. Architecture of ANN and evaluation	121
4. Verification of ANN and probability estimation of IB infection ..	127
5. Application of ANN	140
Chapter 5. Achievement and contribution to related industry	143
Chapter 6. Application plan for research results	147
Chapter 7. References	148

목 차

- 요약문 / 2
- Summary / 9
- Contents / 16

제1장 서론	19
제1절 연구개발의 필요성	19
제2절 연구개발의 목표	21
제3절 연구개발의 내용	22
제2장 국내외 기술개발 현황	24
제1절 국내외의 관련기술의 현황과 문제점	24
제2절 IB 관리를 위한 최근 연구동향	25
제3절 현 기술상태의 취약성	26
제4절 본 연구결과의 의미와 전망	27
제3장 닭 전염성 기관지염 바이러스의 유전자백신 개발	29
제1절 연구개발 내용 및 방법	29
1. IBV의 분리 및 배양	29
2. IBV RNA추출과 정제	29
3. Oligonucleotide Primers	30
4. Reverse Transcriptase (RT)-PCR	30
5. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석에 의한 혈청형 감별	30
6. cDNA의 cloning과 염기서열 분석	31
7. 유전자백신 제조	31
8. <i>In vitro</i> transcription and translation	32
9. 유전자백신의 면역원성 조사	32
제2절 IBV 분리	35
제3절 IBV의 S1 glycoprotein 유전자의 RT-PCR 및 RFLP 분석	35
제4절 IBV의 S1 gene의 sequencing과 phylogenetic tree 작성	37

제5절 IBV N gene의 sequencing과 phylogenetic tree 작성	42
제6절 유전자백신의 제조와 발현 검증	49
1. IBV의 S1 glycoprotein과 N protein gene의 증폭	49
2. 유전자백신 제조	51
3. <i>In vitro</i> transcription/translation에 의한 S1과 N의 유전자 발현의 확인 ..	53
제7절 유전자백신의 면역원성 조사	55
제4장 인공신경망을 이용한 IB 위험인자 관리 기법 개발	59
제1절 전염성기관지염 혈청역학조사	59
1. 연구재료 및 방법	59
2. 연구대상 농가 수 및 계군 당 표본크기 결정	61
3. 계군 모니터링 및 사양관리 특성 파악	66
4. 위험요인 분석	88
5. 혈청학적 검사	104
제2절 위험요인 분석모형	113
1. 로지스틱 회귀모형	113
2. 인공신경망 모형	114
제3절 인공신경망 모델구축 및 평가	121
1. 모형의 요약	121
2. 투입변수	122
제4절 모델검증 및 IB 발생위험 예측	127
1. 분석결과 및 모델검증	127
2. 모형에 근거한 발생위험 예측	132
제5절 인공신경망 응용	140
1. 위험요인의 분류	140
2. 위험요인의 IB 발생위험 기여도	141
제5장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	143
제1절 연구개발목표의 달성도	143
제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도	146
제6장 연구개발결과의 활용계획	147
제7장 참고문헌	148

제1장 서론

제1절 연구개발의 필요성

닭 전염성 기관지염 (IB)의 원인체는 RNA 바이러스인 전염성 기관염 바이러스 (infectious bronchitis virus, IBV)로 전염력이 매우 강한 급성 호흡기성 질병을 일으킨다. 어린 병아리에서 기관수포음, 기침, 재채기, 비루등을 보이는 전형적인 호흡기 증상이 특징적이고 종계나 산란계에서는 호흡기 증상 유무에 관계없이 산란율 저하와 난질의 변화를 초래한다. 산란계에서 IBV는 난관에 감염되어 albumen 단백질의 합성을 저하시켜 비정상적인 ‘watery-white albumen’을 갖는 계란을 생산한다. 이 질병의 특징은 잠복기가 18-36 시간 정도로 매우 짧아 일단 계군에 바이러스가 유입되면 계군사이의 전파가 극히 빠르며 병아리에서 10-50%의 높은 폐사율과 뉴켓슬병이나 전염성후두기관염 등 기타 호흡기성 질환뿐만 아니라 산란저하를 특징으로 하는 산란저하 증후군 등과 감별이 용이하지 않다는 것이다.

특히 신장에 병원성을 나타내는 nephropathogenic IBV가 전 세계적으로 분리되고 있으며 산란계보다는 육계에서 높은 치사율을 보여 그 피해가 매우 크다. 최근에는 IBV가 호흡기뿐만 아니라 생식기, 신장, 장, 근육, Harderian glands, bursa of Fabricius 등 다양한 장기에서 분리되어 오고 있으며 특히 2002년 국내 발생자료에 따르면 다양한 조직 친화성과 병원성이 발현되는 것으로 확인되었다.

국내에서 보고된 연구에 의하면 1986년 초기 발생된 당시에는 주로 어린병아리에서 호흡기 증상으로 인한 생산성 저하와 산란중인 닭에서는 기형란을 동반하는 산란저하 피해가 주류를 이루었으며 이러한 감염 피해는 생독 및 사독백신 사용으로 예방이 가능하였다. 그러나 1990년도 말부터 국내 육계농장에서 육성중인 병아리에서 10%~30% 내외의 폐사와 함께 심한 설사, 신장의 요산침착, 신장염등을 수반하는 신장형 IB 발생이 확인되었고, 산란계 및 종계 사육농장에서는 Massachusetts 형의 IB 백신을 접종한 농장에서도 수란관 낭종과 기형란을 동반하는 피해가 최근까지 지속적으로 발생하고 있다.

정부의 근절계획에 힘입어 지난 5년간 대부분의 바이러스성 질병이 약간의 감소추세를 보이고 있지만 IB 발생은 감소되지 않고 있으며 신고누락율을 감

안하면 오히려 증가하고 있음을 알 수 있다. 국내에서는 본 질병에 대한 학계의 보고가 매우 단편적이어서 정확한 발생규모는 알 수 없지만 발육저하나 대장균과 같은 2차적 세균감염에 의한 산란율 저하를 비롯하여 호흡기형과 신장형을 포함하면 IB로 인한 경제적 피해는 막대한 것으로 추산하고 있다. 또한 IB 바이러스의 유전적 다양성과 지속적인 유전자 변이 가능성은 양계산업에서 향후 지속적인 피해를 야기시킬 소지를 안고 있기 때문에 근본적으로 IB 관리정책의 변화를 요구하고 있다.

혈청형을 결정하는 IBV의 주요 바이러스 중화 항체 결정 부위는 spike protein의 S1 subunit에 존재한다. S1 protein의 단지 몇 개의 아미노산 차이가 다른 혈청형을 나타낼 수 있다. 이렇게 다양한 혈청형을 갖는 IBV의 출현은 이 바이러스에 대한 백신 제조를 어렵게 만든다. IB를 예방하기 위해서는 live vaccine이 필수적인데 새로운 혈청형의 바이러스가 나타날 때마다 병원성을 약화시켜 새로운 live vaccine을 제조하는 것은 현실적으로 많은 시간과 비용이 요구된다. 설령 새로운 혈청형의 백신을 만들더라도 현실적으로 IBV의 변이형 출현속도를 따라잡기는 거의 불가능하다.

혈청형의 다양성을 감안할 때 IB 관리효과의 가장 이상적인 방법은 유행하는 혈청형과 동일한 바이러스를 이용한 백신의 사용이 요구되고 있으나 매년 유행하는 균주의 특성을 정확히 예측해야 하는 문제와 더불어 농장마다 유행하는 바이러스 혈청형의 차이가 많아 백신을 집중하여도 감염될 경우가 많으므로 백신에 의한 질병관리를 더욱 어렵게 한다. 국내 IB 발생규모의 확대와 심각성에 비추어볼 때 국가 방역관리에 소요되는 한정된 자금으로 비용-효과를 극대화하기 위해서는 기존의 백신과는 다른 유효한 DNA 백신개발과 함께 IB의 역학적 특성을 고려한 종합적인 방역대책을 병행하는 것이 IB 관리의 근본적인 해결책이다. 특히 IB는 비말에 의한 공기 감염이 가능하므로 상당한 거리를 두고도 발병, 감염은 폭발적으로 진행될 수 있어 국내의 지리적 여건을 감안하면 전국적으로 확산될 가능성은 상존하며 특히 오염된 계사내에서 바이러스는 4주간 지속된다. 이러한 IB 바이러스 전파의 역학적 특성을 감안하면 먼저 역학적 위험요인을 분석하고 이 결과에 근거한 방역대책을 강구하는 것이 매우 효과적임을 시사한다.

시장개방으로 모든 축산물이 전면 수입 개방되는 상황에서 국제 경쟁력이 없으면 농장을 경영하기 어렵게 되므로 양계 산업에서 주요 바이러스성 질병인 IB 발생을 최소화하기 위한 모든 노력이 경주되어야 한다. 과거와는 달리 종계와 육계 병아리의 품질과 생산성 향상을 위해 시도되는 많은 노력도 이러한 국제적인 추세에 동행하려는 움직임이다. 특히 수입개방시대에 맞추어 국가

에서 정책적으로 시행하는 질병 퇴치 프로그램은 국제적인 기본적인 방역 체계를 유지하면서 생산농장의 생산성 향상에 기여하는 것이 핵심이다. 따라서 앞으로는 질병이 발생되지 않도록 미리 예방하지 않으면 생산물의 판매에도 장애가 될 수 있으므로 한 단계 앞선 방역관리를 유지하고 적용하는 것이 필수적이다. 본 연구를 통하여 양계 종사자가 쉽게 접근할 수 있는 예방대책을 강구하여 적용함으로써 양계 종사자의 심리적 안정감과 고품질의 안전한 축산물이 생산되는데 가치를 더할 수 있게 될 것이다.

제2절 연구개발의 목표

본 연구는 사독 혹은 약독 생독백신에 의한 현행 관리대책의 실효성을 극복하기 위한 대안으로 유전자 백신개발과 위험요인 관리기법을 탐색하고자 수행되었다. 다양한 혈청형이 유행하고 있는 최근의 세계적 발생상황을 고려할 때 전통적으로 백신에 의한 질병관리는 한계가 있을 것으로 판단하여 본 연구에서는 (1) IB 발생농장의 역학적 특성 조사 (2) 닭에서 분리한 IB 바이러스의 유전적 특성 (3) 항원결정 부위를 클로닝한 유전자 백신제조 기법 확립 (4) 제조된 백신의 방어효과 확인 (5) pooling 혈청을 이용한 IB 유병률 추정 (6) 감염에 기여하는 위험요인 분석 (7) IB 관리기법을 확립하기 위한 인공신경망 모형 구축을 목적으로 하였다. 단계별 목표는 다음과 같다.

<1 단계> 국내 IB 발생의 혈청역학적 특성과 국내 IBV 분리주의 특성 규명

- 국내 유행 바이러스 분리 및 유전자 염기서열 조사
- 바이러스주 선발 및 특성규명
- 혈청역학조사를 통한 IB 발생 상황 파악 및 계군 모니터링
- 농장별 위험요인의 분포 조사

<2 단계> 국내 분리주를 이용한 유전자 백신 제조와 위험요인 분석

- 바이러스 분리주의 RFLP 패턴 분석
- IBV 항원결정부위의 클로닝과 유전자백신 제조
- 유전자백신의 in vitro 발현성 조사

- IB 유병률 추정과 국가 방역사업에서 합병혈청의 유용성 평가
 - IB 발생의 위험요인 분석과 감염확률 예측
- <3 단계> 백신의 면역원성 조사와 위험관리 기법 확립을 위한 모형개발

- 유전자백신의 면역원성, 체액성 면역 및 세포매개성 면역 조사
- 백신의 방어효과 시험
- 위험요인의 분석모형 확립
- IB 발생 기여위험도 추정방법 확립
- 인공신경망 모형 확립을 위한 관련기법 고찰과 보완

제3절 연구개발의 내용

세부과제별로 수행한 연구내용은 다음과 같다.

1. 국내 유행 IBV 분리주의 특성 규명 (제1세부)
 - 가. 국내에 유행하는 바이러스 조사 연구
 - 나. 바이러스 유전자 염기서열 조사
 - 다. 유전자백신 제조를 위한 바이러스주 선발 및 특성규명
2. IB 발생 역학조사 (제2세부)
 - 가. 농장별 위험요인의 분포와 규모 조사
 - 나. IB 발생 상황 파악 및 계군 모니터링
 - 다. 사양관리 특성 조사
3. 유전자 백신 제조 (제1세부)
 - 가. IBV 항원결정부위의 클로닝
 - 나. 유전자백신 제조
 - 다. 유전자백신의 in vitro 발현성 조사
4. 위험요인 분석 (제2세부)
 - 가. IB 발생의 경시적 조사
 - 나. 바이러스 분리주의 RFLP 패턴 분석

- 다. 유병률 추정을 위한 합병혈청의 유용성 평가
 - 라. 위험요인 분석모형 결정
 - 마. IB 발생의 위험요인 분석
 - 바. 감염확률 예측
5. 백신의 면역원성 및 방어효과 시험 (제1세부)
- 가. 유전자백신의 면역원성 조사
 - 나. 체액성 면역과 세포매개성 면역 조사
 - 다. 백신의 방어효과 시험
6. 위험관리 기법 확립을 위한 모형개발 (제2세부)
- 가. 유전자백신의 면역원성 조사
 - 나. 체액성 면역과 세포매개성 면역 조사
 - 다. 백신의 방어효과 시험
 - 라. 위험요인의 분석 모형 개발 및 관리 프로그램 확립
 - 마. 위험요인의 IB 발생 기여위험도 추정
 - 바. 인공신경망 모형 확립

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

DNA 백신은 항원부위를 암호화하고 있는 유전자를 포함하는 vector (plasmid)를 직접 숙주에 투여하여 면역반응을 유도하는 새로운 백신 방법이다. DNA 백신은 다음과 같은 이유로 고전적인 백신 방법의 대안으로 제시되고 있다. 첫째, DNA 백신은 바이러스의 유전자 중에서 항원결정 부위를 포함한 일부만을 사용하기 때문에 바이러스의 병원성이 회복될 가능성이 없고, 면역이 저하된 개체에서 감염을 일으키지 않기 때문에 안전하다. 둘째, 항원을 만드는 과정 중에 필요한 단백질 정제 과정이 필요하지 않아 시간과 비용이 절약된다. 셋째, 항원단백질이 숙주세포내에서 만들어지기 때문에 바이러스가 자연 감염된 후에 만들어진 단백질과 유사하고 항원의 종류와 접종부위에 따라 Th1과 Th2 반응을 생성할 수 있어 세포 및 체액성면역 반응을 함께 유도할 수 있다. 넷째, DNA 백신은 지속적인 면역이 가능하다. 다섯째, 동일한 plasmid 내에 특정바이러스의 subtype이나 심지어 다른 바이러스의 유전자를 동시에 포함하는 multiple vaccine도 가능하다.

이와 같은 장점 때문에 DNA 백신은 사람과 동물을 위한 후보 백신으로서 널리 연구되어져 왔으며, 미래의 백신개발을 위하여 커다란 잠재력을 가지는 것으로 여겨지고 있다. 현재까지 동물에 사용될 목적으로 개발된 DNA vaccine은 Bovine herpesvirus, Avian influenza virus, Lymphocytic choriomeningitis virus, Rabies, Bovine diarrhoea virus, Feline immunodeficiency virus, Newcastle disease virus, Mycoplasma pulmonis, infectious bursal disease virus, feline calicivirus, 그리고 Aujeszky's virus 등이 있는데, 대부분의 경우에 중화항체를 생성하고 공격접종에 대하여 방어를 나타내었다. 또한 cytotoxic T lymphocyte 의 활성이 bovine herpesvirus, rabies, Influenza virus 및 lymphocytic choriomeningitis virus 등에서 확인되었다. Lymphocytic choriomeningitis virus 백신은 바이러스의 지속 감염에서 DNA 백신의 효용성을 확인하기 위한 모델로 사용될 수 있다.

이상과 같이 DNA 백신은 외국에서 다양한 항원을 대상으로 제조되어 그 효용성이 확인되어 오고 있는 실정이지만 국내에서는 이에 대한 연구가 거의

이루어지지 않고 있기 때문에 국내에서도 이 분야에 대한 연구가 매우 시급한 실정이다. DNA 백신을 이용한 IB백신을 제조하는 기술이 확립되어 이용할 수 있게 되면 새로운 혈청형의 IBV가 나타나더라도 바로 항원결정 부위를 클로닝하여 DNA 백신을 제조하여 이용할 수 있게 되어 효과적인 IB의 예방이 가능할 것으로 판단된다.

미국을 비롯한 선진 축산국에서 역학적 위험요인 분석에 근거하여 국가 단위 관리 프로그램을 개발한 사례는 있지만 국내에서 수행된 연구는 없다. 국가별 IB 발생의 역학적 특성은 많은 차이를 보이기 때문에 국내 양계 농장에서 발생하는 IB에 대한 역학조사가 반드시 선행되어야 한다. 특히 최근 유행의 주류를 이루고 있는 IB 바이러스는 변이형이며 야외농장에서 쉽게 변이될 뿐만 아니라 서로 다른 혈청형들간에는 상호 교차교차면역이 되지 않기 때문에 백신 접종만으로 확실한 예방 효과를 기대하기는 어렵다.

제2절 IB 관리를 위한 최근 연구동향

현재 IB를 예방하기 위하여 다양한 종류의 백신이 사용되고 있지만 이 질병은 우리나라를 포함하여 양계산업을 하는 모든 나라에서 지속적으로 문제가 되고 있다. 미국동물건강협회 (US Animal Health Association)의 조류전염성 질병위원회 (Committee on transmissible disease of poultry)에서는 육계에서 Marek's disease, MG/MS와 더불어 IB를 가장 중요한 질병으로 지정하고 있다.

IB가 관리되지 않는 이유는 야외 분리주와 현재 사용되고 있는 백신주가 항원적 (혈청학적)으로 다르기 때문이다. 최근의 세계적인 발생상황에서 보듯이 8종 이상의 다양한 혈청형이 유행하고 있으며 서로 다른 혈청형간에는 교차면역이 잘 되지 않고 또한 원인 바이러스는 비교적 쉽게 변이되어 변이형 바이러스가 출현하는 빈도가 매우 높다. 이렇게 항원적으로 서로 다르면 백신을 사용하여도 완전한 방어가 이루어지지 않는데 문제가 있다. IBV의 원형 (prototype) 바이러스는 Massachusetts M41이다. Jungherr 등 (1956)에 의하여 다른 혈청형의 바이러스 (Connecticut)가 처음 확인된 이래 새로운 혈청형의 IBV가 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 계속 분리되어 오고 있다. 미국의 경우 California Veterinary Diagnostic Laboratory가 1995년부터 분리동정한 594주의 IBV 중에서 59%인 336주는 표준 IBV 혈청형으로 분류할 수 없어 California variant로 분류된 사례가 있다. 이러한 변이주의 지속적인 출현은

기존의 백신으로 완전한 방어가 이루어지지 않기 때문에 IBV에 의한 피해가 계속 증가할 수밖에 없는 실정이다.

표준형에서 변이된 혈청형이 꾸준히 분리되는 상황은 외국이나 우리나라에서 동일하며 새로운 IBV의 가장 일반적인 source는 다연령 산란계군이다. 다연령 산란계군, 병아리의 정기적인 입식 그리고 산란계에서 IBV의 재순환 등은 “all in-all out”하는 대부분의 육계 생산지역보다 IBV의 감염과 전파의 기회를 높게 한다. 게다가 산란계의 오랜 사육기간 또한 새로운 변이 혈청형 IBV의 출현을 증가시킬 수 있는 요소이다.

새로운 변이주들은 바이러스가 감수성 있는 세포에 결합하는데 관계되는 필수 유전자의 돌연변이에 의하여 생성된다. 이러한 변이때문에 Massachusetts, Connecticut, Arkansas형의 바이러스 또는 다른 불활화 백신으로 백신을 하더라도 바이러스가 세포에 결합하고 증식하여 질병을 일으킨다. IBV의 진화에는 여러 가지 요인들이 관여한다고 알려져 있다. 즉 야외에서 IBV변이주의 생성은 point mutation, deletion, insertion, recombination에 의하여 생성되는 것으로 알려져 있다. 이러한 변이는 백신을 위한 여러 종류의 IBV strain의 사용, 밀집사육, 숙주의 면역상태등에 의하여 촉진될 수 있다.

제3절 현 기술상태의 취약성

국내 양계산업이 산업화되기 시작하면서 질병을 효과적으로 관리하기 위하여 계사 소독이나 환기 유지와 같은 전통적인 방법과 아울러 백신접종이 주종을 이루고 있으나 큰 효과를 거두지 못하고 있다. 그 주된 이유는 최근의 세계적인 발생상황에서 보듯이 매우 다양한 혈청형이 유행하고 있으며 서로 다른 혈청형간에는 교차면역이 잘 되지 않고 또한 원인 바이러스는 비교적 쉽게 변이되어 변이형 바이러스가 출현하는 빈도가 매우 높기 때문이다. 국내에서는 86년에 최초로 보고되면서 IB 발생이 공식적으로 확인되었으며, 현재 전세계적으로 발생하고 있는 Massachusetts 형과 유사한 유전형으로 분류된 바 있으나 유입경로와 주요 유전형이 무엇인지에 대한 구체적인 증거가 제시된바 없다. 더구나 이러한 혈청형의 다양성을 감안할 때 예방의 효과를 극대화하기 위해서는 유행하는 혈청형과 동일한 바이러스를 이용한 백신의 사용이 요구되고 있으나 매년 유행하는 균주의 특성을 정확히 예측해야 하는 문제와 더불어 농장마다 유행 하는 바이러스 혈청형의 차이가 많아 백신을 접종하여도 감염될

경우가 많으므로 백신에 의한 질병관리를 더욱 어렵게 하고 있으며 실용적인 측면에서 볼 때 백신접종만으로 IB에 대한 예방대책을 수립하는 것은 근본적으로 한계가 있다. 이러한 문제의 심각성에 비추어볼 때 국내에서 IB 발생 규모를 비롯한 역학적 특성을 규명하고 국내 분리주를 사용한 유전자 백신개발은 그 대안으로 매우 중요한 의미를 갖는다.

최근 들어 국내외에서 보고된 질병발생 형태를 보면 단일 바이러스에 의한 것이 아니라 여러 가지 혈청형이 유행하고 있음을 시사하고 있다. 현재 사독 혹은 약독 생독백신을 이용한 예방법이 시행되고 있지만 다양한 혈청형이 보고됨에 따라 백신에 의한 예방관리가 실효를 거두기 위해서는 상당한 기술적인 문제가 선행되어야하는 한계를 지니고 있다. 따라서 유전자 백신을 이용한 IB백신을 제조하는 기술이 확립되어 이용할 수 있게 되면, 새로운 혈청형의 IBV가 나타나더라도 바로 항원결정 부위를 클로닝하여 유전자 백신을 제조하여 이용할 수 있게 되어 효과적인 IB의 예방이 가능할 것으로 판단된다.

제4절 본 연구결과의 의미와 전망

현재 사용 중인 백신 중에서도 생백신의 경우 면역원성을 유지하며 병원성을 저하시키는 과정에서의 기술적 어려움, 병원체의 병원성 회복 가능성이 상존하고, 불활화 백신의 경우 안전성은 높으나 낮은 면역유도능력 특히 세포매개성 면역이 문제가 되고 있다. 이와 같은 단점을 극복하기 위하여 여러 축종에 질병을 유발하는 병원체를 이용하여 유전자 백신의 다양한 연구가 진행되어 왔고 향후 백신개발은 유전자 백신으로 더욱 가속화될 것으로 판단된다. 백신을 이용하여 전염병을 예방하려는 노력은 현재까지 계속되고 있지만 특히 IB 바이러스의 경우 유전자 변이능력과 국가별 사육환경이나 IB 발생의 차이를 고려할 때 유효한 백신 개발과 국내 IB 역학적 특성을 고려한 관리대책을 병행하는 것이 매우 중요한 과제다. 미국의 경우에서도 보듯이 위험관리 기법에 근거한 전염성 질병 관리는 세계적인 추세다. 본 과제를 통한 예방 프로그램의 효과가 만족스럽게 도출된다면 이 기법을 다른 질병에도 쉽게 응용할 수 있어 양계관련 산업의 안정적 생산기반을 조성할 것이다. 특정 질병에 대한 백신은 원인체와 항원성이 밀접하게 관련이 있어야 그 효과를 기대할 수 있다. 현재 국내에서 유행하는 IB 바이러스의 경우 외국에서 분리되는 IB 바이러스와 유전적자 특성이 매우 다른 것으로 보고된다는 것을 고려할 때 항원성이

다른 바이러스로 만든 백신은 국내에서 유행하는 바이러스와 항원성의 차이로 그 효과가 매우 제한되거나 이론적으로 효과가 없을 것으로 판단된다. 따라서 국내 바이러스 분리주를 이용한 유전자 백신 개발은 지속될 것으로 전망된다.

제3장 닭 전염성 기관지염 바이러스의 유전자 백신 개발

제1절 연구개발내용 및 방법

본 연구의 내용은 국내에서 유행하고 있는 IBV의 특성을 분자생물학적으로 규명하고, 국내에서 문제가 되는 IB 바이러스를 선발한 다음 중화항체와 항원형 (혈청형)의 특이성을 결정하는 IBV의 유전자를 reverse transcription과 polymerase chain reaction (RT-PCR)으로 증폭시킨 다음 증폭된 유전자를 eukaryotic expression vector plasmid에 클로닝하여 유전자백신을 제조하고, 대장균에서 recombinant plasmid를 다량 확보한 후 *in vitro*와 *in vivo* 에서 클로닝한 유전자의 발현을 확인하고 면역반응을 규명하는 것이다. 구체적인 연구내용과 방법은 다음과 같다.

1. IBV의 분리 및 배양

국내에서 유행하는 IBV는 IB가 의심되는 닭의 장기(기관, 폐, 신장등)로부터 직접 분리하여 실험에 사용하였다. 장기를 채취하여 유제를 만들어 원심 분리한 다음, 상층액을 여과 후 발육계란의 chorioallantoic cavity(CAC)에 접종하여 바이러스를 증식시켰다. 증식된 바이러스는 IBV 특이 PCR과 계태아 증상으로 IBV의 유무를 확인하였다. IBV field strain은 계태아에 초대 접종하였을 때 계태아에 적응되지 않아 증상을 나타내지 않을 수 있으므로 최소한 3대까지 계태아에서 계태배양을 실시하였다. IBV로 확인된 바이러스는 CAC에 접종하여 증식시킨 다음 실험에 사용하였다.

2. IBV RNA추출과 정제

바이러스를 감염시킨 계태아에서 chorioallantoic fluid(CAF)를 취하여 바이러스 RNA추출을 위한 재료로 사용하였다. 바이러스 RNA는 다음 방법에 따라 추출하였다. Sodium dodecyl sulfate(최종농도 2%)와 proteinase K(최종농

도 250 μ g/ml)를 CAF에 더하고 55 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지시킨 후 acid phenol(pH 4.0)과 chloroform/isoamyl alcohol(49:1)로 RNA를 추출한다. 추출된 RNA는 RNaid kit를 사용하여 정제하였다.

3. Oligonucleotide Primers

IBV로부터 정제한 RNA의 reverse transcription과 PCR을 위한 primer는 발표된 IBV 염기서열을 참고로 하여 선택하였다. RT-PCR을 이용하여 S1 gene을 증폭시키기 위하여 사용한 primer는 forward primer로 S1OLIGO5 (5TGAAAACCTGAACAAAAGA3) 또는 NEWS1OLIGO5 (5TGAAAACCTGAACAAAAGAC3) 그리고 reverse primer로 S1OLIGO3 (CTAAACTAACATAAGGGC3) 또는 degenerate3-2 (5CCATAAGTAACATAAGGGCAA3) primer pair를 사용하였다. Ngene을 증폭하기 위한 primer는 forward primer IBVNF (5'-GGGAAAACCTGTGAGGAACA-3') 와 reverse primer IBVNR (5'-GCAGGTCCATTATGTTA-3')를 사용하였다.

4. Reverse Transcriptase reaction과 Polymerase Chain Reaction

RT반응액은 10X PCR buffer(500mM KCl, 200mM Tris HCl) 2 μ l, 10mM 각 dNTP 2 μ l, 250ng antisense primer, 40 unit RNasin, 80mM MgCl₂ 1.5 μ l와 준비된 RNA를 함유하고 전체 반응액 20 μ l는 멸균된 DEPC로 처리한 증류수를 더하여 얻었다. 이 반응액을 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리 후 200 unit의 Molony murine leukemia virus RT를 더하고 45 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. PCR을 위하여 10X PCR buffer 8 μ l, 250ng의 sense primer, 80mM MgCl₂ 3.5 μ l 그리고 5 unit의 Taq DNA polymerase를 반응액에 더하고 최종반응액 100 μ l는 멸균된 증류수를 더하여 얻었다. PCR 반응액은 94 $^{\circ}$ C에서 1분의 denaturation, 45 $^{\circ}$ C에서 2분의 annealing 그리고 74 $^{\circ}$ C에서 5분의 polymerization을 한 cycle로 35 cycle 실행하였다. PCR product는 ethidium bromide를 포함하는 1% agarose gel에서 분석하였다.

5. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석에 의한 혈청형 감별

증폭된 PCR생성물은 이미 발표된 IBV의 염기서열을 참고로 하여 선택한 제한효소로 처리하였다. 만약 비특이적인 PCR생성물들이 제한효소에 의한

profile의 분석에 장애가 될 경우에는 제한효소로 소화시키기 전에 GeneClean kit를 사용하여 정제한 다음 소화시켰다. 소화된 PCR생성물의 RFLP pattern을 2% agarose gel에서 전기영동 후 관찰하여 혈청형을 감별하였다.

6. cDNA의 cloning과 염기서열 분석

예상된 size를 갖는 PCR 생성물을 agarose gel에서 잘라낸 후 cDNA를 정제하였다. 정제된 cDNA를 TOPO TA cloning vector에 ligation시킨 후 competent *Escherichia coli*로 transformation시킨 후 recombinant plasmid를 갖는 백색집락을 kanamycin과 X-gal이 들어있는 Luria-Bertani agar에서 선택하였다. Alkaline lysis 방법으로 plasmid DNA를 분리한 다음 제한효소로 처리하여 insert의 size를 결정하였다. 예상한 insert가 확인되면 cesium chloride density gradient centrifugation 방법으로 염기서열 분석을 위한 다량의 plasmid를 준비하였다. 원하는 insert가 확인된 plasmid를 정제한 다음 denaturation시킨 후 dideoxy chain termination방법으로 염기서열을 분석하였다. Insert의 size가 클 경우에는 추가적으로 primer를 합성하여 사용하였다. 염기와 아미노산 서열 data의 분석은 컴퓨터 프로그램 DNASIS를 이용하였다.

이상과 같은 방법으로 국내에서 분리된 IB 바이러스의 유전자적 특성을 규명한 다음 유전자백신 작성을 위한 바이러스주를 선발하여 유전자백신을 제조하였다. IBV로부터 정제한 RNA의 reverse transcription과 PCR을 위한 primer는 발표된 IBV 염기서열을 참고로 하여 IBV의 항원결정 부위로 알려진 유전자부위를 포함할 수 있게 선택하였다.

7. 유전자백신 제조

준비한 RNA에 3 μ g random hexamer와 1 μ l 10mM dNTPs 를 더하고 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응 시킨 뒤에, 4 μ l 5X 1st strand buffer, 2 μ l 0.1M DTT, 1 μ l RNase inhibitor를 더하여 25 $^{\circ}$ C에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시켰다. 1 μ l Superscript II reverse transcriptase (200unit/ μ l)를 더하여, 42 $^{\circ}$ C에서 50분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 다음, Ribonuclease H를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분, 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 합성된 cDNA를 증폭시키기 위하여 3 μ l cDNA에 25 μ l PCR premix (1.25unit/25 μ l TaKaRa Ex Taq polymerase, 0.4mM dNTPs, Ex TaqTM buffer including 4mM Mg²⁺, TaKaRa, Shiga, Japan), 1 μ l forward 와 reverse primer를 첨가한 후에 전체 반응액이 50 μ l가 되도록 멸

균증류수를 더하였다. PCR 반응은 94°C에서 30초간 denaturation, 51°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 4분간 polymerization을 35회 실시하고, 마지막 반응에서는 polymerization을 74°C에서 15분간 실시하였다.

증폭된 PCR products를 GENE CLEAN[®] Turbo kit를 이용하여 정제하였고, 정제된 DNA는 pcDNA3.1/V5/His-TOPO와 같은 cloning & expression vector에 5분간 ligation 반응을 시킨 뒤, 2 μ l의 ligation 반응액을 competent cells (*Escherichia coli* TOP10)에 혼합하여 얼음 위에서 20분간 정치시킨 후, 42°C에서 30초간 heat-shock를 주는 One Shot[®] chemical Transformation을 이용하였다. 250 μ l의 SOC medium을 첨가하여 37°C 진탕배양기에서 225 RPM으로 1시간 동안 배양하고, 항생제가 첨가된 LB agar에 배양액을 접종한 다음 24시간 배양 후, 다수의 단일 집락을 LB broth에 증식시킨 후 DNA plasmid를 분리하였다. 클로닝한 유전자를 확인할 수 있는 제한효소를 이용하여 분리한 plasmid를 소화시켜 후 클로닝된 유전자를 확인한 후 plasmid를 준비하여 염기서열을 결정하였다. 이것을 DNASIS version 2.1 software로 eukaryotic expression vector에 클로닝 전에 확인된 IBV의 염기와 비교하여 항원결정부위 유전자가 올바른 방향으로 클로닝된 집락을 선택하였고, EndoFree[™] Plasmid Giga Kit를 이용하여 대량의 plasmid를 확보하였다.

8. *In vitro* transcription and translation

제조된 유전자백신의 발현은 TnT[®]T7Quick Coupled Transcription/ Translation Systems (Promega)과 Transcend[™] Colorimetric Translation Detection System 등과 같은 발현시스템을 이용하여 검증하였다.

9. 유전자백신의 면역원성 조사

In vitro 에서 유전자의 발현을 확인한 유전자 백신은 chicken에서 유전자 백신의 발현여부를 조사하였다. 본 연구에서는 최종적으로 유전자 발현이 확인된 유전자백신 중 S1 gene과 N gene 분석결과와 phylogenetic tree 분석결과를 기준으로 선발한 pcDNA-K507-S1 과 pcDNA-K507-N (expression vector-IBV strain-cloned gene) 을 실험 유전자백신으로 선발하여 실험에 사용하였다 <Table 3-1>.

Table 3-1. Experimental procedure for DNA vaccination and challenge with homologous IBV507-01

Group	1st vaccine ^A	2nd vaccine ^A	Challenge ^{BC}
1. Normal control (NC)	No	No	No
2. Challenge control (CC)	No	No	Yes
3. Vector control (VC)	pcDNA	pcDNA	Yes
4. pcDNA507-S1 (S1)	pcDNA507-S1	pcDNA507-S1	Yes
5. pcDNA507-N (N)	pcDNA507-N	pcDNA507-N	Yes
6. pcDNA507-S1 + pcDNA507-N (S1+N)	pcDNA507-S1 +pcDNA507-N	pcDNA507-S1 + pcDNA507-N	Yes

^AChickens (12 / group) in groups 3, 4, 5, and 6 were vaccinated with 200 µg of the pcDNA empty vector or pcDNA507-S1 or pcDNA507-N or 200 µg of pcDNA507-S1 plus 200 µg of pcDNA507-N at 1 week and at 3 weeks old.

^BChallenge by intraocular inoculation with the K507-01 ($10^{4.5}$ EID₅₀/bird) 2 weeks after the second vaccination.

^CProtection was evaluated by the absence of challenge virus in kidneys and trachea. Trachea and kidney samples were collected and homogenized. The supernatants were inoculated in 9-to-11-day-old embryos. After two blind passages, Re-identification of the challenge virus were performed using dot-blot immunoblotting assay (Song *et al.*, 1998).

유전자백신을 근육으로 접종 후에 유전자 발현에 의한 면역반응의 생성여부를 체액성 면역과 세포매개성 면역으로 검사하고 공격접종 후 방어효과는 신장과 기관에서 바이러스의 검출여부로 확인하였다. 체액성 면역은 IBV 특이 항체를 혈구응집억제 시험을 이용하여 검사하였고 세포매개성 면역은 공격접종하기 전에 채혈하여 분리한 peripheral blood lymphocyte를 이용한 lymphocyte proliferation assay (Kim등, 2004)를 이용하여 검사하였다. 공격접종 후에 기관과 신장에서 바이러스 분리는 Song등(1998)에 의하여 개발된 dot-blot immunoblotting assay를 이용하여 확인하였다.

Table 3-2. History of Korean IBV field isolates, RFLP patterns, and GenBank accession numbers

	IBV isolates	Organs ¹ used for virus isolation	Chicken type ²	Age of IB outbreak (days)	PCR-RFLP patterns	GenBank accession numbers
1	K434-01	CT	B	28	Arkansas	AY790368
2	K748-01	K	B	37	KM91 ³	AY790359
3	K058-02	T	B	70	KM91	AY790360
4	K044-02	K	B	60	KM91	AY790358
5	K117-02	T	B	70	KM91	AY790362
6	K234-02	T	B	16	KM91	AY790361
7	K545-02	K	BB	14	Variant	AY790366
8	K514-03	CT	BB	14	KM91	AY790365
9	K10217-03	K	BB	35	Variant	AY790363
10	K1255-03	CT	BB	14	Variant	AY790364
11	K3-3	K	B		Variant	AY790367
12	K2-6	CT	BB		Variant	AY790369

¹K = Kidney, T = Trachea, CT = Cecal tonsil.

²B = Broiler.

³KM91 was the representative isolate of Korean IBV isolates determined as genotype III which showed a distinct RFLP pattern in PCR-RFLP analysis (Song등, 1998).

제2절 IBV 분리

IB로 의심되는 닭으로부터 모두 12주의 IB 바이러스를 분리하였다 <Table 3-2>. IB 바이러스는 기관에서 3, 신장에서 5, 그리고 맹장 (cecal tonsil)에서 4주가 분리되었고, 육계와 육용종계에서 각각 7주와 5주가 분리되었다.

제3절 IBV의 S1 glycoprotein 유전자의 RT-PCR 및 RFLP 분석

분리한 IB 바이러스의 S1 유전자를 RT-PCR을 이용하여 증폭하였고 RFLP를 분석하였다. IB 바이러스 분리주들은 모두 약 1,720 bp의 예상된 크기를 나타내는 PCR product를 생성하였다 <Fig 3-1>.

RT-PCR로 증폭한 S1 glycoprotein gene을 제한효소인 *Hae*III로 처리한 후 RFLP pattern을 조사하였다. 10주의 분리주 중 6주 (K748-01, K058-02, K117-02, K234-02, K514-03, K044-02)는 KM91 type으로 나타났고, 1주 (K434-01)는 Arkansas type으로 나머지 5주 (K545-02, K10217-03, K1255-03, K3-3, K2-6)는 기존의 RFLP type과는 다른 변이형으로 나타났다. 변이형 중 K2-6는 다른 3 바이러스와 다른 RFLP type을 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때 국내에는 다양한 유전자적 특성을 갖는 IBV가 공존하며 지속적인 유전자적 변이를 일으키는 것으로 추정된다 <Fig 3-2>.

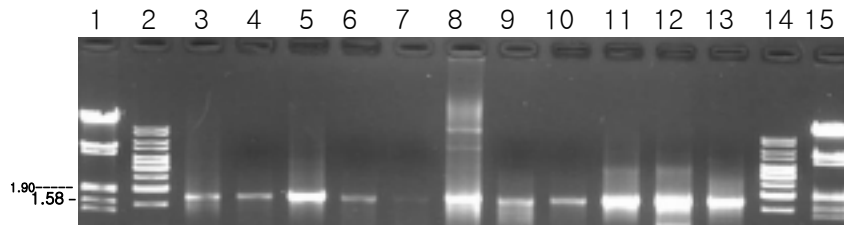


Fig 3-1. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified S1 glycoprotein genes from Koean IBV isolates. Lanes 1 and 14 = molecular weight markers, molecular weight markers, lambda DNA digested with *HindIII* and *EcoRI* ; 2 and 14= GeneRulerTM 1 kb DNA ladder ; 3 = K748-01; 4 = K058-02 ; 5 = K117-02 ; 6 = K234-02 ; 7 = K514-03 ; 8 = K10217-03 ; 9 = K434-01 ; 10 = K044-02 ; 11 = K1255-03 ; 12 = K3-3 ; 13 = K2-6. Numbers at left are molecular weight markers in kilobase pairs.

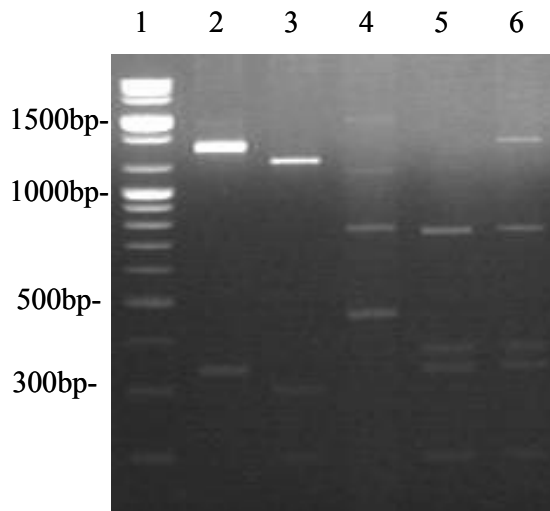


Fig 3-2. RFLP patterns of the PCR-amplified S1 glycoprotein genes from Korean IBV isolates digested with restriction enzyme *Hae III*. 1= 100bp Plus DNA Ladder ; 2 = K044-02 ; 3 = K281-01 ; 4 = K 3-3; 5 = K2-6; 6= K545-02.

제4절 IBV의 S1 gene의 sequencing과 phylogenetic tree 작성

IBV 국내분리주의 염기서열 분석결과 국내분리주의 경우 71.2% (K545-02 and K3-3) - 99.7% (K748-01 and K117-02)의 염기서열 유사성을 나타내었고 외국분리주와는 45.9% (DE072 and K2-6) - 80.7% (H120 and K044-02)이 유사성을 나타내었다 <Table 3-3; Fig 3-3>. 아미노산 서열 비교결과 국내분리주의 경우 71.5% (K545-02 and K3-3) - 99.3% (K748-01 and K117-02)의 유사성을 외국분리주와는 44.9% (DE072 and K2-6) - 80.3% (BEAU and K044-02)이 유사성을 나타내었다.

결정된 아미노산서열을 발표된 국내분리주 그리고 외국분리주와 비교하였을 때 53-96, 115-163, and 268-398 (numbering is in reference to Mass41 strain) 부위에서 가장 많은 변이가 관찰되었다. 결정된 아미노산 서열을 기초로 작성된 phylogenetic tree 분석결과 <Fig 3-4> 국내에서 분리된 12주의 3 branch로 분류되었다. 최근 분리주들 (K10207-03, K3-3, and K1255-03)이 독립적인 branch를 형성하였고, 6 IBVs (K514-03, K044-02, K058-02, K234-02, K117-02, and K748-01)가 두 번째 branch으로 분류되었는데 이들은 이전 분석에서 KM91 type으로 분류된 바이러스 (K069-01, K774-01, K507-01) 와 동일한 그룹으로 분류되었다. 그리고 K2-6, K434-01와 K545-02등은 IBV Ark99 과 Gray strain 계열로 분류되었다.

Table 3-3. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S1 glycoprotein gene of 12 Korean IBV isolates and non-Korean

		Deduced amino acid similarity in upper triangle																											
		K281-01	K354-01	K375-01	K379-01	K381-02	K385-02	K388-02	K395-05	A689	Besante	Ca99	D146	DE92	Gay	H52	JH147	K3823	M979	Q389V	TW974	Vic5	V1891						
K281-01	***	98.3	96.1	95.4	96.1	96.1	95.9	96.0	95.9	92.9	95.4	95.2	93.9	95.6	94.1	95.6	95.6	92.5	92.4	96.0	92.7	98.2							
K354-01	98.8	***	96.6	95.1	96.1	95.8	94.1	96.2	94.1	93.2	95.8	92.9	94.1	94.1	94.4	95.8	95.9	92.0	91.9	96.2	92.9	97.7							
K375-01	96.7	96.7	***	96.4	96.6	94.9	95.6	96.2	96.6	92.9	94.8	95.2	94.6	95.2	93.9	96.6	94.4	91.3	91.8	96.0	92.4	97.9							
K379-01	95.8	95.5	95.5	***	94.1	94.4	92.4	96.0	95.4	91.9	94.5	92.9	94.1	92.0	93.2	95.4	95.2	90.3	91.2	95.2	91.9	97.0							
K381-02	95.1	95.0	95.1	95.6	***	94.9	92.9	96.4	94.4	92.9	95.8	92.4	94.1	92.9	94.0	95.6	95.9	91.3	91.2	95.5	92.9	98.6							
K385-02	96.7	96.4	95.5	94.8	95.5	***	92.4	95.2	95.4	93.1	91.9	93.6	92.9	94.1	94.9	95.1	90.8	91.7	95.2	92.4	97.4								
K388-02	91.5	91.1	90.4	90.6	91.7	89.3	***	91.4	92.2	91.7	94.3	95.8	93.6	92.9	92.2	94.9	94.4	91.0	91.7	95.7	91.7	98.9							
K395-05	86.9	86.7	86.4	86.5	86.5	85.5	85.8	***	90.0	89.0	89.3	89.7	90.2	89.5	89.5	91.4	90.0	89.6	92.2	88.7	90.8	98.8							
A689	95.1	93.3	95.1	92.7	92.6	92.8	91.4	89.8	***	92.4	92.8	92.2	95.6	94.6	93.9	97.1	95.1	91.3	91.8	96.5	92.4	97.7							
Besante	91.0	90.8	90.2	89.8	90.3	90.8	90.1	89.6	91.9	***	92.4	91.4	92.2	91.7	94.1	94.4	95.4	90.8	89.7	96.2	93.6	97.9							
Ca99	93.6	93.1	92.3	94.6	92.5	92.5	93.4	86.8	94.7	92.0	***	91.2	94.8	93.1	92.7	96.2	94.5	87.2	90.7	96.8	99.0	96.7							
D146	91.9	91.1	90.4	92.5	91.4	90.8	94.6	89.2	91.6	90.1	93.9	***	94.4	92.4	92.2	95.1	94.1	91.3	90.5	96.2	91.7	98.4							
DE92	92.3	92.3	92.7	95.1	92.1	92.2	92.8	89.8	91.6	91.1	92.2	92.4	***	93.1	93.6	94.8	95.4	90.8	90.2	96.7	92.9	97.5							
Gay	92.1	92.9	91.7	91.5	92.2	91.3	90.7	89.1	93.8	92.0	93.8	91.2	95.1	***	93.6	96.1	94.9	96.5	89.2	96.2	92.4	97.0							
H52	91.8	91.6	91.1	91.0	91.5	90.7	90.1	86.8	92.8	92.4	92.3	89.9	91.8	92.4	***	93.4	94.1	92.8	90.8	96.5	95.9	96.7							
JH147	94.6	94.4	94.1	95.4	94.1	93.8	93.8	86.4	97.3	92.9	96.8	92.7	96.4	96.2	93.5	***	96.3	92.5	91.4	92.2	95.6	98.7							
K3823	92.8	92.9	92.6	95.0	92.1	92.1	92.2	86.1	93.3	91.2	94.5	91.3	95.7	92.9	91.7	94.6	***	92.3	90.7	96.7	92.9	97.7							
M979	87.5	87.8	86.8	86.3	87.1	86.3	86.2	84.3	87.5	87.9	84.8	85.5	84.8	86.7	89.2	88.2	87.3	***	90.8	91.3	92.5	89.2							
Q389V	87.3	86.9	86.2	86.7	85.7	86.3	86.8	80.5	86.8	83.5	87.8	84.6	84.0	83.1	85.4	86.3	86.3	84.6	***	87.8	91.0	98.2							
TW974	87.4	87.2	87.1	86.3	86.3	85.8	86.8	85.1	87.2	87.5	88.8	86.3	86.9	87.3	87.2	88.4	87.6	85.8	84.0	***	90.0	98.2							
Vic5	88.8	88.8	87.6	87.8	88.2	87.2	87.2	84.8	88.5	88.5	87.5	86.7	88.4	87.6	89.7	89.8	88.3	91.1	85.5	84.6	***	97.5							
V1891	98.5	98.7	98.8	98.2	98.0	97.4	97.9	98.6	96.7	97.2	94.9	97.8	96.9	95.8	95.9	97.7	98.1	97.6	96.9	97.8	97.8	97.8	***						

Nucleotide similarity in lower triangle

K148-01	MLKSLFLAI	ILCALGSA	+++MMITFY	YQAFRPPG	PHLGGAYAV	WNSWYTMK	GSANCTNSR	IKDVMGSA	SIAMTAP	GG	MARSGSPG	95
K434-01	---VFP-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---S2	---D-B	---ESTP	---W-A-A	---YQSK-F	---H	---S-T-E	---	96
K2-4	---V-V	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	97
K044-02	---V-VT	---F	YD-D	---	---	---	---	---	---	---	---	98
K068-02	---M-VT	---W	YD+D	---	---	---	---	---	---	---	---	99
K111-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	100
K154-02	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	101
K10217-03	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	102
K1234-02	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	103
K1255-03	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	104
K089-01	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	105
AR939	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	106
GR81	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	107
DE072	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	108
DEAU	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	109
H120	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	110
MA5541	---V-VT	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	111
K148-01	AKMFEIV	FVTHYSSSS	GGPITGMP	QGHIRISAKK	NOS++++L	FYMLTVGSK	YRPSKGLCN	NFTSVYLMG	BLVFTGNT	11	QVTSAGYFK	189
K434-01	---N-V	---FV-B-N	YD-E-T	---	---	---	---	---	---	---	---	190
K2-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	191
K044-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	192
K068-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	193
K111-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	194
K154-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	195
K10217-03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	196
K1234-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	197
K1255-03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	198
K089-01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	199
AR939	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	200
GR81	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	201
DE072	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	202
DEAU	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	203
H120	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	204
MA5541	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	205
K148-02	AGQVWYIM	KFFVLYAV	NGVQDVILC	DDPPELLAC	QYNTGFSQG	FYFTNSSLV	S+DQVYVRE	SVNTLILIT	NFTVINEIM	12	SPNQQVHTI	208
K434-01	---IT-KV	---R-V-A	---A	---S-KG	---	---	---	---	---	---	---	209
K2-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	210
K044-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	211
K068-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	212
K111-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	213
K154-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	214
K10217-03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	215
K1234-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	216
K1255-03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	217
K089-01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	218
AR939	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	219
GR81	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	220
DE072	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	221
DEAU	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	222
H120	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	223
MA5541	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	224
K148-01	STGDTAGS	GYNFWLFL	SSFYKESNF	MSSYHP+++	*SDFRPEI	NMLNFWLS	ISLAKPLEG	GGKGSWSSR	ATDCRAYSYN	6	S+PRAKRY	303
K434-01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	304
K2-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	305
K044-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	306
K068-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	307
K111-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	308
K154-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	309
K10217-03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	310
K1234-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	311
K1255-03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	312
K089-01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	313
AR939	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	314
GR81	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	315
DE072	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	316
DEAU	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	317
H120	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	318
MA5541	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	319
K148-01	AGLQGFEC	GLLVYVYKSD	GSRLGATEP	FWITQBYNM	ITLMTCHYIN	IYGRISRFI	TNNTDSSSY	NVLASMLAI	LTSSAIDIF	13	VGGSHLMY	483
K434-01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	484
K2-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	485
K044-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	486
K068-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	487
K111-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	488
K154-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	489
K10217-03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	490
K1234-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	491
K1255-03	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	492
K089-01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	493
AR939	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	494
GR81	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	495
DE072	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	496
DEAU	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	497
H120	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	498
MA5541	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	499

K748-01	YKVNPCEDVN	QQFVVSQGL	VGILTSHNET	GSQPLENQFY	IKLTKETRRF	RR	535
K434-01	-----	-----	-----R-----	-----	-----	-----S-----	548
K2-6	-----G-----	-----R-----	-----R-----	-----F-----	-----TG-----	-----	544
K044-02	-----	-----	-----R-----	-----	-----	-----	539
K058-02	-----	-----	-----S-----R-----	-----	-----	-----T-----	540
K117-02	-----	-----	-----	-----	-----	-----	535
K234-02	-----	-----	-----	-----	-----	-----	540
K545-02	-----G-----	-----	-----R-----	-----	-----F-----TG-----	-----	544
K3-3	-----	-----NI-----	-----R-----	EDV	V	NSSH R	541
K10217-03	-----	-----NI-----	-----R-----	EDV	V	NSSH R	540
K1255-03	-----	-----NI-----	-----R-----	EDV	V	NSSH R	540
K514-03	-----	-----	-----R-----	-----	-----	-----	535
K069-01	-----	-----	-----R-----	-----	-----	-----	535
ARK99	-----L-----	-----	-----R-----	-----	-----	-----I-NG-H-S-----	543
GRAY	-----	-----	-----R-----	D-L	---	I-NG-S-----	543
DE072	-----S-I-----	E-Y-----N-----	K-N-Q	VA-G-GDM	V-FSTSS-	I-----	539
BEAU	-----	-----	-----R-----	-----L-----	-----	-----I-NG-----	537
H120	-----	-----	-----R-----	-----L-----	-----	-----I-NG-----	537
MASS41	-----	-----	-----R-----	-----L-----	-----	-----I-NG-----	543

Fig 3-3. The deduced amino acid sequence comparisons of the S1 glycoprotein gene of 13 Korean IBV isolates and 6 published non-Korean IBV strains. The dashes(-) indicate regions where the sequences are identical to those of K748-01. Deletions within the sequences are shown with asterisks(*).

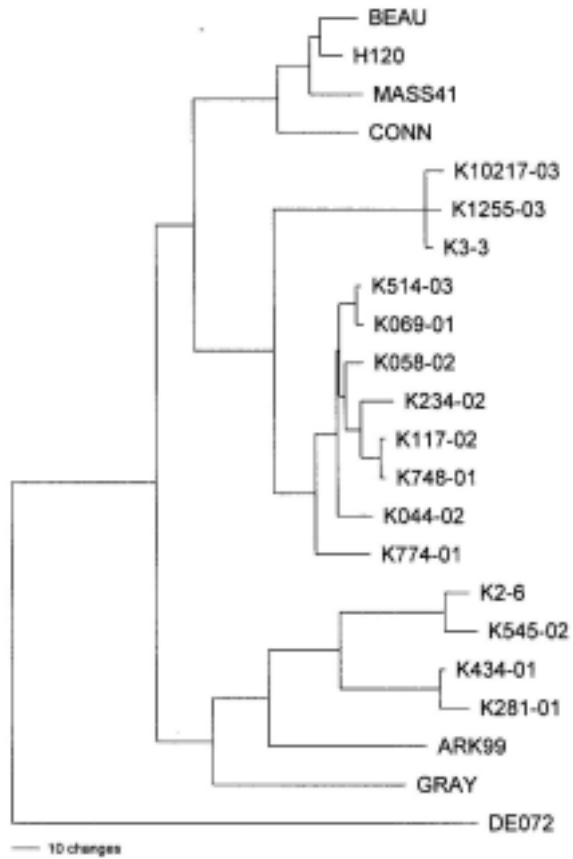


Fig 3-4. Phylogenetic relationship based on the deduced amino acid sequences of the S1 glycoprotein of the 12 Korean IBV field isolates (K434-01, K748-01, K058-02, K044-02, K117-02, K234-02, K545-02, K514-03, K10217-03, K1255-03, K3-3, and K3-3) and non-Korean IBV strains generated by maximum parsimony method with heuristic search and 100 bootstrap replicates. The length of each branch represents the number of amino acid changes between sequences

제5절 IBV N gene의 sequencing과 phylogenetic tree 작성

본 연구에서는 IBV S1 gene과 함께 방어에 관여하는 것으로 N gene을 분석하였다. IBV 국내분리주의 N gene을 RT-PCR로 증폭시킨 다음 증폭된 유전자를 클로닝하였고 염기서열을 결정하였다. 결정된 N gene의 염기서열은 다음과 같은 accession number로 GenBank database에 등록되었다 [AY790344 (K069-01), AY790345 (K281-01), AY790346 (K434-01), AY790355 (K507-01), AY790356 (K774-01), AY790347 (K748-01), AY790348 (K044-02), AY790357 (K058-02), AY790349 (K161-02), AY790351 (K203-02) AY790350, (K210-02), AY790352 (K234-02), AY790354 (K514-03), and AY790353 (K1255-03)].

국내분리주인 IBV K507-01와 K774-01은 다른 IBV와 비교하였을 때 아미노산 163 -168 부위에서 다른 분리주와 차이점을 나타내었는데 이들 두 분리주는 SLNRG 아미노산 (numbering is in reference to Korean IBV isolate K281-01)이 삽입된 것으로 나타났다.

일반적으로 염기서열을 비교하였을 때 국내분리주는 85.5% (K203-02 and K1255-03) - 98.8% (K281-01 and K434-01) 그리고 외국분리주와 비교하였을 경우에는 57.4% (K203-02 and V18/91) - 95.4% (K210-02 and Cal99)이 유사성을 나타내었다 <Table 3-4>. 아미노산 서열을 비교하였을 경우 국내분리주는 89.2% (K203-02 and K1255-03) - 98.3% (K434-01 and K281-01), 그리고 외국분리주와 비교시 57.0% (K774-01 and V18/91) - 96.6% (K507-01과 JP8147)의 유사성을 나타내었다 <Fig 3-5>.

결정된 아미노산 서열을 기초로 작성된 phylogenetic tree 분석 결과 IBV 국내분리주는 3 cluster로 분류되었다. 국내분리주 IBV K069-01, K281-01, K434-01, K507-01, K774-01, K748-01, K044-02, K058-02, K161-02, K203-02 and K234-02는 독립적인 cluster를 형성하였다. 다른 분리주인 IBV K210-02는 미국과 중국에서 분리되는 IBV 바이러스 그룹으로 분류되었고, 최근 IBV 분리주인 IBV K514-03와 K1255-03은 중국 IBV strain과 관련있는 cluster로 분류되었다 <Fig 3-6>.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 특정 IBV strain의 경우 서로 다른 기원을 갖는 IBV strain의 recombination에 의하여 유래된 것으로 추정된다. 또한 새로운 백신을 개발할 경우 S1 glycoprotein gene과 함께 nucleocapsid gene도

함께 고려하여야 할 것으로 보인다.

Table 3-4. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein genes of Korean IBV isolates (K281-01, K434-01, K507-01, K774-01, K161-02, K203-02, K210-02, and K1255-03) and non-Korean IBV strains

Deduced amino acid similarity in upper triangle																							
	K281-01	K434-01	K507-01	K774-01	K161-02	K203-02	K210-02	K1255-03	Avi99	Bessheim	Ca99	D1466	D2073	Gray	H21	JPH447	K20533	N974	Q328V	TW99-4	Vic 5	V18791	
K281-01	***	98.3	98.3	93.4	96.1	96.1	93.9	98.8	93.9	92.9	93.4	93.2	93.8	93.6	94.1	95.6	93.6	93.3	93.4	99.0	92.7	98.2	
K434-01	98.8	***	98.6	93.1	96.1	93.8	94.1	98.2	94.1	93.2	93.8	92.9	94.1	94.1	94.4	95.8	93.9	93.8	93.9	99.2	92.8	97.9	
K507-01	96.7	96.7	***	96.4	96.6	94.9	93.6	98.2	94.6	92.9	96.8	93.2	94.6	93.2	93.9	96.6	94.4	93.3	93.6	99.0	92.4	97.9	
K774-01	93.8	93.5	93.5	***	94.1	94.4	92.4	98.8	93.4	91.9	96.5	92.9	96.1	92.8	93.2	95.8	93.2	96.3	93.2	99.2	93.8	97.8	
K161-02	93.1	95.8	95.3	93.6	***	94.9	92.9	98.4	94.4	92.9	93.8	92.4	96.1	93.9	94.1	95.6	93.9	93.5	93.2	99.5	92.8	98.6	
K203-02	96.7	96.6	95.5	94.8	95.5	***	92.4	99.2	93.4	93.1	99.1	91.9	93.6	92.8	94.1	94.9	93.1	98.8	93.7	99.2	92.4	97.6	
K210-02	93.9	91.1	98.8	98.6	91.7	99.3	***	98.4	93.2	91.7	96.5	95.6	95.6	92.9	92.1	94.9	94.4	93.8	93.7	99.7	90.7	98.9	
K1255-03	96.9	96.7	96.6	96.5	94.3	93.3	93.8	***	98.8	99.0	99.3	99.7	99.2	99.3	99.8	93.4	96.0	99.6	92.2	98.7	98.8	98.8	
Avi99	93.3	93.3	93.1	92.7	93.4	92.6	91.4	95.8	***	92.4	95.8	95.1	95.6	94.6	93.9	97.1	93.1	93.3	93.8	96.1	92.4	97.7	
Bessheim	93.8	90.8	90.2	89.8	96.3	98.8	98.1	89.6	93.9	***	92.8	94.4	92.2	92.7	94.1	94.4	93.4	98.8	89.7	96.2	93.4	97.9	
Ca99	93.6	96.1	95.3	94.6	93.9	92.5	93.4	88.8	94.3	92.6	***	95.2	94.8	93.1	92.7	96.2	94.7	97.2	98.7	96.0	98.8	96.7	
D1466	96.9	94.1	90.8	92.3	91.4	98.8	94.6	89.2	93.6	98.3	99.9	***	94.4	92.4	92.2	94.1	94.1	93.3	98.9	96.2	98.7	98.4	
D2073	93.3	93.3	92.7	93.1	92.3	92.8	95.8	95.6	91.1	95.2	92.4	***	95.1	93.6	96.8	93.6	98.8	98.2	96.7	92.9	97.9	97.9	
Gray	93.1	92.9	91.7	91.5	92.2	91.3	98.7	89.1	93.8	92.8	93.8	93.2	93.1	***	93.4	96.1	94.9	98.5	89.2	98.2	92.4	97.0	
H21	91.6	91.4	91.1	91.8	91.9	98.7	98.3	86.9	92.8	92.4	92.3	89.9	91.8	92.4	***	93.4	94.1	92.8	98.8	98.3	96.9	96.7	
JPH447	94.6	94.4	94.1	93.8	94.1	93.8	93.8	88.6	97.3	92.8	96.0	92.7	94.4	96.2	93.8	***	96.3	92.5	91.4	93.2	95.6	98.7	
K20533	92.8	92.9	92.4	92.9	92.3	92.3	92.2	86.1	93.3	91.2	94.5	91.3	91.7	92.9	91.7	94.6	***	92.3	98.7	98.7	92.9	97.7	
N974	99.9	97.6	96.8	96.3	97.3	96.3	96.2	88.3	97.9	97.8	94.8	93.8	94.8	86.7	89.2	88.3	87.3	***	98.8	93.3	95.5	89.2	
Q328V	87.5	86.9	86.1	86.7	87.7	88.3	88.9	90.5	86.8	87.5	87.0	87.0	84.6	84.0	85.1	85.4	86.3	86.3	88.6	***	87.8	91.0	88.2
TW99-4	87.6	87.2	87.1	86.3	86.3	88.8	88.8	88.1	87.2	87.8	88.0	86.3	86.9	87.5	87.2	88.4	87.6	85.9	86.8	***	96.0	84.2	
Vic 5	88.0	88.0	87.6	87.6	88.2	87.2	87.2	84.8	88.5	88.5	87.3	86.7	88.4	87.6	89.7	89.8	88.3	91.1	89.3	84.6	***	87.8	
V18791	88.7	88.7	88.6	88.2	88.8	87.4	87.8	88.6	86.7	87.2	84.9	87.8	84.9	85.0	85.8	87.3	88.3	87.6	86.9	87.8	87.8	87.8	

Nucleotide similarity in lower triangle

(A)

K281-01 ATGCCAEEGGTAAAGCACTGGAAGGACACACAGCCCGCCAGCCAGTCTCAAACTAGGAGSACCAAAACCCACCTAAAGTTGGTCTCTCTGGAAATGCAT 100
K434-01
K507-01
K774-01
K161-02
K200-02
K210-02
K1255-03
Ark99
Beaudette
Ca199
O1466
DE072
Gr89
H52
JP8147
KB8523
N9/74
OX189
TW97-4
Vic 5

K281-01 CTTGGTTTCAAGCCATAAAGGCAAGAGCTTAAGTCACTGCTCTCAAGTTGAAAGTASCCGGGTTCTGATANTGAAMTCTTAATTAAGCCAGCA 200
K434-01
K507-01
K774-01
K161-02
K200-02
K210-02
K1255-03
Ark99
Beaudette
Ca199
O1466
DE072
Gr89
H52
JP8147
KB8523
N9/74
OX189
TW97-4
Vic 5

K281-01 ACATGGATACTGAGAGGCGCAGCCAGGTTTANCCAGSTAAAGCCGAGAGAAACACATCCAGATGCTTGGTACTTCTATTACACTGGAGAGGACCA 300
K434-01
K507-01
K774-01
K161-02
K200-02
K210-02
K1255-03
Ark99
Beaudette
Ca199
O1466
DE072
Gr89
H52
JP8147
KB8523
N9/74
OX189
TW97-4
Vic 5

K281-01 GCCGCTGACCTGAATFSGGGTATAGCCAGATGGTATAGTGTSSBTTGCTGCAAAAGGGTCTGATGTTAAATCTATGCTCAACCAAGGGTACTAGGGACC 400
K434-01
K507-01
K774-01
K161-02
K200-02
K210-02
K1255-03
Ark99
Beaudette
Ca199
O1466
DE072
Gr89
H52
JP8147
KB8523
N9/74
OX189
TW97-4
Vic 5

600
K281-01 CTGATAGTTGACCAATATCCTCTACGATCTCTGATGGAGACCTGATGGTAATTCGGTGGGACTTCATTCCTCGAATCGTGGTAG*****
K434-01 A C A T TCTGAATCG
K507-01 TCTGAATCG
K774-01 A C A T T A A T G C *****
K161-02 T A G T A T A A T *****
K203-02 T A G T A T A A T *****
K210-02 T A G T A T A A T *****
K1255-03 T A G T A T A A T *****
Ark99 C A A G C C *****
Beaudette C A A G C C *****
Ca199 C C C A A A A *****
D1466 C C C A A A A *****
DE072 C A A G C C *****
Gray C C C A A A A *****
HS2 C C C A A A A *****
JFB147 C C C A A A A *****
K88523 C C C A A A A *****
NS74 C C C A A A A *****
GX1BV C C C A A A A *****
TW97-4 C C C A A A A *****
Vic S C C C A A A A *****

600
K281-01 *****SAGTGGAAAGTCAAGACGAGCTTCATGAGCAGGTCATAGAGCACCATCGCGTGAAGGCTCGCGTGGTGGTGAAGTGGTCTGAAGATGAT
K434-01 TGGTAG A A A G C T A C *****
K507-01 TGGTAG A A A G C T A C *****
K774-01 T G A A G C T A C *****
K161-02 G D T A G A A G T A C T A C G A G A *****
K203-02 G D T A G A A G T A C T A C G A G A *****
K210-02 G D T A G A A G T A C T A C G A G A *****
K1255-03 G D T A G A A G T A C T A C G A G A *****
Ark99 G A A A A A G A C T A C G A G A *****
Beaudette A A A A A A G A C T A C G A G A *****
Ca199 A A A A A A G A C T A C G A G A *****
D1466 A A A A A A G A C T A C G A G A *****
DE072 A A A A A A G A C T A C G A G A *****
Gray A A A A A A G A C T A C G A G A *****
HS2 G A A A A A G A C T A C G A G A *****
JFB147 A A A A A A G A C T A C G A G A *****
K88523 A A A A A A G A C T A C G A G A *****
NS74 A A A A A A G A C T A C G A G A *****
GX1BV A A A A A A G A C T A C G A G A *****
TW97-4 T A A T G A G C A A T A T A T A G C G A G A C G *****
Vic S C A A T G A G C A A T A T A T A G C G A G A C G *****

700
K281-01 CTTATTGCTGGTCAGCAANGATAATCCAGGATCAGCNSAASAGGTTCTGCGATTACTAAGGCTAAGGCTGATGAATGGCTCATGCGCGTATTGCA
K434-01 A C *****
K507-01 A C *****
K774-01 T G A C A T C *****
K161-02 G A C G T T T C A G A G T A C A A A G C C T A T C T *****
K203-02 G A C G T T T C A G A G T A C A A A G C C T A T C T *****
K210-02 G A C G T T T C A G A G T A C A A A G C C T A T C T *****
K1255-03 G A C G T T T C A G A G T A C A A A G C C T A T C T *****
Ark99 A C T A C A C C A A A A C C T *****
Beaudette A C T A C A C C A A A A C C T *****
Ca199 A C T A C A C C A A A A C C T *****
D1466 A C T A C A C C A A A A C C T *****
DE072 G T A G A A C *****
Gray G T A G A A C *****
HS2 T T T C A A G A A C C *****
JFB147 T T T C A A G A A C C *****
K88523 T T T C A A G A A C C *****
NS74 T G G G T T C A A G G T A A A A C C *****
GX1BV T G G G T T C A A G G T A A A A C C *****
TW97-4 T G G G T T C A A G G T A A A A C C *****
Vic S T G G G T T C A A G G T A A A A C C *****

800
K281-01 A G C G C A C T G T C C A C C T G G C T A T A G G T T G A T C A A G T C T T T G G T C C C C T A C A A G G T A A G G A N G G A A A T T T G T G A T G A C A G A T G A A T G A G G A A G G
K434-01 A T G A T G *****
K507-01 A T G A T G *****
K774-01 T A T G A T G *****
K161-02 T A C A T G A T C C *****
K203-02 T A C A T G A T C C *****
K210-02 T A C A T G A T C C *****
K1255-03 T A C A T G A T C C *****
Ark99 T A C A T G A T C C *****
Beaudette T A C A T G A T C C *****
Ca199 T A C A T G A T C C *****
D1466 T A C A T G A T C C *****
DE072 T A C A T G A T C C *****
Gray T A C A T G A T C C *****
HS2 T A C A T G A T C C *****
JFB147 T A C A T G A T C C *****
K88523 T A C A T G A T C C *****
NS74 T A C A T G A T C C *****
GX1BV T A C A T G A T C C *****
TW97-4 T A C A T G A T C C *****
Vic S T A C A T G A T C C *****

1245
 K281-01 GTGATTAATTGGGTTGATTCAGCAGCTTGGTGAAGTGAACCTTTGA
 K434-01
 K507-01
 K774-01
 K161-02
 K203-02
 K210-02
 K1255-03
 Ark99
 Beaudette
 Cal99
 D1466
 DE072
 Gray
 H52
 JP8147
 K88523
 M9/74
 OX189
 TW97-4
 Vic S

(B)
 K281-01 MASGKAAGKTGAPAPVLLKLGPKPKYVSSGASWFGAIIKAKKIKSPAPKFEVGSNPDNENLKLSDGHCYWRIGDARFKPKGGGRKVPDANWYFYTGIDP
 K434-01
 K507-01
 K774-01
 K161-02
 K203-02
 K210-02
 K1255-03
 Ark99
 Beaudette
 Cal99
 D1466
 DE072
 Gray
 H52
 JP8147
 K88523
 M9/74
 OX189
 TW97-4
 Vic S

200
 K281-01 AADLMWQSDGDIYRVAAGADVKSEMSOGTRDPKFDQYPLRFSDGGPDNFRDFIPLMRG*****RGRSTAASSAASRUPSRREGSRGRSSGSD
 K434-01
 K507-01
 K774-01
 K161-02
 K203-02
 K210-02
 K1255-03
 Ark99
 Beaudette
 Cal99
 D1466
 DE072
 Gray
 H52
 JP8147
 K88523
 M9/74
 OX189
 TW97-4
 Vic S

300
 K281-01 LIIARAANKIIGDQKXQSRITKAKADEMAHRRYQRTVFPQYKVDGVFQRTKQKEQNFQDKQWNEEGIKDGRVTAALMLVPSHACLFGSRVTPKLGQDQ
 K434-01
 K507-01
 K774-01
 K161-02
 K203-02
 K210-02
 K1255-03
 Ark99
 Beaudette
 Cal99
 D1466
 DE072
 Gray
 H52
 JP8147
 K88523
 M9/74
 OX189
 TW97-4
 Vic S

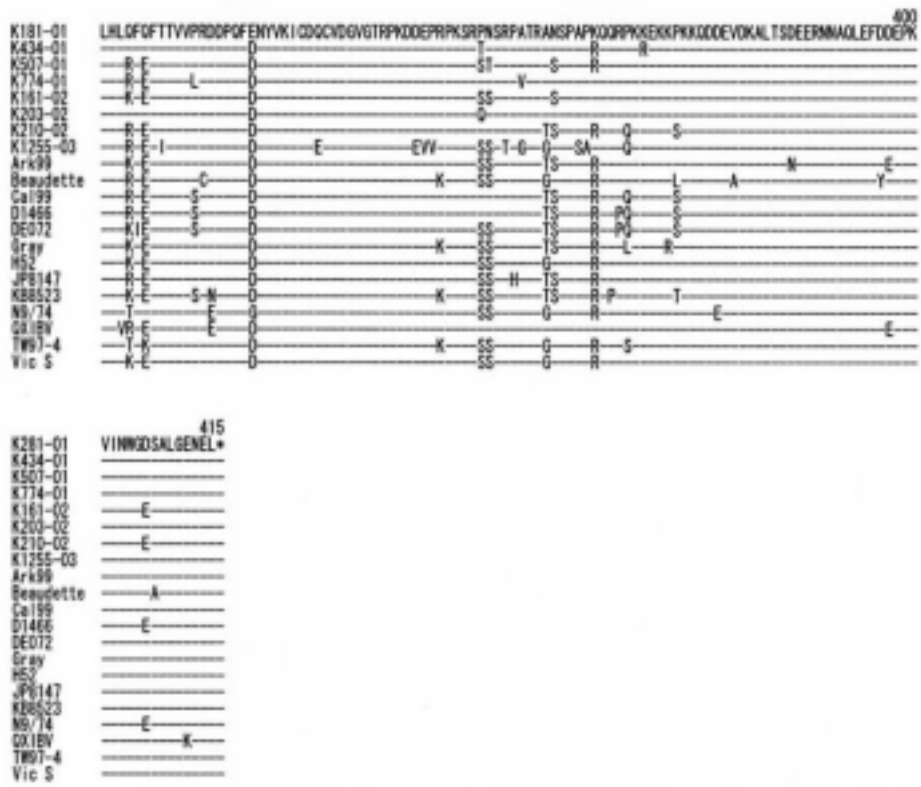


Fig 3-5. Comparison of the nucleotide(A) and deduced amino acid (B) sequences of the nucleocapsid protein genes of Korean infectious bronchitis virus isolates (K281-01, K434-01, K507-01, K774-01, K161-02, K203-02, K210-02, and K1255-03) and non-Korean infectious bronchitis virus strains. The dashes (-) indicate regions where the sequences are identical to those of K281-01. Asterisks (*) indicate unavailable sequences.

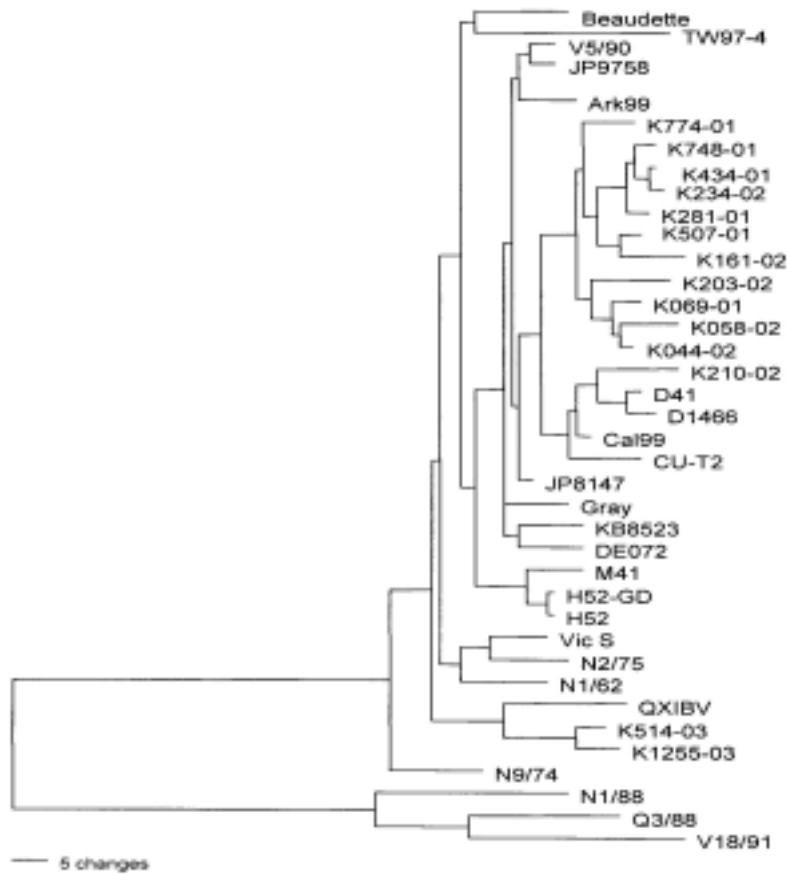


Fig 3-6. Phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein genes of Korean IBV isolates and non-Korean IBV strains. Phylogenetic tree was generated by the maximum parsimony method in a heuristic search with 100 bootstrap replicates. The trees were unrooted. The length of each branch represents the numbers of nucleotide or amino acid differences between sequences.

제6절 유전자백신의 제조와 발현 검증

1. IBV의 S1 glycoprotein과 N protein gene의 증폭

IBV 중에서 RT-PCR-RFLP 분석과 염기와 아미노산 서열 결정 & phylogenetic tree 분석을 통하여 유전자 백신후보주를 선발하였다 <Table 3-5>. 백신후보주 선발 시 본 연구실에서 기 분석된 IBV strain도 함께 고려되었다. IBV 백신후보주는 S1과 N gene을 함께 분석한 결과로 선발하였다. 백신후보주로 현재 국내에서 가장 많이 분리되는 있는 혈청형인 KM91 type (K507-01등)을 중심으로 하여 선발하였고, Arkansas type (K210-02)과 최근에 분리되고 있는 KM91 type의 variant type으로 추정되는 K1255-03을 유전자백신을 제조하기 위한 백신 후보 바이러스주로 선발하였다. 백신후보주로 선발된 IBV의 S1과 N gene을 RT-PCR로 증폭한 결과 모두 예상된 크기의 유전자가 증폭되었다 <Fig 3-7, 3-8>.

Table 3-5. Characteristics of IBV strains selected for genetic vaccines

IBV strains	PCR-RFLP patterns	GenBank accession numbers
K774-01	KM91	AY257065
K507-01	KM91	AY257064
K161-02	KM91	AY257066
K117-02	KM91	AY790362
K514-03	KM91	AY790365
K210-02	Arkansas	AY257067
K1255-03	Variant	AY790364

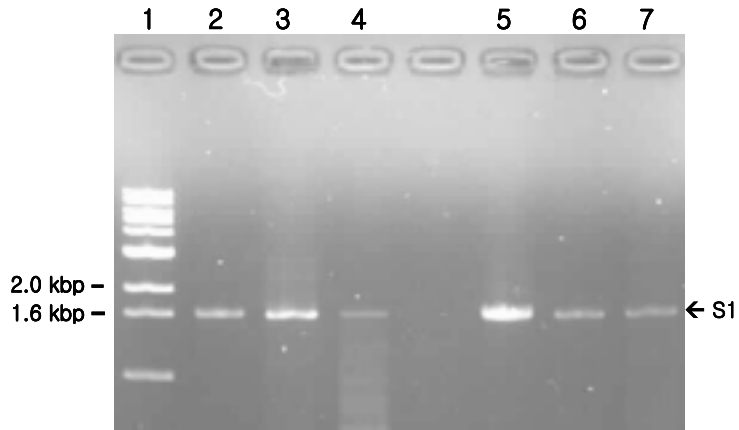


Fig 3-7. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified S1 glycoprotein genes from Korean IBV strains. Lanes 1 = 1 kbp ladder ; 2 = K507-01 ; 3 = K774-01 ; 4 = K117-02 ; 5 = K210-02 ; 6 = K1255-03 ; 7 = K514-03.

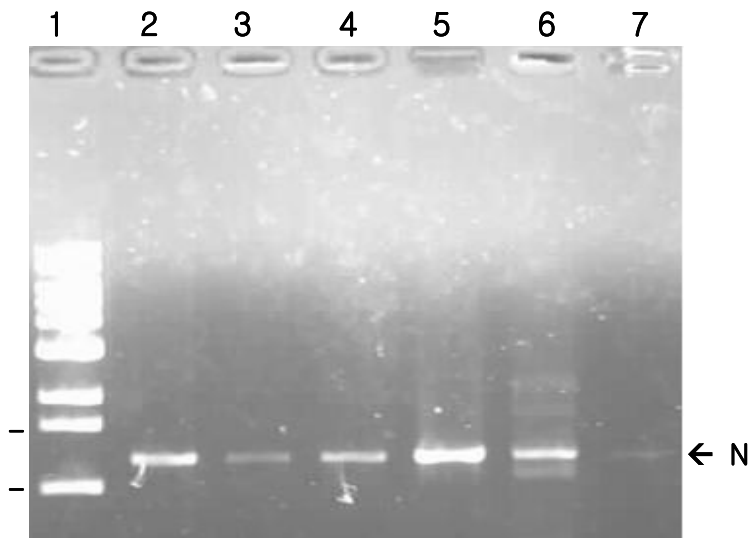


Fig 3-8. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified N protein genes from Korean IBV strains. Lanes 1 = 1 kbp ladder ; 2 = K507-01 ; 3 = K774-01 ; 4 = K161-02 ; 5 = K210-02 ; 6 = K1255-03 ; 7 = K514-03.

2. 유전자백신 제조

백신후보주로 선발된 IBV의 S1과 N gene을 RT-PCR로 증폭 후 정제한 다음 eukaryotic expression vector인 pcDNA3.1/V5/His-TOPO (Invitrogen)에 클로닝하였다. Expression vector에 클로닝한 유전자는 recombinant plasmid를 대장균에 transformation 시킨 후 증식된 대장균으로부터 recombinant plasmid를 분리하여 확인하였다.

1차적으로, 클로닝된 S1과 N gene을 확인하기 위하여 분리한 recombinant plasmid를 제한효소 *Bst*XI으로 처리하였다. Expression vector는 S1과 N gene이 삽입되는 양쪽에 제한효소 *Bst*XI의 unique recognition site를 가지고 있다. Recombinant plasmid를 제한효소로 처리한 다음 전기 영동한 결과 클로닝된 S1과 N gene을 확인할 수 있었다 <Fig 3-9, 3-10>. 백신후보주의 일부는 클로닝된 S1과 N gene 내에 *Bst*XI site를 가지고 있거나 partial digestion에 의하여 제한효소로 처리한 다음 전기영동 하였을 때 RT-PCR에 의하여 증폭된 S1 및 N gene과 크기에서 차이를 나타냈다.

2차적으로, 제한효소 처리에 의하여 S1과 N gene의 insertion이 확인된 clone으로부터 recombinant plasmid를 분리한 다음 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 결정한 후 삽입된 유전자의 orientation을 확인하고, 결정된 염기와 아미노산 서열을 1차 년도에 결정하여 GenBank에 보고한 original sequence와 비교하였다. 비교한 결과 original sequence와 동일한 sequence를 갖는 것으로 확인된 clone을 선택하여 in vitro transcription / translation 법으로 유전자백신의 유전자 발현을 확인하였다.

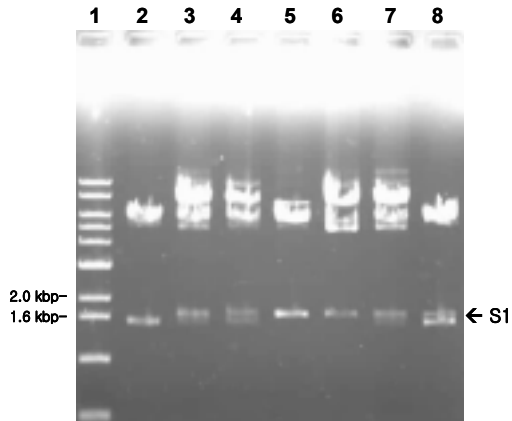


Fig 3-9. Cloning of PCR-amplified S1 glycoprotein genes from Korean IBV strains in expression plasmids and agarose gel electrophoresis after digestion of recombinant plasmids with restriction enzyme *Bst*XI. Lanes 1 = 1 kbp ladder ; 2 = K507-01 ; 3 = K774-01 ; 4 = K117-02 ; 5=K161-02 ; 6 = K210-02 ; 7 = K1255-03 ; 8 = K514-03.

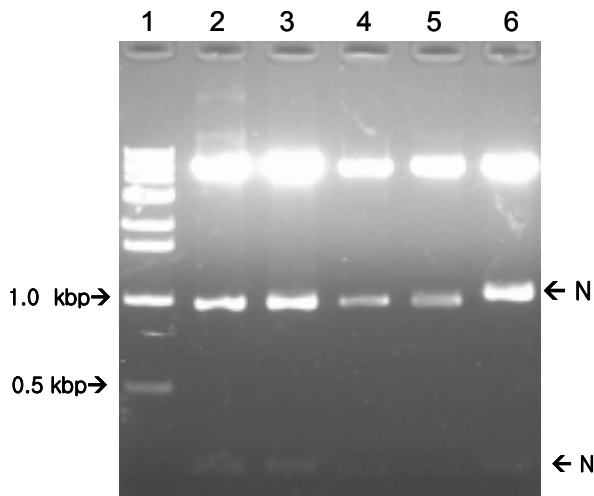


Fig 3-10. Cloning of PCR-amplified protein genes from Korean IBV strains in expression plasmids and agarose gel electrophoresis after digestion of recombinant plasmids with restriction enzyme *Bst*XI. Lanes 1 = 1 kbp ladder ; 2 = K507-01 ; 3 = K774-01 ; 4 = K161-02 ; 5 = K210-02 ; 6 = K514-03.

3. *In vitro* transcription / translation에 의한 S1과 N의 유전자 발현의 확인

IBV 백신후보주의 S1과 N gene을 eukaryotic expression vector에 클로닝하여 염기서열 결정과 orientation을 확인한 결과 올바르게 삽입된 것으로 결정된 recombinant plasmid를 준비하여 유전자 발현을 검증하였다. IBV strain에 따라 차이가 있을 수 있지만 S0 precursor 유전자의 염기서열에 의하면 1,162 amino acid를 생성하는 것으로 예상된다. Precursor S0 polypeptide는 S1과 S2로 나누어지는데 IBV Beaudette과 M41 strain의 경우 S1은 517 residue (57 kDa) 또는 514 residue (56.2 kDa)로 구성되고 S2는 625 residue (69.2 kDa)로 구성되는 것으로 밝혀졌다. IBV의 S0 protein은 glycoprotein으로 알려져 있는데, S0의 oligosaccharide는 mannose type이 N-glycosidic linkage에 의하여 연결되어 있는 것으로 밝혀졌다. 이렇게 형성된 IBV의 precursor S0 glycoprotein (155 kDa)은 post-translational cleavage에 의하여 S1 (90 kDa)과 S2 (84 kDa) 나누어진다. *In vitro* transcription and translation에 의하여 발현되는 단백질은 glycosylation이 일어나지 않는 조건이기 때문에 S1의 경우 약 57 kDa의 protein이 생성될 것으로 예상되었다. 본 연구에서 제조한 유전자백신인 recombinant plasmid를 발현시킨 결과 예상된 결과인 약 57 kDa의 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었고 대표 유전자백신의 발현은 <Fig 3-11>과 같다. 이는 S1 gene이 올바르게 expression vector에 삽입된 것을 의미한다.

IBV의 N protein은 RNA genome과 결합되어 있으며, glycosylation 되지 않고 phosphorylation 된 protein으로 보고되었다. IBV Beaudette과 M41 strain의 N gene의 염기서열 결정 결과 1,226 base로 구성된 하나의 open reading frame으로부터 약 45 kDa의 polypeptide가 발현될 것으로 추정되었는데, *in vitro* translation 결과 51 kDa 그리고 IBV virion으로부터 추출된 N polypeptide의 경우 50-54 kDa의 분자량을 갖는 것으로 보고되었다. 이러한 차이가 나타나는 이유는 N polypeptide의 phosphorylation 형성여부와 관련 있다. 본 연구에서 IBV의 N gene으로 만든 유전자백신인 recombinant plasmid를 발현시킨 결과 예상한 약 51 kDa의 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있어 N gene이 올바르게 expression vector에 삽입되었음을 확인할 수 있었다. 대표 유전자백신의 발현은 <Fig 3-12>와 같다.

최종적으로 유전자발현이 확인된 recombinant plasmid를 유전자백신으로 선발하여 pcDNA-K507-S1 또는 pcDNA-K507-N (expression vector-IBV strain-cloned gene) 식으로 명명하였고 대상동물인 닭을 대상으로 *in vivo* 실험을 실시하였다.

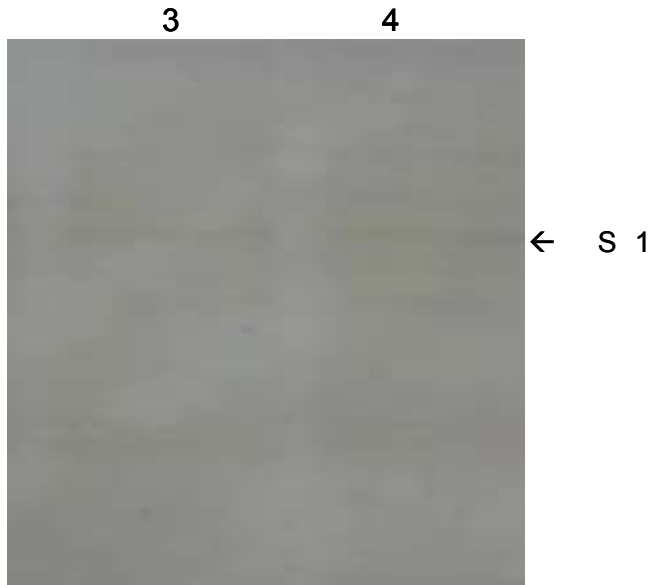


Fig 3-11. Colorimetric translation detection of SDS-PAGE analysis of a coupled *in vitro* transcription/translation reaction (Progmea). Lanes 1 = molecular weight standard (Invitrogen) ; 2 = pcDNA-K507-S1 ; 3 = pcDNA-K161-S1 ; 4 = pcDNA-K1255-S1.

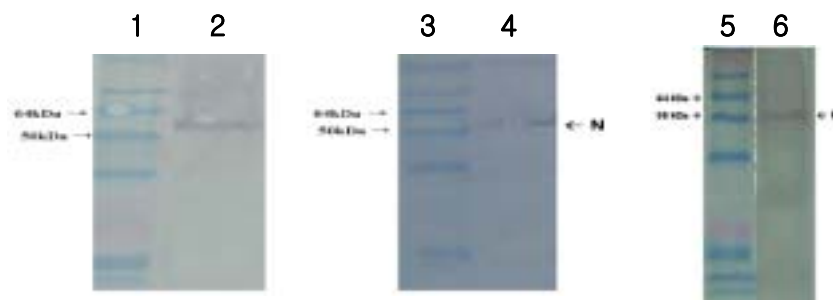


Fig 3-12. Expression of IBV N genes by *In Vitro* Transcription and Translation. Lanes 1, 3 and 5 = molecular weight standard (Invitrogen); 2 = pcDNA-K507-N ; 3 = pcDNA-K1255-N ; 6 = pcDNA-K161-N.

제7절 유전자백신의 면역원성 조사

발현이 확인된 유전자 백신 중 S1 gene과 N gene의 분석결과와 phylogenetic tree 분석결과를 토대로 선발한 IBV K507-01 strain으로 제조한 pcDNA507-S1과 pcDNA507-N을 SPF 닭에 접종하고 IBV K507-01 strain으로 공격접종을 실시하였다.

체액성면역은 혈구응집억제반응을 이용하여 IBV 특이 항체를 검출하였다 <Table 3-6>. 공격접종 전에 각 그룹은 유의한 항체역가 차이를 나타내지 않았다. 공격접종 5일 후 측정된 항체 역가 검사에서 공격접종군 (CC)과 pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N군이 유의한 역가차이를 나타내었지만 나머지 그룹사이에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 공격접종 9일 후 측정된 항체 역가 검사에서 normal control군을 제외한 나머지 그룹 간에 유의한 역가 차이는 나타나지 않았다. 그러나 공격접종 후 pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N군에서 비교적 고르고 높은 항체 역가가 확인되었다. 이상의 결과로 볼 때 공격접종 5일과 9일 후에 상승한 항체 역가는 공격접종한 바이러스에 의한 항체로 추정된다.

세포매개성 면역반응은 공격접종 전에 채혈한 말초혈액을 이용한 lymphocyte proliferation assay를 이용하여 검사하였다 <Table 3-7>. 검사 결과 pcDNA-K507-S1군이 가장 높은 stimulation activity를 나타내었으나 pcDNA-K507-N군과 pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N군과 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 그러나 NC, CC, 그리고 VC군과는 유의한 차이를 나타내었다.

유전자백신을 접종한 다음 백신의 실질적인 방어효과를 기관과 신장에서 공격접종한 바이러스를 검출로 하는 방법으로 확인하였다 <Table 3-8>. 공격접종 5일 후 기관에서 pcDNA-K507-N군과 pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N군 (50% 방어율)은 다른 군에 비하여 유의성 있는 방어율의 차이를 나타내었고 신장에서는 pcDNA-K507-S1군 (50% 방어율)이 다른군과 비교하였을 때 유의성 있는 방어율의 차이를 나타내었다. 공격접종 9일 후 기관의 경우 모든 실험군이 유의성 있는 차이를 보이지 않았고 신장에서는 pcDNA-K507-N군이 가장 높은 방어율을 (66.7%) 나타내었고 pcDNA-K507-S1군은 50%의 방어율을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 S1 gene과 N gene을 cloning하여 제조한 유전자백신의 방어효과를 인정할 수 있으나 완전한 방어효과는 얻을 수 없었다. 앞으로 유전자 백신을 *in ovo*로 1차 백신하고 부화된 병아리에 attenuated vaccine으로 2차 백신하는 prime-boosting method와 면역조절에 관여하는 cytokine gene을 genetic adjuvant로 이용하는 방법 등 다양한 백신접종 방법을 개발하는 것이 필요하다고 판단된다.

Table 3-6. Humoral immune response after DNA vaccination determined by hemagglutination inhibition (HI) test

Group ^A	Geometric mean HI titer (log ₂) of serum ^B		
	Prechallenge	5 days PC	9 days PC
1. Normal control	1.7a	2.6a	3.5a
2. Challenge control	3.3b	3.5a	6.3b
3. Vector control	1.9b	2.7a	6.3b
4. pcDNA-K507-S1	2.4b	4.8a	6.3b
5. pcDNA-K507-N	4.2b	4.3a	5.8b
6. pcDNA-K507-S1 +pcDNA-K507-N	3.3b	5.2b	7.1b

^ANormal control: without vaccine and challenge; challenge control: without vaccine but with challenge; vector control: vaccinated vector without insert and challenge; pcDNA-K507-S1: vaccinated with pcDNA-K507-S1 vaccine and challenge; pcDNA-K507-N: vaccinated with pcDNA-K507-N vaccine and challenge; pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N: vaccinated with pcDNA-K507-S1 and pcDNA-K507-N vaccine and challenge. At week 3 after second vaccination, all groups except normal control group were challenged via eyedrop with $1 \times 10^{4.5}$ EID₅₀ of IBV K507-01 strain.

^BValues within the same column not followed by the same superscript are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3-7. The mitogenic responses of peripheral blood lymphocytes prepared from randomly selected chickens with or without DNA vaccines before challenge with IBV K507-01 strain

Group ^A	Stimulation activity ^B
1. Normal control	1.01 ± 0.04c
2. Challenge control	1.00 ± 0.08bc
3. Vector control	1.04 ± 0.07bc
4. pcDNA-K507-S1	1.30 ± 0.18a
5. pcDNA-K507-N	1.13 ± 0.09abc
6. pcDNA-K507-S1 pcDNA-K507-N	1.11 ± 0.06abc

^ANormal control: without vaccine and challenge; challenge control: without vaccine but with challenge; vector control: vaccinated vector without insert and challenge; pcDNA-K507-S1: vaccinated with pcDNA-K507-S1 vaccine and challenge; pcDNA-K507-N: vaccinated with pcDNA-K507-N vaccine and challenge; pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N: vaccinated with pcDNA-K507-S1 and pcDNA-K507-N vaccine and challenge. At week 3 after second vaccination, all groups except normal control group were challenged via eyedrop with $1 \times 10^{4.5}$ EID₅₀ of IBV K507-01 strain.

^BThe stimulation activity (Δ OD <optical density>) was calculated by the following formula: Δ OD = (mean OD of ConA stimulated cells) / (mean OD of unstimulated cells). Values within the same column not followed by the same superscript are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3-8. Protection efficacy of DNA vaccine determined by virus detection

Group ^A	Virus detection ^B			
	5 days PC		9 days PC	
	Trachea	Kidney	Trachea	Kidney
1. Normal control	0/6	0/6	0/6	0/6
2. Challenge control	6/6a	6/6a	3/6b	6/6a
3. Vector control	6/6a	5/5b	1/6b	5/6b
4. pcDNA-K507-S1	6/6a	3/6c	2/6b	3/6bc
5. pcDNA-K507-N	5/6b	5/6b	1/6b	2/6c
6. pcDNA-K507-S1 +pcDNA-K507-N	3/6c	4/6bc	1/6b	5/6b

^ANormal control: without vaccine and challenge; challenge control: without vaccine but with challenge; vector control: vaccinated vector without insert and challenge; pcDNA-K507-S1: vaccinated with pcDNA-K507-S1 vaccine and challenge; pcDNA-K507-N: vaccinated with pcDNA-K507-N vaccine and challenge; pcDNA-K507-S1 + pcDNA-K507-N: vaccinated with pcDNA-K507-S1 and pcDNA-K507-N vaccine and challenge. At week 3 after second vaccination, all groups except normal control group were challenged via eyedrop with $1 \times 10^{4.5}$ EID₅₀ of IBV K507-01 strain.

^BNumber of positive chicken / number of total chickens. Trachea and kidney samples were collected and homogenized. The supernatants were inoculated in 9-to-11-day-old embryos. After two blind passages, Re-identification of the challenge virus were performed using dot-blot immunoblotting assay (Song *et al.*, 1998). Values within the same column not followed by the same superscript are significantly different ($P < 0.05$).

제4장 인공지능경망을 이용한 IB 위험인자 관리 기법 개발

제1절 전염성기관지염 혈청역학조사

1. 연구재료 및 방법

국내에서 발생하고 있는 전염성 기관지염 (chicken infectious bronchitis, IB)의 역학적 특성을 위험관리 측면에서 분석하고 개별 위험요인이 IB 발생에 어느 정도 영향을 미치는지 평가한다. 또한 본 연구에서 얻은 혈청역학조사 성적에 근거하여 IB 발생위험을 예측할 수 있는 인공지능경망 모델을 구축하고 이 모델의 정확성과 응용 가능성을 탐색하는 것이 목적이다.

Table 4-1. Number of households by province in Korea

Province	< 10,000	10,000-30,000	30,000-50,000	>= 50,000	Total	%
Seoul	1	0	0	0	1	0.04
Pusan	5	0	0	0	5	0.19
Daegu	2	7	2	0	11	0.41
Incheon	14	7	3	0	24	0.90
Kwangju	1	4	0	0	5	0.19
Daejeon	1	1	0	0	2	0.08
Ulsan	5	6	3	1	15	0.57
Kyunggi	211	210	81	63	565	21.30
Kangwon	25	43	19	9	96	3.62
Chungpook	50	29	15	9	103	3.88
Chungnam	55	128	29	20	232	8.74
Cheonpook	418	103	4	5	530	19.98
Cheonnam	72	44	37	15	168	6.33
Kyungpook	355	182	42	33	612	23.07
Kyungnam	153	57	24	13	247	9.31
Jeju	6	24	4	3	37	1.39
Total	1,374	845	263	171	2,653	100.0

- 산란계 농가 현황: 본 연구를 수행하기 위해 필요한 농가수를 결정하기 위해서는 몇가지 사항을 전제로 한다. 첫째, IBV 감염의 위험요인을 파악하기 위한 사업의 특성과 한정된 자원을 감안할 때 전국단위 조사는 한계가 있으며 둘째, 연구 대상 지역의 지리적 접근성과 지역 수의사와의 협조체계가 원활한 지역을 고려하여 경기도, 강원도, 충청도 소재 농장으로 한정하며 셋째, IBV 감염에 의한 피해는 육계와 산란계에 공통이지만 본 연구에서는 상대적으로 피해 규모가 큰 산란계 농가로 한정한다. 2003년 3월 기준으로 농림부에 등록된 우리나라 전체의 산란계 사육농가는 2,653 농가로 사육수수는 약 4,800만수로 추정되고 있다 <Table 4-1>. 사육농가수로 볼 때 경기도와 강원도는 전체 농가의 21%와 3.6%를 점유하고 사육수수로 볼 때 각각 30%와 5%를 차지하여 이들 두 지역을 합하면 우리나라 전체 사육농가의 25% (약 660가구), 전체 사육수수의 35% (약 1,720만수)에 해당된다 <Table 4-2>.

Table 4-2. Number of laying hens by province (Unit: 1,000)

Province	< 10,000	10,000-30,000	30,000-50,000	>= 50,000	Total	%
Seoul	20	0	0	0	20	0.00
Pusan	40	0	0	0	40	0.08
Daegu	19	106	79	0	204	0.42
Incheon	79	83	108	0	270	0.55
Kwangju	8	71	0	0	79	0.16
Daejeon	5	23	0	0	28	0.06
Ulsan	26	115	117	132	391	0.80
Kyunggi	93	3,850	3,041	6,842	14,673	30.11
Kangwon	77	839	722	874	2,512	5.16
Chungpook	30	506	524	958	2,295	4.71
Chungnam	27	2,377	1,081	2,455	6,191	12.70
Cheonpook	42	1,670	139	659	2,893	5.94
Cheonnam	51	689	1,369	1,447	4,020	8.25
Kyungpook	2,3	3,072	1,504	3,657	10,587	21.72
Kyungnam	59	1,013	913	1,200	3,723	7.64
Jeju	26	402	124	275	828	1.70
Total	5,691	14,822	9,725	18,501	48,740	100.0

2. 연구대상 농가 수 및 계군 당 표본크기 결정

가. 연구대상 농가 수 결정

방법 1: 국내 IB 감염의 유병률에 대한 정보를 알아야 연구 대상 농가수를 결정할 수 있는데 국내 양계 농가에서 IBV 유병률에 대한 객관성이 있는 자료가 거의 없고 그나마 이용 가능한 자료원은 첫째 국립수의과학 검역원의 시험연구보고서 (닭 병성감정 결과)를 사용하는 것이다. 그러나 이 결과는 검역원으로 의뢰된 가검물에 국한된 자료이기 때문에 실제 유병률을 반영하기는 어려운 것으로 판단된다. 국립수의과학 검역원의 2003년 공식자료에 의하면 전국적으로 13건의 가검물이 IBV 양성으로 진단되었지만 이는 앞에서 언급한바와 같이 의뢰된 가검물에 한정된 자료이므로 실제 유병률을 반영하지 못한다. <Table 4-3>은 바이엘 동물의약품 (내부자료)에서 제공한 자료다.

Table 4-3. Number of outbreaks of IB by year in Korea

Year	Month				Total
	1-3	4-6	7-9	10-12	
1996	8	27	26	5	66
1997	2	9	13	1	54
1998	1	12	6	5	33
1999	2	25	9	1	71
2000	1	11	11	2	40
2001	8	25	13	1	56
2002	2	16	5	1	56
2003	5	1	6	1	22
2004	5	14	12	1	32
Total	122	140	101	67	430

방법 2: 다른 방법으로 국내양계 분야의 전문가 (개업, 연구소, 학계)의 자문을 통하여 유병률에 대한 추정치를 얻는 방법이다. 조사결과 약 10-30%의 범위로 추정되며 일부 전문가는 매우 높은 추정치를 제공하였다. 몇가지 가정에 근거하여 Cannon과 Roe (1982)가 제시한 방법에 근거하여 연구 대상 농장수를 결정하였다.

- 가정 1: 유병률이 10%, 신뢰수준 95%, 참값의 $\pm 10\%$ 범위 내에서 추정치를 얻고자 가정할 경우 연구 대상 농장수는 약 35개가 된다. 계산된 농장수는 전체 660가구의 5%를 초과하므로 유한모집단 보정계수를 적용하여 수정된 표본크기 (n_a)를 계산해야 하는데 유병률 10%를 가정할 경우 34개 농장이 요구되지만 연구비용의 한계로 본 조사에서는 31개 농장을 선발하였고 이는 연구결과에 큰 영향을 미치지 않는다.

$$n = \frac{1.96^2 \times p \times (1-p)}{e^2} = \frac{1.96^2 \times 0.1 \times (1-0.1)}{0.1^2} = 34.6$$

$$n_a = \frac{n}{1 + \frac{n}{N}} = \frac{35}{1 + \frac{35}{660}} = 34$$

- 가정 2: 유병률 (p) 30%, 신뢰수준 95% (1.96), 오차 (e) $\pm 10\%$ 를 가정할 때 유한모집단 보정계수를 적용하면 약 72개 농장이 필요하다. 즉 유병률을 30%로 가정하면 연구 대상 농장수는 약 81 가구가 되고, 계산된 농장수는 전체 660가구의 5%를 초과하므로 유한모집단 보정계수를 적용 (공식참고)하여 수정된 표본크기 (n_a)를 계산해야 한다. 따라서 유병률 10%를 가정할 경우 34개, 유병률 30%를 가정할 경우 72개 농장이 필요하다.

$$n = \frac{1.96^2 \times p \times (1-p)}{e^2} = \frac{1.96^2 \times 0.3 \times (1-0.3)}{0.1^2} = 80.7$$

$$n_a = \frac{n}{1 + \frac{n}{N}} = \frac{81}{1 + \frac{81}{660}} = 72$$

- 가정 3: 유병률 50%, 신뢰수준 95%, 참값의 $\pm 10\%$ 범위 내에서 추정치를 얻고자 가정할 경우 연구 대상 농장수는 약 96 가구가 되며, 유한모집단 보정계수를 적용하여 수정된 표본크기 (n_a)는 84 가구가 된다.

$$n = \frac{1.96^2 \times p \times (1-p)}{e^2} = \frac{1.96^2 \times 0.5 \times (1-0.5)}{0.1^2} = 96.0$$

$$n_a = \frac{n}{1 + \frac{n}{N}} = \frac{96}{1 + \frac{96}{660}} = 84$$

대규모 집단에서 다양한 추정유병률, 절대정확도 및 신뢰수준에 따라서 유병률을 추정하는데 필요한 표본크기를 요약하면 <Table 4-4>와 같다. 이상의 계산에 따라 34-72개 농장을 조사하며 연구에 소요되는 비용과 인력을 고려하여 결정하였다.

Table 4-4. Sample size for prevalence estimation

	Confidence level (%)					
	90		95		99	
	Accuracy (%)		Accuracy (%)		Accuracy (%)	
Prevalence (%)	10	5	10	5	10	5
1	3	11	4	15	7	26
5	13	51	18	73	32	126
10	24	97	35	139	60	239
15	35	138	49	196	85	339
20	43	173	61	246	106	425
25	51	203	72	288	125	499
30	57	227	81	323	139	557
35	62	246	87	350	151	606
40	65	260	92	369	159	637
45	67	268	95	380	165	659
50	68	271	96	385	166	663

나. 계군 당 표본크기 결정

- 적어도 1두의 감염된 개체를 검출하는데 필요한 표본크기: 농가 수가 결정되면 다음단계는 IBV에 감염된 1두의 개체를 검출하는데 필요한 표본크기를 계산하는 것으로 모집단의 유병률과 신뢰수준에 따라 적어도 1두의 감염 개체를 검출하는데 필요한 표본크기를 계산한다. 여기에서 연구자의 관심은 농장된 감염된 개체의 비율에 관심을 두는 것이 아니라 IBV에 감염된 적어도 1두의 개체를 검출하는데 필요한 표본크기를 결정하는 것으로 이를테면 적어도 1두의 감염개체가 있을 경우 감염된 계군으로 간주하는 것이다.

어느 모집단에서 유병률의 참값을 P라고 할 때 P는 이 모집단으로부터 무작위로 추출된 1두의 개체가 감염되어 있을 확률이 되고 1-P는 감염되어 있지 않을 확률이다. 이 모집단으로부터 2두를 선발할 경우 2두 모두 감염되어 있지 않을 확률은 $(1-p) \times (1-p)$ 가 된다. 따라서 이 모집단으로부터 n두를 선발하고 n두 모두 감염되어 있지 않을 확률은 $(1-p)^n$ 이 되므로 n두의 표본에서 적어도 1두의 감염개체가 있을 확률은 (C)는 $C=1-(1-p)^n$ 이 된다. 이 식을 n에 대하여 정리하면 다음과 같다.

$$C=1-(1-P)^n \Leftrightarrow n = \frac{\log(1-C)}{\log(1-P)}$$

이 공식을 이용하여 모집단의 다양한 유병률 조건하에서 적어도 1두의 감염된 개체를 검출하는데 필요한 표본크기를 계산하면 <Table 4-5>와 같다.

Table 4-5. Sample size for detection of at least one positive

Prevalence (%)	Confidence level (%)		
	90	95	100
1	229	298	458
5	45	58	90
10	22	28	44
15	14	18	28
20	10	13	21
25	8	10	16
30	6	8	13
35	5	7	11
40	5	6	9
45	4	5	8
50	3	4	7

앞에서와 같이 IBV의 유병률 추정치를 10-30%로 가정할 경우 <Table 4-5>를 활용하면 유병률 10%에서 28수, 20%에서 13수, 30%에서 8수, 50%에서 8수로 계산되므로 대략적으로 8-28수의 개체를 선발하면 된다. 따라서 본 연구에서는 계군 당 10수의 개체를 무작위로 선발하여 역가를 측정하였다.

- 표본검사결과 모두 음성일 때 모집단에서 감염된 동물의 최대 수: 앞에서 언급한 Cannon과 Roe (1982)의 공식을 변형하면 검사의 민감도를 100%로 가정하면 모집단에서 감염된 동물의 최대 수 (d)는 N=모집단의 크기, n=표본크기, P=신뢰수준이라고 하면 다음의 공식으로 계산된다.

$$n = (1 - (1 - P)^{\frac{1}{n}}) \times (N - \frac{n-1}{2})$$

가정 1: N=15,000수, P=90%, n=10수일 경우

$$n = (1 - (1 - 0.9)^{\frac{1}{10}}) \times (15000 - \frac{10-1}{2}) = 3085$$

가정 2: N=15,000수, P=90%, n=15수일 경우

$$n = (1 - (1 - 0.9)^{\frac{1}{15}}) \times (15000 - \frac{15-1}{2}) = 2134$$

가정 3: N=10,000수, P=90%, n=10수일 경우

$$n = (1 - (1 - 0.9)^{\frac{1}{10}}) \times (10000 - \frac{10-1}{2}) = 2056$$

가정 4: N=10,000수, P=90%, n=15수일 경우

$$n = (1 - (1 - 0.9)^{\frac{1}{15}}) \times (10000 - \frac{15-1}{2}) = 1422$$

3. 계군 모니터링 및 사양관리 특성 파악

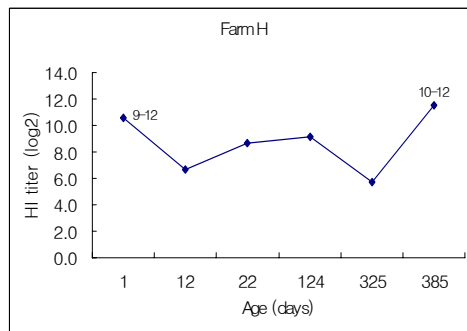
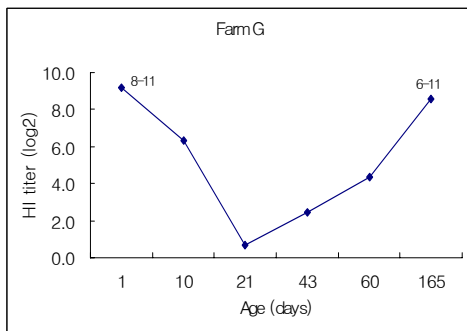
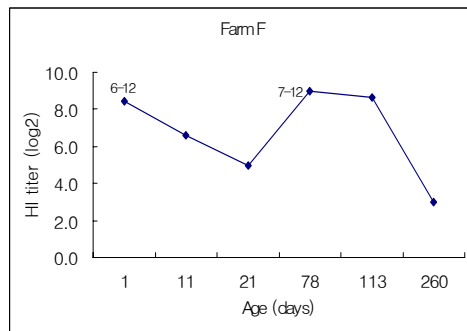
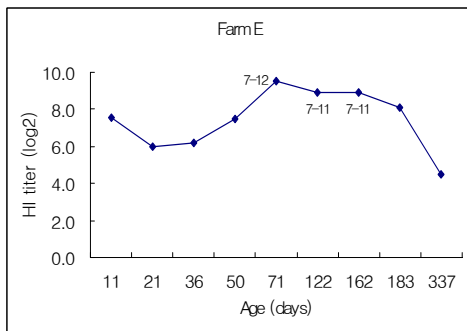
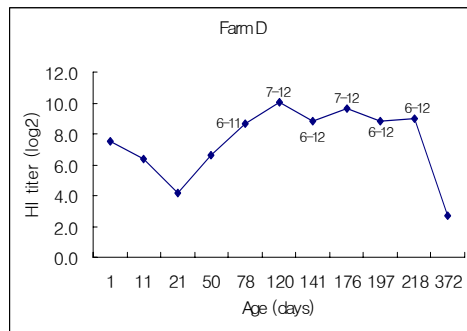
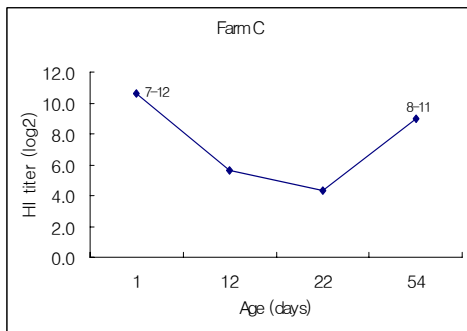
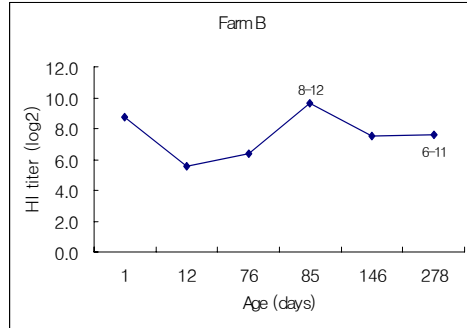
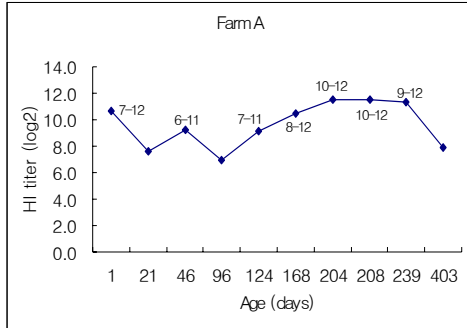
연구대상 농가에 대하여 농장주와 지역 수의사의 협조를 얻어 IB 발생상황에 대한 역학조사를 수행하였다. 각 농장별 환경 위생, 계사관리, 질병관리 및 백신접종 등에 관한 정보를 얻기 위하여 역학조사표를 사용하였다. 완성된 역학조사표의 신뢰도를 검증하기 위하여 연구 대상 농가 중 표본을 선발하여 예비 연구를 수행하여 조사 항목과 내용을 보완하였다. 현장방문을 통한 자료 수집은 2단계 수준에서 수행하였다. 1단계에서는 월 1회의 정기방문으로 역학조사표를 사용하여 위험요인에 대한 기초자료를 수집하고, 2단계에서는 연구대상 농가 중 질병발생이 확인된 농장에 대하여 수시방문을 통하여 역학조사를 시행하였으며 혈청검사는 3년간 지속하였다.

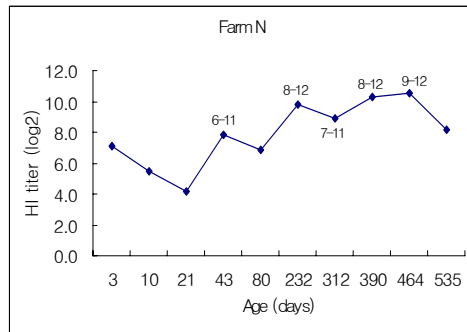
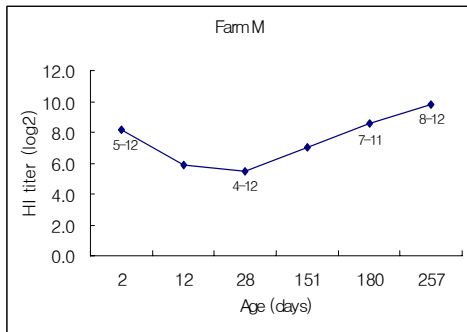
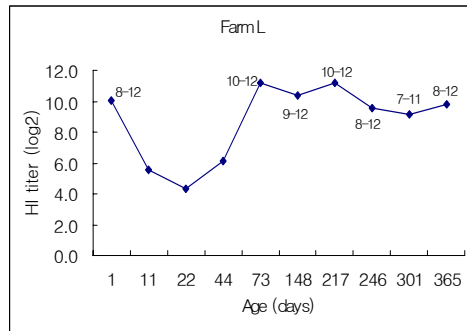
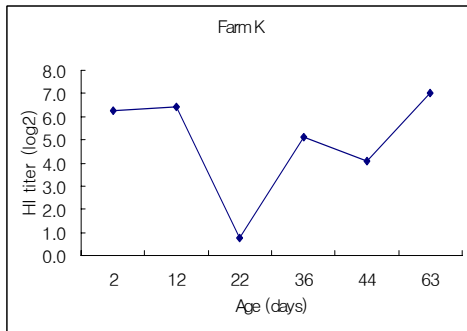
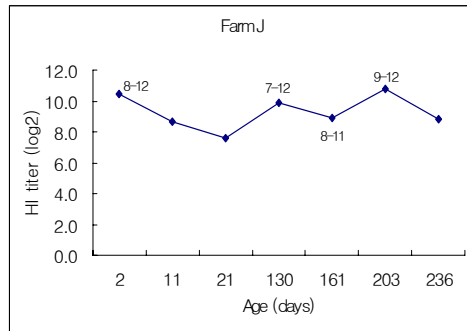
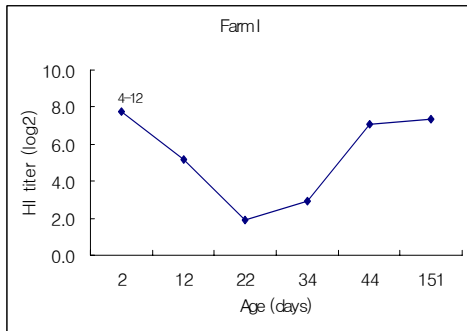
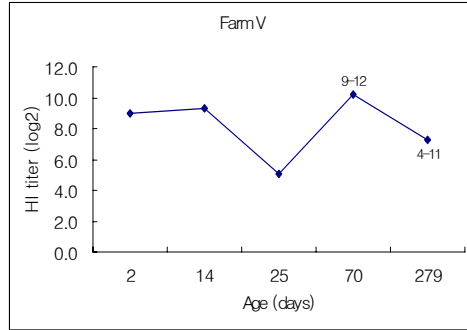
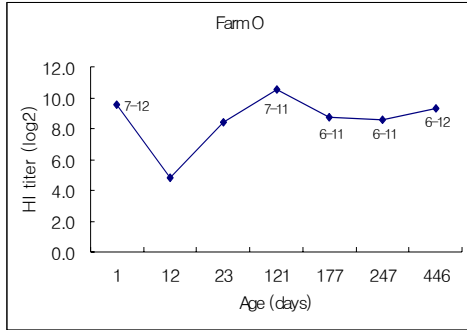
연구 대상 농가에서 질병 발생상황에 대한 역학조사를 수행하기 위하여 농장주와 지역 수의사를 개별 접촉하고 연구에 대한 서면협조를 얻은 후 각 농가별 위험요인의 규모와 분포, 환경 위생, 계사 및 질병관리 및 백신접종 등에 관한 역학조사표를 작성하여 활용하였다. 완성된 역학조사표의 신뢰도를 검증하기 위하여 연구 대상 농가 중 표본을 선발하여 예비 연구를 수행한 결과 신뢰도 계수가 85%로 실제로 사용할 수 있는 수준으로 나타났다. 지역 수의사와 공동으로 대상 농가를 정기 및 수시로 방문하여 계군을 혈청학적으로 모니터링하였다. 앞에서 계산된 31개의 농장 중 주기적인 모니터링이 가능한 27개 농장을 분석하였다.

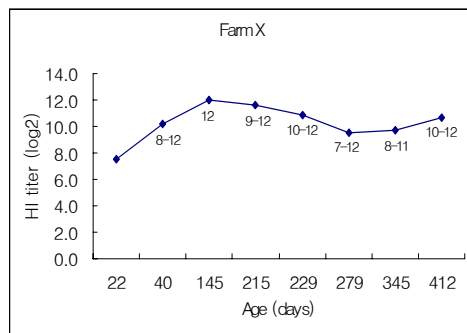
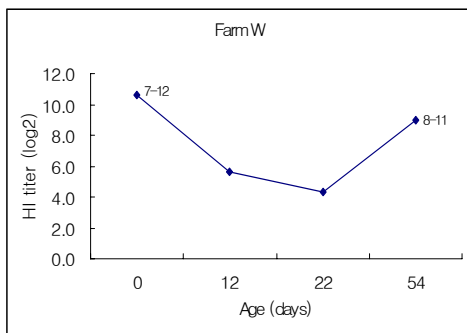
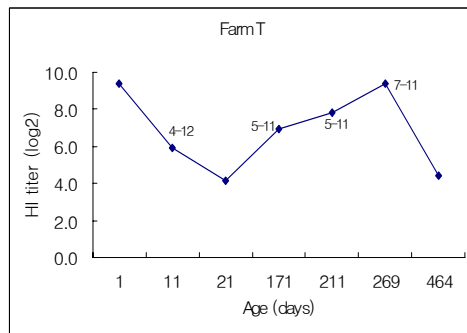
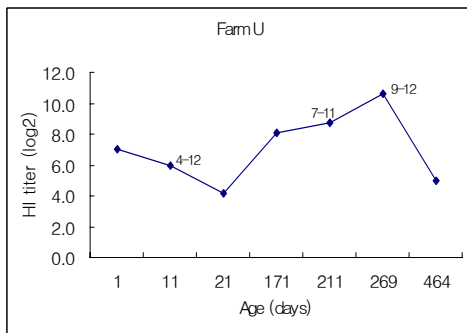
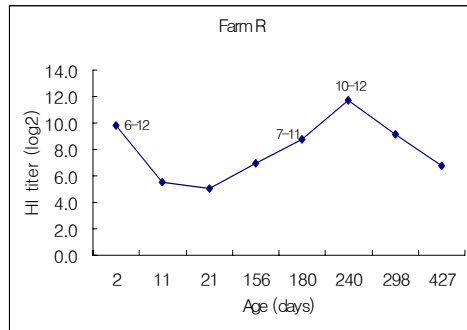
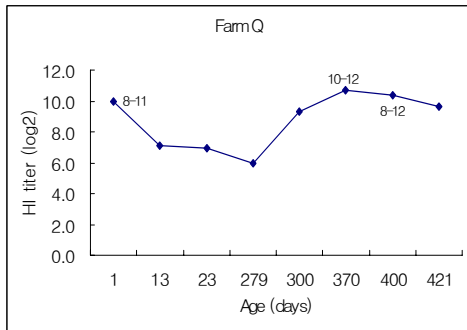
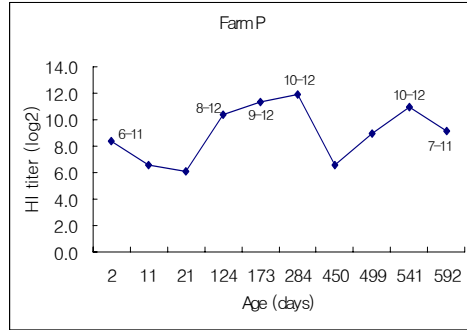
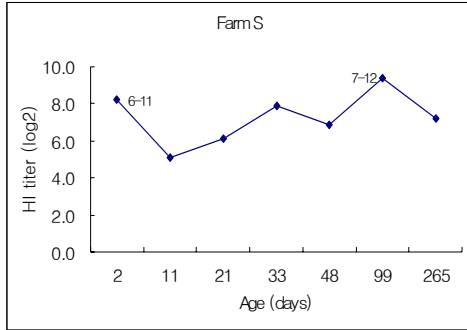
가. 유병률 조사

1) 2003-2004년 조사

IB 유병률을 추정하기 위하여 연구 대상 농장에 추가하여 총 395개 계군에서 계군당 10개씩 총 3,950개의 혈청에 대하여 항체역가를 측정하였다. IB 양성기준에 대하여 역가 (geometric mean titer) 11 이상이 적어도 하나 검출되는 경우 감염으로 판정할 때 (의견교환: Dr. Stephen Thayer, Poultry Diagnostic and Research Center, University of Georgia, USA) 14.2% (56개)의 유병률, 역가 10 이상이 적어도 하나 검출되는 경우를 기준으로 할 때 40.8% (161개)의 유병률을 보였다. 이러한 결과는 양성결과를 판단하는 역가의 기준설정, 조사시점, 백신접종 상태, 선정농가의 특수성, 관찰기간 54일 (약 8주)부터 최대 634일령 (약 90주) 등에 따라 어느 정도 차이가 있는 것으로 사료된다. 특히 경시적 모니터링이 가능했던 31개 계군의 경우 혈구응집 역가 (hemagglutination inhibition geometric mean)가 11 이상을 양성으로 판정할 때 1개 농장을 제외하고 모두 1회 이상의 IBV에 감염되는 것으로 조사되었다 <Fig 4-1>.







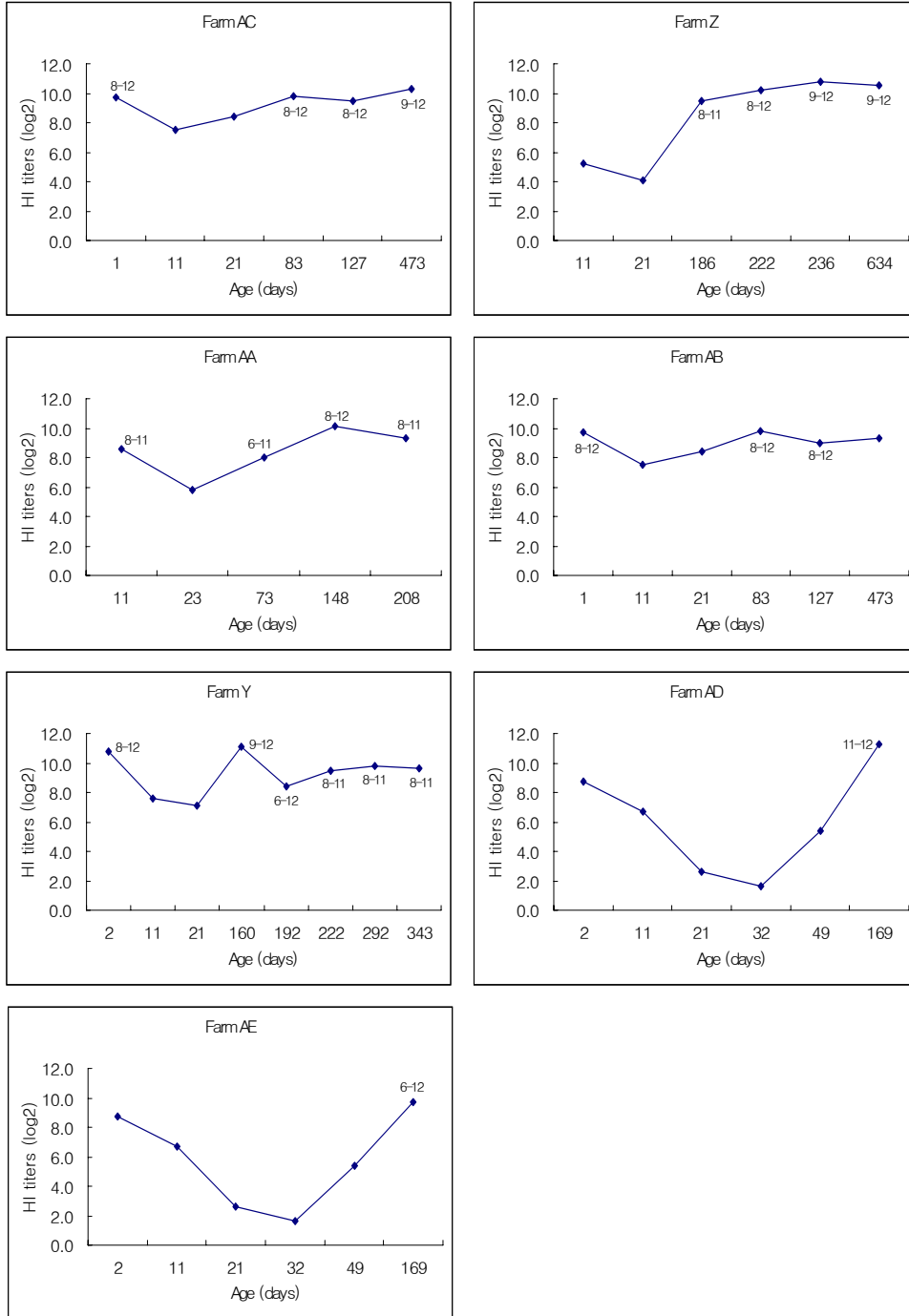
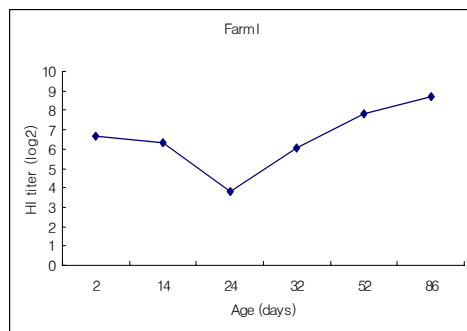
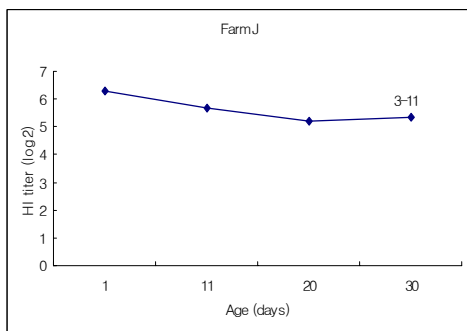
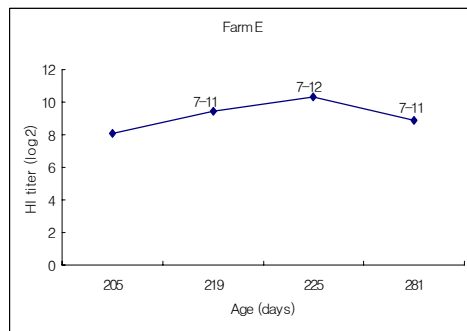
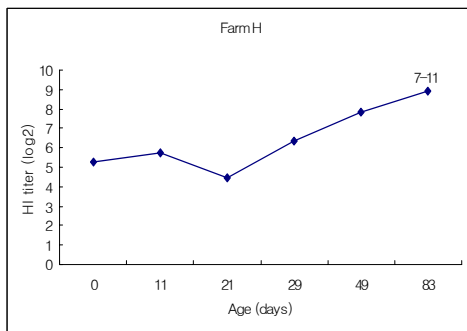
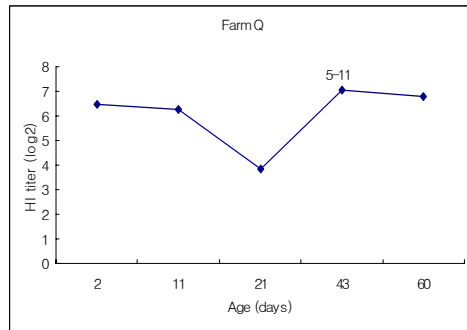
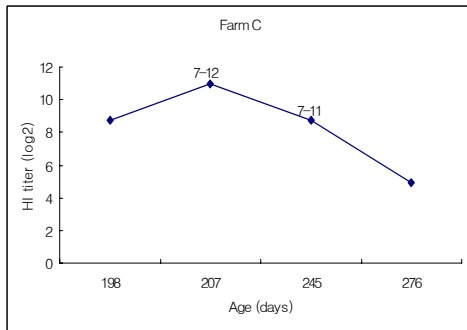
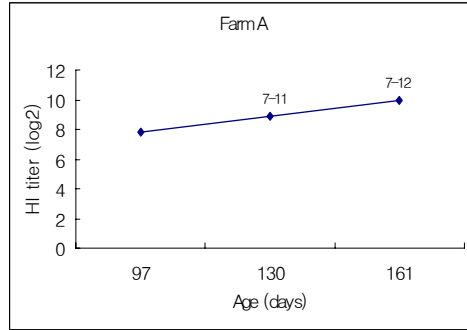
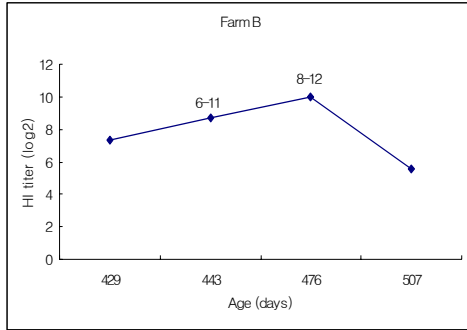


Fig 4-1. Hemagglutination inhibition (HI) geometric mean titers (GMT). The numbers at data point represent the ranges of HI GMT.

2) 2004-2005년 조사

2차년도 조사에서는 조사변수를 추가하였으며 이 조사표는 신뢰도 검정결과 88%로 비교적 높게 나타났다. 1차년도 연구에 이어 지속적으로 모니터링이 가능한 31개 계군과 2차년도 연구에서 새로 추가된 계군을 포함하여 총 132개 계군을 대상으로 하였다. 농장의 개인적인 사정에 따라 산발적으로 추적한 농장을 제외하고 역학조사표 상의 중요한 변수에 대한 자료가 충분하여 분석에 활용할 수 있는 자료는 109개 계군 (82.6%)이다.

IB 양성판정 기준은 1차년도와 동일하게 HI 역가 (geometric mean titer) 11 이상으로 판정하였다. 이 기준에 의하면 109개 계군 중 52개 계군이 양성으로 확인되어 39.4%의 유병률을 보였다. 한편, 양성기준을 역가 10 이상으로 판정할 때 56개 계군이 양성으로 확인되어 42.4%의 유병률로 조사되었다. 이러한 결과는 1차 조사에서와 마찬가지로 양성판단 역가의 기준설정, 조사시점, 선정 농가의 특수성, 백신접종 상태, 산란계에 대한 조사기간 약 8주부터 최대 92주 등에 따라 어느 정도 차이가 있는 것으로 사료된다. 경시적인 혈청학적 검사에서 IB가 발생한 것으로 추정되지만 증체율이나 주간 폐사율을 정확히 기록하지 않는 경우 농장주가 인지하지 못하고 지나가는 경우도 많았는데 이 경우 산란저하는 10% 이내로 유지되었다. 이는 수의사의 임상적 진단의 어려움과도 관련이 있으며 특히 겨울철에 간헐적으로 발생하는 육계의 신장형과는 다르게 산란저하와 산란피크르 채우지 못하는 특성을 갖는 산란계 (종계포함)의 경우 99%는 미확인으로 지나가고 단지 1-2%만 인지되는 특성이 보고된 결과라든가 IB에 의한 호흡기형의 99%는 년중 발생한다는 보고와 유사하다. 본 연구에서는 HI 검사와 임상증상 등에 근거하여 IB를 진단하였기 때문에 특징적인 상황을 제외하면 일부 뉴캐슬병 등의 질환과 감별이 어려운 경우도 있었다. 특히 경시적인 모니터링이 가능했던 대부분의 농장에서 1회 이상의 IBV에 감염되는 것으로 조사되었다. <Fig 4-2>는 연구 대상 농가 중 일부 특징적인 농장에 대한 HI 역가의 변동 상황을 나타낸 것이다.



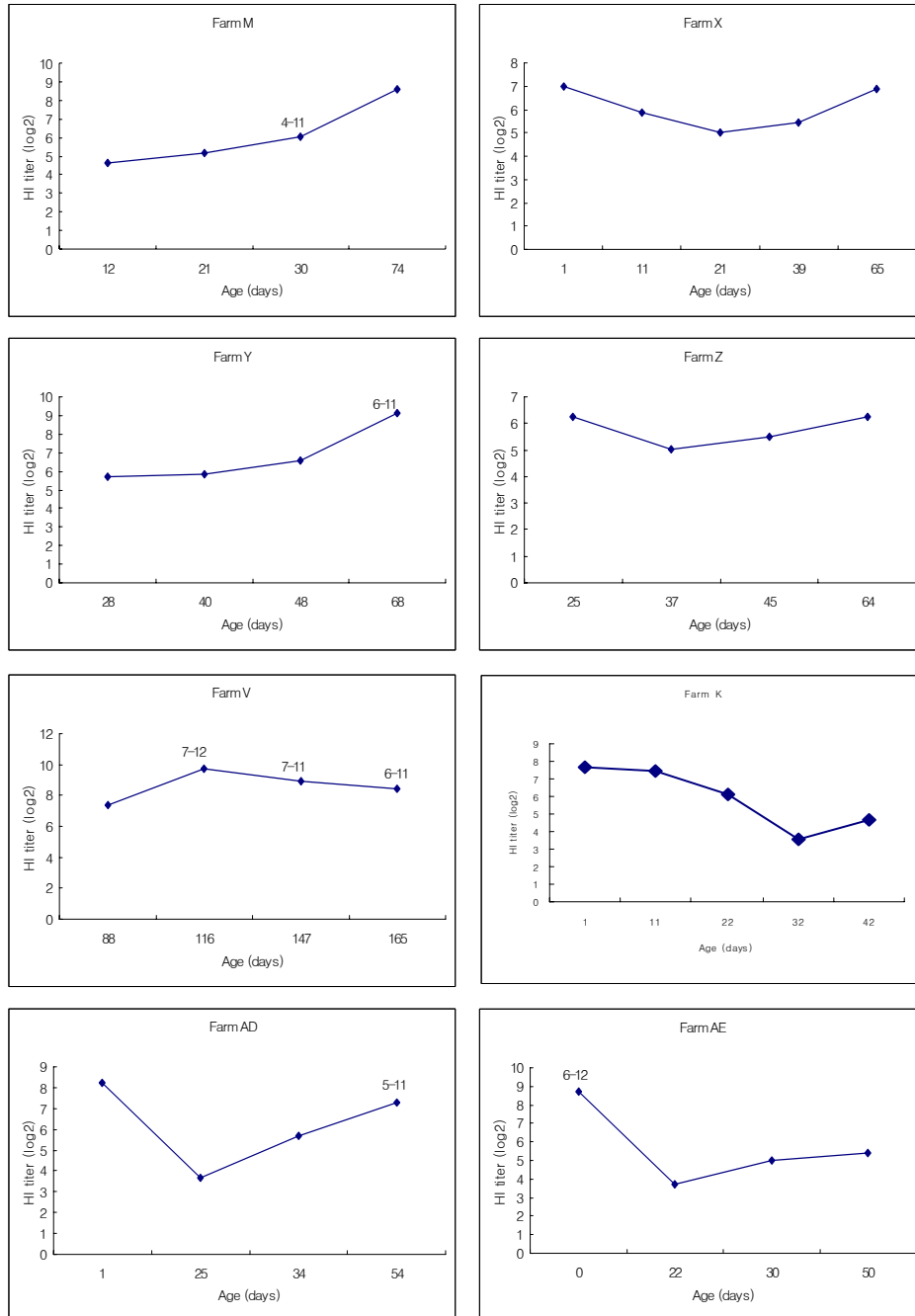


Fig 4-2. Hemagglutination inhibition (HI) geometric mean titers (GMT). The numbers at data point represent the ranges of HI GMT.

나. 농장의 사양관리 특성

국내 많은 농장들이 노후한 계사, 다일링 계군을 포함할 뿐만 아니라 환기시스템이나 기타 설치류 구제대책이 전반적으로 불량하고 계사입구의 소독도 제대로 수행되지 않았다. 이러한 상황은 실제 감염율과 백신접종에 따른 감염율을 구분하기 어렵게 하고 일부 농장은 년중 높은 수준의 항체역가를 보였다. 또한 산란기에 접어든 계군에 대한 IB 혈청검색시 백신접종 여부에 관계없이 높은 수준의 IB 항체 (역가: 7-9 수준)를 보유하고 있는 계군이 많았다. 도태를 앞둔 노계군에서도 야외감염 수준이라고 할 수 있는 혈구응집억제 항체역가가 10 이상의 높은 수준을 보유하고 있는 계군이 흔하였다.

특히 임상수의사의 개인적인 경험에 근하면 혈청학적으로 IB 양성이 의심되는 계군일지라도 IB 감염에 따른 피해상황과 반드시 일치하지는 않는다는 것이다. 농장관계자와의 현장조사에서 바이러스의 특성이나 감염시기에 따라 자연감염군과 백신접종군간에 피해의 차이가 없어 백신사용의 불신감이 존재하고 있었다. 또한 국내 변이형 IBV로 조제된 BBNE 사독백신을 접종하였음에도 산란피크에 도달하지 못하는 경우가 많다는 의견을 보였다. 한편, 농장관계자는 호흡기형 IBV에 감염되어 증체율이 저하되거나 주간 폐사율이 10%를 상회하고 있음에도 그 피해를 정확하게 인지하지 못하는 경우가 많고 이는 수의사의 임상적 진단의 어려움과도 관련이 있었다.

현장방문을 통한 자료수집은 월 1회의 정기방문으로 이미 작성된 역학조사 양식을 사용하여 농장운영, 계사관리, 환경 및 위생관리, 질병관리 영역에 대한 기초자료를 수집하고 필요에 따라 연구대상 농가 중 임상적, 실험실적 결과를 근거로 발생이 의심되는 농장에 대하여 수시방문을 통한 역학조사를 시행하였다. IBV는 감염시 닭의 맹장편도나 신장에 지속적으로 바이러스가 지속하기 때문에 엄격한 계군관리를 실시하지 않을 경우 농장에서 IBV의 지속적인 감염의 고리를 차단하기 어렵다. 특히 잠복기가 18-36시간으로 짧고 감염조건이 성립되면 계군 전체가 오염되는데 많은 시간이 소요되지 않아 질병의 경과가 짧을 것으로 기대되지만 어떤 IBV에서는 오랫동안 생존할 수 있기 때문에 닭의 방어체계에서 벗어나 결국에는 변이주를 만들어 내며 이는 국내 농장의 특징의 하나다 (손영호, 2004). 또한 다른 질병 (특히 MS)과의 혼합감염이 있거나 심한 스트레스에 노출되는 경우에도 IB가 재발될 수 있다. IB는 바이러스의 특성이나 감염시기에 따라 호흡기, 산란저하, 신장염 등으로 인한 급성폐사와 같이 눈에 띄는 다양한 증상과 피해를 유발하지만 자연감염되더라도 현저한 피해없이 주간폐사율, 증체율, 사료효율 등과 같은 계군의 생산성 자료의 분석을

통해서만 인지될 뿐 지나가는 경우도 있었다. 수란관 발달이 본격화되는 성성숙 시점인 12-14주령 전후에 감염되면 산란개시 이후 기형란의 생산은 없으나 산란피크에 도달하지 못하며 70-80%의 산란율에 머무는 경우가 많았다. 본 연구에서 수행한 역학조사 결과 HI 역가와 IB 감염여부는 네가지 범주로 구분된다.

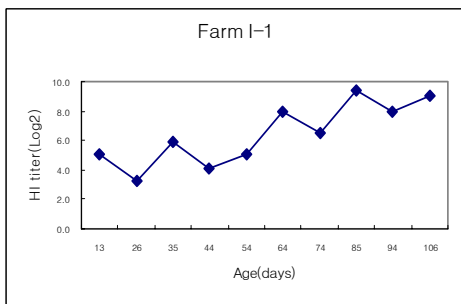
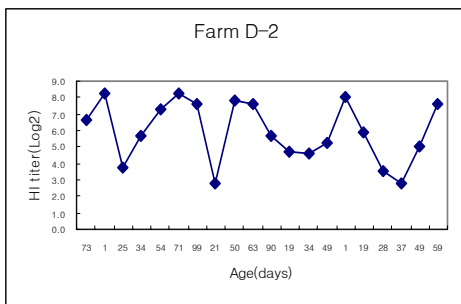
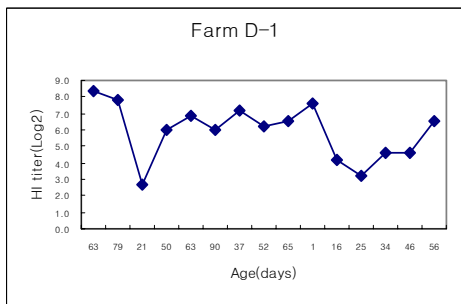
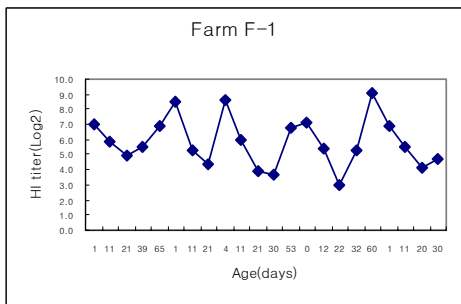
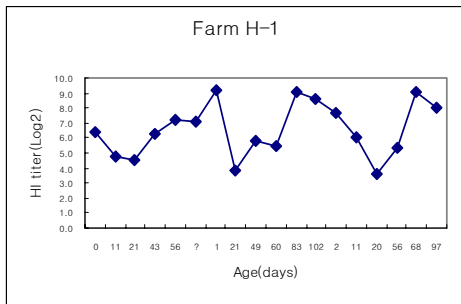
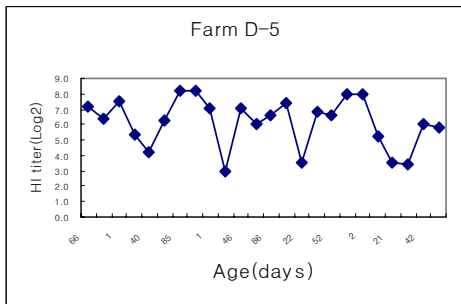
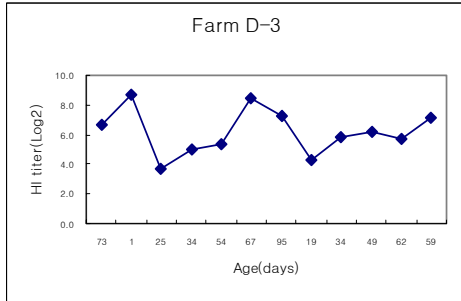
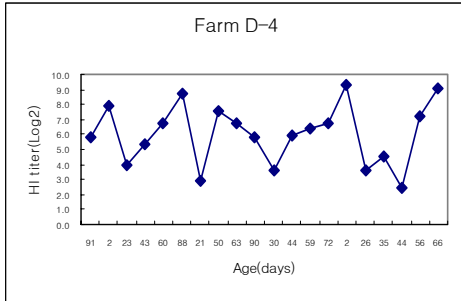
첫째, HI 역가가 낮고 임상증상이나 산란율 저하가 없는 경우로서 음성계군으로 분류된다 <Fig 4-3>.

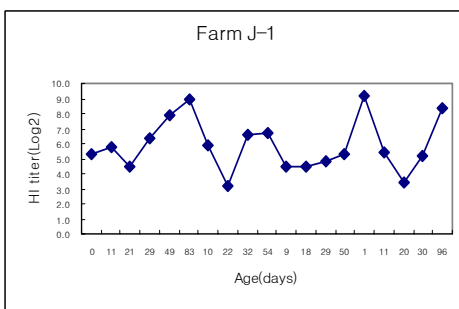
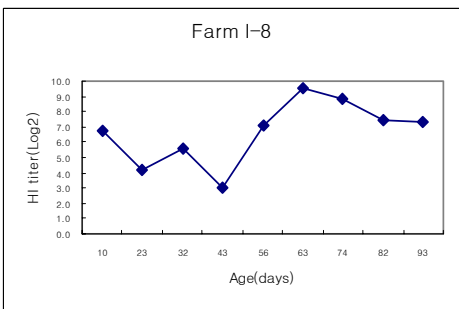
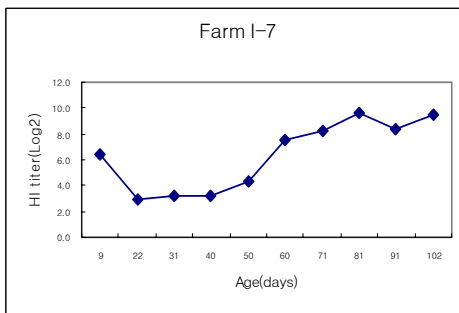
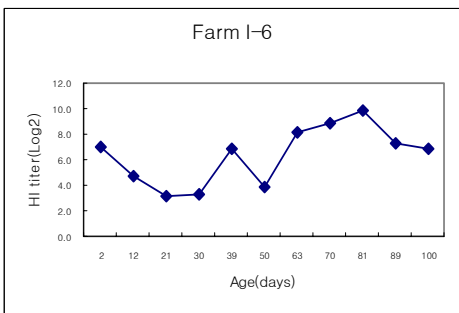
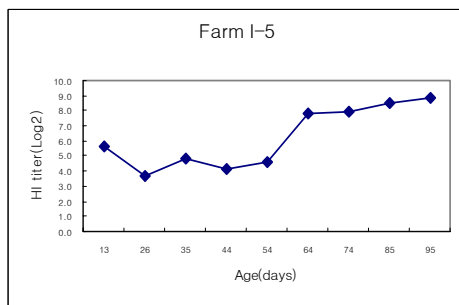
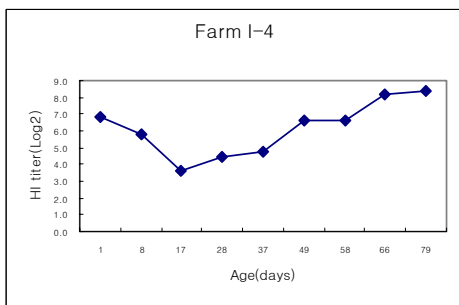
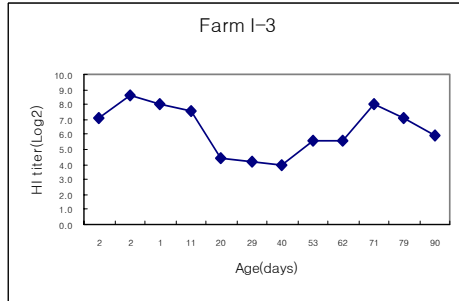
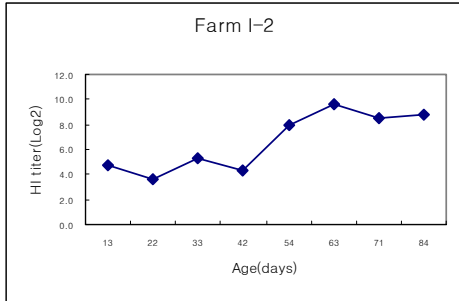
둘째, HI 역가가 높고 (역가 11 이상) 임상증상이나 산란율 저하가 현저히 나타나는 경우 <Fig 4-4>. 52개 양성 계군 중 이 기준에 부합하는 계군은 11.5% (n=6)로 로지스틱 회귀모형에서 사용한 대부분의 위험요인에 노출된 계군이었다. 연구 대상 농장의 상당수는 노후한 계사, 연속입추, 다일령 계군을 포함할 뿐만 아니라 환시시스템이나 기타 설치류 구제대책이 전반적으로 불량하고 계사입구의 소독 등 biosecurity 측면에서 열악한 상황을 보이고 있었다. 이러한 상황은 자연감염과 백신접종에 따른 감염을 구분하기 어렵게 하고 일부 농장은 년중 높은 수준의 항체역가를 보였다. 초산이 개시된 이후에 감염되는 경우로 감염 일령에 따라 다르지만 기형란, 연란 발생이 비교적 흔하게 관찰되면서 산란율이 25%까지 저하되는 경우도 있었다. 감염된 닭을 부검한 결과 복수가 가득하고 기관의 수양성 점액의 증가 및 충혈, 수란관의 유착 및 위축 등 전형적인 IB 소견이 보였으며 산란율을 회복하는데 상당 시간이 소요되고 환우를 시행한 농장도 있었다.

셋째, HI 역가는 높지만 임상증상이나 산란율 저하가 경미한 경우 <Fig 4-5>. 양성 계군 중 이 기준에 부합하는 계군은 55.8% (n=29)로 로지스틱 회귀모형에서 사용한 대부분의 위험요인에 노출된 계군으로 산란율이 10% 내외로 유지되었다. 일반적으로 IB 백신을 실시하지 않는 시기인 40주 이후에 산란율 저하 등 현저한 피해가 없으면서 HI 역가가 비교적 매우 높게 형성되는 계군은 IB 감염의 피해로 인정될 수 있을 정도의 산란저하나 현저한 임상증상도 관찰되지 않았음을 고려할 때 계군내 오염된 IB 바이러스에 의해 계군의 일부가 지속적으로 산발성으로 감염되고 있는 것으로 볼 수 있다.

넷째, HI 역가는 높지만 임상증상이나 산란율 저하가 거의 없는 경우 <Fig 4-6>. 이 기준에 부합하는 계군은 32.7% (n=17)로 산란율이 5% 미만일시적으로 나타나다가 회복되는 계군이 대부분이었다. 약 10주령 전후

(2-12주) 미만의 육성기에 감염되는 경우 호흡기에 국한되는 가벼운 증상을 경험한 후 강력한 자연면역 형성되고 산란개시 이후 산란피크에 도달할 가능성이 많은 것으로 알려져 있다. 또한 300일령 이후에 감염되는 경우에도 IB에 의한 임상증상과 산란저하로 인한 피해는 거의 없는 것으로 나타났다. 혈청학적으로 IB의 자연감염이 의심되지만 IB 감염에 따른 피해가 반드시 동반되는 것이 아니기 때문에 향후 발생에 따른 피해를 감안하면 이 범주에 해당하는 농장은 역학적으로 매우 중요한 의미를 부여할 수 있고 향후 연구에서 관심을 지속할 필요가 있을 것으로 판단된다.





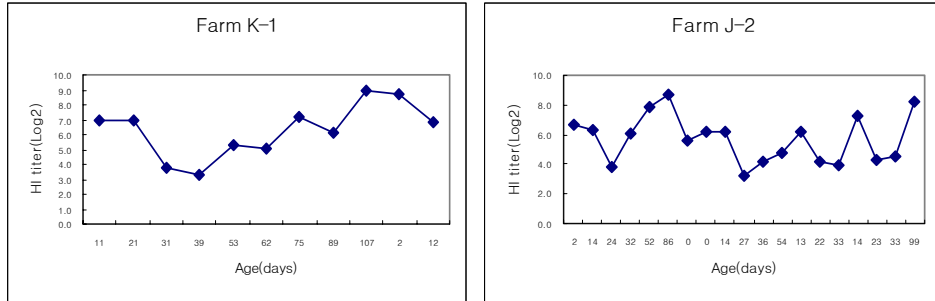


Fig 4-3. IB negative flocks with no clinical signs or egg production rate.

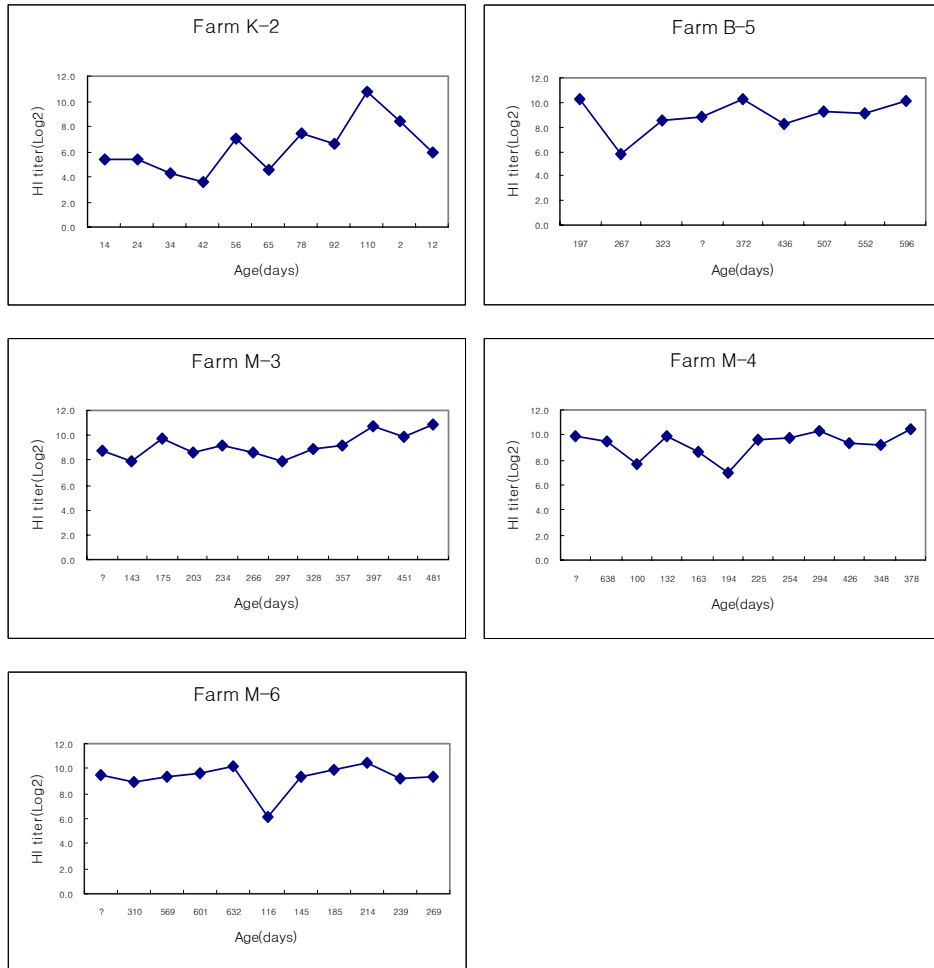


Fig 4-4. IB positive flocks with significant clinical signs or egg production rate.

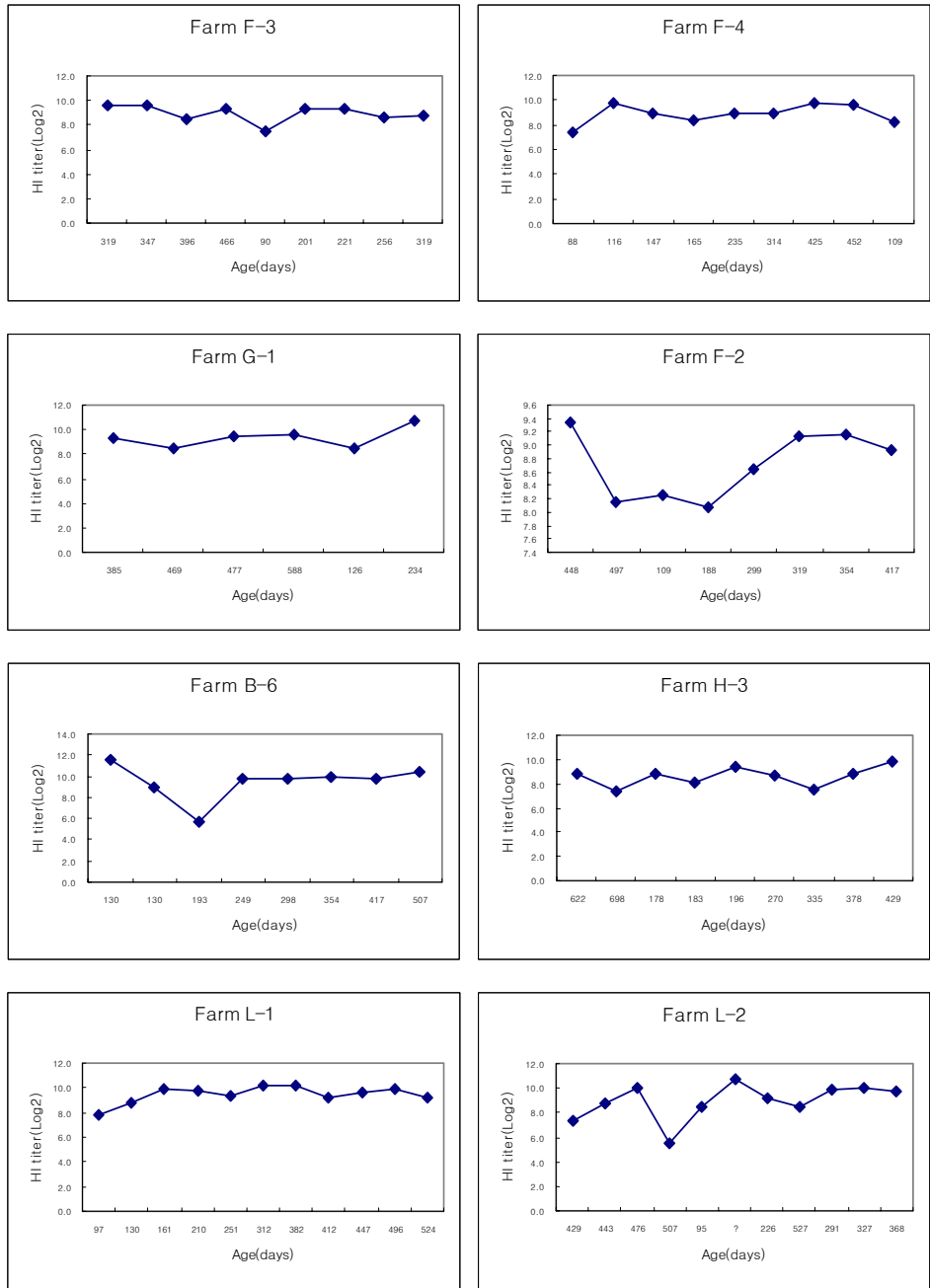
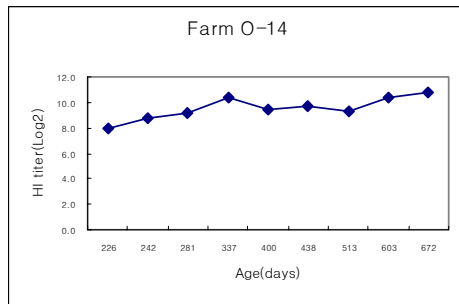
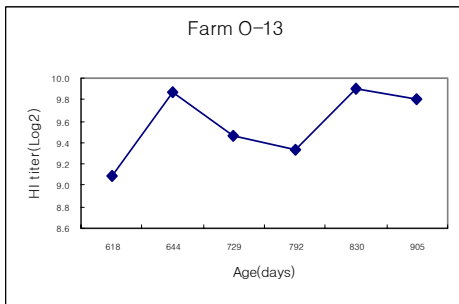
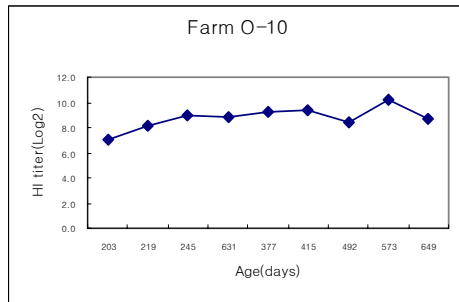
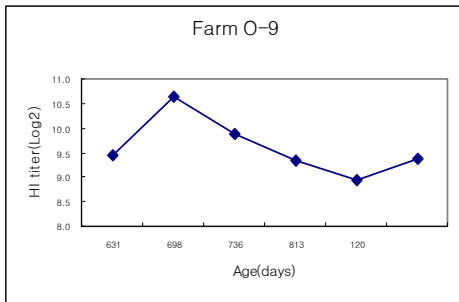
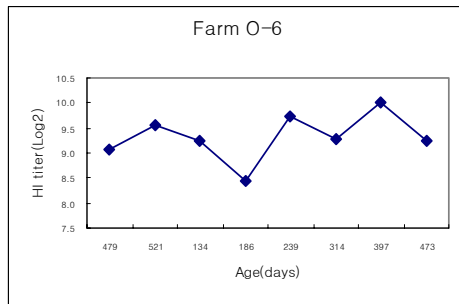
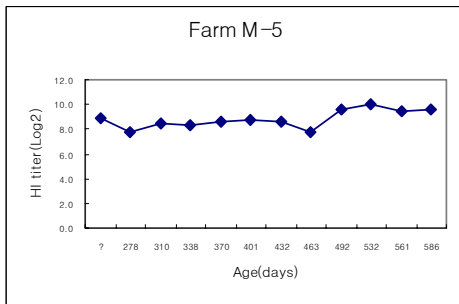
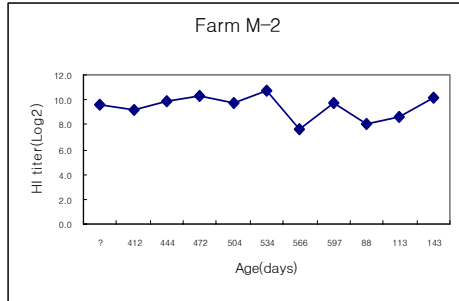
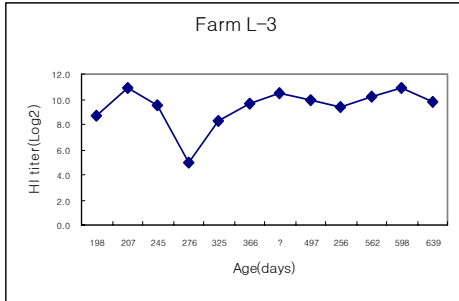
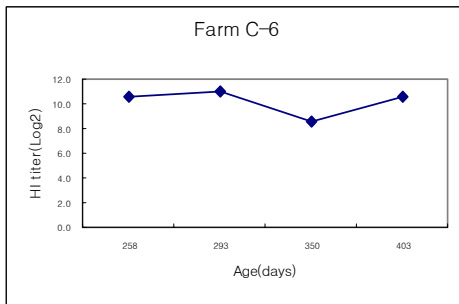
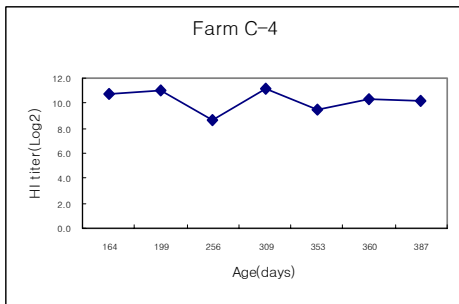
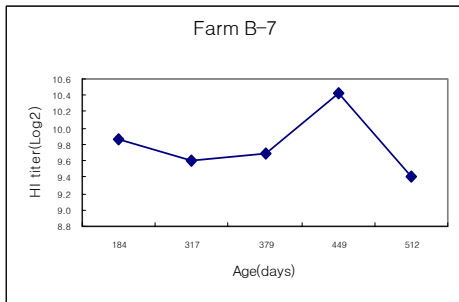
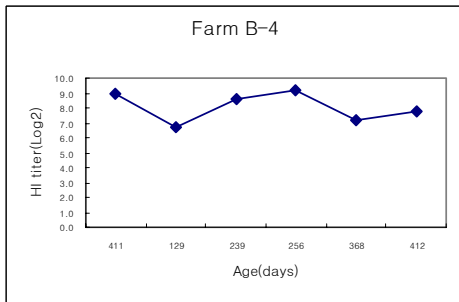
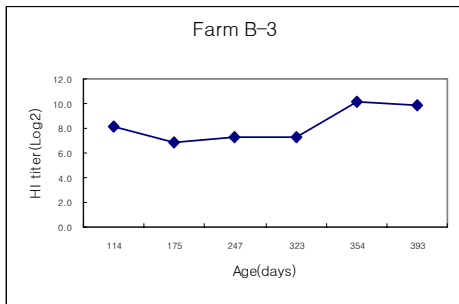
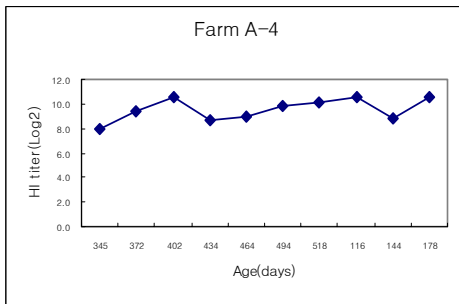
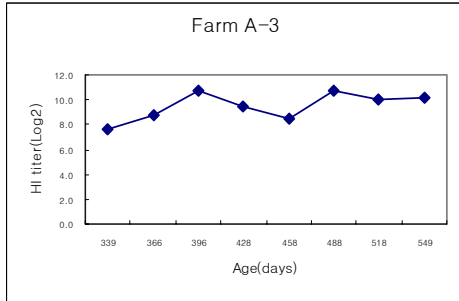
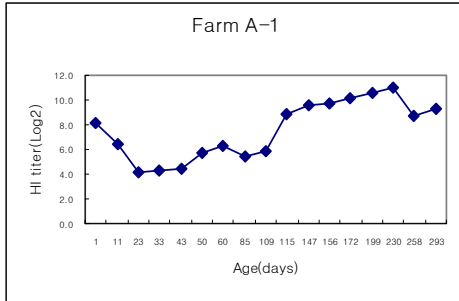
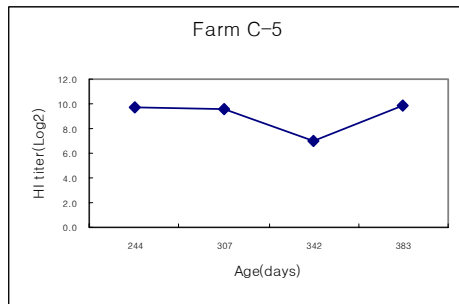
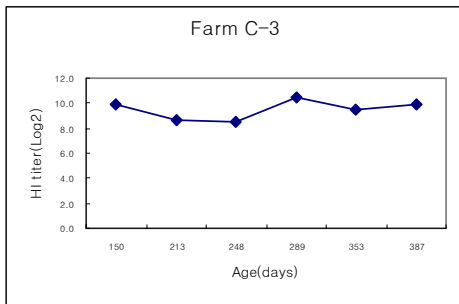
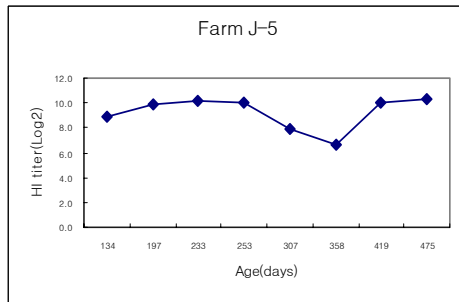
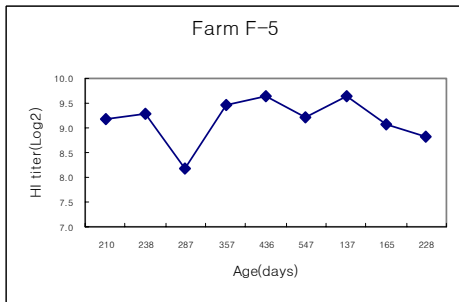
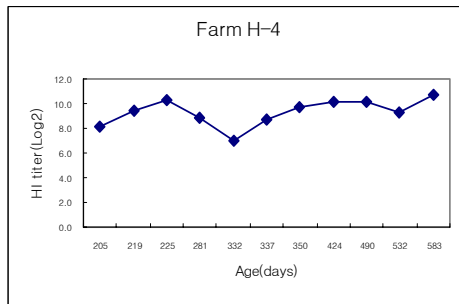
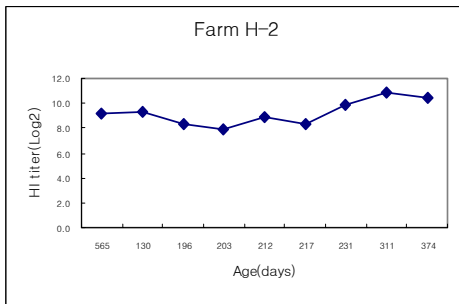
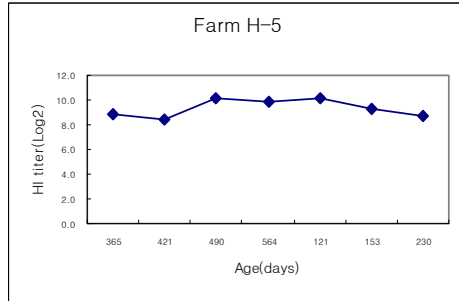
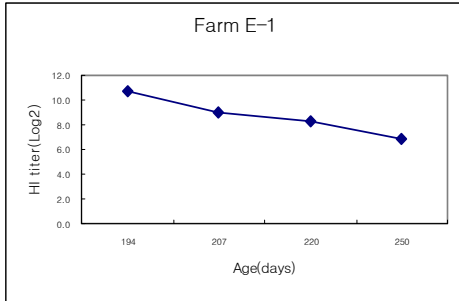
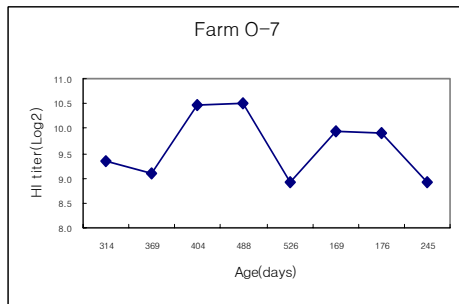
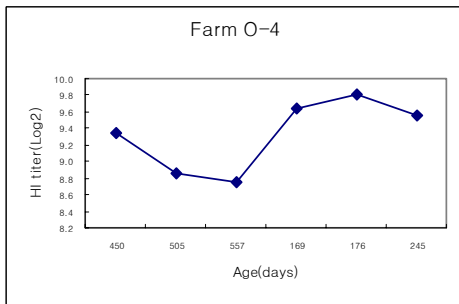
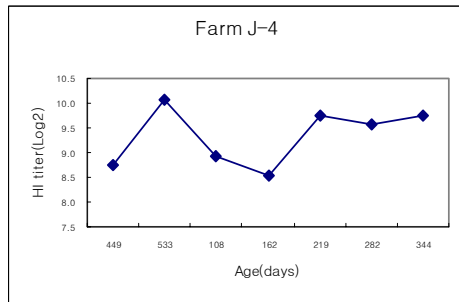
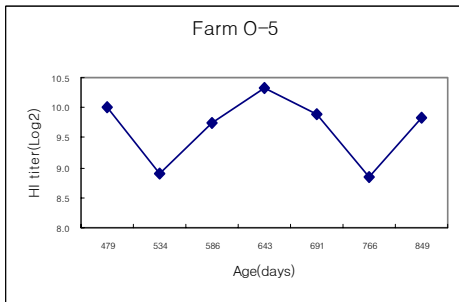
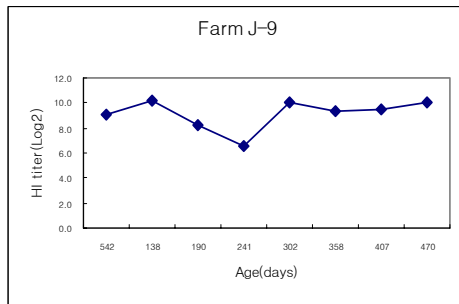
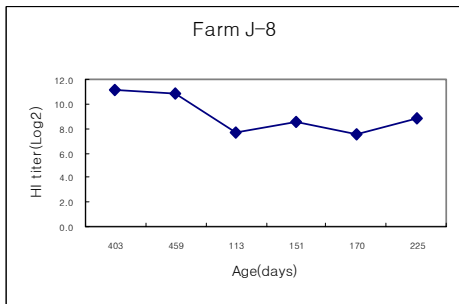
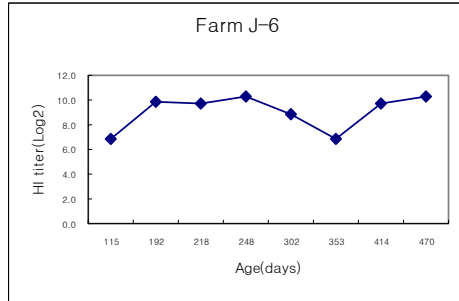
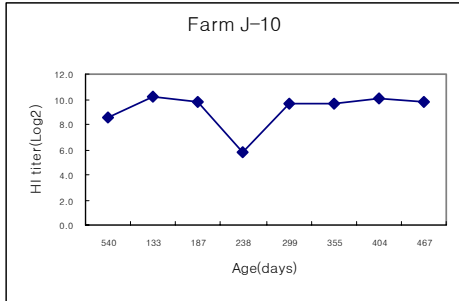


Fig 4-5. IB positive flocks with high HI titer but with mild clinical signs or change in egg production.









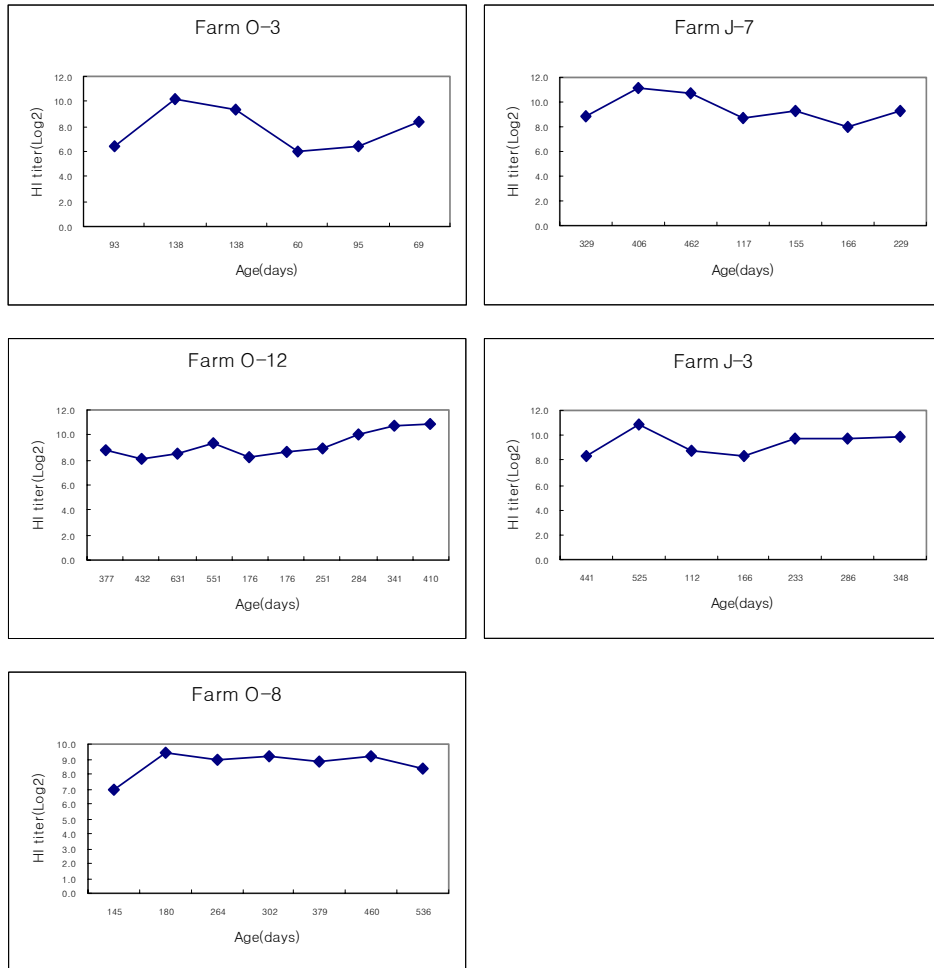


Fig 4-6. IB positive flocks with high HI titer but no changes in egg production.

4. 위험요인 분석

IB 역학조사로 구축된 자료에 대하여 계군관리, 환경 위생, 백신접종 및 기타사항에 대하여 질병발생에 기여하는 위험요인을 분석하였다. 분석방법은 인공신경망을 이용한 분석과 로지스틱 회귀분석을 이용하였으며 두 방법의 결과를 비교하였다. 로지스틱 회귀분석 모형에 의한 예측능력은 다변량 분석에서 위험요인으로 확인된 변수에 대하여 ROC 곡선을 작성하여 변수들간 능력을 상호 비교평가하였다. ROC 곡선은 민감도를 y축에, 1-특이도 즉 가양성율을 x-축으로 하여 작성한 그림으로 진단검사의 예측능력을 평가하는데 널리 사용되는 방법이다. 이 분석을 위하여 MedCalc 프로그램 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)을 사용하였다.

가. 2003-2004년 분석

본 조사에서 사용한 역학조사표는 51개의 변수로 구성되며 요약하면 다음과 같다.

- 농장의 소재지, 규모 등 일반정보 (4개 항목)
- 계군 및 사양정보 (24개 항목)
 - 사육계군 수, 계군의 크기, 농장 운영 기간
 - 입추방법, 환기 시스템
 - 계분 및 사체처리 방법
 - Biosecurity 프로그램
 - 기타 농장관리 및 사양의 특성 등
- 질병발생 상황 (23개 항목)
 - 년도별 (2002-2004) IB 발생 상황
 - 년도별 (2002-2004) 기타 질병 발생 상황
 - 질병별 진단방법 (임상적, 실험실적 등)

연구대상 농가에 대한 위험수준은 다음의 두가지 요인으로 구분하였다. 먼저 주요인 (major factor)으로는 연속입추 혹은 All-in-All-out 시행 여부, Cold stress 가능성, 축사의 환기 시스템 유무 및 작동 상황을 포함하였다. 한편, 부수적인 요인 (minor factor)으로는 산란피크 시점 (겨울 혹은 여름), 육성과 산란을 동시에 하는 농장과 별도로 농장, 다른 질병의 복합감염 유무 (Marek's,

Influenza 등), 산란계의 이동 시점 (성성숙 시점 전후), 계사의 운영 년수 (새로 지은 계사 및 노후계사) 등을 포함하였다. 특히 산란피크 시점을 포함한 이유는 겨울철일수록 계사 내 이슬이 많이 맺혀 바닥이 질어지므로 해서 호흡기 질환 발생이 높아 입식시기를 조절하여 피크시점을 조절하는 것이 예방수단으로 효과적일 것이라는 가정에 근거한 것이다. 분석모형은 다음과 같다.

- 로지스틱 회귀모형: $\log \frac{p}{1-p} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n$

여기에서, p = 전염성 기관지염 (결과)이 발생할 확률, β_0 = 절편, $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ = 역학조사 자료에서 얻은 독립변수 (x_1, x_2, \dots, x_n)에 대한 회귀계수를 의미한다. 2개의 종속변수 즉 IB 양성과 음성 (변수명: NEWIB) 두 번째는 IB 양성과 동시에 뉴캐슬병 양성인 군과 두가지 모두 음성 (변수명: STATUS)인 군을 사용하여 각각 판정하였다. 본 보고서에는 전자의 방법에 따른 결과를 보고한다. 분석에서 먼저 모든 독립변수에 대한 단변량 분석을 수행하고 유의수준이 0.25 이하인 변수는 최종 다변량 분석에 투입하였다. 컴퓨터 패키지는 SAS (version 8.2, SAS Institute Inc.)를 사용하였고 통계적 유의성은 회귀계수와 표준오차를 이용한 Wald 카이제곱 검정으로 평가하였고 모든 유의성은 95%에서 판정하였다. 양의 회귀계수는 변수값이 변하는 경우 IB에 감염될 위험이 동일한 방향으로 변한다는 것을 의미한다. 한편, 보정된 교차비 (odds ratio, OR)와 신뢰구간은 Wald 카이제곱 통계량으로 계산하였고 만일 교차비가 1.0을 넘는 경우 IB에 감염될 위험이 증가하고 1.0 미만인 경우에는 IB에 감염될 위험이 감소한다는 것을 의미한다. <Table 4-6>은 본 연구에서 독립변수로 사용된 위험요인과 각 위험요인에 대한 분류항목을 제시하고 있다.

Table 4-6. Risk factors and categories relevant to the infectious bronchitis (IB) cases among layer chickens, 2003-2004

Risk factor group	Risk factor	Categories
Strain	Chicken strains	Hyline, Roman
Flock size	Flock sizes	1-15,000, > 15,000
Age	Phase of laying cycle	<= 17 w (before laying) 18-34 w (EPP) 35-56 w (MPEP) > 56 w (LPEP)
Entry of chicks	Method of	Continuous or All-in-all-out
Peak	Season showing highest EP	Summer, winter
Ventilation	Ventilation system	Yes, no
Infection	Infection other than IB	Yes, no
Operation	Operation years of houses	< 5, >= 5 year
Stress	Cold stress in the houses	Yes, no

EP, egg production; EPP, early phase of EP; MPEP: middle phase of EP; LPEP: late phase of EP.

<Table 4-7>은 IB 양성균과 음성균에 대한 단변량 분석결과로 중추단계 (17주)의 계군이 11개, 산란초기 (18-34주) 6개, 산란중기 (35-56주) 8개, 산란후기 (57주 이상) 단계의 계군이 2개였다. 사육 품종은 Hyline이나 Roman이 거의 동일한 수준을 보였고, 입추방법을 볼 때 10개 (37%)가 All-in-all-out 시스템을 유지하고 있었으며 특히 농장 운영 년수가 5년 미만이 9개로 전체의 33.3%를 차지하였다. 각 위험요인에 대한 단변량분석 결과는 <Table 4-8>과 같고 입추방법 (p=0.2180), 적절한 환기 시스템의 운용 (p=0.1740), 계사 운영 년수 (p=0.0299) 등 3개 변수가 최종 다변량 분석에 투입되었다.

Table 4-7. Univariate analysis of relations between risk factors and infectious bronchitis (IB) cases among 27 flocks, 2003-2004

Risk factor	IB positive (n=12)		IB negative (n=15)		
	No.	%	No.	%	
Age	<= 17 weeks	4	33.3	7	46.7
	18-34 weeks	4	33.3	2	13.3
	35-56 weeks	3	25.0	5	33.3
	> 56 weeks	1	8.4	1	6.7
Strain	Hyline	7	58.3	7	46.7
	Roman	5	41.7	8	53.3
Flock size	1-15,000	3	25.0	3	20.0
	> 15,000	9	75.0	12	80.0
Entry of chick	All-in-all-out	6	50.0	4	26.7
	Continuous	6	50.0	11	73.3
Peak	Summer	8	66.7	9	60.0
	Winter	4	33.3	6	40.0
Ventilation	Yes	8	66.7	6	40.0
	No	4	33.3	9	60.0
Infection	No	3	25.0	0	0
	Yes	9	75.0	15	100.0
Operation	< 5	1	8.3	8	53.3
	>= 5 year	1	91.7	7	46.7
Stress	No	3	25.0	4	26.7
	Yes	9	75.0	11	73.3

Table 4-8. Independent evaluation of the potential association of risk factors with a diagnosis of infectious bronchitis (IB) cases, 2003-2004

Risk factor	PE	OR (95% CI)	p-value
Age			
<= 17 weeks	Reference		
18-34 weeks	1.257	3.50 (0.431 - 28.45)	0.2416
35-56 weeks	0.0488	1.05 (0.159 - 6.924)	0.9596
> 56 weeks	0.5596	1.75 (0.084 - 36.29)	0.7175
Strain			
Hyline	Reference		
Roman	-0.470	0.63 (0.135 - 2.89)	0.5476
Flock size			
1-15,000	Reference		
> 15,000	-0.288	1.33 (0.12 - 4.62)	0.7565
Entry of chick			
All-in-all-out	Reference		
Continuous	1.012	2.75 (0.55 - 13.75)	0.2180
Peak			
Summer	Reference		
Winter	-0.288	0.75 (0.15 - 3.65)	0.7218
Ventilation			
Yes	Reference		
No	-1.098	0.33 (0.07 - 1.62)	0.1740
Infection			
No	Reference		
Yes	-12.736	- NC -	
Operation			
< 5	Reference		
>= 5 year	2.531	12.57 (1.28 - 123.55)	0.0299
Stress			
No	Reference		
Yes	-0.087	0.92 (0.161 - 5.21)	0.9220

PE, parameter estimate; OR, odds ratio; NC, not convergence.

단변량 분석에서 선발된 변수를 다변량 분석에 투입하여 분석한 결과 95% 유의수준에서 유의성을 보이는 변수는 계사 운영년수로 앞에서 분석한 단변량 결과와 동일하다. 즉 5년 이상 경과된 계사에 비하여 5년 미만인 계사 즉 비교적 운영기간이 짧은 계사일수록 IB에 감염될 위험이 감소하는 것으로 나타났다 (p=0.0299). 다변량 분석에 의한 로지스틱 회귀함수는 다음과 같다.

$$\hat{P} = \frac{1}{1 + e^{-(4.6109 - 2.5314 \times operation)}}$$

이 모형의 적합성을 회귀계수가 0 (즉 $\beta = 0$)이라는 귀무가설을 likelihood ratio 방법으로 평가하면 매우 적합한 것으로 나타났다($X^2=6.76, df=1, p=0.0093$). <Table 4-8>에서 IB 감염에 대한 위험감소율을 계산하면 회귀계수가 -2.5314 이므로 $e^{-2.5314} = 0.0795$ 로 이는 환기시스템의 효과를 보정할 경우 계사 운영년수가 5년 이상인 경우와 비교할 때 계사 운영년수가 5년 미만일 때 IB 감염의 위험이 92.1% 감소한다는 것을 의미한다 ($100 * (0.0795 - 1) = -92.1\%$). 농장 운영년수에 따른 IB 발생 위험확률을 계산하면 <Table 4-9>와 같다. 운영년수가 1년일 경우 IB 발생의 위험확률이 11.1%이고 3년을 상회하면 약 95%의 위험확률을 갖는 것으로 나타났다. <Table 4-10>은 로지스틱 회귀모형에 의한 농장별 IB 발생위험 확률을 정리한 것으로 18개 농장은 약 39%의 발생확률, 나머지 9개 농장은 약 89%의 발생확률을 갖는 것으로 나타났다.

Table 4-9. Probability of IB infection by house operation

House operation (year)	Probability of IB infection (%)
1	11.1
2	61.1
3	95.2
4	99.6
5	99.9
6	99.9
7	100.0

Table 4-10. Probability of IB infection estimated by logistic function

													V E N I O T N M P R R N N O N I D F O E C E E R R E E _ _ S S W N W L C O L O E V R O S S _ _ S S W N W L _ I A N C E A L U U N N N N T E S E F E S P P T G T M T D L L E E E E A A E W A L V P A C E I S I E I _ T T W W W T S A A G O E R M H A O H O N O S I N I N N U O S G E C L O U K N I N T N T B D B D D S N O E X K _ B																			
1	2003	9	1	2	88	13	25000	7000	1	2	2	1	2	2	1	1	3	3	2	1	2	1	0	3	2	1	1	2	1	0.88889		
2	2003	9	1	1	140	20	7000	7000	1	1	2	1	2	2	1	1	3	2	2	1	2	1	0	3	2	2	2	1	1	0.88889		
3	2003	9	1	2	385	55	6000	3000	1	1	2	1	2	2	2	1	2	3	2	1	2	1	0	3	2	2	3	1	1	0.38889		
4	2003	9	1	2	231	33	23000	13000	2	1	1	1	2	1	1	1	3	3	2	1	2	1	0	3	2	2	2	2	1	0.88889		
5	2003	10	1	1	318	46	50000	12000	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	3	2	2	3	2	1	0.38889		
6	2003	10	1	1	245	35	50000	12000	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	3	2	2	3	2	1	0.38889		
7	2003	10	1	1	91	13	25000	25000	2	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	1	3	2	1	1	2	1	0.38889		
8	2003	10	1	1	200	29	15000	15000	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	0.38889		
9	2003	10	1	1	200	29	16000	16000	1	1	1	1	2	1	2	1	1	3	1	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	0.38889		
10	2003	10	1	1	175	25	50000	10000	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	3	2	2	2	2	1	0.38889	
11	2003	10	1	1	354	51	50000	10000	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	3	2	2	3	2	1	0.38889
12	2003	10	1	1	315	45	50000	12000	1	1	1	1	2	2	2	1	3	1	2	1	1	2	1	3	2	2	3	2	1	0.38889		
13	2003	11	1	2	60	9	60000	15000	1	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	3	2	1	1	2	1	0.38889		
14	2003	11	1	2	58	8	36000	6000	1	2	2	1	2	2	2	1	3	2	2	1	2	1	0	3	2	1	1	2	1	0.38889		
15	2003	12	1	2	280	40	20000	20000	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	4	3	2	3	2	1	0.38889	
16	2003	12	1	2	65	9	55000	55000	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	4	3	1	1	2	1	0.38889	
17	2003	12	1	2	60	9	50000	12000	1	2	2	1	2	1	1	2	3	3	2	1	2	1	0	4	3	1	1	2	1	0.88889		
18	2003	12	1	2	63	9	35000	35000	1	2	2	1	2	1	1	2	2	3	2	1	2	1	0	4	3	1	1	2	1	0.88889		
19	2003	12	1	1	420	60	15000	15000	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	4	3	2	4	1	1	0.88889		
20	2003	1	1	1	280	40	15000	15000	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	4	3	2	3	1	1	0.88889		
21	2004	1	1	2	63	9	45000	8000	1	1	2	1	2	2	1	1	2	2	2	1	2	1	0	4	3	1	1	2	1	0.88889		
22	2004	2	1	2	64	9	56000	9000	1	1	2	1	1	2	2	2	1	3	1	2	2	1	1	4	3	1	1	2	1	0.38889		
23	2004	3	1	1	65	9	50000	10000	1	1	2	1	2	1	2	2	3	3	2	1	2	1	0	1	1	1	1	2	1	0.38889		
24	2004	3	1	1	378	54	30000	30000	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2	1	0	1	1	2	3	2	1	0.88889		
25	2004	3	1	1	427	61	30000	30000	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	0	1	1	2	4	2	1	0.38889		
26	2004	3	1	2	130	19	15000	15000	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1	0.38889		
27	2004	5	1	2	65	9	50000	9000	1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0.38889	

이상의 결과를 종합하면 계사의 운영 년수가 짧을수록 IB 감염확률이 감소한다는 것에 대해서는 다양한 해석이 가능하다. 특히 계사운영 년수는 본 연구에서 사용한 위험요인과의 상관성을 볼 때 환기시스템 (tolerance=0.989), 스트레스 (tolerance=0.996), 복합감염 (tolerance=0.938)등과 밀접한 연관성이 있을 것이고 이러한 위험요인들은 노후계사에 비해서는 신계사에서 요인음성일 가능성이 높기 때문일 것으로 사료된다.

나. 2004-2005년 분석

2차년도 조사에서는 계사형태, 사료 급여방법, 계란수거 방법, 계분처리방법 및 횃수, 사체처리 방법, 계사 출입시 소독 여부, 전년도의 뉴캐슬병 발생 여부 등에 관한 항목을 추가하였다. 이러한 변수들은 사양관리와 관련하여 biosecurity 프로그램의 실행이 IB 발생과 관련이 있을 것으로 가정한 것이다. 1차년도 분석에서 피크시점 변수는 대부분의 농장에서 가을 혹은 봄에 피크시점을 계획하는 것으로 나타나 위험요인으로 확인되지 않았지만 2차 년도에서 그 가능성을 확인하고자 조사 대상에 포함하였다. 종속변수는 2004-2005년 기간 중 IB 발생 여부이고, logistic 회귀분석을 이용한 모델 구축과정은 2003년 분석과정과 동일하다.

<Table 4-11>은 본 연구에서 독립변수로 사용된 위험요인과 각 위험요인에 대한 분류항목을 요약한 것이고 <Table 4-12>는 기술통계량을 정리한 것이다. IB 양성균과 음성균에 대한 단변량 분석결과는 <Table 4-13>과 같다. 농장 운영 년수가 5년 미만에 비하여 5년 이상인 경우 IB 발생 위험이 7.7배 높고 ($p=0.0009$), 농장 내 계군의 수가 많을수록 ($p=0.0164$), 연속입추 ($p=0.0087$), 계분처리 기간이 길수록 ($p=0.0264$) IB 발생위험이 증가하는 것으로 나타났다. 한편, 다일링 계군이 없거나 전년도 뉴캐슬병의 발생이 없을 때 IB 발생위험은 감소하는 것으로 나타났다. 환기시스템의 효율적 관리, 사료급여 방법, 계란수거 방법, 사체처리 방법, 방문객 관리, cold 스트레스 여부, 직전 파스에서의 환우 여부, 온도 및 습도 관리 등은 IB 발생위험과 관련이 없는 것으로 나타났다.

Table 4-11. Risk factors and categories relevant to the infectious bronchitis (IB) cases among layer chickens, 2002-2005

Risk factor	Description	Categories
Year_op	Operation years of houses	< 5, >= 5 year
Flock_No	Flock numbers	< 2, >= 2
FLK_SIZE	Flock sizes	3categories
GRW_YNR	Type of farm	Yes, No
MTD_YN	Presence of multi-age flock	Yes, No
MOLT_YN	Molting practice	Yes, No
INTRO	Method of entry of chicks	AIAA*, continuous
TEMP	Checking temp/humidity	Yes, No
GRW_TYPE	Type of growing house	Open, closed
ADT_TYPE	Type of laying house	Open, closed, both
VENTX	Ventilation system	Power, others
EGG_CT	Method of egg collection	Hand, belt, both
FEC_TR	Method of feces disposal	In-house, out-of-house
FEC_TNX	Frequency of feces disposal	Weekly, monthly
CARCASSX	Carcasses disposal	Incineration/burial, other
VISITORX	Sanitary measure for visitors	Yes, No
COLD	Cold stress in the houses	Yes, No
ND_TOT	ND during 2002-2005	Yes, No

* AIAA, All-in-all-out system.

Table 4-12. Frequency distribution of risk factors by with or without infectious bronchitis (IB) cases, 2004-2005

		IB positive (n=12)		IB negative (n=15)	
		No.	%	No.	%
Year_op	< 5	4	8.33	16	41.3
	>= 5 year	44	91.67	23	58.97
Flock_No	< 2	22	45.83	28	71.79
	>= 2	26	54.17	11	28.21
FLK_SIZE	<=30,000	16	33.33	17	43.59
	30,001-100,000	21	43.75	20	51.28
	> 100,000	11	22.92	2	5.13
GRW_YNR	Yes	14	38.89	10	41.67
	No	22	61.11	14	58.33
MTD_YN	Yes	34	70.83	12	13.79
	No	14	29.17	27	69.23
MOLT_YN	Yes	25	86.21	15	78.95
	No	4	13.79	4	21.05
INTRO	All-in-all-out	17	35.42	25	64.10
	Continuous	31	64.58	14	35.90
TEMP	Yes	13	30.95	18	46.15
	No	29	69.05	21	53.85
GRW_TYPE	Open	12	57.14	10	76.92
	Closed	9	42.86	3	23.08
ADT_TYPE	Open	14	51.85	10	66.67
	Closed	10	37.04	3	7.14
	Mixed	3	11.11	2	4.76
FEEDX	Link-type	32	88.89	22	91.67
	Traditional	4	11.11	2	8.33
VENTX	Power	18	37.50	9	23.08
	Others	30	62.50	30	76.92
EGG_CT	Hand only	3	11.54	1	6.67
	Belt only	18	69.23	13	86.67
	Both	5	19.23	1	6.67
FEC_TR	In-site	13	36.11	10	41.67
	Vehicle	23	63.89	14	58.33
FEC_TNX	Weekly	23	47.92	28	71.79
	> Monthly	25	52.08	11	28.21
CARCASSX	Incineration	25	53.19	26	66.67
	Feed stuffs	22	46.81	13	33.33
VISITORX	Sanitation	14	29.17	16	41.03
	No-sanitation	34	70.83	23	58.97
COLD	Yes	23	48.94	25	64.10
	No	24	51.06	14	35.90
ND_TOT	Yes	39	81.25	21	53.85
	No	9	18.75	18	46.15

Table 4-13. Independent evaluation of the potential association of risk factors with a diagnosis of infectious bronchitis (IB) cases, 2004-2005

Risk factor	PE	OR (95% CI)	p-value
Year_op			
< 5	Reference		
>= 5 year	2.035	7.65 (2.29 - 25.56)	0.0009*
Flock_No			
< 2	Reference		
>= 2	1.101	3.01 (1.22 - 7.39)	0.0164*
FLK_SIZE			
<=30,000	Reference		
30,001-100,000	0.109	1.12 (0.45 - 2.79)	0.8151
> 100,000	1.765	5.84 (1.12 - 30.54)	0.0365*
MTD_YNR			
Yes	Reference		
No	-1.698	0.18 (0.07 - 0.46)	0.0003*
INTRO_R			
All-in-all-out	Reference		
Continuous	1.180	3.26 (1.35 - 7.87)	0.0087*
FEC_TNX			
Weekly	Reference		
> Monthly	1.017	2.77 (1.13 - 6.79)	0.0264*
ND_TOT			
Yes	Reference		
No	-1.312	0.27 (0.10 - 0.70)	0.0074*

PE, parameter estimate; OR, odds ratio.

단변량 분석에서 위험요인으로 확인된 변수를 대상으로 다변량분석을 수행한 결과는 <Table 4-14>와 같다. 다일령계군이 존재하는 계군에 비하여 다일령계군이 없을 때 IB 발생 위험은 96.1% 감소하는 것으로 분석되었다 (p=0.0045). 또한 전년도 뉴캐슬병 발생이 없을 때 IB 발생 위험은 65.7% 감소하며, 계분처리 기간이 길수록 IB 발생 위험은 증가하는 것으로 분석되었다 (p=0.0473). 한편 농장내 계군의 수가 많을수록 IB 발생 위험은 감소하지만 유의하지는 않았다 (p=0.079). 농장운영 년수는 최종분석에서는 유의하지는 않았지만 1차 년도에서는 유의하였고 2차 년도에서도 단변량 분석에서 유의한 것으로 나타나 최종모형에 투입하는 것이 타당할 것으로 사료되어 다음과 같은 모형이 작성되었다.

$$\hat{P} = \frac{1}{1 + e^{-(1.92 + 0.85 \times Year_{op} \times Flock \times -2.07 \times -3.25 \times Multi_{age} \times 0.4 \times Fec_{tn} \times -1.07 \times ND)}}$$

Hosmer-Lemeshow 통계량으로 평가한 결과 최종모형의 적합성은 적절한 것으로 분석되었다 (Chi-square=5.80, df=6, p=0.4461). <Table 4-15>는 로지스틱 회귀모형으로 농장별 IB 발생위험 확률을 예측한 결과이다.

Table 4-14. Multivariate logistic regression of the potential association of risk factors with a diagnosis of infectious bronchitis (IB) cases, 2004-2005

Risk factor	PE	OR (95% CI)	p-value
Year_op	0.8496	2.339 (0.677 - 8.083)	0.1794
Flock_No	-2.0715	0.126 (0.012 - 1.272)	0.0790
Multi-age	-3.2487	0.039 (0.004 - 0.366)	0.0045
Fec_TN	0.4029	1.496 (0.596 - 3.756)	0.3910
ND	-1.0705	0.343 (0.119 - 0.987)	0.0473

Table 4-15. Predictive probability of IB outbreak by farms using the logistic regression model

ID_NO	OP_YEAR2	RFLK_NO	MTD_YNR	FEC_TNX	ND_TOT	PROB
1	1	1	0	0	0	0.66794
2	0	0	0	0	1	0.70063
3	1	1	0	1	1	0.50781
4	1	1	0	1	1	0.50781
5	1	1	0	1	0	0.75059
6	1	1	0	1	1	0.50781
7	0	0	1	1	1	0.11968
8	0	0	1	1	1	0.11968
9	1	0	1	1	0	0.48116
10	1	0	1	0	0	0.38265
11	1	1	0	0	0	0.66794
12	1	0	1	1	0	0.48116
13	1	0	1	1	1	0.24123
14	1	1	0	0	0	0.66794
15	1	1	0	0	0	0.66794
16	1	1	0	0	0	0.66794
17	1	1	0	0	0	0.66794
18	1	1	0	0	0	0.66794
19	1	1	0	0	0	0.66794
20	1	1	0	0	0	0.66794
21	1	1	0	0	0	0.66794
22	1	1	0	0	0	0.66794
23	1	1	0	0	0	0.66794
49	1	1	0	0	0	0.66794
50	1	1	0	0	0	0.66794
51	1	1	0	0	0	0.66794
52	1	1	0	0	0	0.66794
53	1	1	0	0	0	0.66794
54	1	1	0	0	0	0.66794

Table 4-15 (cont'd)

ID_NO	OP_YEAR2	RFLK_NO	MTD_YNR	FEC_TNX	ND_TOT	PROB
55	1	1	0	0	0	0.66794
56	1	1	0	0	0	0.66794
57	1	1	0	0	0	0.66794
58	1	1	0	0	0	0.66794
24	1	0	1	1	0	0.48116
25	1	0	1	1	0	0.48116
26	1	0	1	1	0	0.48116
27	1	0	1	1	0	0.48116
28	1	0	1	1	0	0.48116
29	1	1	0	0	0	0.66794
30	1	1	0	1	0	0.75059
31	0	1	0	1	0	0.56272
32	0	1	0	1	0	0.56272
33	1	1	0	0	0	0.66794
34	1	1	0	1	0	0.75059
35	0	1	0	1	1	0.30612
36	1	1	0	1	0	0.75059
37	1	0	1	1	1	0.24123
38	1	0	1	1	0	0.48116
39	1	0	1	1	1	0.24123
40	1	0	1	1	0	0.48116
41	0	0	1	1	0	0.28394
42	1	0	1	1	0	0.48116
43	1	0	1	1	0	0.48116
44	0	1	0	1	0	0.56272
45	0	0	1	1	0	0.28394
46	1	0	1	1	0	0.48116
47	1	0	1	1	0	0.48116
48	1	0	1	1	0	0.48116
59	1	0	1	0	1	0.17526

Table 4-15 (cont'd)

ID_NO	OP_YEAR2	RFLK_NO	MTD_YNR	FEC_TNX	ND_TOT	PROB
60	1	1	0	0	0	0.66794
61	1	0	1	0	0	0.38265
62	1	0	1	1	0	0.48116
63	1	0	1	0	0	0.38265
64	1	0	1	0	0	0.38265
65	1	0	1	0	0	0.38265
66	0	0	1	0	0	0.20951
67	1	1	0	0	0	0.66794
68	1	0	1	1	0	0.48116
69	1	1	0	1	1	0.50781
70	1	0	1	1	0	0.48116
71	1	1	0	1	0	0.75059
72	1	1	1	1	0	0.10462
73	0	0	1	1	1	0.11968
74	1	0	1	1	1	0.24123
75	1	0	1	1	1	0.24123
76	1	0	1	1	1	0.24123
77	1	0	1	1	1	0.24123
78	1	0	1	1	1	0.24123
79	1	0	1	1	1	0.24123
80	1	0	1	1	0	0.48116
81	1	0	1	1	1	0.24123
82	1	1	0	1	0	0.75059
83	0	0	1	0	1	0.08330
84	0	0	1	0	1	0.08330
85	0	0	1	0	1	0.08330
86	0	0	1	0	1	0.08330
87	1	0	0	1	0	0.95982
88	1	0	0	1	1	0.89117
89	1	0	0	1	1	0.89117

Table 4-15 (cont'd)

ID_NO	OP_YEAR2	RFLK_NO	MTD_YNR	FEC_TNX	ND_TOT	PROB
90	1	0	0	1	1	0.89117
91	1	0	0	1	1	0.89117
92	1	0	0	1	0	0.95982
93	0	0	1	0	0	0.20951
94	1	0	1	0	0	0.38265
95	1	0	0	1	0	0.95982
96	1	0	1	0	1	0.17526
97	1	0	1	1	0	0.48116
98	1	0	1	0	0	0.38265
99	1	0	1	0	1	0.17526
100	0	0	1	0	1	0.08330
101	1	0	0	1	0	0.95982
102	0	0	1	0	0	0.20951
103	0	0	1	0	1	0.08330
104	1	0	1	0	1	0.17526
105	0	0	1	0	1	0.08330
106	0	0	1	0	1	0.08330
107	0	0	1	0	1	0.08330
108	1	0	1	1	0	0.48116
109	1	0	1	0	1	0.17526

5. 혈청학적 검사

가. HI 검사

IBV에 대한 항체역가는 기존의 문헌에 보고된 방법에 준하여 HI 검사로 측정하였다 (King 등, 1984). 혈청을 56℃에서 30분간 비동화시킨 후 비특이반응을 제거하기 위하여 혈청 50 μ l를 12.5% kaolin 현탁액 150 μ l에 넣어 (혈청희석농도 1:3) 실온에서 한 시간 동안 방치하였다. V형 플레이트에서 pH 6.5로 조정된 HEPES buffer saline을 25 μ l씩 분주하고 희석한 혈청을 3000rpm에서 10분간 원심하여 kaolin을 침전시킨 상층액을 50 μ l씩 넣은 후 25 μ l씩 2진 희석을 하였다. 모든 well에 4 HAU로 희석된 IB항원 (대성미생물연구소)을 25 μ l씩 분주하여 4℃에서 40분간 반응시키고 PBS 용액으로 희석한 1% 닭적혈구를 25 μ l씩 분주하여 4℃에서 40분간 반응시킨 후 혈구응집억제가 일어나는 최고희석배수의 역대수 값을 항체역가로 판독하였다. 한 계군의 10개 혈청을 15 μ l씩 혼합한 총 500개의 합병혈청에 대하여 동일한 방법으로 HI 검사를 실시하였다.

HI 검사결과의 양성판정 기준에 대한 원칙이 없기 때문에 본 연구에서는 임상수의사와 학계 전문가의 조언을 근거로 임의적인 기준을 설정하였다. 즉 개별 혈청항체 검사에서 9 이상인 역가가 적어도 1개 이상 검출되는 경우 (기준 1), 9 이상인 역가가 적어도 2개 이상 검출되는 경우 (기준 2), 10 이상인 역가가 적어도 1개 이상 검출되는 경우 (기준 3), 11 이상인 역가가 적어도 1개 이상 검출되는 경우 (기준 4) 등 네 가지 기준을 적용하였다.

나. HI 검사와 ELISA 검사의 상관관계

일선 수의사는 IB로 의심되는 계군에 대하여 일정 수수의 개체로부터 채혈 후 혈청에서 HI 역가를 측정한 자료에 근거하여 계군관리에 활용하고 있다. 자염감염 역가를 정확히 판정하기 위해서는 백신의 종류 및 접종 시기, 임상증상, 계군의 성적, 접종경로 등에 관한 정보와 특히 paired 혈청에 대하여 역가의 증가 정도를 판정하는 것이지만 이 방법은 농장 단위에 적용하기에 현실적으로 제한점이 많다. 따라서 IB의 자연 감염역가로 판정하는 절대적인 기준은 없지만 통상적으로 HI 역가 9, 10, 11 이상이 관찰되는지에 근거하여 판정하는 경향이 있다. 이러한 기준의 근거는 오일백신으로 인하여 역가가 특정한 기준 이상으로 증가하기 어려우며 더군다나 산란이후에는 생독 백신을 접종하지 않는 다는

것에 근거한 것이다. 그러나 육성기간 중에 감염된 경험이 있으면서 오일백신을 접종한 경우에는 앞서 언급한 역가 이상으로 관찰되는 경우도 있다. 일부 수의사는 역가 5 이상인 경우 IB에 대한 항체가 존재하며 5 이하인 경우 IB 항체가 아닌 비특이적인 반응일 가능성도 있는 것으로 해석하여 ELISA 검사를 통하여 확진한다는 의견을 제시하기도 한다. 이러한 배경하에서 현재 통용되고 있는 자연감염 여부를 판정하는 기준의 유용성을 평가하고자 본 연구에서 IB 진단 방법으로 사용한 HI 검사와 ELISA 검사간의 일치도 (agreement)를 분석하였고, 일치도는 KAPPA 통계량을 계산하여 평가하였다.

본 연구에서 IB 진단 방법으로 사용한 HI 검사와 ELISA 검사간의 일치도를 파악하였다. 일치도 분석에 사용된 자료는 계군 모니터링으로 선정된 농장 중 105개 계군에 대한 혈청 1800개를 무작위로 추출하여 ELISA 검사와 HI 검사를 동시에 측정하였다. 두 검사의 양성 판정기준은 일선 수의사와 양계관련 전문가 (교수)의 도움을 받아 다음과 같은 다양한 기준을 작성하였다.

- HI 검사의 양성판정

- 기준 1 (HI1): 적어도 하나의 역가가 9 이상인 경우
- 기준 2 (HI2): 적어도 하나의 역가가 10 이상인 경우
- 기준 3 (HI3): 적어도 하나의 역가가 11 이상인 경우
- 기준 4 (HI4): 역가 9 이상이 2개 이상인 경우
- 기준 5 (HI5): 역가 10 이상이 2개 이상인 경우
- 기준 6 (HI6): 역가 9 이상이 2개 이상이고 적어도 하나의 역가가 10 이상인 경우
- 기준 7 (HI7): 역가 10 이상이 2개 이상이고 적어도 하나의 역가가 11 이상인 경우

- ELISA의 양성판정

- 기준 1: ELISA 역가가 10,000 이상인 경우
- 기준 2: ELISA 역가가 10,000 이상이고 CV가 40% 이상인 경우

일치도 평가를 위해서 KAPPA 통계량을 계산하였다. <Table 4-16>에서 보듯이 두 검사의 일치도는 비교적 낮은 상관성을 보였으며, ELISA1의 경우 HI6와 일치도가 가장 높은 26.9%를 보였고 HI7에 대해서는 7%로 가장 낮은 일치도를 보였다. 반면에 ELISA2의 경우 모든 HI 기준에 대하여 매우 낮은 일치도를 보였다. 일반적으로 IB와 관련하여 HI 검사와 ELISA 검사간의 상관

관계를 보면 국내에 유행하는 IB는 다양한 혈청형이 존재하며 ELISA 검사에서 목표로 하고 있는 항체는 S1 단백질이므로 이들 두 검사의 일치도는 매우 낮을 것으로 기대하였으며 분석결과 유사한 양상을 보였다.

Table 4-16. Agreement between HI titer and ELISA, using KAPPA statistic

	HI 역가에 근거한 양성 판정 기준						
	HI1	HI2	HI3	HI4	HI5	HI6	HI7
ELISA1	0.1667	0.2347	0.0934	0.2486	0.0943	0.2689	0.0701
ELISA2	0.0089	0.0193	-0.1012	0.0203	-0.1272	0.0279	-0.1189

현재 상용화되고 있는 ELISA 검사법은 메사추세츠 항원을 이용하여 군 특이적인 항체를 검출하는 것으로 신속하고 많은 양의 혈청을 검사하는 장점이 있으나 검사의 민감도와 특이도에 대한 자료가 부족하여 결과를 해석하는데 상당한 주의를 필요로 한다. HI 검사법의 경우 IBV는 원래 닭의 적혈구를 응집하는 능력이 없기 때문에 IBV 항원에 대하여 효소를 처리한 한 후 응집검사를 시행하게 되는 관계로 검사법의 표준화에 따른 해석상의 문제가 있다. 그러나 HI 검사에는 혈청형이 다른 항원을 사용할 수 있으므로 혈청형 감별에 사용할 수 있는 장점이 있다. 두 검사의 일치도는 전반적으로 낮지만 현장에서 자연감염 여부를 판정하기 위한 목적으로는 HI 검사만으로도 충분할 것으로 생각된다.

다. Pooling 혈청을 이용한 유병률 추정

1) 서론

IB를 진단하는 방법으로는 IBV를 직접 분리하거나 면역형광시험법, 역전사 중합효소연쇄반응 (RT-PCR), 한천겔침강법, HI 검사, 효소면역검사법 (ELISA) 등이 사용되며 (Wit 2000; 장과 김 1989) 검사법 자체에 내재된 특성

때문에 연구목적에 따라 다양하게 사용된다. 그 중에서 IB의 항체 역가를 측정하는 HI 검사는 질병의 초기 반응을 검출하는데 유용하여 백신 반응을 정기적으로 모니터링하거나 야외 감염에 의한 항체 역가의 변화를 확인하는 목적으로 흔히 사용되며 비용이 저렴하다는 장점으로 임상수의사가 선호하는 방법이다 (Wit 2000, OIE 2004). 국가단위에서 대규모 모집단을 대상으로 혈청 유병률 (seroprevalence)을 조사하는 연구에서 개별혈청을 사용할 경우 검사비용과 인력이 많이 소요되는 문제점 때문에 대량의 시료를 검사해야 하는 상황에서 비용효율적인 방법을 고려할 필요가 있다 (Cahoon-Young 등 1989; Kline 등 1989; Christensen과 Gardner 2000; Wells 등 2003; Jordan 2005). 검사건수를 줄이는 한 가지 대안은 개별혈청을 통합한 소위 합병혈청 (pooled sera)을 검사하는 것이다. 개별혈청과 합병혈청의 상관관계가 높을 경우 농장의 감염여부를 판정하거나 혈청 유병률을 추정할 수 있는 등 여러 가지 측면에서 장점이 있다 (Hauck 1991; Cowling 등 2001; Evers과 Nauta 2001). 따라서 IB의 혈청학적 진단법인 HI 검사를 이용하여 개별혈청 역가와 합병혈청의 역가 간의 관계를 파악하고 두 방법에 의한 혈청 유병률을 비교함으로써 합병혈청의 임상적 활용 가능성을 평가하는 것은 매우 중요하다.

2) 재료 및 방법

2005년 1월부터 2006년 2월까지 강원대학교 수의학과에 IB 혈청검사로 의뢰된 총 5,000수의 혈청을 분석에 사용하였다. 이 시료는 강원, 경기, 충북, 충남 소재 50개 산란계군에서 계군 당 무작위로 선발된 10수에서 채혈된 것이다. 혈청역가와 양성 판정기준은 앞에서 기술한바와 같다. 개별혈청 역가의 평균과 합병혈청 역가의 관계는 최소제곱 회귀선을 적합시킨 후 결정계수 (coefficient of determination)로 판단하였다. 결정계수는 0-1의 범위를 가지며 계수 0은 합병혈청의 역가를 개별혈청의 평균역가로 설명하기 어렵다는 것을 의미하고, 계수 1은 100%의 설명력을 갖는다는 것을 의미한다. 합병혈청 역가의 최적 기준점 (optimal cut-off point)은 x축의 가양성률 (1-특이도)에 대응하는 민감도를 y축에 표현한 ROC (receiver operating characteristic) 곡선으로 평가하였다 (박과 한 1999; Greiner 등 2000). 곡선 아래 면적 (area under the curve, AUC)과 곡선상의 다양한 기준점에서 민감도, 특이도, 예측도, 우도비 (likelihood ratio)를 계산하였다 (박 등 2000). 개별혈청 유병률 (individual prevalence)과 합병혈청 유병률 (pooled prevalence)의 차이는 카이제곱 검정으로 평가하였다.

Table 4-17. Diagnostic performance of pooled test by four criteria

Criteria	Pooled titer	Se	Sp	PPV	NPV	LR+	LR-
Criterion 1	7	0.987	0.756	0.925	0.949	4.05	0.02
	8	0.883	0.959	0.985	0.728	21.72	0.12
	9	0.719	0.992	0.996	0.535	88.42	0.28
	10	0.438	1.000	1.000	0.367	NA	0.56
Criterion 2	7	0.997	0.564	0.813	0.990	2.29	0.01
	8	0.954	0.855	0.926	0.907	6.57	0.05
	9	0.814	0.971	0.982	0.732	28.00	0.19
	10	0.438	1.000	1.000	0.367	NA	0.50
Criterion 3	7	0.997	0.533	0.789	0.990	2.13	0.01
	8	0.965	0.830	0.908	0.932	5.67	0.04
	9	0.836	0.967	0.978	0.772	25.37	0.17
	10	0.519	1.000	1.000	0.543	NA	0.48
Criterion 4	7	1.000	0.394	0.624	1.000	1.65	0.00
	8	0.988	0.639	0.734	0.981	2.73	0.02
	9	0.928	0.843	0.857	0.921	5.93	0.09
	10	0.633	0.976	0.964	0.725	26.29	0.38

Se, Sensitivity; Sp, Specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR+, positive likelihood ratio; LR-, negative likelihood ratio; NA, not available.

3) 분석결과

개별혈청의 평균역가와 합병혈청의 역가에 대한 회귀선에서 개별혈청의 평균 역가는 합병혈청의 역가를 약 87% 설명하였다 ($r^2=0.872$, $SE=0.0154$, $p<0.0001$, $pool=1.2498+0.8952 \times mean$) <Fig 4-7>. 본 연구에서 가정한 네 가지 양성 판정 기준에 따른 ROC 곡선에서 기준 1의 경우 AUC는 0.975 (95% CI, 0.958-0.987; $SE=0.006$)로 가장 높았고 기준 4는 0.946 (95% CI, 0.923-0.964; $SE=0.009$)으로 가장 낮았다. 한편 기준 2와 기준 3에서는 각각 0.969 (95% CI, 0.950-0.983; $SE=0.007$)와 0.946 (95% CI; 0.951-0.983, SE ; 0.006)으로 분석되었다.

각 기준에서 민감도는 0.836-0.954, 특이도는 0.843-0.967 범위를 보였으며 기준 1과 2는 합병혈청 역가 8 이상, 기준 3과 4는 합병혈청 역가 9 이상의 기준이 최적 기준점으로 분석되었다 <Table 4-17>. 개별혈청과 최적 기준점에서 합병혈청의 유병률을 비교할 때 기준 1 (75.4%와 67.6%)과 3 (63.6%와 54.4%)에서는 통계적으로 유의한 차이를 보였지만 기준 2와 4에서는 두 유병률 간 차이는 없었다 <Table 4-18>.

Table 4-18. Comparison of prevalences between individual and pooled sample by four criteria

Criteria	Individual prevalence (%)	Pooled prevalence (%) at pooled titer of:			
		7	8	9	10
1	75.4	80.4	67.6*	54.4*	33.0*
2	65.6	80.4*	67.6	54.4*	33.0*
3	63.6	80.4*	67.6	54.4*	33.0*
4	50.2	80.4*	67.6*	54.4	33.0*

* P < 0.001.

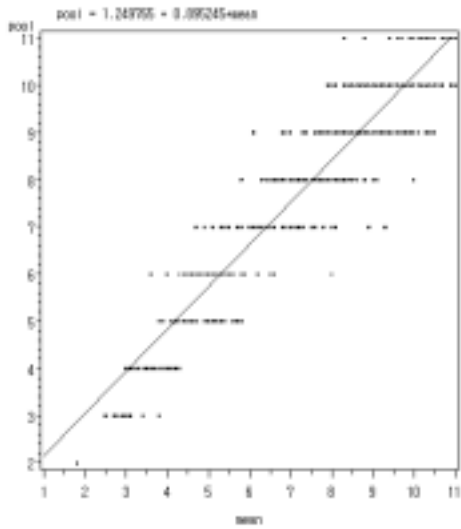


Fig 4-7. Relationship between pooled titers (pool) and mean individual titers (mean). Coefficient of determination = 0.872, SE = 0.0154, $p < 0.0001$.

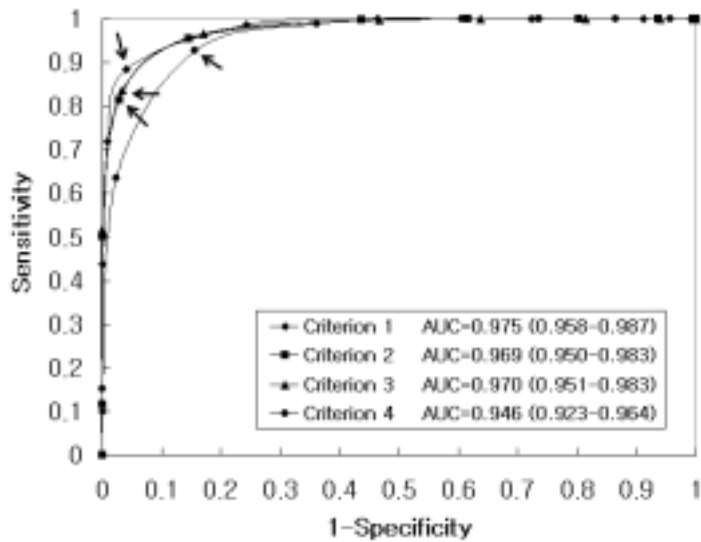


Fig 4-8. Receiver operating characteristic curves for 4 criteria. Arrows represent optimal cut-off points at each criterion.

본 연구에서 합병혈청 역가에 대한 개별혈청 평균역가의 설명력은 87%로 높게 나타났다. 특히 개별역가가 높을 때 두 변수의 관련성이 높는데 이는 국내 IB의 유병률이 높다는 점에 비추어 볼 때 활용 가능성이 매우 높음을 시사한다. 이는 감염 농도와 경로에 따라 약간의 차이가 있지만 IB의 잠복기가 18-36시간으로 매우 짧고 전파가 급격히 빠르기 때문에 (Calnek 등 1991) 특히 IB가 상재되어 있는 계군에서는 상당수 개체들이 동시에 감염되어 있을 가능성이 높기 때문이다. 이러한 특성은 ROC 곡선을 이용한 진단의 정확도에서도 유사한 결과를 보였다. AUC 해석과 관련하여 제시된 기준 (Swets, 1988) (0.5 이하는 진단효용 없음, 0.5-0.7 낮음, 0.7-0.9 중등도, 0.9 이상은 매우 높음)에 의하면 본 연구에서 개별역가에 대한 합병역가의 AUC는 <Fig 4-8>에서 보듯이 0.946-0.975 범위로 매우 높은 정확도를 보이는 것으로 분석되었다. 합병혈청 역가의 양성판정 기준을 설정하는 것은 유병률 추정에서 매우 중요하다. 양성과 음성으로 구분하는 진단의 기준점을 너무 높게 설정하면 실제로 질병이 있음에도 질병이 없는 군으로 분류되어 가음성률이 증가하므로 음성예측도는 낮아진다. 반대로 진단의 기준점을 낮게 설정하면 실제로 질병이 있는 개체는 모두 포함되어 민감도는 증가하는 반면 가양성률이 증가하여 양성예측도는 낮아진다.

기준점 설정은 검사할 집단의 유병률과 비용 이외에도 연구 상황에 따른 민감도와 특이도의 교환조건을 충분히 고려하여 판정기준을 결정해야 한다 (Smith 1991; 박과 한 1999). 이러한 의도로 본 연구 결과의 활용성을 높이기 위해 상황에 맞는 최적 기준치를 사용할 수 있도록 합병혈청 기준에서 진단의 정확도를 제시하였다. 최적 기준점에서 민감도는 0.836-0.954, 특이도는 0.843-0.967 범위를 보여 비교적 높은 정확도를 나타냈다. 한편, 최적 기준점에서 개별혈청 유병률과 합병혈청 유병률은 기준 1에서 7.8%, 기준 2에서 2%, 기준 3에서 9.2%, 기준 4에서 4.2%의 차이를 보여 양성판정 기준에 따라 유병률의 차이가 있음을 시사한다. 이러한 차이에 대해서는 몇 가지 설명이 가능하다. 먼저 IB 감염여부를 확진할 수 있는 검사법을 사용하지 않았기 때문에 정확한 유병률의 차이는 확인할 수 없다는 점이다. 또한 본 연구에서는 지역 수의사와 학계 전문가의 자문을 통하여 현장에서 사용하고 있는 기준을 임의적으로 적용하였다는 점이다. 양성판정 기준은 합병혈청의 효용성과 직접적인 관련이 있다. 즉 유병률이 높을 때 양성판정 기준을 높이지 않으면 가양성률 (false positive)이 증가하여 양성예측도가 저하되는 문제가 발생한다. 예를 들어 IB 검사의 민감도와 특이도가 95%일 때 유병률이 10%에서 20%로 증가한다고 가정하면 양성예측도는 32.1%에서 17.4%로 낮아져 검사결과 양성일 때

실제로 감염되어 있을 확률이 낮아짐을 의미한다. 본 연구에서 사용한 기준 1과 3에 비하여 보다 엄격한 기준인 3이나 4가 국내의 현실을 대표할 수 있는지는 추후 연구를 통하여 판단해야 할 것이며 국내 IB 유병률을 고려한 양성 판정 기준이 마련되어야 할 것으로 사료된다.

제2절 위험요인 분석모형

위험요인의 분포와 관리실태 파악에 따른 후속 연구로서 IB 발생에 대한 혈청역학 자료를 지속적으로 수집하여 위험요인을 관리하기 위한 잠정적인 모형을 구축하는 것이다. 본 연구는 다양한 혈청형을 갖는 IB 발생 위험을 줄이기 위하여 국내 유행균주에 특이적인 유전자 백신을 이용한 관리방법과 함께 IB 발생과 관련되는 위험요인을 규명하게 된다. 따라서 2차년도 연구에서는 전년도와 마찬가지로 국내 사육농가에서 발생하고 있는 IB의 역학적 특성을 분석한 결과에 근거하여 모형에 투입할 변수를 결정하고 최종모형을 탐색하였다.

1. 로지스틱 회귀모형

모형을 이용하여 예측을 수행할 때 전통적인 방법으로 일반선형 모형과 다변량 자료에 대한 판별분석을 사용한다. 일반선형 모형의 경우 일반적으로 예측을 목적으로 수행되는 전통적인 분석방법은 회귀분석이다. 선형회귀 분석법은 획득한 자료에 대하여 잔차의 제곱합을 최소화하는 최소자승법 (least square method)을 이용하여 직선을 적합시키는 것이다. b_0 를 y 축의 절편, b_1 을 회귀선의 기울기라 할 때 이 모형은 다음과 같다: $y=b_0+b_1x$. 한편, 판별함수는 인공신경망을 적용하는 상황과 매우 유사한데 연구 대상이 되는 특성을 갖는 개체들과 이러한 특성이 없는 개체들을 수집하여 두 군으로 구분할 수 있는 판별함수를 작성하고 이 함수에 근거하여 새로운 개체들에 적용하는 것이다. 선형 판별함수를 이용하여 추가정보를 확보함으로써 판별능력이 향상된다. 그러나 판별함수를 이용한 방법에서도 상호 겹치는 부분이 여전히 존재하거나 특히 비선형을 보이는 경우 전통적인 분석방법으로는 두 군을 구분하기 매우 어려운 상황이다. 특히 다요인 (multifactorial)이 작용하는 대부분의 상황에서 전통적인 방법으로 예측을 수행하는 것은 매우 어렵기 때문에 신경망모형이라는 새로운 분석법이 대두된다. 본 연구에서 수행하게 될 모형의 하나인 로지스틱 회귀모형은 다음과 같다.

- 로지스틱 회귀모형:

$$\log \frac{p}{1-p} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_nx_n$$

$$p = \frac{1}{[1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1x_1 + \dots + \beta_nx_n)}]}$$

여기에서

- 모형의 가정: 전염성 기관지염 발생 확률에 대한 로그 교차비 (log odds)
- p = 전염성 기관지염 (결과)이 발생할 확률
- β_0 = 절편
- $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ = 역학조사 자료에서 얻은 독립변수(x_1, x_2, \dots, x_n)에 대한 회귀계수

2. 인공신경망 모형

인공신경망 (artificial neural network, ANN)은 다요인 분석 (multifactorial analysis)을 수행하는 계산 방법론으로 의학에서 예측, 분류 및 패턴인식에 응용되고 있다. 본 연구에서 수행하게 될 ANN은 multilayer perceptron (MLP)으로 input과 output node 사이에 hidden layer가 연결되며 각 층 내에서 모든 node가 서로 연결된 three-layered MLP 모형으로 feedforward type이다. 즉 알려진 input 값이 요구되는 output 값으로 변형되는 방향이 좌측에서 우측으로 이동하는 형태를 취한다. 본 연구과제의 경우 IB 발생 여부는 output node, 각 농장으로부터 얻은 계사관리, 환경위생관리, 백신접종 등에 관한 역학조사 자료는 input node가 되며 각 node는 input으로부터 수신받은 가중신호 (weighted signal)를 합하여 비선형 함수의 형태로 output을 발생하게 된다. 인공신경망 모형은 로지스틱 회귀모형과 매우 유사하나 훈련자료 (training set)를 이용하여 input, hidden, output간의 함수관계를 설정한 후 검증자료 (validation set)를 이용하여 실제 판별능력 (pattern recognition or classification task)을 시험하게 된다. 모형설정 단계에서 수행하게 될 구체적인 내용은 첫째, 모형의 적합성을 만족시키는 최적의 모형 개발 둘째, 판별능력이 우수하면서 최소 모수원리를 유지하는 모형 셋째, 실제자료에 대하여 검증하였을 때 오차 (error) 발생이 최소화하는 모형 넷째, 특히 hidden layer 개수를 최소화하는 모형 다섯째, 현장에 쉽게 응용할 수 있는 모형개발이다.

가. 모형의 특성

인공신경망 모형 (artificial neural network, ANN)은 로지스틱 회귀모형과 매우 유사하나 훈련자료 (training set)를 이용하여 input, hidden, output간의 함수관계를 설정한 후 검증자료 (validation set)를 이용하여 실제 판별능력

(classification)을 검증하게 된다. 따라서 최종모형에서 독립변수는 위험요인으로 선정된 독립변수 (x_1, x_2, \dots, x_n)가 되며, 결과변수는 전염성 기관지염 (결과)이 발생할 예측 확률 (P)이 된다. 모형설정 단계에서 수행하게 될 구체적인 내용은 첫째, 모형의 적합성을 만족시키는 최적의 모형 개발 둘째, 판별 능력이 우수하면서 최소 모수원리를 유지하는 모형 셋째, 실제자료에 대하여 검증하였을 때 오차 (error) 발생이 최소화하는 모형 넷째, 특히 hidden layer 개수를 최소화하는 모형 다섯째, 현장에 쉽게 응용할 수 있는 모형개발이다. 3차년도 연구에서 최종모형을 확립하여 예측모형의 평가 등 응용 가능성을 탐색하게 된다.

예를 들어 $y=b_0+b_1x$ [여기에서 b_0 는 y축의 절편, b_1 은 회귀선의 기울기]와 같은 일반선형모형의 경우 input neuron이 1, output neuron이 1, 활성화함수 (activation function)를 선형함수로 하는 ANN을 이용하여 모형화할 수 있다. 따라서 실질적으로 ANN은 회귀분석 모형과 동일한 형태라고 할 수 있다. Backpropagation network은 신경망구조에서 가장 많이 사용되는 모형으로 방사선, 혈액화학 분석, 병리조직소견, 진단의학, 암 진단 등 임상의학 분야에 다양하게 응용되고 있다. 특히 질병발생을 예측하는 연구에 있어 응용 가능성은 매우 높다. 예를 들어 민감도와 특이도가 알려진 표준검사 (gold standard)로 진단이 가능한 어떤 질병이 존재하는지를 예측하는 상황을 가정하여 보자. 표준검사법은 흔히 비용이 비싸고 침습적인 경우가 많기 때문에 연구의 목적은 보다 안전하고 비침습적이며 저렴한 방법으로 표준검사를 대체할 수 있는 방안을 탐색하는 것이다. 위험요인에 관한 연구 결과 6개의 변수 (예: $v_1, v_2, v_3, v_4, \text{age, sex}$)가 이 질병과 관련이 있는 것으로 조사되었다고 하자. 그러나 이러한 연관성에도 불구하고 질병에 이환된 집단과 이환되지 않은 집단의 특성은 상호 겹쳐지기 때문에 (즉 두 집단을 완벽하게 구분해주는 절대적인 하나의 변수는 없다는 의미임) 어떤 개별적인 하나의 변수도 최적의 진단검사가 될 수 없다. 따라서 신경망 모형은 이러한 예측변수들의 집합체에 대하여 미세하지만 어떤 차이를 구분해주는 진단적 패턴을 인지하도록 해주는 과정이 필요한데 (이는 이미 확보한 자료를 사용하여 훈련 혹은 교육시키는 과정이라고 함) 이를 backpropagation network이라고 한다. 이러한 교육자료 (training set)는 질병이 있는 개체와 없는 개체들의 데이터로 구성되며 적절한 교육자료를 확보한 후 다음 단계에서는 신경망 구조를 선택하고 교육자료를 사용하여 훈련시키고 그 결과를 검증 (cross-validation)하는 과정을 거친다.

본 연구에서 수행하게 될 인공신경망 모형은 multilayer perceptron (MLP)으로 input과 output node 사이에 hidden layer가 연결되며 각 층 내에서 모든

node가 서로 연결된 three-layered MLP 모형으로 feedforward 형으로 구축된다. 본 연구과제의 경우 IB 발생 여부는 output node, 각 농장으로부터 얻은 사양정보, 계사관리, 환경위생관리, 백신접종 등에 관한 역학조사 자료는 input node가 된다. hidden layer는 추천되는 계산방법을 통하여 최소화되도록 결정한다.

나. Training fact와 hidden neuron 개수 결정

신경망 훈련에 필요한 자료의 수 (fact)와 Hidden neuron의 수에 관한 결정은 참고문헌 (Lawrence, 1994)과 경험적으로 판단하였으며, 일반적으로 자료의 수가 많을수록 (또한 hidden neuron의 수가 많을수록) 좋은 것으로 알려져 있지만 반대로 fact가 너무 적으면 신경망이 암기 (memorize)하는 문제가 발생하여 일반화에 어려움이 있다. 한편, hidden layer의 개수와 관련하여 hidden neuron의 수가 너무 적을 경우 network은 훈련기간 중 수렴할 기회가 희박해지는 문제가 있고, 반대로 너무 많으면 network이 수렴은 잘하지만 일반화하는데 문제가 발생한다. 신경망 훈련에 필요한 자료의 수 (number of training facts, TF)와 hidden neuron의 수 (HN)를 결정할 때 추천되는 방법은 다음과 같다.

- TF 결정

방법 1: TF의 개수는 신경망에 투입되는 neuron 개수의 2-9배 범위로 결정한다.
 $TF = 2 \times (\text{inputs} + \text{hiddens} + \text{outputs}) \sim 10 \times (\text{inputs} + \text{hiddens} + \text{outputs})$

예를 들어 6개의 input, 3개의 hidden, 1개의 output으로 구성된 신경망의 경우 20~100개의 fact가 필요함을 의미한다.

방법 2: 절대적인 기준이 없기 때문에 연구자에 따라 흔히 total fact의 10% 혹은 50%를 추천한다.

- HN 결정

우수한 신경망은 검증 사례 (testing case)에 대하여 일반화를 잘 할 수 있는 모형이지만 모든 training fact에 대하여 완벽하게 습득하는 것은 그리 중요한

것은 아니다. 완벽성을 높이기 위하여 hidden neuron의 수를 증가하게 되는데 경우에 따라서 예측능력이 감소하는 경우도 있다.

방법 1: HN을 결정하는 절대적인 기준은 없지만 실용적인 측면에서 input과 output neuron 수의 합을 2로 나눈 것이 적절하다는 제안이 보고되었다. 즉

$$HN = (\text{inputs} + \text{outputs}) / 2$$

예를 들어 6개의 input, 1개의 output으로 구성된 신경망의 경우 3~4개 (예: 3개로 결정)의 hidden neuron 이 적절함을 의미한다.

방법 2: 두 번째 방법은 training fact에 error tolerance를 곱하여 계산하는 방법이다. 예를 들어 100개의 fact가 있고 error tolerance를 0.1로 결정하는 경우 $100 \times 0.1 = 10$ 개의 hidden neuron이 결정된다. 한편, 방법 (1)과 방법 (2)에서 계산된 평균치를 사용할 수도 있다. 즉 $(3+10)/2 = 6\sim 7$ 개의 hidden neuron이 결정된다.

방법 3: 세 번째 방법은 다소 복잡하다. TF를 결정하는 방법과 같이 최소 및 최대값을 이용하는 것이다. 즉

$$\text{최소 HN 수: } (\text{No. of facts} / 10) - (\text{inputs} + \text{outputs})$$

$$\text{최대 HN 수: } (\text{No. of facts} / 2) - (\text{inputs} + \text{outputs})$$

예를 들어 6개의 input, 1개의 output, 100개의 fact로 구성된 신경망의 경우 3~43개의 hidden neuron이 적절함을 의미한다.

방법 4: Input neuron과 output neuron의 기하평균을 사용하는 방법이다. 본 연구에서 23개의 input neuron과 1개의 output neuron으로 구성되어 있으므로 약 5개 내외의 HN이 적절한 것으로 판단할 수 있다.

기타 HN 결정과 관련하여 특히 두 번째 방법에서처럼 hidden neuron의 수에 대하여 선택할 수 있는 범위가 너무 넓은 경우 개수를 줄이는 한가지 방법은 testing tolerance를 가능한 좁히는 것이다. 또한 충분한 수의 fact를 획득할 수 없는 경우에는 hidden neuron의 수를 줄이는 것이 좋다.

다. Backpropagation network

이 구조는 독립변수를 구성하는 input layer, input 패턴으로부터 진단적 특성을 추출하는 hidden layer (middle layer), 진단결과를 출력하는 output layer 등 3개의 layer를 갖는 multilayer perceptron 모형이다. 각 layer는 neuron이라고 하는 처리성분 (processing element)으로 구성되고 input layer의 각 neuron은 hidden layer의 모든 neuron과 연결되며 또한 hidden layer의 모든 neuron은 output layer의 모든 neuron과 연결되는 구조를 갖는다. input layer와 output layer는 직접적으로 연결되어 있지 않다. 정보는 신경전달의 형태에서 정보는 input layer에서 output layer로 전향적으로 전달된다 (feed forward network; 왼쪽에서 오른쪽으로). 신경망 구축의 목적은 예측치와 실제결과의 차이를 최소화하는 것이다. 즉 훈련된 신경망으로 예측된 결과와 실제 결과를 비교할 때 나타나는 오차는 신경망의 input으로 다시 전달하고 가중치를 조정함으로써 결과적으로 예측 능력이 최대화되도록 신경망을 훈련시킨다는 의미에서 “backpropagation (또는 back-error propagation)”이 된다.

라. 신경망 훈련 (training network)과 허용오차

오류 역전파 신경망 모형 (error Backpropagation network)의 핵심은 신경망의 연결가중치와 bias 즉 연결 행렬 (connection matrix)을 적절히 조정하여 입력변수의 백터를 출력패턴에 대하여 올바르게 일치하도록 해주는 것이라 할 수 있다. 이러한 연결행렬을 결정하는 과정을 훈련 (혹은 교육)이라고 하며, 이는 가중치와 bias를 조정하여 신경망의 오차를 최소화하는 훈련방법 (예: gradient descent method)이다. 가중치가 최적의 값 (예: 오차가 최소화되는 경우)에 도달한 경우 network은 훈련되었다고 한다.

$$\begin{aligned} \text{Min } E_p &= 0.5 \sum_j (T_j - O_j)^2 \\ E &= \sum_p E_p \end{aligned}$$

여기에서 E_p 는 특정한 훈련 fact p와 관련된 오차, T_j 는 특정한 훈련 fact p에 대하여 출력 neuron j에 대한 목표 출력값, O_j 는 특정한 훈련 fact p에 의해 생성된 neuron j에 대한 실제 출력값, E는 훈련 set에 대한 총 오차 (total error)를 의미한다.

실질적인 의미에서 훈련이라 함은 신경망 구조로 하여금 자료 (예제)를 통하

여 습득할 수 있도록 교육시키는 반복적인 과정이다. 훈련 개시점에서 신경망의 연결 가중치 (connection weight)는 무작위로 할당된다. 할당 후 훈련자료의 첫 번째 fact (데이터베이스의 record를 의미)의 독립변수에 근거하여 결과 (출력)를 추정하도록 한다. 이 추정치는 실제 진단 결과와 비교한다. 만일 훈련 추정치 (training estimate)가 실제 진단결과의 오차허용 (training or error tolerance) 범위 내에 있을 경우 이 추정치는 올바른 결정으로 간주하며 다음 fact를 제시해준다. 만일 추정치가 오차 허용 범위 내에 속하지 않는다면 신경망의 연결 행렬을 변화시켜 오차를 줄이도록 한다. 이러한 훈련과정은 신경망이 모든 fact에 대하여 올바른 결정을 내릴 때까지 반복하게 된다. 만일 모든 fact에 대하여 100% 올바른 결정을 달성하지 못한다면 연구자가 설정한 종료점에 도달할 때까지 반복한다. 허용오차는 신경망의 예측치가 실제 결과와 어느 정도 근사한지를 나타내는 지표로서 신경망에 의한 출력값이 올바른 결정이라고 간주되는 출력값의 범위를 의미한다. 예를 들어 output pattern이 최소 -145에서 최대 +194라면 범위는 339가 되며 0.1의 tolerance를 적용하면 ± 33.9 가 되는데 이는 출력값이 training pattern의 ± 33.9 범위내에 위치할 때 올바른 결정이라고 간주한다는 것을 의미한다. tolerance가 0이라는 것은 신경망에 의한 출력값이 모든 fact에 대하여 완벽한 일치도를 보인다는 것을 의미한다. 한편, 예를 들어 질병이 존재할 경우 1, 없을 경우를 0로 코딩한 경우 0.1의 오차허용은 “신경망에 의하여 질병이 존재한다는 출력결과에 대하여 output neuronal activity가 0.9 이상일 경우“ 혹은 ”신경망에 의하여 질병이 없다는 출력결과에 대하여 output neuronal activity가 0.1 미만일 경우“ 신경망의 추정결과가 올바른 것으로 간주한다는 것을 의미한다. 일반적으로 오차허용은 0.1을 흔히 사용한다. 요약하면 훈련 오차 (training error)는 연결행렬 (connection matrix)를 보정함으로써 최소화한다. 가중치를 훈련시키는 방법은 오차 역전파 모형 (backpropagation of error), gradient descent method, Levenberg-Marguardt algorithm 등 다양한 방법이 있는데 본 연구에서는 가장 흔히 사용되는 첫 번째 방법을 이용한다.

마. 신경망 교차검증 (cross-validation)과 모형선택

훈련이 종료된 이후 최종 단계는 훈련된 신경망의 예측 능력을 검증하는 것이다. 교차검증에서 훈련된 신경망 (trained network)이 일반화하는 능력은 훈련자료에서 제외된 나머지 자료의 fact에 대하여 추정 능력을 평가한다. 흔히 이용 가능한 자료 중 10-20%를 검증용 자료로 유지한다. 즉 훈련된 신경망이

경험하지 않은 새로운 fact에 대하여 추정된 결과와 실제 결과를 올바른 판정률 (% correct classification)을 계산함으로써 비교한다.

두가지 이상의 신경망에 대하여 우수한 모형을 선택하는 방법으로 BrainMaker의 shuffling 기능을 이용하여 fact의 순서를 달리하여 (즉 모형 구축에 이용되는 training fact와 testing fact를 달리함) 모형을 구축하여 두 모형의 일치하는 경우 적절한 것으로 판단하였다. 한편 두 신경망의 결과가 다른 경우 평균치를 계산할 수 있다. Training 과정에서 발생하는 오차 [average error와 root mean squared (RMS) error]를 추적하여 오차가 최소화되는 모형을 선발한 후 다시 training 과정을 거치는 방법을 선택하였다.

제3절 인공신경망 모델구축 및 평가

1. 모형의 요약

가. 신경망 훈련

신경망은 backpropagation of error법으로 훈련하였으며 training 과정의 허용오차 범위로써 training tolerance를 0.1, testing tolerance를 0.4로 설정하였다. training fact의 수는 total fact의 90%, testing fact의 수는 total fact의 10%로 하였다. 신경망 훈련에 적용된 parameter를 요약하면 <Fig 4-9>와 같다.



Fig 4-9. Setting of parameter for the training of neural network.

나. 모형의 구조

예비분석용 신경망은 23개의 input, 6개의 hidden neuron, 1개의 output으로 구성된 23-6-1 backpropagation network으로 <Fig 4-10>과 같다. 23개의 예측변수는 대부분 binary data로 범주화하였으며 누락 관찰치 (missing value)는 소프트웨어에서 추천하는 방법으로 변수 당 두 개의 독립적인 변수를 작성하여 입력변수로 사용하였다. 결과변수 (output)는 IB 발생 유무로서 0 (질병

없음)과 1 (질병있음) 사이의 연속적인 값으로 출력된다. 앞에서 제시한 첫 번째 방법을 활용하면 23개의 input과 1개의 output이 있으므로 12개의 hidden neuron이 추천되지만 본 자료의 경우 training fact가 많은 것이 아니므로 경험적으로 6개의 hidden layer를 설정하였다.

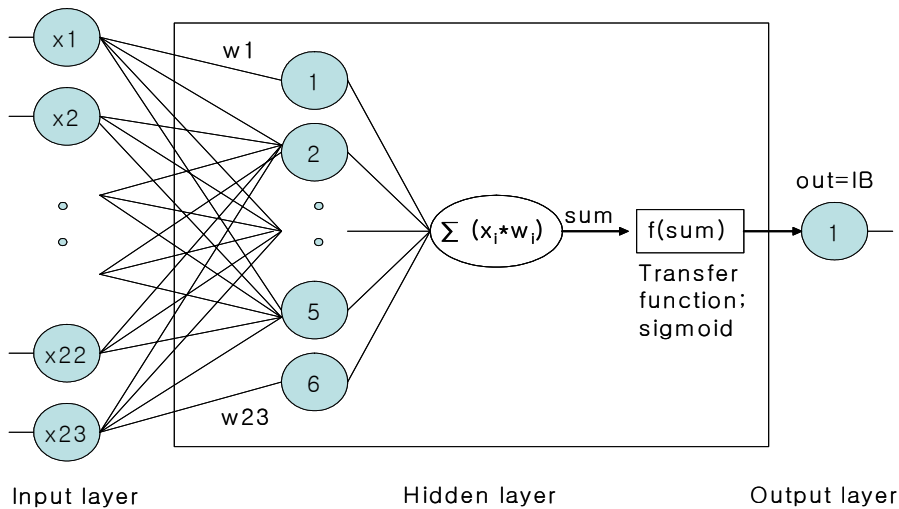


Fig 4-10. Architecture of 23-6-1 backpropagation network.

2. 투입변수

신경망 모형에 사용된 투입변수는 표 9와 같고 각 변수에 대한 설명은 로지스틱 회귀모형에서 설명하였다. 특히 누락 관찰값이 있는 투입변수 예를 들어 농장운영 년수 (OP_YEAR)의 경우 신경망 모형에 투입하기 위하여 소프트웨어에서 추천하고 있는 방법에 의거하여 별도의 변수를 작성하여 투입하였다 (예: OP1, OP2 등). 예비모형을 통하여 개별변수의 특성을 잠정적으로 파악하고 최종모형에 투입된 변수와 각 변수들에 대한 설명은 <Table 4-19, 20, 21>에 요약하였다. 이 표에서 기호 1과 2는 누락 관찰치 (missing value)를 신경망에 투입하기 위하여 2개의 독립변수로 설정한 것을 의미한다. <Fig 4-11>은 최종모형에 대한 신경망구조를 도식화한 것이다.

Table 4-19. Input neuron

Risk factor group	Categories
Output	
IB_TOT	0, 1
Input	
OP1, OP2	< 5, >= 5 year
Flock_No	Yes, No
Flock1, Flock2	< 2, >= 2
Grw1, Grw2	Yes, No
MTD1, MTD2	Yes, No
Intro1, Intro2	All-in-all-out, Continuous
Temp1, Temp2	Yes, No
Vent1, Vent2	Power, Others
FEC1, FEC2	Weekly, monthly
Car1, Car2	Incineration or burial, Use of feed
Vis1, Vis2	Yes, No
Cold1, Cold2	Yes, No
ND_TOT	Yes, No

Table 4-20. Description of input neurons

Risk factor	Description
op_year	Operation years of house
flock	No. of flocks in a farm
size	Flock size
grw	Type of farm
m_age	Presence of multi-age flocks
molt	Molting practice
introduction	All-in-all-out introduction of flock
temp	Checking temperature/humidity
grw_type	Type of house
vent	Power ventilation system
feces_tr	In-site disposal of feces
feces_tn	Frequency of feces disposal
carcass 1	Incineration of carcass
carcass 2	Animal feeds of carcass
visitor	Sanitary measure for visitors
cold *	Presence of cold stress

* This factor was based on the subjective assessment of a veterinarian who is responsible for routine check-up the farm. Yes represents a farm with improper management of in-house temperature control.

Table 4-21. Input neurons, its definition and coding system used to train the artificial neural network for predicting chicken infectious bronchitis virus infection

Neuron	Input	Coding system	
		Category	Values
1	op_year	> 5	1.0
		≤ 5	0.0
2	flock	Continuous	Normalized, 0-1
3	size	< 40,000	0.0
		40,000 - 100,000	0.5
		> 100,000	1.0
4	grw	Growth only	0.0
		Adult only	1.0
5	m_age	Presence	1.0
		Absence	0.0
6	molt	Yes	1.0
		No	0.0
7	introduction	Yes	1.0
		No	0.0
8	temp	Yes	1.0
		No	0.0
9	grw_type	Open	1.0
		Closed	0.0
10	vent	Yes	1.0
		No	0.0
11	feces_tr	Yes	1.0
		No	0.0
12	feces_tn	Longer than weekly	1.0
		At least weekly	0.0
13	carcass 1	Yes	1.0
		No	0.0
14	carcass 2	Yes	1.0
		No	0.0
15	visitor	Yes	1.0
		No	0.0
16	cold	Yes	1.0
		No	0.0
17	IB (output)		Continuous

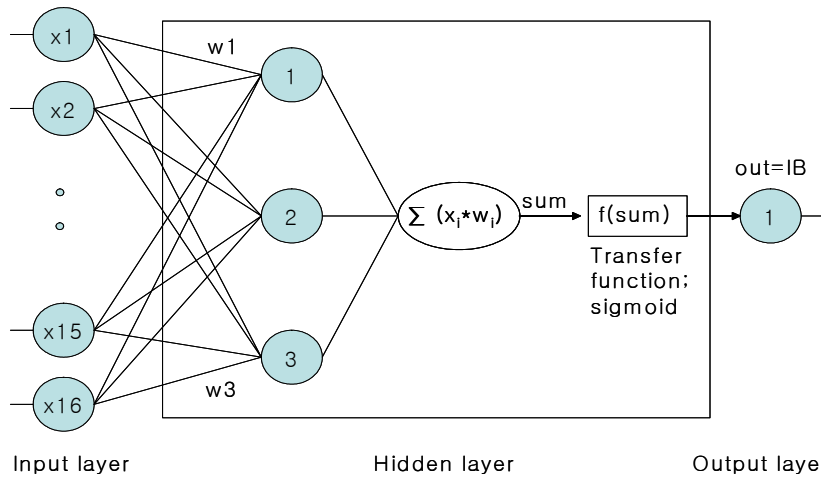


Fig 4-11. A three-layered fully interconnected neural network architecture. Lines between nodes represent synaptic connections, which are initially determined by random values and then altered by learning rule of the back-propagation algorithm. Sixteen neurons representing presumed risk factors associated with IB form the input layer (left). Each input neuron is synapsed to 3 neurons, forming a single hidden layer (center box). Each hidden layer neuron, in turn, stimulates a single neuron in the output layer (right), producing a normalized value interpreted as the probability of chicken infectious bronchitis virus infection.

제4절 모델검증 및 IB 발생위험 예측

1. 분석결과 및 모델검증

가. 접근방법

신경망 훈련은 전체 network의 오차를 줄이고 실제로 경험하지 않은 새로운 패턴을 접할 때 올바른 결정을 내릴 수 있도록 input과 output 간의 관계에 가중치를 설정하는 것이 목적이다. 훈련에 필요한 자료의 크기는 input의 개수, 결정의 개수, IB 문제의 복잡성에 따라 좌우되는데 IB 연구에서는 전체 자료에 대하여 오차평균 제곱 (mean square error)을 최소화하는 방법인 backpropagation을 적용한다. 이 단계에서 수행하게 될 내용은 첫째, 신경망의 훈련 종료 후 IB 역학조사 자료의 20%를 모형평가 과정에 적용 둘째, 평가결과 오차가 인정할만한 수준에 미치지 못하면 모수를 수정한 후 ANN 훈련과정 반복 셋째, 훈련 알고리즘 (training algorithm)의 다양화 넷째, 연결 가중치 (connection weight)의 최적화 등이다. 최종 모형에 투입된 변수들의 예측능력은 ROC 곡선을 작성하여 비교하였다.

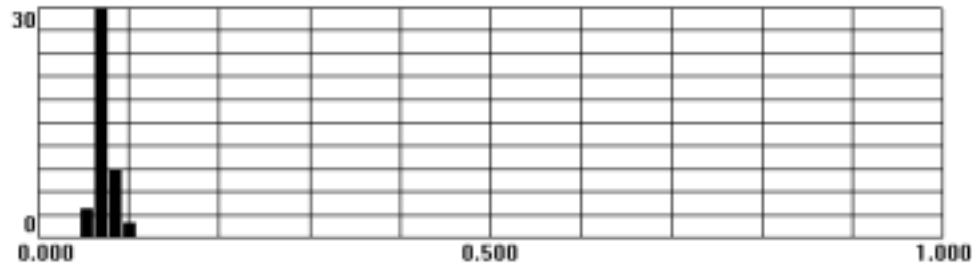
신경망 데이터베이스를 구축 후 이 자료를 이용하여 일차적으로 작성한 모형 (IBnet)에서 산출된 오차를 검증한 결과 12번째 훈련모형에서 오차가 최소화되는 모형이 확인되었으며 이 모형을 다시 훈련시켜 Net12모형으로 명명하였다. <Fig 4-12>는 IBnet의 training 오차를 나타낸 것이다. <Fig 4-12a>에서 x축은 오차수준이고 y축은 오차허용 범위 내에 위치하는 출력값의 수로 훈련과정이 진행됨에 따라 허용오차에 완전히 수렴함을 알 수 있다. <Fig 4-12b>에서 훈련과정에서 진행되는 수행번호 (run number)이고 y축은 각 시행에서 총 오차수준 (overall error level)으로 훈련이 진행됨에 따라 오차가 점진적으로 감소함을 알 수 있다. 일차모형에서 출력된 많은 모형 중 오차가 최소화되는 모형을 구체적으로 확인하고자 출력결과를 NetMaker에서 오차를 확인하였다. Net12 모형에 이어 일부 입력변수의 조정을 통하여 몇가지 추가적인 모형을 작성하여 오차수렴 과정을 평가하였으며 <Fig 4-13> 그 일부를 요약하면 <Table 4-22>와 같다. 아래의 신경망 모형은 error tolerance 0.1, testing tolerance 0.4, hidden layer 6개로 고정하여 분석한 것이다.

Table 4-22. Average error (AE) and root squared errors (RMS) by networks evaluated

Variables removed	AE	RMS	Network
Full model	0.0713	0.0715	IBNet
Cold1, Cold2	0.0424	0.0455	IB1Net
Cold1, Cold2, Vis1, Vis2	0.0330	0.0350	IB3Net
Cold1, Cold2, Vis1, Vis2, Car1, Car2	0.0301	0.0329	IB4Net
Cold1, Cold2, Vis1, Vis2, Car1, Car2, Intro1, Intro2			NC
Cold1, Cold2, Vis1, Vis2, Car1, Car2, Vent1, Vent2	0.0998	0.1000	IB6Net

NC, not converged.

(a)



(b)

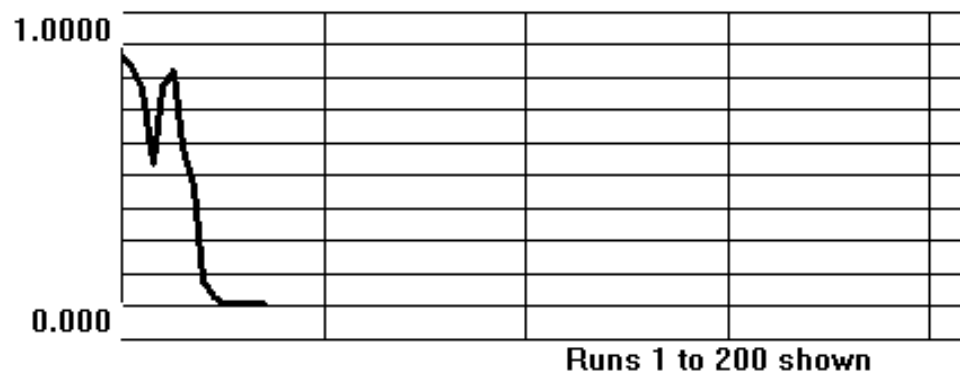


Fig 4-12. Training error of Net12 network.



Fig 4-13. Example of RMS error of IB6Net network.

나. 모델검증 및 평가

전체 자료 중 10%의 예비 자료로 구성된 testing fact에 대하여 신경망 Net12를 적용하여 판별능력을 검증한 결과 0.1 error tolerance에서 82%의 정확도를 유지하였다. 이 모형은 몇가지 측면에서 향후 개선할 여지가 있다. 첫째는 완전모형 (full model)의 경우 23개의 투입변수로 구성된 모형이기 때문에 비교적 많은 입력요소를 가지고 있어 hidden layer의 수가 불가피하게 증가하고, 실용성이 다소 저하되는 면이 있다. 또한 입력변수의 일부는 normalizing (0~1)을 위한 자료변환이 필요할 것을 판단한다. 모형에 특정한 변수를 제거 혹은 삽입할 경우 모형의 오차가 증가하거나 수렴하지 못하는 경우도 있으므로 (NC 모형) 향후 투입변수를 줄이면서 오차가 최소화되고 상대적으로 판별능력이 우수한 모형을 개발하는 것이 중요하며 활용 가치가 높을 것으로 판단된다. 더불어 이 모형은 누락관찰치가 일부 존재하는 모형이기 때문에 예측 정확도에 로지스틱 모형에 비하여 높지만 추가자료를 확보함으로써 보완할 필요가 있을 것으로 생각한다 (평균값 사용과 변수를 추가하는 문제). 모형에 투입된 5개 변수에 대하여 각각의 ROC 곡선을 작성하여 변수들간 예측 능력을 비교 평가하였다 <Fig 4-14, Table 4-23>. 다일령 계군의 유무가 예측능력이 69.5% (95% CI, 0.60 - 0.78)로 가장 높았으며 예측능력에 있어서 계군의 수 (Flock_No)와 분변 처리 상태 (Fec_TN) 변수와 유의한 차이를 보였다 <Table 4-24>.

Table 4-23. Summary statistics (ROC curve) by risk factor

Risk factor	Area under the ROC curve (SE)	95% CI
Fec_TN	0.524 (0.056)	0.427 - 0.62
Flock_No	0.618 (0.054)	0.520 - 0.710
Multi_age	0.695 (0.050)	0.600 - 0.780
ND	0.622 (0.053)	0.524 - 0.710
Year_op	0.601 (0.054)	0.503 - 0.694

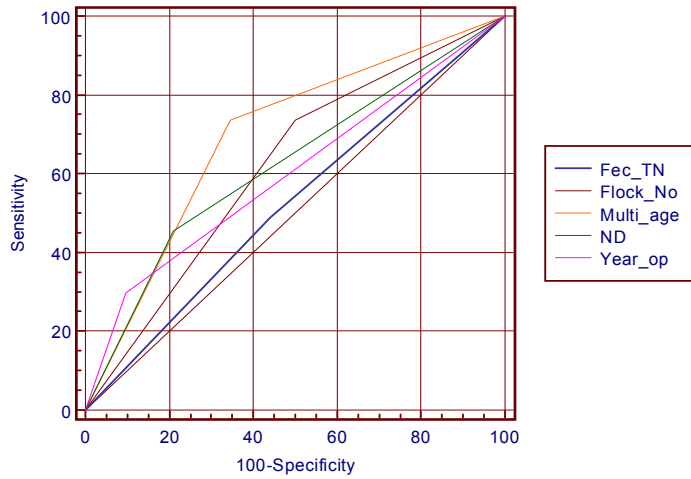


Fig 4-14. Receiver-operating Characteristic (ROC) curve for each variable entered into the final multivariate logistic regression model.

Table 4-24. Comparison of ROC curve (Difference, \mp SE)

	FN	MA	ND	YO
FE	0.094 \mp 0.066	0.171 \mp 0.069	0.098 \mp 0.073	0.077 \mp 0.065
	0.153	0.013	0.181	0.239
FN		0.077 \mp 0.034	0.004 \mp 0.064	0.017 \mp 0.070
		0.022	0.952	0.805
MA			0.073 \mp 0.068	0.094 \mp 0.070
			0.282	0.180
ND				0.021 \mp 0.069
				0.759

FET, Fec_TN; FN, Flock_No; MA, Multi_age; YO, Year_op.

이상의 결과를 종합하면, IB 발생위험은 농장 내 다일령 계군이 없을 때, 지난 4년간 뉴캐슬병 발생이 없을 때 유의하게 감소하며, 계군의 수가 많을수록 발생위험은 감소하지만 유의하지는 않았다. 감보로와 티푸스 질환은 IB 위험과 관련이 없었다. 이러한 위험요인을 IB 발생위험에 위험관리 요소로 적용할지에 대한 실질적 의미에 대해서는 추가적인 고찰이 필요할 것으로 생각된다. 다일령 계군이 존재할 경우 농장에 IBV가 상존하여 낮은 노출 강도로 산란계가 지속적인 노출을 경험함으로써 어느 정도 자연면역력이 형성되는 것과 관련이 있을 것으로 사료된다. 또한 산란저하를 경험하는 뉴캐슬병의 발생이 적다는 것은 농장의 계군관리가 위생학적으로 잘 관리되는 농장임을 시사한다.

2. 모형에 근거한 발생위험 예측

가. 로지스틱 모형

단변량분석에서 유의한 변수는 9개로 이를 요약하면 <Table 4-25>와 같다. 9개 변수에 대하여 다변량 분석을 시도한 결과 유의한 변수는 확인되지 않았고 모형의 적합성도 좋지 않았다 (Hosmer-Lemeshow Chi-square=14.82, df=7, p=0.0383). 따라서 이들 변수 중 MTD_YN를 제외한 축소모형에서도 유의한 변수는 없었지만 모형의 적합성은 적절한 것으로 나타났다 (Hosmer-Lemeshow Chi-square=7.42, df=7, p=0.4922). 이 모형의 AUC=0.734 (c-statistic)로 분석되었다. <Table 4-26>은 로지스틱 회귀모형에 의한 계군별 IB 발생위험 확률을 누락변수가 없는 계군 (n=69)에 대하여 출력한 것으로 IB 발생위험은 최소 2.6%, 최대 71.3%의 발생확률을 갖는 것으로 나타났다. 발생확률이 10% 이하인 계군이 전체 중 10개 (14.4%), 50% 이상인 계군도 13개 (18.8%)를 차지하였다. 발생확률이 30% 이상인 계군이 전체 계군 중 38개 (55%)를 차지하여 전체적으로 IB 발생위험이 높은 것으로 판단된다.

Table 4-25. Frequency distribution of risk factors by with or without infectious bronchitis (IB) cases, 2004-2006

Risk factor	Category	No. positive	No. negative	OR
Year_op (year)	< 5	2	17	1.04
	5-10	4	13	0.80
	10-15	4	17	4.91
	15-20	13	9	2.38
	20-25	7	10	3.40
	>25	5	5	1.00
Flock_No	1	10	29	1.00
	2	4	11	0.76
	3	5	6	1.74
	> 4	7	8	1.83
GRW_YN	Jungchu	8	8	1.79
	Jungchu+Adult	11	29	0.68
	Adult	7	19	1.00
MTD_YN	Yes	24	25	3.15
	No	14	46	1.00
INTRO	All-in-all-out	17	44	1.00
	Continuous	21	27	2.01
FEC_TN	Everyday	4	3	1.00
	Weekly	7	30	0.58
	Monthly	15	8	4.69
	After pass	12	23	1.30
CARCASS	Incineration	1	14	1.00
	Burial	24	43	8.37
	Feed stuffs	13	13	14.9
VISITOR	Full sanitation	7	29	1.00
	Partial	6	6	2.50
	No sanitation	14	20	1.75
ROAD	< 10 m	9	7	2.74
	10-100 m	8	16	1.07
	100-500 m	3	11	0.58
	500-1 km	3	5	1.28
	> 1 km	3	16	1.00

Table 4-26. Probability of IB infection estimated by final logistic function (n=69)

Obs	ID_NO	IB	OP_YR	FLK_NO	GRW_YN	INTRO	FEC_TN	CARCASS	VISITOR	ROAD	PROB
1	1	1	5	2	2	1	2	3	1	1	0.55522
3	3	0	6	3	1	2	9	4	1	4	0.71251
4	4	1	2	2	2	2	6	4	2	2	0.35920
5	5	1	2	2	1	2	8	2	4	2	0.37077
6	6	1	4	2	1	2	8	2	2	2	0.58464
7	7	1	1	1	3	1	6	2	2	5	0.02622
8	8	0	1	1	2	1	9	4	2	5	0.07280
9	9	1	4	1	2	1	8	4	4	2	0.19969
11	11	0	5	2	2	2	2	4	2	4	0.49119
12	12	1	4	1	1	1	8	4	4	1	0.46416
13	13	0	4	1	2	1	9	4	4	1	0.22781
14	14	0	6	8	3	2	1	1	1	3	0.53192
15	15	0	4	3	2	2	1	2	1	5	0.39256
16	16	1	3	5	3	2	3	3	1	2	0.35685
17	17	0	3	3	3	2	1	2	1	2	0.64792
18	18	0	6	5	2	2	3	3	2	2	0.70985
19	19	1	2	2	2	2	3	3	1	3	0.36806
21	21	0	6	5	3	2	1	3	1	3	0.50805
22	22	1	3	2	3	2	3	3	1	3	0.21504
23	23	1	3	5	3	2	3	5	1	3	0.37900
24	49	0	6	5	3	2	2	2	1	5	0.32107
25	50	1	6	7	3	2	1	2	1	3	0.53861
26	51	1	6	6	3	2	4	4	4	3	0.37310
27	52	1	6	7	3	2	1	2	1	5	0.41094
29	54	1	6	6	3	2	4	3	1	4	0.41449
30	55	1	5	3	2	2	4	3	3	3	0.45340
32	57	1	5	2	3	2	3	2	4	2	0.20504
33	58	1	2	2	3	2	3	2	4	3	0.09018
34	24	1	2	1	2	1	9	6	4	1	0.20851
35	25	1	4	1	2	1	6	6	4	2	0.29822
36	26	0	2	1	2	1	9	6	3	1	0.24388
38	28	1	3	1	2	1	9	6	3	2	0.23940
39	29	0	3	2	2	2	2	2	3	1	0.42946
40	30	0	5	3	3	2	7	7	4	3	0.28073
43	33	1	5	3	3	2	2	2	4	1	0.29769
44	34	0	4	2	2	2	5	6	3	1	0.59499
45	35	1	1	3	2	2	6	6	3	2	0.37470
46	36	0	5	3	3	2	5	6	3	2	0.38282
47	37	1	3	1	1	1	9	6	4	1	0.47159

Table 4-26 (cont'd)

Obs	ID_NO	IB	OP_YR	FLK_NO	GRW_YN	INTRO	FEC_TN	CARCASS	VISITOR	ROAD	PROB
48	38	1	2	1	1	1	9	6	3	2	0.40090
50	40	0	2	1	1	1	9	7	4	1	0.45750
51	41	1	1	1	1	1	9	6	3	1	0.40678
52	42	1	5	1	1	1	9	6	3	2	0.57375
53	43	0	4	1	1	1	9	6	3	1	0.57972
55	45	0	1	1	1	1	9	8	3	2	0.42996
56	46	0	2	1	1	1	9	6	3	1	0.46399
57	47	0	3	1	1	1	9	6	3	2	0.45791
58	48	0	4	1	1	1	9	6	3	2	0.51605
60	60	0	3	4	3	2	2	2	3	2	0.22622
62	62	0	4	1	2	1	9	6	3	4	0.19188
63	63	1	4	1	2	1	2	7	4	3	0.35954
64	64	1	3	1	2	1	2	6	4	3	0.27157
65	65	1	3	1	2	1	4	7	3	5	0.21375
66	66	1	1	1	2	1	4	7	4	5	0.12230
68	68	1	4	1	2	1	9	7	1	5	0.24712
69	69	1	5	2	3	2	9	1	1	5	0.09659
70	70	1	3	1	2	1	9	1	1	5	0.08279
71	71	1	5	3	3	2	9	7	1	5	0.26344
72	72	1	3	3	3	1	9	7	3	2	0.15870
73	73	1	1	1	2	1	9	8	3	5	0.11492
74	74	1	2	1	3	1	9	7	3	5	0.04870
75	75	1	5	1	2	1	9	7	3	2	0.37433
76	76	1	4	1	2	1	9	1	1	5	0.10228
77	77	1	3	1	2	1	9	1	1	5	0.08279
78	78	1	3	1	3	1	9	6	3	5	0.05140
79	79	1	3	1	2	1	9	1	3	5	0.05679
80	80	1	3	1	3	1	9	6	3	4	0.06550
81	81	1	2	1	2	1	9	6	3	3	0.16160
82	82	1	3	6	2	2	9	8	3	2	0.61897

나. 인공신경망 모형

최종모형을 구축하기 위하여 input neuron의 수와 입력변수의 특성에 변화를 주어 4가지 모형을 고려하였다 <Table 4-27>.

Table 4-27. Four different artificial neural networks and corresponding input neurons

Network	No. input neurons	Characteristics
IBV_D1	16	All categorical
IBV_D2	16	Categorical except YO, FS
IBV_D3	13	All categorical
IBV_D4	13	Categorical except YO, FS

YO, op_year; FS, flock, size.

입력 뉴런의 특성과 훈련모수를 변경하면서 다양한 신경망을 구성하였으며 최적의 신경망으로 확인된 IBV_D1 신경망의 경우 훈련자료에 대하여 77건 중 73건을 올바르게 판단하여 94.8%의 정확도를 보였다 <Fig 4-15>. 민감도와 특이도는 각각 95.5% (42/44, 95% CI, 84.5 - 99.4)와 93.9% (31/33, 95% CI, 79.8 - 99.3)로 나타났다. 훈련된 신경망을 검정자료에 적용하여 ROC 곡선을 작성한 결과 AUC는 전체의 94.8% (SE=0.086, 95% CI 0.592-0.961)를 차지하는 우수한 모형으로 나타났다 <Fig 4-16>. ROC 곡선에서 기준을 0.7149 이상으로 판단할 때 진단의 정확도가 88.9%로 가장 높았으며 100%의 민감도를 달성하였다. 이러한 민감도와 특이도에서 44%의 IB 유병률을 가정할 때 IBV_D1 모형은 80%의 양성예측도와 100%의 음성예측도를 보였다 <Table 4-28>. 이러한 소견에 근거할 때 본 연구에서 구축한 신경망 모형은 산란계군에서 IB의 존재를 확인하기 위한 목적에 성공적으로 응용될 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 4-28. ANN performance at different criterions for the output value

Criterion (%)	SE (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)	Diagnostic accuracy (%)
> 0.1094	100	60	66.7	100	77.8
> 0.7149	100	80	80.0	100	88.9
> 0.9656	75	80	75.0	80.0	77.8
> 0.9737	75	100	100	83.3	88.9
> 0.9981	50	100	100	71.4	77.8

SE, sensitivity; SP, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

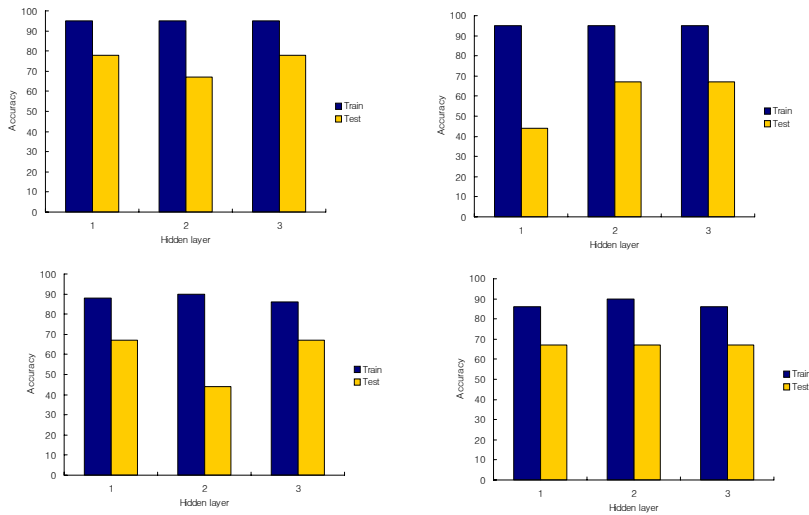


Fig 4-15. Diagnostic accuracy of the 4 different artificial neural networks (top left, IBV_D1; top right, IBV_D2; bottom left, IBV_D3; bottom right, IBV_D4) for predicting the diagnosis of infectious bronchitis in laying hen flocks. Tolerance parameter was set to 0.1 and 0.2 for training and testing set, respectively.

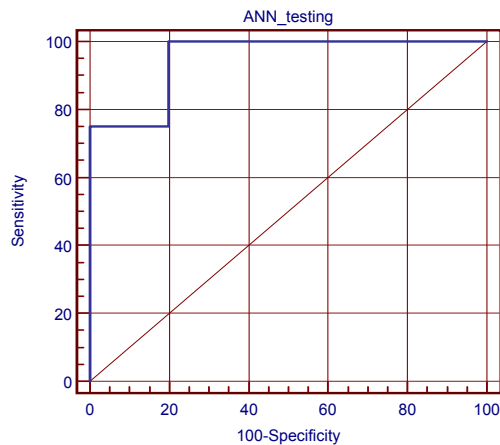


Fig 4-16. Receiver operating characteristic (ROC) curve for the artificial neural network. The area under the ROC curve was 0.948 (SE=0.086, 95% CI 0.592-0.961).

최적모형인 IBV_D1 신경망을 이용하여 입력변수의 위험요소를 평가한 결과는 <Fig 4-17>과 같다. 즉 계사의 운영년수가 오래될수록, 총 사육수수가 클수록, 다일령계군의 존재, 연속입추방법을 적용하는 농장에서 IB 감염의 위험은 증가하는 것으로 나타났다. 또한 농장에서 발생하는 계분을 처리하기 위해 외부에서 차량이 방문하거나 계분 처리 간격이 길수록, cold stress가 존재하는 농장일수록 IB 감염의 위험이 증가하였다. 사체처리 방법에서 소각을 하지 않고 매몰하거나 사료화를 시행하는 경우, 외부인이 농장 방문할 때 소독을 시행하지 않을 경우 IB 감염위험은 증가하는 것으로 나타났다.

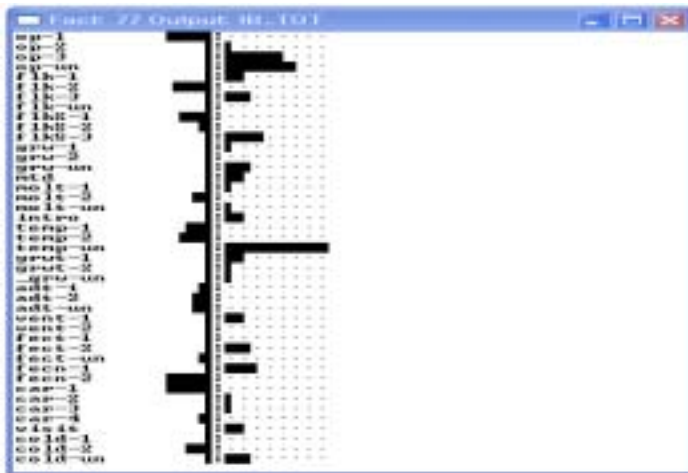


Fig 4-17. Sensitivity analysis of IBV_D1 network

제5절 인공지능망 응용

1. 위험요인의 분류

질병발생을 줄이기 위하여 농장에 적용 가능한 위험요인을 분류하기 위하여 앞에서 설명한 IBV_D1 신경망 (AUC=0.948)에서 IB 발생위험을 증가시키는 위험요인을 정리하면 다음과 같다.

- 계사의 운영 년수가 오래된 농장 (OP_YR)
- 사육 규모가 큰 경우 (FLK_NO)
- 다일령 계군이 존재하는 경우 (MTD_YN)
- 연속입추방법 적용할 경우 (INTRO)
- 계분처리를 위하여 외부에서 차량이 방문하는 경우 (FEC_TN)
- 계분처리 간격이 긴 경우
- Cold stress가 존재하는 경우
- 사체처리 방법에서 매몰하거나 사료화를 시행하는 경우 (CARCASS)
- 외부인 농장 방문시 소독을 시행하지 않을 경우 (VISITOR)

이들 9개 위험요인 중 농장에 적용이 가능한 간섭요인 (intervention factor)은 다음과 같이 분류할 수 있다.

- 간섭이 어려운 고정요인: 계사의 운영 년수, Cold stress 감소
- 장기적 간섭이 필요한 요인: 사육규모의 적정화, 다일령 계군, 입추방법
- 단기적 간섭이 가능한 요인: 계분처리 방법 및 간격조정, 사체소각처리, 농장 출입시 소독

한편, 로지스틱 모형과 동일하게 9개 변수가 위험요인으로 분석되었는데 두 모형에서 공통적으로 확인된 요인은 계사의 운영 년수 (OP_YR), 사육 규모 (FLK_NO), 다일령 계군 존재 (MTD_YN), 입추방법 (INTRO), 계분처리 방법 (FEC_TN), 사체처리 방법 (CARCASS), 외부인 농장 방문시 소독 (VISITOR) 등 7개 변수이다.

위에서 분석된 요인 중 간섭이 어렵거나 장기적 간섭을 필요로 하는 요인은 현실적으로 농장에 적용하기 어렵다. 따라서 단기적 간섭이 가능한 요인 중 계

분처리 방법과 간격 조정, 사체의 소각처리 및 외부인 농장 방문시 출입을 통제하는 요인은 즉시 농장에 적용할 수 있는 요인으로 확인된다. 그러나 단기적 간섭이 가능한 요인 중 계분처리를 위해 외부차량이 방문하지 않고 자체적으로 소각 처리하기 위해서는 일정규모의 시설투자와 인력이 소요되기 때문에 적용하기 쉽지 않다. 사체처리 역시 추가 비용이 발생하는 부분이다. 농장에서 추가 비용이 발생하는 간섭행위에 대해서는 대부분의 연구농장이 참여하기 어렵다는 의견을 보였다. 그 대안으로 앞에서 분석된 위험요인 중 비교적 비용이 적게 소요되면서 중요한 요인인 농장 출입시 소독을 시행하는 간섭행위 (PAR=0.755)를 적용하기로 결정하였다. 따라서 연구 대상이 되는 132개 계군의 53개 농장 중 6개 농장만이 적용시험에 참여하겠다는 의사를 표현하여 현재 이들 농장에 대한 IB 발생상황을 모니터링하고 있다.

2. 위험요인의 IB 발생위험 기여도

위험요인의 현장 적용이 제한됨에 따라 그 대안으로 각 위험요인이 IB 발생에 어느 정도 기여하는지를 모형으로 평가하였다. 질병 발생위험을 예측하고 분석된 위험요인을 농장에서 제거하였을 때 질병발생 감소분을 평가하는 연구는 모형의 활용 측면에서 매우 중요하다 (Roush 등, 1997). 이 단계에서 수행하게 될 내용은 위험요인으로 확인된 성분 중 농장에 적용이 가능한 요인을 가려내고 이들 요인을 단독 혹은 병용할 때 질병발생의 감소분을 평가하는 것이다.

Table 4-29. Population attributable risk (PAR) of risk factors for IB

Risk factor	PAR
House operation (year)	0.715
No. of flock	0.691
Type of farm	0.610
Presence of multi-age flocks	0.696
Method of introduction	0.614
Method of feces disposal	0.600
Method of carcass disposal	0.933
Disinfection for visitors	0.755
Distance to nearest road	0.700
All nine risk factors combined	0.999

위험요인으로 확인된 모든 변수를 현장에 적용할 수 있는 것은 아니기 때문에 각 변수의 효과가 어느 정도인지를 파악한 후 우선순위를 결정해야 한다. 한가지 방법은 모집단에서 특정한 위험요인에 기인된 위험의 정도를 정량화하는 방법으로 모집단 귀속위험도 (population attributable risk percent, etiologic fraction, PAR)를 계산하였다. 이는 관심을 두고 있는 위험 요인이 존재하지 않을 때 모집단에서 해당 질병이 발생하지 않을 것으로 기대되는 백분율을 의미한다. 단일 요인만을 고려하지 않고 다른 여러 가지 요인 (혼란요인, confounding)들이 존재할 때 이들 요인의 효과를 보정한 귀속위험도를 계산하는 것은 여러 가지 측면에서 응용 가능성이 높다. 첫째로 하나의 요인이 아니라 여러 가지 다양한 요인에 목표를 둔 간접 혹은 예방 프로그램의 효과를 평가할 수 있다. 또한 위험요인의 분포가 서로 다른 지역 혹은 국가에서 질병 발생률을 비교하거나 총 질병 발생률 중 위험요인으로 설명이 가능한 비율을 계산함으로써 질병과 위험요인 간의 인과관계를 추정할 수 있다.

<Table 4-29>는 각 위험요인의 기여도를 분석한 결과를 요약한 것이다. 단일 요인으로는 사체처리가 93.3%로 가장 높고 그 다음으로 농장 출입시 (방문객 포함) 소독이 75.5%를 차지하였다. 기타 계사의 운영 년수 (71.5%)와 농장과 가장 인접한 도로와의 직선거리 (70.0%)도 중요한 위험요인으로 나타났다. 위험요인 간 상호작용 (interaction)을 고려하지 않을 때 9개 위험요인을 모두 합할 경우 PAR은 99.9%로 계산된다.

제5장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발목표의 달성도

- 1차년도

- 연구목표

- 국내 유행 IBV 조사와 위험요인의 분포 및 사양관리 실태 조사

- 평가 착안사항

- 국내에 유행하는 IB 바이러스의 유전자적 특성 조사
 - 유전자백신 제조를 위한 바이러스주 선발
 - 위험요인의 분포규모와 사양관리 실태 조사
 - 국내 IB 발생상황에 대한 역학조사

- 연구목표의 달성도

- 국내에서 유행하고 있는 12주 이상의 IB 바이러스를 분리
 - RT-PCR-RFLP 분석 염기서열 및 아미노산 서열 결정
 - phylogenetic tree 작성
 - 확률표본 추출법을 이용한 적정 농가수와 표본크기 결정
 - 연구 대상 농가에 대한 혈청역학 조사 완료
 - 위험요인의 분포와 양계농장의 관리실태 조사 완료

- 기술발전예의 기여도

- 국내에는 이전 연구에서 확인된 KM91 type의 IB 바이러스와 함께 변이가 일어난 것으로 추정되는 새로운 바이러스들이 나타나고 있음을 확인
 - 특히 IBV의 S1 glycoprotein gene과 함께 nucleocapsid gene을 함께 분

석하였는데 지금까지와의 연구보고와는 다르게 nucleocapsid gene도 많은 유전적 변이가 일어나고 있음을 확인

- 혈청역학조사에 필요한 적정 표본크기 산출방법 확립
- 합병혈청을 이용한 유병률 추정이 매우 유용하여 타 질병에의 응용에 기여

- 2차년도

- 연구목표

- 유전자 클로닝과 유전자백신 제조 및 혈청역학적 특성 규명

- 평가 착안사항

- IB 항원결정부위의 클로닝과 유전자백신 제조
 - 유전자백신의 특성 규명
 - 국내 분리 바이러스의 혈청 역학학적 특성 파악
 - 인공신경망 분석모형 비교 분석

- 연구목표의 달성도

- KM type에 속하는 바이러스와 함께 다른 type으로 분류되는 바이러스로부터 S1과 N gene을 이용하여 유전자백신 제조
 - S1과 N 유전자로 제조된 유전자 백신은 *in vitro* transcription / translation method에 의하여 유전자 발현 확인
 - RFLP 패턴 분석완료
 - 위험분석 모형을 구축하기 위하여 로지스틱 모형과 인공신경망 모형 확립
 - 구축한 모형으로부터 농장별 IB 발생확률 예측
 - 합병혈청의 유용성 증명

- 기술발전에의 기여도

- 유전자 백신제조 방법 확립으로 타 질병에 응용 기반 조성
 - 모형의 정확도를 평가하기 위한 ROC 분석과 모형의 최적화 방안 확립

- 인공지능망 모형구축에 필요한 모수 선별 방법과 처리방법 확립

- 3차년도

- 연구목표

유전자백신의 면역원성 조사 및 위험관리 모형개발

- 평가 착안사항

- 유전자백신의 면역원성 조사
- 유전자백신의 방어효과 조사
- 위험요인의 분석 모형 확립 및 발생자료 응용
- 인공지능망 응용 가능성 평가

- 연구목표의 달성도

- 유전자 백신 중 KM91 type에 속하는 K507-01로부터 제조된 유전자백신을 닮아 집중하여 면역원성과 방어효과 조사
- 유전자백신의 부분적 방어효과가 확인
- 위험요인 분석모형 확립 완료
- 16개 입력 neuron을 사용한 최적 인공지능망 모형 구축 완료
- 모형 검증에서 민감도와 특이도에 근거한 정확도가 높은 모형 확인
- 입력 neuron의 IB 발생 위험 기여도 추정

- 기술발전예의 기여도

- 백신의 면역원성을 향상시킬 수 있는 adjuvant 확인 방안 강구
- 현장 적용이 어려운 위험요인에 대한 위험기여도 추정방안 확립

제2절 관련분야의 기술발전에의 기여도

IBV는 유전자변이가 매우 빠르게 일어나는 바이러스로 항원적 특성이 다르게 기존의 백신으로 완전한 방어효과를 어려운 것이 특징이다. 유전자백신은 비교적 최근에 많이 연구되는 분야로 제조기법에 확립되면 새로운 바이러스가 출현할 때마다 관련 유전자를 클로닝하여 백신을 제조할 수 있다. 전통적인 위험요인 분석기법인 로지스틱 모형과 최근 활용되고 있는 신경망 모형을 구축하기 위하여 적용한 방법론은 질병발생 자료를 분석하는 연구에 활용이 가능하며 특히 모형구축에 적용된 기법들은 응용 가능성이 매우 높다. 본 연구에서는 백신을 제조하고 발현을 확인한 다음 닭에서 방어효과를 확인 할 수 있는 시스템을 확립하여 이 분야의 연구에 크게 기여할 것으로 사료된다. 또한 위험요인에 의한 질병관리 프로그램을 확립하기 위한 분석모형을 개발 완료함으로써 본 연구결과로 얻은 결과는 향후 국가방역사업에 반영할 수 있을 것으로 판단한다. 특히 대규모 혈청시료에 대한 검사에 근거하여 유병률을 추정하는 사업에서 합병혈청을 이용한 검사법을 확립하여 국가예산을 절감하는 효과가 클 것으로 사료된다.

제6장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

- 유전자백신의 방어효과 향상을 위한 다양한 genetic adjuvant 이용 방안
- 유전자백신의 *in ovo* 적용 방법 개발 필요
- 유전자백신의 교차면역 검증 필요
- IB의 실험실적 확산을 위한 간편 검사법과 양성판정 기준 확립
- 위험요인에 대한 현장 적용시험 연구
- 전문가 시스템을 개발하기 위한 역학연구 보완

2. 타 연구에의 응용

- 본 연구에서 개발된 유전자백신의 제조기법은 다른 바이러스의 유전자백신 제조를 위하여 사용이 가능하다고 판단됨
- IBV의 S1과 N gene의 염기서열은 GenBank에 등록하여 고유의 ID를 부여받았으며 이는 다양한 IBV 연구에 활용이 가능
- 새로운 변이형 출현시 관련 유전자를 이용한 백신을 제조 가능
- 합병혈청을 이용한 혈청역학조사의 유병률 추정 가능
- 위험분석기법, IB 감염확률을 추정과 신경망모형 구축기법은 타 질병에 대한 연구에 활용 가능

3. 기업화 추진방안

- 본 연구에서 개발된 유전자백신의 경우 방어효과를 향상시키는 방법을 개발한 다음 기업화 추진방안을 고려하여 볼 수 있다고 판단됨.
- 신경망 모형에 대한 검증작업을 광범위하게 적용한 후 보급형 전문가 시스템 개발 가능

제7장 참고문헌

Alexander DJ, Chettle NJ (1997). Procedures for the hemagglutination and the hemagglutination-inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 6: 9-17.

Astion ML, Wilding P (1992). The application of backpropagation neural networks to problems in pathology and laboratory medicine. *Arch Pathol Lab Med* 116: 995-1001.

Baxt WG (1992). Improving the accuracy of an artificial neural network using multiple differently trained networks. *Neural Comp* 4: 772-780.

Beck JR, Shultz EK (1986). The use of relative operating characteristic (ROC) curves in test performance evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 110: 13-20.

Bhattacharjee PS, Carter SD, Savage CE, Jones RC (1995). Re-excretion of infectious bronchitis virus in chickens induced by cyclosporine. *Avian Pathol* 24: 435-441.

Bruzzi P, Green SB, Byar DP, Brinton LA, Schairer C (1985). Estimating the population attributable risk of multiple risk factors using case-control data. *Am J Epidemiol* 122: 904-914.

Cahoon-Young B, Chandler A, Livermore T, Gaudino J, Benjamin R (1989). Sensitivity and specificity of pooled versus individual sera in a human immunodeficiency virus antibody prevalence study. *J Clin Microbiol* 27: 1893-1895.

Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder Jr. HW (1991). *Diseases of poultry*. 9th ed. Iowa State University Press, pp. 471-484.

Cannon RM, Roe RT (1982). Livestock disease surveys: A field manual for veterinarians. Australian Bureau of Animal Health, Canberra.

Cavanagh D, Davis PJ, Pappin DJC, Binns MM, Boursnell MEG, Brown TDK (1986). Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res* 4: 133-143.

Cavanagh D, Davis PJ, Cook JKA, Li D, Kant A, Koch G (1992). Location of amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 21: 33-43.

Cavanagh D, Naqi SA in Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McCougald LR, Saif YM (1997). Diseases of Poultry. Iowa state University Press, Ames. pp. 511-526.

Christensen J, Gardner IA (2000). Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. *Prev Vet Med* 45: 83-106.

Cicchetti DV (1992). Neural networks and diagnosis in the clinical laboratory: state of the art. *Clin Chem* 38: 9-10.

Cook JKA (1968). Duration of experimental infectious bronchitis in chickens. *Res Vet Sci* 9: 506-514.

Cook JKA (1984). The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol* 13: 733-741.

Cowling DW, Gardner IA, Johnson WO (1999). Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples. *Prev Vet Med* 39: 211-225.

Cox GJM, Zamb TJ, Babiuk LA (1993). Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol* 67: 5664-5667.

Cunningham CH (1975). Avian infectious bronchitis: characteristics of the virus and antigenic types. *Am J Vet Res* 36: 522-523.

De Wit JJ (2000). Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 29: 71-93.

Dhinakar Raj G, Jones RC (1997). Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol* 26: 677-706.

Eidson CS, Page RK, Fletcher OJ, Kleven SH (1979). Vaccination of broiler breeders with teno-synovitis vaccine. *Poult Sci* 58: 1490-1497.

Evers EG, Nauta MJ (2001). Estimation of animal-level prevalence from pooled samples in animal production. *Prev Vet Med* 49: 175-190.

Fan MW, Bian Z, Peng ZX, Zhong Y, Chen Z, Peng B, Jia R (2002). A DNA vaccine encoding a cell-surface protein antigen of *Streptococcus mutans* protects gnotobiotic rats from caries. *J Dental Res* 81: 784-787.

Feinstein AR (1996). Multiple logistic regression. In: Feinstein AR (ed). *Multivariable analysis*. 1st ed. New Haven: Yale University Press. pp 297-300.

Furlong JW, Dupuy ME, Heinsimer JA (1991). Neural network analysis of serial cardiac enzyme data. *Am J Clin Pathol* 96: 134-141.

Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL (1993). DNA vaccines: protective immunization by parenteral, mucosal, gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11478-11487.

Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD (2000). Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 45: 23-41.

Hanley JA, McNeil BJ (1982). The meaning and use of the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143: 29-36.

Hanlon L, Argyle D, Bain D, Nicolson L, Dunham S, Golder MC, McDonald M, McGillivray C, Jarrett O, Neil JC, Onions DE (2001). Feline leukemia virus vaccine efficacy is enhanced by co-administration with IL-2 and IL-8 expression vectors. *J Virol* 75: 8424-8433.

Hauk WW (1991). Confidence intervals for seroprevalence determined from pooled sera. *Ann Epidemiol* 1: 277-281.

Heald CW, Kim T, Sisco WM, Cooper JB, Wolfgang DR (2000). A computerized mastitis decision aid using farm-based records: an artificial neural network approach. *J Dairy Sci* 83: 711-720.

Hitchner SB, Winterfield RW, Appleton GS (1966). Infectious bronchitis virus types-incidence in the United States. *Avian Dis* 10: 98-102.

Hosmer DW, Lemeshow S (1989). *Applied logistic regression*. Wiley, New York.

Ignjatovi J, Sapats S (2000). Avian infectious bronchitis. *Res Sci Tech Off Int Epiz* 19: 493-508.

Jordan D (2005). Simulating the sensitivity of pooled-sample herd tests for fecal *Salmonella* in cattle. *Prev Vet Med* 70: 59-73.

Kim JH, Song CS, Mo IP, Kim SH, Sung HW, Yoon HS (1992). An outbreak of nephropathogenic infectious bronchitis in commercial pullets. *Res Reports Rural Develop Admin* 34: 28-31.

Kim SJ, Sung HW, Han JH, Jackwood D, Kwon HM (2004). Protection against very virulent infectious bursal disease virus in chicken immunized with DNA vaccines. *Vet Microbiol* 101: 39–51.

King DJ, Hopkins SR (1983). Evaluation of the hemagglutination–inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. *Avian Dis* 27: 100–112.

King DJ, Hopkins SR (1984). Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the hemagglutination–inhibition test. *Avian Dis* 28: 727–733.

King DJ (1988). Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains, *Avian Dis* 32: 362–364.

Kline RL, Brothers TA, Brookmeyer R, Zeger S, Quinn TC (1989). Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera. *J Clin Microbiol* 27: 1449–1452.

Kodihalli S, Haynes JR, Robinson HL, Webster RG (1997). Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. *J Virol* 71: 3391–3396.

Kozak M (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNA. *Nucl Acids Res* 12: 857–872.

Kozak M (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196: 947–950.

Kusters JG, Niesters HGM, Bleumink-Pluym NMC, Davelaar FG, Horzinek MC, van der Zeijst BAM (1997). Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. *J Gen Virol* 68: 343–352.

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

Kwon HJ, Lee DW, Ahn YK, Yoon JU, Kim SJ (2001). Presence of infectious bronchitis virus in Korea before 1986. *Korean J Vet Res* 41: 59-65.

Lai MM, Cavanagh D (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 48: 1-100.

Lambrechts C, Pensaert M, Ducatelle R (1993). Challenge experiments to evaluate cross-protection induced at the trachea and kidney level by vaccine strains and Belgian nephropathogenic isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 22: 577-590.

Lawrence J (1994). Introduction to neural networks: design, theory, and applications. 6th ed, Luedeking S (Ed). Nevada City, CA, California Scientific Software Press. 1994. pp 154-155.

Lee SK, Sung HW, Kwon HM (2004). S1 glycoprotein gene analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Korea. *Arch Virol* 149: 481-494.

Lewis PJ, van Drunen Little-van den Hurk S, Babiuk LA (1999). Induction of immune responses to bovine herpesvirus type 1 gD in passively immune mice after immunization with a DNA-based vaccine. *J Gen Virol* 80: 2829-2837.

Meistrell ML (1990). Evaluation of neural network performance by receiver operating characteristic (ROC) analysis: examples from the biotechnology domain. *Comput Methods Programs Biomed* 32: 73-80.

Michael MC Lai and Kathryn V Holmes (1997). *Coronaviridae: The viruses and their replication*. pp 1165-1166.

OIE (World organization for animal health (2004). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 5th ed. OIE, Paris. pp. 878-888.

Pak SI, Kwon HM, Yoon HJ, Song CS, Son YH, Mo IP, Song CY (2005). Risk factors for infectious bronchitis virus (IBV) infection in laying flocks in three provinces of Korea: preliminary results. *Korean J Vet Res* 45: 405-410.

Park JY, Pak SI, Sung HW, Kim JH, Song CS, Lee CW, Kwon HM (2005). Variations in the nucleocapsid protein gene of infectious bronchitis viruses isolated in Korea. *Virus Genes* 31: 153-162.

Parsons D, Ellis MM, Cavanagh D, Cook JKA (1992). Characterization of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. *Vet Rec* 131: 408-411.

Rhee YO, Kim JH, Mo IP, Choi SH, Namgoong S (1986). Outbreaks of infectious bronchitis in Korea. *Korean J Vet Res* 26: 277-282.

Robinson HL, Hunt LA, Webster RG (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 19: 957-960.

Roush WB, Kirby YK, Cravener TL, Wideman RF (1996). Artificial neural network prediction of ascites in broilers. *Poult Sci* 75: 1479-1487.

Sapats SI, Ashton F, Wright PJ, Igngatovic J (1996). Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus, *Virology* 226: 412-417.

SAS (1999). Statistical analysis system. Version 8.1 for Windows. SAS, Cary, NC.

Schwartz MH, Ward RE, MacWilliam C, Verner JJ (1997). Using neural

networks to identify patients unlikely to achieve a reduction in bodily pain after total hip replacement surgery. *Med Care* 35: 1020-1030.

Serezani CH, Franco AR, Wajc M, Umada Yokoyama-Yasunaka JK, Wunderlich G, Borges MM, Uliana SR (2002). Evaluation of the murine immune response to *Leishmania meta 1* antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine. *Vaccine* 20: 3755-3763.

Shang JS, Lin YE, Goetz AM (2000). Diagnosis of MRSA with neural networks and logistic regression approach. *Health Care Manag Sci* 3: 287-297.

Smith RD (1991). *Veterinary clinical epidemiology : a problem-oriented approach*. Butterworth-Heinemann. NY, pp. 29-43.

Song CS, Kim JH, Lee YJ, Kim SJ, Izumiya Y, Tohya Y, Jang HK, Mikami T.(1998) Detection and classification of infectious bronchitis viruses isolated in Korea by dot-immunoblotting assay using monoclonal antibodies. *Avian Dis* 42: 92-100.

Song CS, Lee YJ, Kim JH, Sung HW, Lee CW, Izumiya Y., Miyazawa T. Jang HK, Mikami T (1998). Epidemiologic classification of infectious bronchitis virus isolated in Korean between 1986 and 1997. *Avian Pathol* 27: 409-416.

Stephens P, Simmons GC (1968). Neutralising antibodies for avian infectious bronchitis virus in Queensland poultry flocks. *Aust Vet J* 44: 29-30.

Stern DF, Seftonm BM (1982). Coronavirus protein: biosynthesis of avian infectious bronchitis virus virion protein. *J Virol* 44: 794-803.

Swets JA (1988). Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240: 1285-1293.

Tang D, Devit M, Johnston SS (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154.

Thayer SG, Eidson CS, Page RK, Kleven SH (1983). Multivalent inactivated virus oil emulsion vaccines in broiler breeder chickens. I. Newcastle disease virus and infectious bursal disease virus bivalent vaccines. *Poult Sci* 62: 1978-1983.

Tourassi GD, Markey MK, Lo JY, Floyd CE (2001). A neural network approach to breast cancer diagnosis as a constraint satisfaction problem. *Med Phys* 28: 804-811.

Wang L, Junker D, Collisson EW (1993). Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology* 192: 710-716.

Wells SJ, Dargatz DA, Ott SL (1996). Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Prev Vet Med* 29: 9-19.

Wells SJ, Godden SM, Lindeman CJ, Collins JE (2003). Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds. *J Am Vet Med Assoc* 223: 1022-1025.

Yu L, Jiang Y, Low S, Wang Z, Nam SJ, Liu W, Kwangac J (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis* 45: 416-424.

농림부. 가축통계 (각 년도별).

박선일, 한홍울 (1999). 수의 임상 역학 및 통계. 한길아카데미, 서울.

박선일, 구희승, 황철용, 윤화영 (2002). 진단검사에서 ROC 곡선의 응용. *한국 임상수의학회지* 19: 312-315.

손영호 (2004). IB 예방을 위한 효과적인 백신접종 프로그램. 양계연구 169호 pp. 46-49.

장정호, 김선중 (1989). 닭 전염성 기관지염에 관한 연구: II. 간접 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)에 의한 항체가 측정. 대한수의학회지. 29: 503-515.