

최 증
연구보고서

가금인플루엔자 백신 및 진단키트 개발
Development of Avian Influenza Vaccine and
Diagnostic kits

충북대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “가금 인플루엔자 백신 및 진단키트개발에 관한 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2006년 07월 15일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 모 인 필

세부연구책임자 : 강 신 영

연 구 원 : 하 봉 도

연 구 원 : 이 진 성

연 구 원 : 레 반 관

연 구 원 : 김 정 은

연 구 원 : 임 용 환

연 구 원 : 김 정 은

연 구 원 : 김 민 경

요 약 문

I. 제 목

가금 인플루엔자 백신 및 진단키트 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 현재 국내에서 막대한 경제적 손실을 끼치고 있는 약병원성 조류인플루엔자에 대하여 발생역학조사를 실시함과 동시에 방제에 필요한 효과적인 사독백신과 진단기법을 개발함으로써 궁극적으로는 효율적인 국가방역 수행으로 조류인플루엔자에 의한 경제적 손실을 최소화하는데 있다.

국내감염상황은 전체 산란계의 약 50%가 감염된 것으로 추정되며 한번 임상발현 시 산란 감소가 약 30%에서 산란정지까지 이루어지기 때문에 경제적 피해액은 매년 수백억에 이를 것으로 판단되고 있다. 따라서, 사독백신의 개발은 시급성을 요하며 개발된 백신을 현장농가에서 사용 시 야외감염을 구별할 수 있는 진단키트의 개발도 동반되어야 할 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

국내분리주를 이용한 사독오일 백신을 개발하고 그 백신들에 대한 실험실적으로 안전성과 효능시험을 실시하여 최적의 백신을 선정한 후 일반 산란계 농장을 대상으로 야외 효능 평가시험을 실시함으로써 최종적으로는 개발백신을 농가에 보급할 것이다. 또한, 백신에 사용되었던 국내분리주의 특정 유전자를 발현시키고 발현된 단백질을 이용하여 ELISA kit를 개발하고 야외감염과의 감별을 위한 진단법을 개발한다. 개발된 가금인플루엔자 백신과 ELISA kit를 현장에서의 가금인플루엔자의 예방과 방역에 사용함으로써 개발된 제품에 대하여 활용성 및 효용가치를 판정할 것이다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 국내분리주를 이용한 사독백신이 개발되었으며 이 백신은 국내 대표적인 표준주 2주에 대하여 완벽한 방어능을 보였다. 또한, 야외감염시 현장에서 활용할 수 있는 신속진단키트와 농장단위의 야외감염을 구별할 수 있는 ELISA 키트가 개발되었다. 현재 개발된 백신은 산업화를 거쳐 국가 검정기관에 백신품목허가를 신청중에 있어 가능한 빠른 시일에 농가에서 활용할 수 있기를 기대한다.

SUMMARY

(영문요약문)

Low pathogenic avian influenza virus (AIV) is widely distributed in avian species and produce significant economic loss especially in the chicken. Since 1996 many outbreaks of low pathogenic AI (H9N2) has been occurred in the commercial layer farms causing severe drop of egg production with or without mortality. Vaccination against low pathogenic AIV infection has been known as efficient tools for epidemic control because of reduction of clinical signs and economic losses. However, limitation of vaccination has been recognized because there is no tools to distinguish field infection of wild viruses from vaccination in the level of antibody detection or RT-PCR. Therefore, new vaccine and diagnostic tools are needed for differentiation between vaccination and field infection.

We developed the killed vaccines using lowpathogenic H9N2 AI virus(ADL0401) isolated in Korea and tested the safety and efficacy of the vaccine in the SPF chickens and 5 different commercial layer farms. In the SPF chicken, the vaccine developed antibody titer enough for protection against challenge of field virus and reduced significant amount of the virus titer compare to those of non-vaccinated control group. In the field test of commercial layer, there was no adverse effect of vaccination such as eggdrop or increase of abnormal egg production. Based on the above tests, we conclude that the vaccine(ADL0401) can be used for the protection against AIV infection in the commercial layer.

To distinguish from field infection, we try to develop new strain of vaccine which have same hemagglutinin (H9) and different neuraminidase compare to field challenge virus (H9N2). Using limited dilution methods, reassorted AIV (AI05GA, H9N3) was generated from MS96 (H9N2), which is isolated from commercial layer in 1996 and from ADL0408 (H5N3), which was isolated from wild birds. It is clear that we generated new strain of low pathogenic AIV (AI05GA) which have same hemagglutinin (H9) and different neuraminidase (N3) compare to MS96 (H9N2) which is common isolates in commercial layer and cause significant economic loss. Therefore, these complete AI05GA AIV with biological infectivity can be used as vaccine strain against low pathogenic AI if

further study will be conducted in the future.

In the study of development of diagnostic kit, the NP, HA, NA and NS1 gene of AIV(H9N2) were cloned and expressed successfully in baculovirus expression system. The indirect and capture enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies specific for NP and NS1 protein of AIV, respectively, have been set up successfully using recombinant proteins. The I-ELISA using NP recombinant protein as a specific antigen could clearly sero-diagnose the infected and non-infected chickens with AIV and has no cross reactivity with known positive sera for IBDV and NDV. It is conclude that we develop the new killed vaccine and diagnostic tools against AI infection(H9N2). These vaccine and diagnostic tools have been successfully applied in the poultry farms and proved its effectiveness of prevention and diagnosis of AIV infection.

CONTENTS

(영 문 목 차)

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	7
제1절	연구개발의 필요성 -----	7
제2절	연구개발의 목표 및 내용 -----	8
제3절	연구개발 방법 및 설계 -----	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	14
제1절	조류인플루엔자 발생현황 -----	14
제2절	국내가금인플루엔자 관련 기술현황 -----	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	17
제1절	가금인플루엔자 백신개발 -----	17
제2절	개발된 백신의 산업화 -----	23
제3절	시험백신에 대한 효능 및 안전성-----	42
제4절	백신용 재조합바이러스의 개발 -----	88
제5절	가금인플루엔자 지단용 ELISA kit 개발-----	101
제6절	가금인플루엔자 신속간이 진단키트 개발 -----	125
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	142
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 -----	143
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	144
제 7 장	참고문헌 -----	145

제1장 연구개발과제의 개요

본 연구의 목적은 현재 국내에서 막대한 경제적 손실을 끼치고 있는 약병원성 조류인플루엔자에 대하여 발생역학조사를 실시함과 동시에 방제에 필요한 효과적인 사독백신과 진단기법을 개발함으로써 궁극적으로는 효율적인 국가방역 수행으로 조류인플루엔자에 의한 경제적 손실을 최소화하는데 있다.

제1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 국내에서는 현재 사독백신이 개발되어 있지 않으며 ELISA 기법 등 대량으로 혈청학적검사를 통하여 모니터리 할 수 있는 체계가 되어 있지 않음.
- 최근 세계적으로 사독백신의 효능이 점차 인정되고 있으며 같은 혈청형(HA type)일 경우 방어력도 매우 높은 수준이 가능하기 때문에 사독백신의 개발이 요구됨.
- 국가 방역 측면과 기술적인 측면에서 볼 때 가금인플루엔자의 경우 바이러스가 변이 가능성이 높은 생독백신보다는 사독백신을 우선적으로 개발되어야 함.
- 혈청형이 같아도 방어효과가 다를 수 있는 가금 인플루엔자 바이러스의 특성상 가능하면 국내분리 바이러스를 백신주로 선택하여야 함.
- 또한, 약병원성 바이러스는 단독감염으로는 임상증상이 뚜렷하지 않기 때문에 약병원성 바이러스에 대한 사독백신의 효능을 평가하기 위해서는 현재의 방법보다 좀더 효율적인 평가 방법이 사독백신의 개발과 함께 수행되어야 함.
- 약병원성 사독백신에 대한 효율적인 평가방법의 개발은 앞으로도 다양한 조류인플루엔자 바이러스의 국내유입이 우려되기 때문에 신속한 사독백신의 개발이라는 측면에서도 반드시 필요한 기술이라고 생각됨.

2. 경제·산업적 측면

- 조류 인플루엔자는 사람의 독감과 비슷한 조류의 질병으로 전염성이 매우 빠르며 병원성은 감염되어도 임상증상이 없는 비병원성 임상형에서부터 감염된 닭이 100% 죽을 수 있는 고병원성 임상형에 이르기까지 다양함.
- 국내에서는 1996년 3월 경기도 화성 등 3개지역 5개농장에서 처음 발생되었으며 모두 약병원성(혈청형 H9N2) 바이러스로 확인되었음.
- 현재는 전국의 산란계 농장으로 확산되어 산란율 저하와 다양한 폐사를 동반함으로써 양계산업에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있음.
- 국내감염상황은 전체 산란계의 약 50%가 감염된 것으로 추정되며 한번 임상발현 시 산란율 감소가 약 30%에서 산란정지까지 이루어지기 때문에 경

제적 피해액은 매년 수백억에 이를 것으로 판단됨.

- 국내 바이러스와 혈청형이 같은 바이러스(H9N2형)가 2-3년 전부터 사우디아라비아 등 중동국가에서 폭발적으로 발생되어 종계에서 육계에 이르기까지 막대한 경제적 손실을 주고 있으며 육계의 경우 약 80%의 폐사율을 기록하기도 하였음.
- 따라서, 이와 같은 외국에서의 사례와 국내에서의 만연 등을 근거로 할 때 국내에서의 조류인플루엔자 방역관련 기술의 개발이 시급히 요청되고 있는 상황임.

3. 사회·문화적 측면

- 본 연구를 통하여 개발된 백신을 양계농가에 접종하여 현장문제를 해결함으로써 국가의 방역정책이 농가로부터 신뢰를 구축할 수 있을 것으로 판단됨.
- 1997년 홍콩에서 H9N2 형의 조류인플루엔자 바이러스 항체가 사람에게서 검출된 사실을 볼 때 양계산업에서 이 바이러스의 감염이 최소화된다면 그만큼 사람에게의 감염 가능성이 낮아지기 때문에 궁극적으로는 사람의 공중위생학적 측면에서 큰 기여를 할 수 있을 것임. .
- 국내에서의 H9N2형 조류인플루엔자에 대한 방제는 매우 시급한 실정이지만 생독백신을 접종하였을 경우 바이러스의 변이 가능성, 사독백신의 낮은 효능성 및 수평전파 차단이 되지 않는 등의 단점으로 인하여 국내 양계산업에서는 백신접종이 적극적으로 추진되지 못하였음.
- 그러나, 중동에서의 상업용 H9N2형 조류 인플루엔자 백신의 성공적인 접종사례와 현재 국내에서의 급격한 발생 증가를 고려할 때 이제는 전국적인 발생상황의 분석, 백신접종기술의 개발 및 진단기술의 확립이 적극적으로 필요할 때임.

제2절 연구개발의 목표 및 내용

본 연구의 목적은 국내양계산업에 막대한 경제적 손실을 끼치고 있는 가금 인플루엔자에 대한 국내역학조사, 사독백신 및 야외감염을 구별할 수 있는 항체진단 기법을 개발하여 가금 인플루엔자에 의한 경제적 손실을 최소화하는데 있다.

1. 가금인플루엔자 백신 개발 <제1세부과제>

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2003)	국내분리주를 이용한 사독오일 백신을 개발하고 그 백신들에 대한 실험실적으로 안전성과 효능시험을 실시하여 최적의 백신을 선정함.	<u>1. 국내분리 가금인플루엔자 바이러스의 병원성 조사</u> ○ 4주령 SPF 닭에 대한 병원성 조사 ○ HA cleavage site 염기서열 분석 ○ 혈청역가의 변화 및 공격바이러스 재분리 <u>2. 국내 분리주를 이용한 오일 사독백신의 개발</u> ○ 국내분리주의 선정 ○ 불활화제의 선택 ○ adjuvant의 선택 ○ immunostimulant의 선택
2차년도 (2004)	국내개발 백신 및 기존 외국백신을 동시에 야외 효능 평가시험을 실시함으로써 개발백신의 보급여부를 판정하고자 함.	<u>1. 개발된 백신에 대한 효능 및 안전성 시험</u> ○ SPF 닭에서의 안전성시험 - 과용량 접종군의 부작용 - 접종부위의 조직검사 ○ SPF 닭에서의 효능시험 - 방어능과 면역지속능을 검사 - 공격접종후 임상증상 및 폐사율 비교 - 혈청역가의 변화 <u>2. 개발 사독백신에 대한 야외 효능 평가</u> ○ 산란계에서의 방어능 - 주기적으로 공격접종 - 임상증상 및 폐사율 비교 ○ 면역지속능 - 주기적으로 혈청검사 ○ 백신프로그램별 효능 비교 - 백신접종횟수 - 백신접종시기
3차년도 (2005)	백신접종 후 혈청검사로 야외감염과 구별되는 백신을 개발함으로써 적극적인 국가방역을 실시할 수 있음.	<u>1. 가금인플루엔자 사독 백신주의 선정 및 효능시험</u> ○ H9형의 AI 바이러스 중 N2형 아닌 바이러스 선정 - H9N8(프랑스), H9N5(미국), H9N?(한국) 등 ○ 검사방법은 1, 2년차에서 실시한 방어능, 면역지속능 등을 비교하는 효능시험을 실시

2. 가금인플루엔자 진단 kit 개발: 제2세부과제

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003)	기존에 사용되었던 AI 혈청학적 진단기법을 국내 양계농가에 적용 후 비교를 하여 진단기법 간의 장단점을 파악하여 국내분리주를 이용한 진단 kit 개발에 기초 자료로 활용하고자 함.	<p>1. 기존 AI 혈청학적 진단기법의 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Type A AI 바이러스 특이 진단기법의 비교 <ol style="list-style-type: none"> 1) AGP, ELISA 등 ○ Subtype (H9N2) AI 바이러스 특이 진단기법 비교 <ol style="list-style-type: none"> 1) HI, NI, ELISA 등 <p>2. 국내분리주를 이용한 진단 kit 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 분리주의 선정 ○ 선정된 국내분리주의 유전자 분석 NP, HA, NA 유전자
2차 년도 (2004)	국내분리주의 특정 유전자를 발현시키고 발현된 단백질을 이용하여 ELISA kit를 개발하고 야외감염과의 감별을 위한 진단법을 개발하고자 함	<p>1. 국내분리주를 이용한 진단 kit 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 선정된 국내분리주의 NP, HA, NA 유전자 발현 <ol style="list-style-type: none"> 1) 발현백터의 선정 2) 발현단백질의 특성분석 ○ 발현단백질 이용 ELISA kit 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1) 항원 및 혈청희석 농도조건 설정 2) Positive/Negative ratio 조건 설정 3) 타 질병과의 교차반응시험 <p>2. 개발된 ELISA kit와 타 진단법과의 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ AGP, ELISA, HI <p>3. 야외감염 감별 진단법 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ NA 이형 AI 바이러스 선정 ○ 선정된 이형 AI 바이러스의 NA 유전자 분석 및 발현 ○ 발현단백질 이용 감별진단법 개발
3차 년도 (2005)	개발된 ELISA kit와 야외감염과의 감별을 위한 진단법의 야외적용시험을 실시하여 활용성 및 효용가치를 판정하고자 함.	<p>1. 개발된 ELISA kit의 야외적용시험</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 전국적 혈청검사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 경기, 영남, 호남 지역의 산란계 및 종계장 2) 일부 농가는 사독오일백신 접종 <p>2. 개발된 야외감염 감별 진단법의 야외적용시험</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 전국적 혈청검사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 경기, 영남, 호남 지역의 산란계 및 종계장

3.

제3절 연구개발 방법 및 설계

약 병원성 가금인플루엔자 바이러스는 2차 감염, 숙주의 나이, 주변환경 등의 조건에 따라 야외에서는 폐사, 산란율 감소 등 다양한 임상증상을 나타내지만 실험실내에서는 임상증상이 매우 미약하여 백신을 개발하여도 실험실적으로 그 효과를 정확하게 평가하기 힘든 실정이다. 또한, 백신을 접종한 닭과 야외감염이 된 닭을 혈청학적으로 구별할 수 있는 기법이 개발되어 있지 않아 조류 인플루엔자가 국내에 만연되어 있음에도 불구하고 현재까지 효율적인 방제대책을 수행하지 못하고 있다. 따라서, 본 연구에서는 현재 국내에 유행하고 있는 약병원성 조류인플루엔자(H9N2) 바이러스를 효과적으로 방제할 수 있는 사독 백신개발과 야외감염을 쉽게 구별할 수 있는 진단 키트를 개발하고자 2개의 세부과제로 나누어 연구를 수행하고자 한다. 본 연구와 관련된 바이러스의 분리, 바이러스의 접종은 현재 충북대학교 수의과대학에 설치되어 있는 차폐시설인 isolater(삼광 제작)에서 실시하며 분리된 균주는 국립수의과학검역원에 등록을 하여 균독주관리규정을 준수함으로써 외부의 유출을 사전에 방지한다.

1. 가금인플루엔자 백신 개발

가. 국내 분리 가금인플루엔자 바이러스의 생물학적 특성조사

백신효능평가에 사용될 공격접종용 약병원성 조류인플루엔자 바이러스 및 2년차에 사용할 백신주를 선정하기 위해 SPF(Specific Pathogen Free: 특정병원체 부재) 닭 및 SPF 계란 등을 사용하여 국제수역사무국에서 추천한 표준 검사방법에 조직에서의 항원분포 등 새로운 검사방법을 추가하여 실험을 수행한다.

나. 국내 분리주를 이용한 오일 사독백신의 개발

사독백신은 기본적으로 “가항”에서 선정된 백신주를 SPF 계란에 접종하여 증식시킨 후 allantoic fluid를 채취하여 formaldehyde 나 β -propiolactone으로 불활화시켜 mineral 혹은 vegetable 유래의 oil로 유제화하여 본 실험에 공시한다. 공시된 사독백신에 대하여는 효능시험 및 안전성 시험을 실시한다. 효능 시험은 SPF 닭에 공시백신을 접종한 계군과 비접종군으로 구분하여 실시하며 백신접종 후 3주가 경과한 다음에 공격접종을 하여 임상증상, 폐사율, 혈청역가(HI 검사)을 비교 분석한다. 안전성 시험도 SPF 닭에 공시백신을 접종한 계군(1수분접종군, 과용량 접종군) 및 비접종군으로 구분하여 실시하며 접종 후 4주동안 임상증상 등의 부작용을 관찰하고 일정한 간격으로 접종부위의 조직을 채취하여 병리조직학적 변화를 검사한다.

다. 개발된 백신에 대한 효능 및 안전성 시험

본 시험에 사용될 효능 평가는 기존에 사용되었던 생물학적 평가방법으로서 주

로 혈청역가의 변화와 target 조직에서의 공격바이러스 재 분리에 근거한 것이다. 즉, 백신을 접종한 SPF(Specific Pathogen Free: 특정병원체 부재) 닭에 국내에서 분리된 야외 조류인플루엔자 바이러스를 공격 접종한 후 기관, 총배설장 등의 국소 방어조직과 채장, 비장 등의 전신방어조직에서 공격바이러스를 재 분리하며 또한, 공격접종 전, 후에 주기적으로 혈청을 채취하여 역가 변화를 분석한다. 따라서, 바이러스의 재 분리와 H9N2에 대한 혈청 내 역가의 변동을 근거로 접종한 백신의 효능을 비교할 것이다.

라. 개발 사독백신에 대한 야외 효능 평가

2년차 사독백신 효능평가기 선정된 백신접종방법, 시기, 횟수 등을 참조하여 국내의 양계장에 본 연구에서 개발된 사독백신을 접종한다. 국내 전업농가 규모인 2만 수 내외의 산란계농장을 최소 5개정도 선정을 한다. 농장은 가능한 조류인플루엔자가 지속적으로 발생하고 있는 전북 김제, 경북 영주, 봉화 지역을 위주로 선정한다. 선정된 농가의 계군은 사독백신 접종군과 비접종군으로 구분한다.

2. 가금인플루엔자 진단 kit 개발

가. 가금인플루엔자 혈청검사기법의 비교

조류인플루엔자 바이러스의 혈청학적 진단기법을 국내 양계농가에 적용한 후 비교를 하여 진단기법 간의 장단점을 파악하여 국내분리주를 이용한 진단 kit 개발에 기초 자료로 활용한다.

나. 가금인플루엔자 혈청검사용 kit 개발

현재 조류인플루엔자 바이러스에 대한 혈청검사로 전체 바이러스를 이용한 ELISA법이나 AGP법이 사용되고 있으나 이들은 항원을 준비하는데 많은 시간과 비용이 소요되는 단점이 있다. 또한 현재 외국에서 개발되어 시판되고 있는 ELISA kit는 가격이 비싼 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 조류인플루엔자 바이러스의 type(A 형)을 결정하는 nucleocapsid protein(NP)을 단백질 발현체계(E. coli 혹은 Baculovirus)를 이용하여 발현시키고 발현단백질의 특성을 규명한 후 ELISA kit를 개발한다. 또한 바이러스의 subtype(HA, NA)을 결정하는 hemagglutinin(HA)과 neuraminidase(NA)를 단백질 발현체계(E. coli 혹은 Baculovirus)를 이용하여 발현시키고 발현단백질의 특성을 규명한 후 ELISA kit를 개발한다. 이를 위하여 우선 제1과제에서 분류된 조류인플루엔자 바이러스 중에서 본 연구에 맞는 바이러스를 선정하고 NP, HA, NA 유전자 염기서열분석을 실시하여 확인한다. 유전자염기서열 분석을 통하여 확인된 바이러스의 NP, HA, NA 유전자를 발현시켜 ELISA법, dmf 확립하여 기존의 진단법인 AGP, 상용 ELISA법, IFA법과 비교하여 특이성 및 민감도를 비교한다.

다. 야외감염구별을 위한 혈청검사 kit 개발

백신접종항체와 야외감염항체를 구별하기 위하여 백신으로 개발한 조류인플루엔자 바이러스의 N형에 대한 혈청검사를 우선적으로 실시를 하지만 방법이 복잡하고 시간이 많이 걸리는 단점이 있어 N형 항원을 이용한 간접형광항체 검사나 ELISA 혈청검사 기법을 개발한다. N5 혹은 N9형의 유전자가 삽입된 recombinant baculovirus를 세포에 감염시켜 ELISA 혹은 indirect immunofluorescence test kit에 사용될 항원을 획득한다. 개발된 kit를 이용하여 N5 혹은 N9형을 검색함으로써 국내에서 유행하는 H9N2형의 야외 감염과 구별할 수 있을 것이다.

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 조류인플루엔자 발생현황

1. 국외 가금인플루엔자의 발생 현황

국가	년도	형질형	특시사항
미국	'83	H5	3개주, 1700만수 살처분
호주	'85, '94	H7	2개농장, 수출금지 6개월
멕시코	'95	H5	전농가 50%, 2,600만수 살처분
홍콩	'97, '01	H5	사람감염
이탈리아	'99	H7	66농가, 200만수 살처분

- 1959년 이후 발생한 강병원성 가금인플루엔자의 역학상황을 분석하여 보면 1990년대에 이르러 발생빈도가 높고 발생지역도 광범위하게 넓어지는 것을 알 수 있다.
- 특히, 우리나라는 중국의 대외개방에 따라 과거보다 더욱 많은 질병이 발생하는 경향이 있으며 이 중에서도 가장 문제가 될 수 있는 것이 강병원성 가금인플루엔자로 1997년에 홍콩에서 발생을 하였고 2001년에 다시 재발생을 한 경험을 가지고 있다.
- 국내에서도 2001년에 중국산 가금육으로부터 강병원성 가금인플루엔자(H5N1)을 분리됨으로서 국내양계산업에 큰 혼란을 준적이 있어 우리나라도 이제는 가금인플루엔자 감염 위험지역으로 분류되고 있는 실정이다.

2. 국내 가금인플루엔자 발생 현황

구 분	'96	'97	'98	'99	'00	'01
뉴캐슬병	622,708	262,660	36,173	433,800	1,256,663	594,078
	(59)	(29)	(14)	(16)	(84)	(40)
약병원성	97,963			480,000	1,373,780	604,600
가금인플루엔자	(5)	-	-	(7)	(30)	(9)

<농림부 통계자료

- 국내의 주요 가금질병 발생동향을 보면 '00년도에 뉴캐슬병 및 약병원성 가금 인플루엔자가 폭발적으로 증가하였다.
- 뉴캐슬병과는 달리 가금인플루엔자는 현재 효과적인 예방백신이 없기 때문에 사전예찰과 차단방역만이 이 질병을 예방하는 유일한 수단임
- 야생조류나 철새에 의하여 충분히 전파될 수 있기 때문에 닭농장과 오리농장은 항상 조류인플루엔자 감염에 노출되어 있음.

3. ELISA에 의한 산란계 농장에서의 가금인플루엔자 모니터링

구 분	충북		충남		계	
	농가수	혈청수	농가수	혈청수	농가수	혈청수
양성율*	12/27	52/261	22/39	118/397	34/66	170/658
(%)	(44.4)	(19.9)	(56.4)	(29.7)	(51.5)	(25.8)

* 양성농가(혈청)수/검사농가(혈청)수 <충북대학교 2002년>

- 충청권에서의 가금인플루엔자 모니터링은 전체 138개농가 1,379개의 혈청을 대상으로 실시하였으며 이 중에서 오리는 모두 18농가, 179개 혈청, 산란계는 66개농가, 658개 혈청, 육계는 54개 농가, 542의 혈청의 분포를 이루었다.
- ELISA에 의한 혈청 모니터링 검사에서 전체 66개 산란계 농가 중 34개 농가 즉 51.5%가 양성반응을 나타냈으며 지역적으로는 충북이 27개농가중 12농가 (44.4%), 충남은 39개농가중 22개 농가 즉 56.4%가 양성으로 나타나 충남이 다소 높은 양성율을 보였다. 개체별로는 전체 658개 혈청중 170개 즉, 25.8%가 양성을 나타내어 농장 양성율보다는 낮게 분포하였다.
- ELISA에 의한 혈청 모니터링 검사에서 전체 54개 육계 농가 중 3개 농가 즉 5.6%가 양성반응을 나타냈으며 지역적으로는 충북이 20개농가중 1농가 (5.0%), 충남은 34개농가 중 2개 농가가 양성으로 나타났다. 개체별로는 전체 542개 혈청중 8개 즉, 1.58%가 양성을 나타내어 농장양성율보다 낮게 분포하였다.

제2절 국내 가금인플루엔자 관련 기술현황

1. 국내기술현황

- 국내에서의 가금인플루엔자 관련 연구는 1996년 3월 경기도 화성에서 국내에서 처음으로 분리된 약병원성 가금인플루엔자 바이러스(H9N2)와 2001년 중국산 수입육으로부터 분리된 강병원성 가금인플루엔자 바이러스(H5N1)에 대한 생물학적 연구를 국립수의과학검역원에서 일부 실시한 것과 지역적으로 혈청검사를 통하여 나타난 발생현황이외에는 연구된 것이 없을 만큼 취약한 분야이다.
- 사람에 관련된 인플루엔자 연구도 국립보건원 호흡기 바이러스과 주관으로 실시한 사람관련 모니터링체계의 확립, 사람으로부터 분리한 인플루엔자 바이러스의 염기서열분석 및 국내 야생조류에서의 인플루엔자 바이러스 분리 등에 국한되어 연구가 수행되어 조류에 관련된 역학, 백신개발, 진단법 개선 등의 연구는 미미한 형편임.

2. 앞으로의 전망

- 지역적 일제 질병조사 결과 전국적 규모의 질병 현황 파악으로 조류인플루엔자에 대한 방역계획수립
- 중국과의 무역거래량의 증가로 현재 중국에서 지속적으로 발생하고 있는 중국의 고병원성 가금인플루엔자 바이러스의 국내유입 가능성이 높음. 이에 대비하여 사독백신제조기술과 신속진단기술의 확립이 필요하고 실제 야외에 적용하여 효용성이 입증되어야 함.
- 국내에서 고병원성 가금인플루엔자의 발생시 현 사업을 통하여 개발될 진단기술과 사독백신제조기술이 질병의 조기진단과 조기 방역에 높은 기여를 할것임.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 가금인플루엔자 백신개발

1. 국내 산란계농장의 MPAI(H9N2) 감염상황

표1-1. 국내 주요 양계사육지역에서의 MPAI(H9N2) 감염상황

지역	가을		겨울		봄		계	
	계군	개체	계군	개체	계군	개체	계군	개체
충부	0/2	0/27	2/6	4/67	6/12	38/121	8/20	42/215
영남	4/7	45/90	1/5	1/48	10/16	66/150	15/28	112/288
호남	2/5	23/73	1/1	6/10	1/6	1/70	4/12	30/153
계	6/14	68/190	4/12	11/125	17/34	105/341	27/60	184/656

*양성계군(수수)/검사계군(수수)

2. 국내양계장 채취 시료에서의 MPAI(H9N2) 바이러스 분

표1-2. 국내에서 분리된 MPAI(H9N2) 바이러스 요약

구분	축종	시료종류	형질형	비고
ADL004	닭	분변	H9N2	
ADL016	비둘기	분변	H9N2	
ADL017	비둘기	분변	H9N2	
ADL019	오리	분변	H9N2	
ADL020	오리	분변	H9N2	
ADL023	오리	총배설강	H9N2	
ADL0401	닭	총배설강	H9N2	

3. 국내 분리 가금인플루엔자 바이러스의 생물학적 특성조사

국내의 감염실태와 국내분리주를 확보하기 위하여 전국적인 혈청검사를 실시하였으며 관련 농가로부터 시료를 채취 바이러스를 분리하였다. 분리된 바이러스에 대하여는 HA 분절부위의 유전자 염기서열, 혈청형 동정을 통하여 기본적인 특성을 파악하였으며 숙주에서의 병원성은 4주령 SPF 닭에 접종을 하여 임상증상, 폐사율, 바이러스 재분리율, PCR을 이용한 각 장기에서의 유전자 검사를 통하여 파악하였다.

가. 백신후보주의 염기서열 분석

표1-3. 백신후보주의 HA cleavage site 염기서열 비교

바이러스	분리축종	혈청형	HA 염기서열 (Cleavage site)	비고
MS96	닭	H9N2	ASYR/GLFG	
ADL0401	닭	H9N2	ASDR/GLFG	

나. 백신후보주의 병원성 조사

표1-4. 백신후보주의 4주령 SPF 닭에 접종 시 병원성 및 혈청역가의 변화

구분	접종량	병원성 (폐사수/접종수)	혈청역가* (접종2주후)	비고
MS96	10 ^{6.4}	0/8	0:6, 3:2	
ADL0401	10 ^{6.5}	0/8	0:5, 2:1, 4:2	
대조군	-	0/8	0:6	

* 0:8: Log2 base로 8개의 혈청이 역가 0임

** OIE 규정: 4주령 SPF 닭 8수에 경구접종 후 2주간 관찰

표1-5. 백신 후보주와 국내 표준주간의 HI 검사에 의한 교차반응(r-value)

항혈청	MS96	ADL0401
MS96	1	0.66
ADL0401	-	1

* SPF 닭 8수에 바이러스 접종 2주후에 혈청채취

** r value, $r = \sqrt{r1 \times r2}$

r1=heterogous titer with virus 2 / homologurs titer with virus 1

r2= heterogous titer with virus 1 /homologurs titer with virus 2

표1-6. 백신후보주의 4주령 SPF 닭에서의 바이러스 증식성 비교

구분	RT-PCR에 의한 유전자(H9 HA) 검색														
	접종2일 후			접종 4일 후			접종 6일 후			접종 8일 후			접종 10일 후		
	T	K	C	T	K	C	T	K	C	T	K	C	T	K	C
MS96	3/3	2/3	1/3	2/3	1/3	3/3	1/3	1/3	2/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	2/3
ADL040	1/3	2/3	1/3	0/3	2/3	1/3	2/3	2/3	1/3	3/3	0/3	0/3	2/3	2/3	1/3
1															
대조군	0/3	0/3	0/3	nt	nt	nt	0/3	0/3	0/3	nt	nt	nt*	0/3	0/3	0/3

4. 국내 분리주를 이용한 오일 사독백신의 개발

국내분리주 중 1주를 선정하여 백신후보주로 하였으며 사독백신으로 개발하기 위하여 2종류의 불활화제를 선택한 후 서로 다른 온도 조건에서 불활화 하였다. 불활화 여부는 접종계란의 폐사와 HA 유무로 판정을 하였다. 또한, 적절한 adjuvant를 선정하기 위하여 3종류의 adjuvant를 불활화한 백신주와 혼합한 후 닭에 접종을 하여 HI 역가를 비교하였다.

가. 불활화제의 선택

표1-7. 처리시간별 및 온도별 계태아 폐사에 따른 바이러스 불활화 비교

VIRUS	불활화제	온도조건	처 리 시 간(폐사수/접종수)							
			1h	2h	3h	4h	5h	6h	12h	24h
MS96	0.01M	37℃	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	BEI	4℃	1/5	0/5	2/5	3/5	1/5	3/5	2/5	0/5
	0.1%	37℃	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Formaline	4℃	1/5	1/5	1/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5
	CONTROL	37℃	3/5							4/5
	(virus)	4℃	3/5				NT*			4/5
ADLO40	0.01M	37℃	5/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	BEI	4℃	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	0.1%	37℃	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1	Formaline	4℃	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
	CONTROL	37℃	5/5							5/5
	(virus)	4℃	4/5				NT			5/5

* Not tested

표1-8. 처리시간별 및 온도별 혈구응집여부에 따른 바이러스 불활화 비교

VIRUS	불활화제	온도조건	처 리 시 간(HA양성수/접종수)							
			1h	2h	3h	4h	5h	6h	12h	24h
	0.01M	37℃	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	BEI	4℃	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
MS96	0.1%	37℃	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Formaline	4℃	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5
	CONTROL	37℃	5/5							5/5

	(virus)	4℃								5/5
	0.01M	37℃	5/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
	BEI	4℃	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
ADL040	0.1%	37℃	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1	Formaline	4℃	0/5	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5
	CONTROL	37℃								5/5
	(virus)	4℃								5/5

NT*

표1-9. 불활화제 처리전후의 바이러스 혈구응집역가의 변화 비교

VIRUS	불활화제	온도조건	처 리 시 간(HA역가)									
			처리전	1h	2h	3h	4h	5h	6h	12h	24h	
MS96	0.01M	37℃	64	64	64	32	32	32	32	32	32	
	BEI	4℃	64	32	32	16	16	16	16	16	32	
	0.1%	37℃	64	64	64	32	16	16	16	16	32	
	Formaline	4℃	64	32	32	16	16	16	16	16	32	
	CONTROL	37℃	64	64	64	64	32	32	32	32	64	
	(virus)	4℃	64	64	64	64	32	32	32	32	64	
ADL040	0.01M	37℃	32	32	16	16	8	8	8	8	8	
	BEI	4℃	32	32	16	16	8	8	8	8	16	
	0.1%	37℃	32	16	16	8	8	8	8	8	8	
	1	Formaline	4℃	32	16	16	16	8	8	8	8	16
	CONTROL	37℃	32	32	32	16	16	16	16	16	32	
	(virus)	4℃	32	32	32	16	16	16	16	16	32	

표1-10. 시험백신의 SPF닭 접종 시 Adjuvant 종류에 따른 HI 역가변화 및 안전성

Adjuvant의 종류	개체번호	HI titer		임상증상
		접종전	접종후 2주	
ISA 70	1	<2	16	0/5
	2	<2	8	0/5
	3	<2	32	0/5
	4	<2	16	0/5
	5	<2	32	0/5
ISA 763	1	<2	4	0/5
	2	<2	4	0/5
	3	<2	16	0/5
	4	<2	16	0/5
	5	<2	-	0/5
IMS 1312	1	<2	32	0/5
	2	<2	16	0/5
	3	<2	32	0/5
	4	<2	4	0/5
	5	<2	8	0/5

제2절 개발된 백신 (Poulshot)의 산업화

1. 제조품목의 불활화제 선정 시험

가. 시험방법

시험백신 제조시 사용될 효과적인 불활화 방법을 결정하기 위해 0.01M BEI(binary ethylenimine)와 0.1% formalin을 37℃ 및 4℃에서 각각 불활화하여, 시간에 따라 각각 5개의 9~11일령의 인플루엔자바이러스 음성 일반종란에 0.2ml을 접종하여 37℃ 부란기에서 7일간 종란의 치사유무를 관찰하며 배양한 후, 장노막강액으로 혈구응집 시험을 실시하여 응집 유무에 따라 불활화 여부를 확인하였다.

나. 시험결과

불활화제	불활화 온도	불활화 시간 (hour)									
		1	2	3	4	5	6	12	24	48	
0.01M	37℃	5/5*	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
BEI	4℃	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5
0.1%	37℃	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
formalin	4℃	0/5	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
대조군	37℃	5/5	NT**	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5/5
	4℃	5/5	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5/5

* : 혈구응집 양성 발육란 수/시험에 사용된 발육란 수

** : Not tested

다. 결 론

0.01M BEI로 불활화한 경우 37℃에서는 12시간까지 불활화가 이루어지지 않았고, 4℃에서는 48시간까지 완전히 불활화가 이루어지지 않았다. 반면에 0.1% formalin으로 불활화 한 경우 37℃에서는 1시간 만에 불활화 되었고, 4℃에서는 12시간이후 완전히 불활화가 되었다. 따라서 백신 제조시 0.1% formalin을 사용하여

4℃에서 24 시간 불활화 하는 방법을 선택하였다.

2. 제조품목의 Adjuvant 결정시험

가. 시험방법

바이러스함량을 동일하게 맞춘 후, 3 종류의 adjuvant로 각각 시험백신을 제조하여 6~8주령의 SPF 닭 5수씩 0.5ml을 흉부근육에 접종하여 14일 동안 안전성 시험을 실시한 후, 채혈하여 혈구응집억제(HI) 시험을 실시하였다.

나. 시험백신의 종류

구분	Adjuvant	제조년월일	불활화전 바이러스 함량
시험백신 1	ISA 70	2004. 2. 20	128 HA unit(7 log ₂)
시험백신 2	ISA 763	2004. 2. 20	128 HA unit(7 log ₂)
시험백신 3	IMS 1312	2004. 2. 20	128 HA unit(7 log ₂)

다. 시험결과

구분	접종 후 임상증상*	안전시험 종료 후 혈구응집억제가
시험백신 1	없음	4.20±0.84**
시험백신 2	없음	2.40±1.67
시험백신 3	없음	3.80±1.30

* : 침울, 졸음, 운동이상, 폐사 등

** : HI역가의 평균(log₂)±표준편차

라. 결 론

Adjuvant 종류에 따른 시험백신의 안전성 시험에서는 모두 안전하였으나,

HI 항체역가는 ISA 70을 사용한 시험백신이 제일 높은 항체역가를 나타내었으므로 앞으로 백신제조시 adjuvant는 ISA 70을 사용하기로 하였다.

3. 시험백신의 항원함량결정시험

가. 시험백신의 종류

지금까지의 실험결과를 바탕으로 바이러스의 함량을 달리하는 3 Lot의 시험백신을 생산하였다.

구분	제조년월일	불활화전 바이러스 함량
시험백신 1	2004. 4. 9	128 HA unit (7 log ₂)
시험백신 2	2004. 4. 9	256 HA unit (8 log ₂)
시험백신 3	2004. 4. 9	512 HA unit (9 log ₂)

나. 시험 방법

3 Lot의 시험백신을 각각 6~8주령의 SPF 닭의 흉부근육에 두 배 용량(1.0ml) 접종시험 및 단일용량(0.5ml)을 2주 간격으로 반복 접종시험을 실시하여 임상증상을 관찰하였다.

다. 시험 결과

구분	접종방법	시험수	관찰기관	임상증상*
시험백신 1	0.5ml, 흉부근육, 2회	10	28일	관찰되지 않음
	1.0ml, 흉부근육, 1회	10	14일	관찰되지 않음
시험백신 2	0.5ml, 흉부근육, 2회	10	28일	관찰되지 않음
	1.0ml, 흉부근육, 1회	10	14일	관찰되지 않음
시험백신 3	0.5ml, 흉부근육, 2회	10	28일	관찰되지 않음
	1.0ml, 흉부근육, 1회	10	14일	관찰되지 않음
대조군	무처리	5	28일	관찰되지 않음

* : 침울, 졸음, 운동이상, 폐사 등

라. 항체역가시험 방법

안전시험에 사용한 시험계중 단일 용량 반복 접종 시험계군에 대하여 2차 백신 접종 2주 후 대조군과 함께 채혈하여 혈구응집억제(HI) 시험을 실시하였다.

마. 항체역가시험 결과

구분	접종방법	시험수	HI 항체역가
시험백신 1	0.5ml, 흉부근육, 2회	10	7.4±1.07*
시험백신 2	0.5ml, 흉부근육, 2회	10	8.9±1.10
시험백신 3	0.5ml, 흉부근육, 2회	10	9.4±0.84
대조군	무처치	5	0

* HI 역가의 평균(log2)±표준편차

바. 결 론

세 가지 시험 백신 모두 안전성에는 이상이 없었으며, 혈구응집억제가 시험을 실시한 결과 바이러스 함량이 512배(9 log2)인 시험백신 3이 가장 높은 HI 항체역가를 보였다. 하지만 항원농도 대비 항체역가를 보면 시험백신 2와 3이 큰 차이를 보이지 않은바, 백신은 256배(8 log2) 이상의 항원을 사용하여 생산한다.

4. 시험백신의 생산내역

제조 품목의 원료성분 및 항원함량결정시험을 통해 각 성분 및 함량에 맞춰 안전성 및 유효성에 대한 시험을 위한 3 Lot의 시험백신을 생산하였다.

구분	제조년월일	바이러스 함량 및 성분	생산수량 (1,000수분/병)
AI-01	2004. 7. 14	불활화된 바이러스 30% Oil adjuvant 70% Formalin 0.2%이하	200
AI-02	2004. 8. 12	불활화된 바이러스 30% Oil adjuvant 70% Formalin 0.2%이하	200
AI-03	2004. 8. 19	불활화된 바이러스 30% Oil adjuvant 70% Formalin 0.2%이하	200

5. 시험백신에 대한 일반실험

가. 불활화전 바이러스의 함량시험

1) 시험방법

종란에서 채득된 감염배양액을 10진 희석하여 9~11일령 발육란의 장노막강내에 희석액별로 10개의 발육란에 0.1ml씩 접종한 후 37℃ 부란기에서 7일간 배양한다. 접종 24시간 이전에 죽은 접종란은 제외하고, 24시간 이후에 죽은 접종란은 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 폐사임을 확인하고, 접종 7일 후에 생존한 접종란에 대하여는 장노막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사한다. 닭 적혈구를 응집하는 것을 양성으로 하여 EID₅₀을 측정한다. 이때 감염배양액의 바이러스 함유량은 혈구응집(HA) 역가로 256배(8 log₂) 이상이어야 한다.

2) 시험결과

시험백신의 불활화전 바이러스의 함량시험 결과 바이러스 함유량은 감염배양액 ml당 $10^{8.5} \sim 10^{9.1} \text{EID}_{50}$ 이고 HA 역가는 1:256 이었다.

구분	배양조건	불활화전 바이러스 함량	
		$\text{EID}_{50}/\text{ml}$	HA 역가
AI-01	37℃ 부란기, 5일	$10^{8.9}$	256 HA unit
AI-02	37℃ 부란기, 5일	$10^{8.5}$	256 HA unit
AI-03	37℃ 부란기, 5일	$10^{9.1}$	256 HA unit

나. 불활화 확인 시험

1) 시험방법

Formalin에 의해 불활화 된 감염배양액을 10개 이상의 10일령 발육란의 장노막강 내에 0.2ml씩 접종한 후, 37℃ 부란기에서 7일간 배양한 다음 장노막강액의 닭 적혈구 응집 여부를 확인한다. 이 때 닭 적혈구 응집성은 없어야한다.

2) 시험결과

불활화 된 감염배양액을 접종한 모든 발육란의 장노막강액에서의 닭 적혈구 응집성은 없었다.

구분	배양조건	닭 적혈구 응집여부
AI-01	37℃ 부란기, 7일	0/10*
AI-02	37℃ 부란기, 7일	0/10
AI-03	37℃ 부란기, 7일	0/10

* : 적혈구 응집 양성 발육란 수/시험에 사용된 발육란 수

다. 방부제 정량시험

1) 시험방법

시험 백신 각 Lot별로 adjuvant 첨가 전 formalin 함유량을 측정하기 위하여 Schiff시약 2.0ml을 가하고 동일하게 formalin 표준액에도 가하여 실온에서 30분간 방치하여 1시간 이내에 520nm Spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

1) 시험결과

시험백신의 방부제 정량시험 결과 아래 표와 같이 3 Lot에서 0.14~ 0.18%를 나타내었다.

구분	Formalin 함량결과
AI-01	0.14%
AI-02	0.18%
AI-03	0.16%

가. 특성시험

1) 시험방법

각 Lot별로 시험백신 2개 이상에 대하여 색, 혼탁도, 침전물의 유무와 색채, 이물 또는 이취에 대하여 검사한다. 색, 혼탁도, 이물시험은 100룩스 광도하에서 실시한다. 현탁 상태를 검사할 때는 소분된 용기를 가볍게 흔들어 혼탁도 및 색조를 검사한다.

2) 시험결과

시험백신은 본래의 조성을 지녔으며, 그 이외의 색깔, 냄새, 혼입물이 없고 각 용기에 소분된 내용물의 성상이 균일하였다.

나. 무균시험

1) 시험방법

시험백신을 Nutrient Agar(NA), Nutrient Broth(NB), Fluid Thioglycollate Medium(Thio)에 각각 2개의 시험관에 접종하여 22℃와 37℃에 양분하여 7일간 배양하면서 세균의 혼입 여부를 관찰한다.

2) 시험결과

시험 결과 모든 시험백신에서 어떠한 세균의 발육도 인정되지 않았다.

시험백신	22℃			37℃		
	NA	NB	Thio	NA	NB	Thio
AI-01	-*	-	-	-	-	-
AI-02	-	-	-	-	-	-
AI-03	-	-	-	-	-	-

* : 배양 세균 없음

다. 안정성(보존성)시험

1) 시험방법

3 Lot의 시험백신을 2~7℃의 냉암소에 보관하면서 제조일로부터 3개월 간격으로 아래의 시험을 통하여 시험백신의 안전성 및 항체역가를 확인한다.

가) 안전성 시험

닭에 대한 백신의 안전성을 확인하기 위하여 각 Lot 별로 저병원성 조류인플루엔자바이러스에 감수성이 있는 생후 6~8주령의 닭에 대하여 15수는 시험백신을 2수분(1.0ml)씩 흉부근육에 접종하고 2주 동안 관찰하며, 다른 15수는 시험백신 1수분씩 흉부근육에 접종한 다음 2주후 같은 방법으로 2차 접종하여 무처치 대조군 5수와 함께 2차 접종 2주 후 까지 임상증상, 접종반응유무 및 폐사 등을 관찰한다.

나) 항체역가시험

안전성 시험이 끝난 시험계군 중 1수분 반복접종 시험계군에 대하여 2차 접종 2주후 무처치 대조군과 함께 채혈하여 혈구응집억제가 시험을 실시하여 HI 항체역가를 측정한다.

2) 시험결과

가) 제조 3개월경과 후 시험결과

(1) 안전성 시험

제조일로부터 3개월이 경과된 각 Lot의 시험 백신을 위의 시험방법대로 접종한 후 임상 관찰한 결과 아무런 임상증상이 관찰되지 않았다.

표2-1. 제조 3개월경과 된 시험백신의 안전성 대한 시험 결과

구분	접종방법	시험수	관찰기관	임상증상*
AI-01	1.0ml, 흉부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음
AI-02	1.0ml, 흉부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음
AI-03	1.0ml, 흉부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음

* : 침울, 줄음, 운동이상, 폐사 등

(2) 항체역가

제조일로부터 3개월이 경과된 각 Lot의 시험 백신을 위의 시험방법대로 접종 및 채혈하여 혈구응집억제 항체역가를 측정한 결과 8.8 ~ 9.2 log2로 나타났다.

표2-2. 제조 3개월경과 된 시험백신의 HI항체역가에 대한 시험 결과

구분	접종방법	시험수	HI 항체역가
AI-01	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	9.07±0.59*
	무처치 대조군	5	0
AI-02	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	8.80±0.77
	무처치 대조군	5	0
AI-03	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	9.20±0.56
	무처치 대조군	5	0

* HI 역가의 평균(log2)±표준편차

나) 제조 6개월경과 후 시험결과

(1) 안전성 시험

제조일로부터 6개월이 경과된 각 Lot의 시험 백신을 위의 시험방법대로 접종한 후 관찰한 결과 아무런 임상증상이 관찰되지 않았다.

표2-3. 제조 6개월경과 된 시험백신의 안전성 대한 시험 결과

구분	접종방법	시험수	관찰기관	임상증상*
AI-01	1.0ml, 흉부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음
AI-02	1.0ml, 흉부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음
AI-03	1.0ml, 흉부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음

* : 침울, 졸음, 운동이상, 폐사 등

(2) 항체역가 결과

제조일로부터 6개월이 경과된 각 Lot의 시험 백신을 위의 시험방법대로 HI 항체 역가를 측정한 결과 8.47 ~ 8.87 log2로 나타났다.

표2-4. 제조 6개월경과 된 시험백신의 HI항체역가에 대한 시험 결과

구분	접종방법	시험수	HI 항체역가
AI-01	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	8.80±0.86*
	무처치 대조군	5	0
AI-02	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	8.47±1.06
	무처치 대조군	5	0
AI-03	0.5ml, 흉부근육, 2회	15	8.87±0.64
	무처치 대조군	5	0

* HI 역가의 평균(log2)±표준편차

다) 제조 9개월경과 후 시험결과

(1) 안전성 시험

제조일로부터 9개월이 경과된 각 Lot의 시험 백신을 위의 시험방법대로 접종한 후 관찰한 결과 아무런 임상증상이 관찰되지 않았다.

표2-5. 제조 9개월경과 된 시험백신의 안전성에 대한 시험 결과

구분	접종방법	시험수	관찰기관	임상증상*
AI-01	1.0ml, 흥부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음
AI-02	1.0ml, 흥부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음
AI-03	1.0ml, 흥부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음

* : 침울, 졸음, 운동이상, 폐사 등

(2) 항체역가시험

제조일로부터 9개월이 경과된 각 Lot의 시험 백신을 위의 시험방법대로 HI 항체역가를 측정된 결과 8.27 ~ 8.67 log2로 나타났다.

표3-6. 제조 9개월경과 된 시험백신의 HI항체역가에 대한 시험 결과

구분	접종방법	시험수	HI 항체역가
AI-01	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	8.67±0.62*
	무처치 대조군	5	0
AI-02	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	8.27±0.70
	무처치 대조군	5	0
AI-03	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	8.47±1.13
	무처치 대조군	5	0

* HI 역가의 평균(log2)±표준편차

라) 제조 12개월 경과후 시험결과

(1) 안전성 시험

제조일로부터 12개월이 경과된 각 Lot의 시험 백신을 위의 시험방법대로 접종한 후 관찰한 결과 아무런 임상증상이 관찰되지 않았다.

표2-7. 제조 12개월경과 된 시험백신의 안전성에 대한 시험 결과

구분	접종방법	시험수	관찰기관	임상증상*
AI-01	1.0ml, 흥부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음
AI-02	1.0ml, 흥부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음
AI-03	1.0ml, 흥부근육, 1회	15	14일	관찰되지 않음
	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	28일	관찰되지 않음
	무처치 대조군	5	28일	관찰되지 않음

* : 침울, 졸음, 운동이상, 폐사 등

(2) 항체역가시험 결과

제조일로부터 12개월이 경과된 시험 백신을 위의 시험방법대로 HI 항체역가를 측정된 결과 8.13 ~ 8.4 log2로 나타났다.

표2-8. 제조 12개월경과 된 시험백신의 HI항체역가에 대한 시험 결과

구분	접종방법	시험수	HI 항체역가
AI-01	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	8.40±0.63*
	무처치 대조군	5	0
AI-02	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	8.13±0.92
	무처치 대조군	5	0
AI-03	0.5ml, 흥부근육, 2회	15	8.33±0.82
	무처치 대조군	5	0

* HI 역가의 평균(log2)±표준편차

라. 결 론

3 Lot의 모든 시험백신이 제조 후 12개월까지 백신의 안전성에 이상이 없었으며, 항체역가시험에서도 제품의 검정기준인 128배를 충분히 넘어 백신의 안정성(보존성)이 인정되었다.

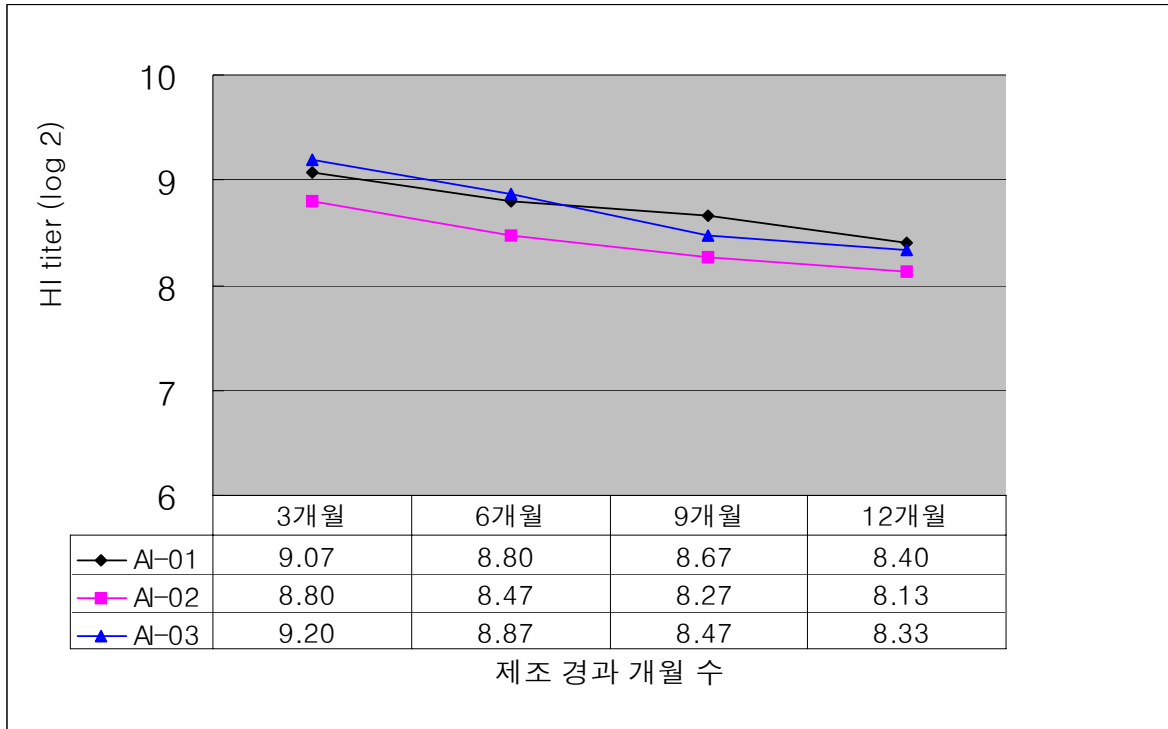


그림2-1. 제조 후 12개월까지 시험백신의 항체역가시험

마. 독성(안전성)에 관한 자료

1) SPF 닭에서의 안전성시험

가) 시험방법

시험백신 1수분(0.5ml)과 2수분(1.0ml)을 각각 4주령의 SPF 닭에 10수씩 접종한 다음 21일간 임상증상을 관찰하였으며, 증체량, 접종반응, 폐사 등도 확인하였다.

나) 시험결과

접종 3주후의 증체량을 시험군과 대조군간 비교를 한 결과 시험군1이 시험군2와 대조군보다 높은 증체량을 나타내었다. 그러나 이러한 차이는 백신에 의한 것이 보다는 isolator라는 특수 환경에 기인한 것으로 판단된다. 따라서 시험군1, 시험군2의 증체량을 대조군의 증체량과 비교하여 볼 때 최소한 백신접종에 의한 체중감소 현상은 없다고 인정할 수 있었다. 또한, 시험기간 중에 폐사계는 없었으며 접종반응에 의한 임상증상도 관찰되지 않았다. 시험군1과 시험군2는 접종 3주후에 조류인플루엔자 바이러스에 대한 HI 항체역가가 평균 6.5에서 6.7(log 2)로 형성이 되어 백신접종이 정확하게 이루어졌다는 것을 증명하였으며 대조군에서는 역가가 전혀 검출되지 않았다.

표2-9. SPF 닭에 1수분 및 2수분 백신 접종 후 임상증상 및 증체량 비교

구분	접종량	시험 수	관찰 기간	임상 증상	체중변화(gram)			접종 반응	폐사	HI 역가
					접종전	3주후	평균 증체량			
시험군1	1수분 (0.5ml)	10수	21일	0/10	248.3 ±28.2*	608.0 ±79.3	359.7	0/10	0/10	6.5 ±0.74 **
시험군2	2수분 (1.0ml)	10수	21일	0/10	251.5 ±28.2	549.5 ±85.2	298.0	0/10	0/10	6.7 ±0.59
대조군	무접종	10수	21일	0/10	231.1 ±27.7	554.7 ±64.1	326.6	0/10	0/10	0

* : 개체별 체중의 평균 ± 표준편차

** : HI 역가의 평균(log2)±표준편차

2) 일반 실용계(백색산란계)에서의 안전성시험

가) 단일용량 반복접종시험

닭에 대한 시험백신의 안전성을 확인하기 위하여 각 Lot별로 저병원성 조류 인플루엔자바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 일반 실용계 15수를 선정하여 1수분(0.5ml)씩 흉부근육에 접종하고 2주 후 동일방법으로 재접종하여 무처치 대조군 5수와 함께 2차 접종 후 2주까지 임상관찰을 실시하였다. 임상증상, 접종 전후의 증체량 변화, 접종반응 유무 및 폐사 등을 확인하였다.

표2-10. 일반 실용계의 백신 단일용량 반복접종 후 임상관찰 결과

시험 백신	접종방법	시험 관찰		평가항목			
		수수	기간	임상증상*	증체량**	접종반응***	폐사
AI-01	6~8주령	15	28	0/15 [†]	720g	0/15 [†]	0/15 [†]
	2주간격 2회 흉부근육, 0.5ml						
AI-02	6~8주령	15	28	0/15	660g	0/15	0/15
	2주간격 2회 흉부근육, 0.5ml						
AI-03	6~8주령	15	28	0/15	690g	0/15	0/15
	2주간격 2회 흉부근육, 0.5ml						
대조군	6~8주령 무처치	5	28	0/5	680g	0/5	0/5

* : 침울, 졸음, 운동이상 등

** : 시험백신 접종 전·후(4주간)의 개체별 증체량의 평균

*** : 접종부위의 종창, 출혈, 육아종형성 등 이상증상

† : 이상계의 수 / 시험계의 수

나) 두 배 용량 접종시험

닭에 대한 시험 백신의 안전성을 확인하기 위하여 각 Lot별로 저병원성 조류인플루엔자바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 일반 실용계 15수를 선정하여 2수분(1.0ml)씩 흉부근육에 접종하고 무처치 대조군 5수와 함께 2주간 임상관찰을 실시하였다. 임상증상, 접종 전후의 증체량 변화, 접종반응유무 및 폐사 등을 확인하였다.

표2-11. 일반 실용계의 백신 두 배 용량 접종 후 임상관찰 결과

시험 백신	접종방법	시험수	관찰 기간	평 가 항 목			
				임상증상*	4주간 증체량**	접종 반응***	폐사
AI-01	6~8주령 홍부근육, 1.0ml	15	14	0/15 [†]	280g	0/15 [†]	0/15 [†]
AI-02	6~8주령 홍부근육, 1.0ml	15	14	0/15	250g	0/15	0/15
AI-03	6~8주령 홍부근육, 1.0ml	15	14	0/15	290g	0/15	0/15
대조군	6~8주령 무처리	5	14	0/5	270g	0/5	0/5

* : 침울, 졸음, 운동이상 등

** : 시험백신 접종 전·후(4주간)의 개체별 증체량의 평균

*** : 접종부위의 종창, 출혈, 육아종형성 등 이상증상

† : 이상계의 수 / 시험계의 수



AI-01 접종계



AI-02 접종계



AI-03 접종계



대조군

그림4-1. 두 배 용량의 시험백신 접종 2주 후 접종 부위의 사진

제3절 시험백신에 대한 효능 및 안전성

4주령 SPF 닭을 이용하여 시험백신의 안전성 평가를 위하여 표1과 같이 실험설계를 하여 실시하였다. 백신 바이러스는 1차년도에 개발된 백신을 사용하였으며 백신접종은 흥부근육으로 근육주사하였다. 본 실험은 충북대학교 부속 실험동물센터의 조류질병실험동물사에 양압을 유지하며 HEPA filter가 장착된 isolater를 배치하여 전 실험을 실시하였다. 시험기간 중에 임상증상을 매일 관찰하였으며 시험전, 시험종료시점에 전체 닭의 체중을 측정하여 증체량을 비교하였다. 또한 접종부위의 조직반응을 관찰하기 위하여 시험이 종료된 후 접종부위에 대하여 조직을 채취하였다.

가. SPF 닭에서의 안전성시험

표3-1. 4주령 SPF 닭에 권장 및 과 용량 접종 후 임상증상 및 증체량 비교

구분	접종량	접종 수	관찰 기간	임상증 상	체중변화		접종반 응	폐사	HI역가
					접종전	3주후			
처리군1	1수분 (0.5ml)	10수	21일	0/15	248.3±28.2	608.0±79.3	0/15	0/15	6.5±0.74
처리군2	2수분 (1.0ml)	10수	21일	0/15	251.5±28.2	549.5±85.2	0/15	0/15	6.7±0.59
대조군	무접종	10수	21일	0/15	231.1±27.7	554.7±64.1	0/15	0/15	0±0

접종 3주후의 증체량을 처리군과 대조군간 student t-test를 한 결과 처리군1과 대조군 사이에 통계학적 유의한 차가 있음이 인정이 되었으나 처리군에 백신을 접종하였다는 점과 isolater에서 사육이 되었다는 점을 감안할 때 최소한 백신접종에 의한 체중 감소 현상은 없다는 것을 인정할 수 있었다. 또한, 시험기간 중에 폐사계도 없었으며 접종반응에 의한 임상증상도 관찰되지 않았다. 처리군1과 처리군2는 접종 3주후에 AI에 대한 HI 역가가 6.5에서 6.7(log 2)로 형성이 되어 백신접종이 정확하게 이루어졌다는 것을 증명하였으며 대조군에서는 역가가 전혀 검출되지 않았다.

나. SPF 닭에서의 효능시험

선정된 농장의 산란계에서의 백신의 안전성을 평가하기 위하여 1차 혹은 2차에 걸쳐 백신을 실시하였으며 백신 후 임상증상을 지속적으로 관찰을 하였다. 시험 중

에 폐사된 닭에 대하여는 본 백신과의 관련여부를 파악하기 위하여 부검을 실시하였으며 필요시 원인체 확인 실험실적 실험을 수행하였다. 백신접종 후 산란율에 대한 영향을 평가하기 위하여 산란 개시시점인 20주령부터 약 20주간 산란율, 주간폐사율, 비정산란 발생을 등을 조사하여 백신에 의한 부작용 여부를 백신접종군과 대조군간 비교하였다. 시험기간 중에는 각각의 실험군에서 생산된 계란은 따로 수거하여 평가하였다. 백신접종에 의한 효능을 평가하기 위하여 백신 접종 후 약 20주간 주기적으로 채혈을 하여 H9N2에 대한 혈구응집억제반응(HI)검사를 실시하였다. 야외농장에서의 개발된 AI백신의 효능검사를 위하여 이미 백신을 접종한 농장의 산란계를 무작위로 선정하여 야외공격주를 실험실적 실험과 동일한 방법으로 공격접종한 후 임상증상 등과 면역반응을 관찰하였다(표4).

표3-2. 4주령 SPF 닭에 개발된 AI 백신 및 공격 접종후 혈구응집억제 역가의 변화 비교

구분	백신접종주령	공격접종주령	접종수	주령별 HI 역가(평균±편차)									
				0-0	7-0	7-3*	7-5	7-14	10-0	10-3	10-5	10-14	
처리군1	4	7	15	0	6.9 ±1.17	7.2 ±1.79	6.8 ±1.33	8.0 ±0	-	-	-	-	
대조군1	-	7	10	0	0±0	0±0	1.3 ±0.58	5.7 ±1.15	-	-	-	-	
처리군2	4, 7	10	15	0	-	-	-	-	7.9 ±0.32	6.6 ±1.14	8.0 ±0	8.0 ±0	
대조군2	-	10	10	0	-	-	-	-	0±0	0±0	0±0	6.0 ±1.73	

* 7-3: 7주령에 공격접종 후 3일차에 시료채취

시험계군에 대하여 1차 혹은 2차 백신접종 후에 야외 바이러스로 공격접종을 하였다. 1차 백신 접종 계군의 경우 공격접종시 HI 역가가 6.9 ± 1.17 (log2)로 충분한 역가가 형성된 것을 확인할 수 있었으며 대조군은 역가가 전혀 검출되지 않았다. 2번 백신을 한 경우에는 HI 역가가 7.9 ± 0.32 로 1번 백신한 계군보다 높은 수준을 형성하였다. 각 계군에 대하여 공격접종을 한 결과 백신접종군은 다소 역가가 상승한 것으로 나타났지만 백신이 오일백신인 점을 감안할 때 지속적으로 상승할 수 있는 여건이기 때문에 반드시 공격접종에 의하여 상승하였다고 판단할 수는 없다. 대조군은 접종 5일 혹은 14일 후에 모두 상당 수준의 HI 역가가 형성되어 모든 계군이 감염되었음을 확인할 수 있었다.

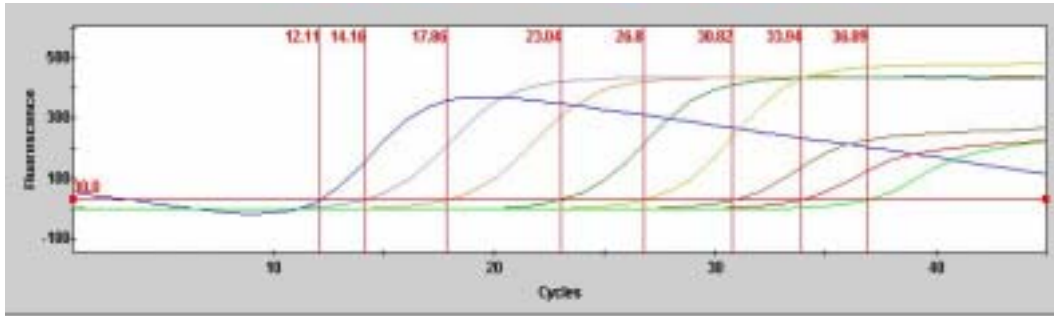


그림 3-1. AI 바이러스 유전자의 증폭. Quantitative realtime PCR검사를 이용하여 10진법으로 희석된 AI 바이러스 유전자 농도에 따른 Ct값을 측정하였으며 Ct값이 낮을 수록 유전자가 많은 것임.

공격접종 후에 바이러스의 감염정도를 알기 위해서는 폐사율 등 임상증상을 관찰하는 것이 가장 확실한 방법이다. 그러나 저병원성 AI 바이러스의 경우 공격접종을 하여도 뚜렷한 임상증상을 보이지 않기 때문에 감염여부 혹은 백신접종시 효과를 측정할 방법이 매우 제한되어 있다. 현재까지는 대부분 감수성 조직에서의 바이러스 존재여부 혹은 역가를 측정하고 있으나 많은 노력이 소요되고 감수성이 낮아 효율성이 매우 낮은 실정이다.

최근 유전자의 존재를 정량적으로 분석할 수 있는 realtime PCR이 다양한 분야에서 사용되고 있다. 본 실험에서도 저병원성 AI 바이러스의 특성을 감안하여 이 검사법을 도입하여 아래와 같이 상관성을 산출하였다. 즉, $10^{7.9} \text{EID}_{50}$ 역가의 저병원성 AI 바이러스에서 유전자를 추출한 후 10진법으로 희석을 하였다. 각 희석배수의 시료를 quantitative PCR로 정량하여 각각의 Ct값을 구하였다. 그림 1에서 보듯이 각각 희석된 시료는 모두 고유의 Ct값을 가지고 있었으며 높은 농도의 시료일 수록 낮은 cycle에서 검색되는 것을 알 수 있다. 또한 이러한 시료의 농도와 Ct 값의 상관성을 규명하기 위하여 관련 방정식을 구한결과 그림2와 같이 높은 상관성이 있는 것을 알

수 있었다. 회석배수가 높은 시료일수록 Ct값이 높게 나타나고 있으며 r^2 값이 0.993으로 회석배수와 Ct값의 상관성이 매우 높아 quantitative PCR로 AI 바이러스의 유전자 양을 측정함으로써 바이러스의 조직내 함량을 추정할 수 있을 것으로 확인되었다.

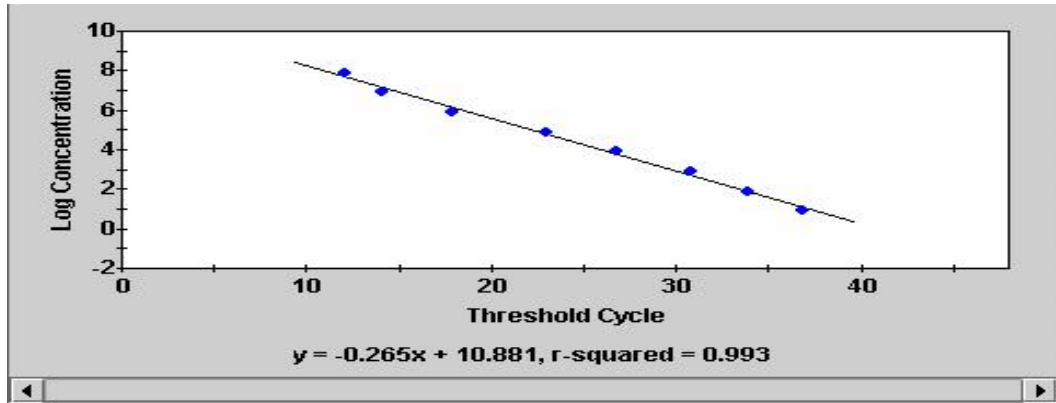


그림3-2. AI 바이러스 유전자 농도변화에 따른 Ct 값의 변화. r^2 값이 1에 가까울수록 높은 상관성을 나타낸다.

표3-3. 시험 AI 백신 1차 접종군에 대한 공격접종 후 구강, 총배설강 및 신장에서의 AIV 유전자 함유량 비교

구분	백신 접종 주령	접종 수수	공격접종 경과 일 수*														
			3			5			10			14					
			O**	K	C	O	K	C	O	K	C	O	K	C			
처리군1	4	15	2.7**														
			*	-0.3 ±0.1	5.0 ±5.3	4.9 ±5.2	1.3 ±1.5	6.5 ±6.7	0.7 ±0.8	NT	1.6 ±1.7	0 ±0	0.9 ±1.1	0 ±0			
대조군1	-	10	4.4	1.7	5.7	5.1	2.3	6.9	1.4								
			±4.5	±1.3	±6.0	±5.3	±2.5	±6.9	±1.1	NT	5.4 ±5.6	0 ±0	1.0 ±1.2	0 ±0			

* 공격접종은 7주령에 야외AI바이러스(MS96)를 수당 $10^{6.9}$ EID₅₀/ml 용량으로 점안 접종

** O: 구강, K: 신장, C: 총배설강

*** qPCR의 Ct 값을 유전자 함유량으로 변환한 것임(2.7 은 $10^{2.7}$ EID₅₀를 의미하는 것임)

본 실험에서 처리군과 대조군간에 조직내 혹은 배설되는 바이러스의 함량이 차이가 있음이 확인되었다. 즉, 대조군, 처리군 모두 바이러스를 접종 후 14일까지 배출하는 것으로 확인이 되어 감염된 것이 확인되었다. 처리군, 대조군 모두 공격초기에는 구강에서 후기에는 총배설장에서 바이러스가 높게 검출이 되었으며 처리군 보다 대조군에서 바이러스의 양이 대부분 높게 검출이 되어 백신으로 인한 바이러스의 증식이 다소 감소되는 것으로 판단이 되었다. 접종 14일 후에는 대조군과 처리군 모두 구강과 총배설장에서는 바이러스가 검출이 되지 않아 더 이상 증식이 되지 않았으나 신장에서는 아직도 적은 양의 바이러스가 검출됨으로서 신장에서 AI 바이러스가 좀더 오래 존재하는 것으로 판단이 되었다.

표3-4. 시험 AI 백신 1차 및 2차 접종군에 대한 공격접종 후 구강, 총배설장 및 신장에서의 AI 바이러스 유전자 함유량 비교

구분	백신 접종 주령	접종 수	공격접종 경과 일 수*												
			3			5			10			14			
			O**	K	C	O	K	C	O	K	C	O	K	C	
처리군2	4	15	2.8**												
			* ±3.1	NT	0.8 ±1.2	1.4 ±1.5	NT	0 ±0	0 ±0	NT	0 ±0.4	0.2 ±0.5	NT	0 ±0	
대조군2	-	10	3.6 ±3.6	NT	4.6 ±4.8	4.0 ±4.0	NT	6.2 ±6.2	1.7 ±1.7	NT	2.6 ±2.5	1.2 ±1.1	NT	0.1 ±0.3	

* 공격접종은 7주령에 야외AI바이러스(MS96)를 수당 $10^{6.9}$ EID₅₀/ml 용량으로 점안
접종

** O: 구강, K: 신장, C: 총배설장 *** NT: Not tested

*** qPCR의 Ct 값을 유전자 함유량으로 변환한 것임(2.8 은 $10^{2.8}$ EID₅₀를 의미하는 것임)

2번 백신을 접종한 처리군과 대조군의 바이러스 함유량을 구강, 총배설장 및 신장에서 비교한 결과, 대조군에서는 시험기간동안 지속적인 바이러스 유전자를 검출할 수 있었으나 2번백신을 한 경우에는 접종 후 5일부터 거의 바이러스가 검출이 되지 않아 2번백신에 의한 바이러스 증식억제효과가 매우 큰 것으로 판단이 되었다. 또한, 바이러스의 함유량에서도 대부분 대조군과 큰 차이를 보였다.

1. 시험 사독백신에 대한 야외 효능 평가

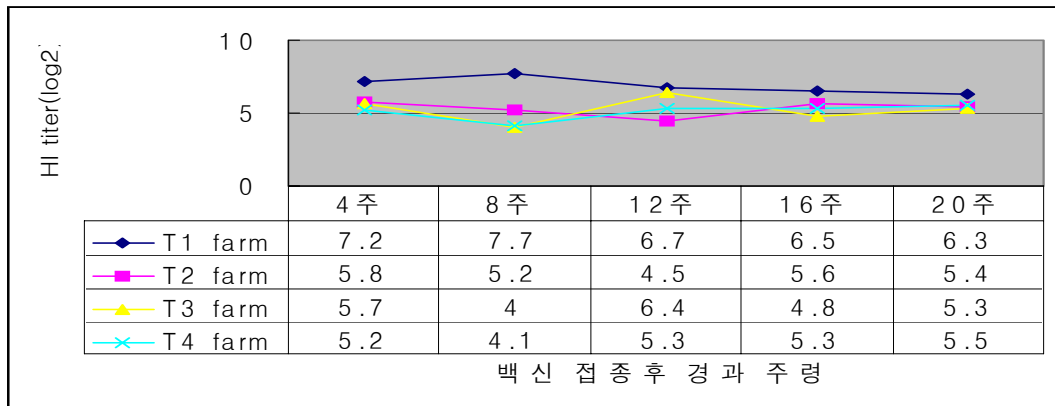
표3-5. AI시험백신의 야외시험을 위하여 선정된 농장 개요

농장	지역	계종	품종	입추일	사육수수	시험수 수	계사형 태	백신접종일령		기타
								1차	2차	
T1	경북영주	산란계	하이라인	040706	68,000	34,000	무창	45	100	
T2	경북영주	산란계	하이라인	040601	24,600	12,600	유창	100	-	
T3	경기여주	산란	하이라인	040511	350,000	70,000	무창	95	-	
T4	경북의성	산란	하이라인	040504	3,150	3,150	유창	120	-	

표3-6. 야외 산란계 농장에 AI 시험백신 1차 혹은 2차 접종 후 HI 역가 변화

농장	백신접 종일령	계군	접종건 수	백신 접종 후 경과 주령				
				4주	8주	12주	16주	20주
T1	45, 100	접종군	0±0	7.2±0.78*	7.7±0.48	6.7±0.67	6.5±0.85	6.3±0.67
	-	대조군		0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
T2	100	접종군	0±0	5.8±1.31	5.2±0.92	4.5±0.97	5.6±1.17	5.4±1.07
	-	대조군		0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
T3	90	접종군	0±0	5.7±0.82	4.0±0.94	6.4±1.07	4.8±0.63	5.3±0.48
	-	대조군		0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
T4	120	접종군	0±0	5.2±1.03	4.1±1.52	5.3±0.67	5.3±1.06	5.5±1.27
	-	대조군		0±0	0±0	0±0	5.5±1.18	5.2±0.79

* HI titer를 log2로 변환한 수치임



4개 산란계농장을 선정하여 1번 혹은 2번 사독백신을 접종한 후 정기적으로 혈청검사를 하였다. 그 결과 접종한 계군 모두 20주 동안 5.0 이상(log2)의 역가를 유지하고 있었으며 2번 백신접종을 한 계군이 1번 백신접종을 한 계군보다 높은 역가를 유지하고 있었다. 시험기간 동안 대조군에서는 AI 바이러스에 대한 역가 반전이 T4 농장을 제외하고는 나타나지 않았다. T4농장의 경우 외부로부터 AI 바이러스가 시험백신접종 후 16주가 경과한 시점에서 감염된 것으로 판단이 되었다.

가. 제1농장의 야외성적

1) 농장개요

- 농 장 명 : 협육농장 (기호: Exp0401aif-T1)
- 주 소 : 경상북도 영주시 장수면 갈산3리
- 성 명 : 송 원 옥
- 전 화 : 054-637-3633
- 사육규모 : 68,000수, 무창 성계사(2동), 무창 육추계사(1동)
- 시험계군
 - 품 종 : 하이라인 산란계
 - 입 추 일 : 2004년 7월 6일
 - 시 험 수 : 34,000수(1동)

2) 실험계군의 개요

초생추 병아리 34,000수를 봉산부화장에서 구입하여 농장내 무창 빠다리 육추장에서 육성하여 90일령에 성계사 1동으로 이동시켜 산란하는 무창계사 산란계 농장

으로 협업 양계단지 농장 내에서 성계 40만수, 육추 12만수가 사육되고 있다. 야외 시험은 동일한 계사에서 접종군 25,500수에 대하여 1차 45일령, 2차 100일령에 각각 0.5ml를 대퇴부근육에 접종하였고, 대조군은 백신을 접종하지 않은 8,500수로 하였다.

3) 백신 접종 프로그램

표4-1. 제1농장의 백신접종 프로그램

접종시기	접종일자	백신명
0일령	2004년 7월 5일	뉴캐슬 오일백신, 뉴캐슬(B1) 생독백신
7일령	2004년 7월 12일	뉴캐슬(B1)-전염성기관지염 생독혼합백신
14일령	2004년 7월 19일	감보로병 생독백신
18일령	2004년 7월 23일	뉴캐슬병
22일령	2004년 7월 27일	감보로병 생독백신
26일령	2004년 7월 31일	뉴캐슬병(크론)-전염성기관지염 생독 혼합백신
35일령	2004년 8월 9일	뉴캐슬병사독, 계두 생독백신
45일령	2004년 8월 19일	조류인플루엔자오일백신 , 닭 전염성후두기관염 백신
55일령	2004년 8월 29일	티푸스 생독백신
70일령	2004년 9월 13일	뉴캐슬병(라소타)
80일령	2004년 9월 23일	생독혼뉴캐슬병(B1), 전염성기관지염 오일혼합백신
90일령	2004년 10월 2일	뇌척수염 생독백신
100일령	2004년 10월 12일	조류인플루엔자 오일백신
110일령	2004년 10월 22일	티푸스 생독백신
120일령	2004년 12월 2일	뉴캐슬 오일백신

4) 시험백신의 안전성시험

시험백신의 닭에 대한 안전성을 확인하기 위하여 45일령의 건강한 닭 50마리(시험 30마리, 대조 20마리)를 선정하여 시험군에는 대퇴부근육에 0.5ml씩 접종하였고 100일령에 2차접종을 추가로 실시하였다. 무처치 대조군과 같이 2차 접종 후 14일까지 임상관찰을 실시하였다

가) 임상증상

14일간의 임상증상관찰기간동안 선정된 50수에 대하여 정밀관찰을 실시하였던 바 백신접종에 따른 폐사, 식욕감퇴, 설사 혹은 과민반응이 관찰되지 않았으며 접종 부위의 조직반응도 인정되지 않았다.

표4-2. 제1농장의 시험백신 접종 후 임상증상 관찰 결과

구분	접종주령 및 시험수	접종량 및 접종부위	관찰 일수	임상증상				
				설사	식욕 감퇴	과민 반응	폐사	접종 반응
1차 접종	시험 45일령 25,500수 (30수 라벨)	0.5ml 대퇴부근육	14일	없음	없음	없음	없음	없음
	대조 45일령 8,500수 (20수 라벨)	무처리	14일	없음	없음	없음	없음	없음
2차 접종	시험 100일령 25,500수 (30수 라벨)	0.5ml 대퇴부근육	14일	없음	없음	없음	없음	없음
	대조 100일령 8,500수 (20수 라벨)	무처리	14일	없음	없음	없음	없음	없음

나) 산란율 및 비정상란율

40주령까지의 산란율을 비교하여 보면 대조군과 백신접종군 사이에 별다른 차이가 없었다. 따라서 백신접종에 의한 산란율저하는 인정이 되지 않았다. 그러나 29주령부터 IB 감염에 의한 산란저하 및 탈색란 발생이 급격히 증가하였다. IB의 검사는 기관과 총배설강의 시료 및 혈액을 이용하였으며 감염여부를 혈청검사와 PCR 방법으로 확인하였다.

표4-3. 제1농장의 산란율 및 비정상란율 비교

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군 (25,500수)		대조군 (8,500수)	
		산란율(%)	비정상란(%)	산란율(%)	비정상란(%)
6	20	54.0	0.2	64.0	0.2
7	21	70.7	1.8	85.2	2.2
8	22	92.9	2.4	92.9	2.4
9	23	95.9	1.6	93.2	1.5
10	24	95.5	1.5	93.6	1.3
11	25	95.6	1.6	94.0	1.4
12	26	95.4	1.6	94.7	1.4
13	27	94.6	1.0	92.2	1.3
14	28	89.5	1.3	85.9	1.1
15	29	65.9	1.4	68.5	1.3
16	30	43.9	2.2	55.9	6.4
17	31	54.1	4.9	60.8	3.8
18	32	73.1	7.3	70.7	6.3
19	33	80.0	8.5	80.3	7.0
20	34	82.5	8.0	83.2	7.2
21	35	85.2	8.2	85.7	7.2
22	36	85.4	8.0	85.8	7.4
23	37	85.5	7.0	85.9	7.0
24	38	85.2	8.0	85.8	8.0
25	39	85.6	9.0	85.9	8.9
26	40	85.7	9.0	85.7	9.0

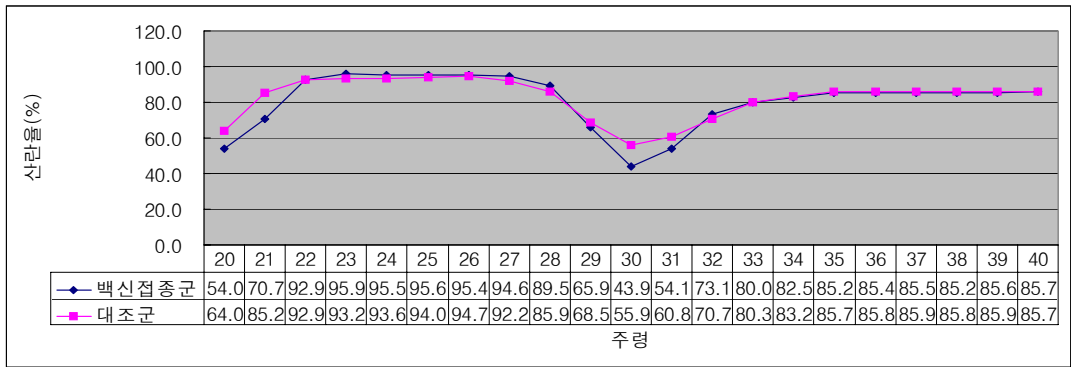


그림4-1. 제1농장의 시험백신 접종 후 산란율의 변화

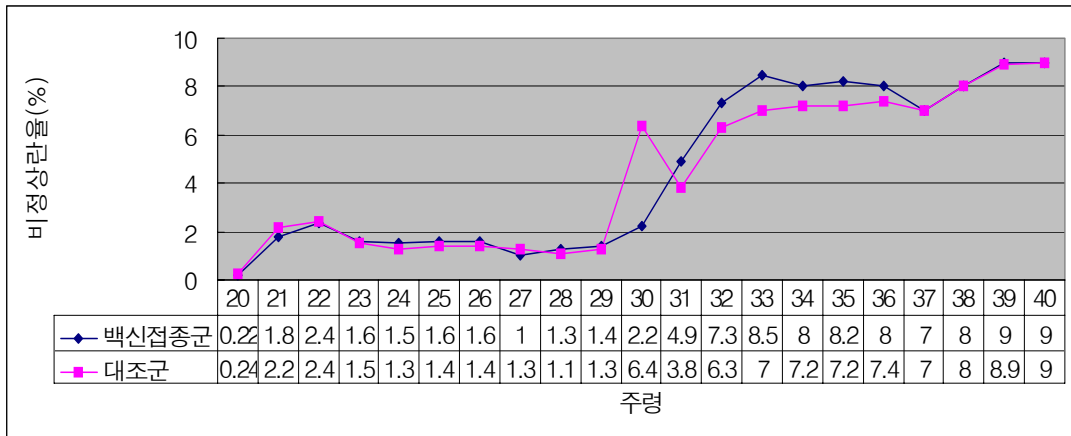


그림4-2. 제1농장의 시험백신 접종 후 비정상란율의 변화

다) 폐사율

주간폐사율은 대조군에 비하여 백신 접종군이 다소 높게 형성이 되었으나 두 계군 모두 0.3% 이하로 국내 정상계군의 평균수준을 유지하여 백신접종으로 인한 것으로 판단이 되지 않았다. 또한, 폐사원인도 복막염 등 일반 세균성 질병에 의한 것으로 특별히 백신접종에 의한 것으로 인정되지 않았다.

표4-4. 제1농장의 백신 접종 후 주간 폐사(율) 및 폐사 원인

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군(25,500수)		대조군(8,500수)	
		주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인	주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인
6	20	11(0.04)	탈수, 약추	10(0.12)	탈수, 약추
7	21	21(0.08)	약추	8(0.09)	약추
8	22	18(0.07)	요산침착	7(0.08)	요산침착
9	23	21(0.08)	대장균, 약추	4(0.05)	대장균, 약추
10	24	10(0.04)	대장균, 약추	6(0.07)	대장균, 약추
11	25	11(0.04)	수란관염	4(0.05)	수란관염
12	26	8(0.03)	대장균, 약추	3(0.04)	수란관염
13	27	7(0.03)	대장균, 약추	4(0.05)	약추
14	28	26(0.10)	복막염, 약추	8(0.09)	복막염
15	29	28(0.11)	복막염, 약추	8(0.09)	복막염, 약추
16	30	37(0.15)	약추, 복막염	10(0.12)	복막염, 약추
17	31	62(0.24)	대장균, 약추	16(0.19)	복막염, 약추
18	32	74(0.29)	약추, 복막염	15(0.18)	복막염, 약추
19	33	70(0.27)	탈수, 요산침착	14(0.16)	탈수, 요산침착
20	34	73(0.29)	대장균, 약추	15(0.18)	대장균, 약추
21	35	57(0.22)	탈수, 복막염	13(0.15)	탈수, 복막염
22	36	55(0.22)	탈수, 복막염	14(0.16)	탈수, 대장균
23	37	56(0.22)	대장균, 약추	12(0.14)	복막염, 약추
24	38	54(0.21)	수란관염, 약추	10(0.12)	수란관염
25	39	47(0.18)	수란관염, 약추	11(0.13)	약추
26	40	44(0.17)	대장균, 약추	9(0.11)	대장균, 약추

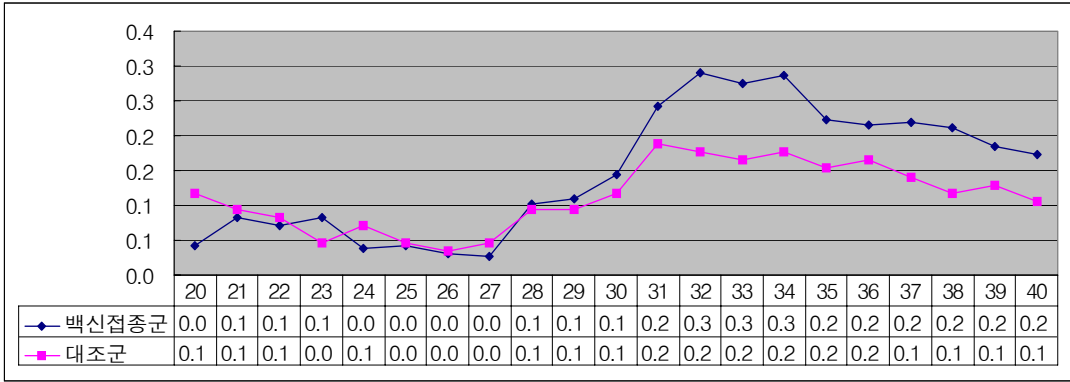


그림4-3. 제1농장의 백신접종 후 주간폐사율의 변화

5) 시험 중 조류인플루엔자 감염 여부 확인 시험

시험기간 중 농장의 조류인플루엔자의 감염여부를 파악하기 위하여 백신접종 8주 및 16주후에 분변(1개 시료 당 10개 분변), 기관(1개 시료 당 5수의 기관), 총배설강(1개 시료당 5수의 총배설강)시료를 채취하여 RT-PCR 방법으로 검사하였다. 양성일 경우 계란접종을 계획하였다.

표4-5. 제1농장의 조류인플루엔자 바이러스 분리

접종후 주령	실제 주령	구분	시료		
			기관	총배설강	분변
8	15	접종군	-*	-	-
		대조군	-	-	-
16	23	접종군	-	-	-
		대조군	-	-	-

* : RT-PCR 검사 음성

6) 시험계군의 혈구응집억제(HI) 항체가

백신접종군과 대조군의 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항체가를 백신접종

후 20주간 정해진 시간에 검사를 하였다. 시험기간 동안 대조군에는 HI 항체가 검출되지 않아 이 농장에는 조류 인플루엔자 바이러스 감염이 없었던 것으로 판단된다. 백신접종은 2회에 걸쳐 실시되었으며 HI 항체는 백신접종 후 상승을 하였으나 12주령부터는 감소를 시작하여 시험종료일에는 5.2(log2) 정도를 유지하였다.

표4-6. 제1농장의 주령별 혈구응집억제 항체역가 분포 및 결과

백신접종 후 주령	실제 주령	구분	HI 항체역가(log2)								평균	
			0	1	2	3	4	5	6	7		8
접종전	6	접종군	30*								0	
		대조군	20								0	
1	8	접종군	8	9	3	8	2				1.6±1.3**	
		대조군	20								0	
2	9	접종군				1	2	16	10	1		5.3±0.8
		대조군	20								0	
3	10	접종군					3	6	16	5		6.2±0.8
		대조군	20								0	
4	11	접종군					2	4	16	8		7.0±0.8
		대조군	19								0	
8	15	접종군				1		1	8	20		7.5±0.9
		대조군	20								0	
12	19	접종군						8	12	10		7.1±0.7
		대조군	20								0	
16	23	접종군				3	7	13	4	1		5.8±1.0
		대조군	20								0	
20	27	접종군				6	15	7	1			5.2±0.7
		대조군	20								0	

* : 해당 항체에 대한 시험계의 수

** : HI 역가의 평균(log2)±표준편차

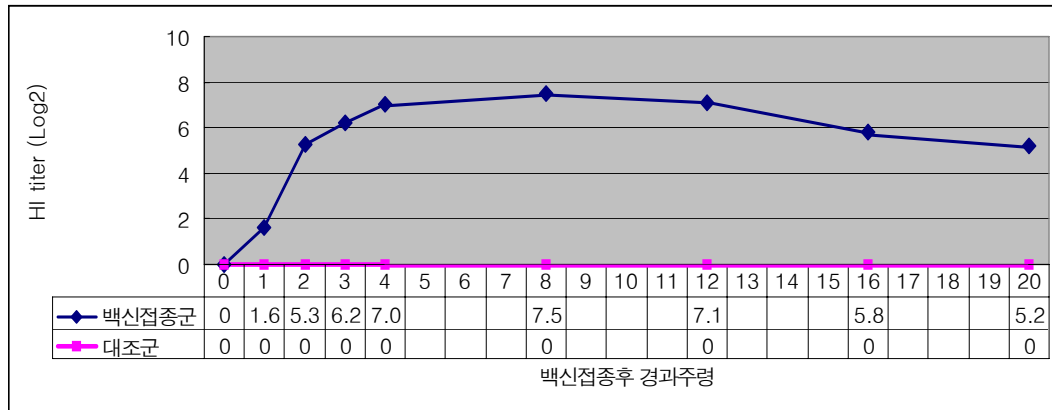


그림4-4. 야외시험 농장1의 주령별 혈구응집억제 항체역가의 변화

나. 제2농장의 야외성적

1) 농장개요

- 농 장 명 : 도봉농장 (기호 : Exp0401aif-T2)
- 주 소 : 경상북도 영주시 부석면 보계1리 도봉
- 성 명 : 이 상 원
- 전 화 : 054-633-6720
- 사육규모 : 24,600수 (1농장, 2농장 구분 사육)
- 시험계군
 - 품 종 : 하이라인 산란계
 - 입 추 일 : 2004년 6월 1일
 - 시 험 수 : 12,300수(1농장 2동)

2) 실험계군의 개요

2개 농장으로 구성된 일반산란계 농장으로서 도봉농장 2계군과 상망농장 1계군 총 3개 계군이 있으며 농장 간에는 약 15km정도 떨어져 있다. 본 실험에 사용된 병아리는 경북 예천에 위치한 중추전문농장에서 80일령에 구입하였다. 철저한 사양관리와 차단방역으로 평소에도 산란성과 계란의 품질이 우수한 농장이다. 야외 시험은 동일한 계사에서 백신접종군 9,096수에 대하여 100일령에 0.5ml를 대퇴부근육에 접종하였고, 대조군은 백신을 접종하지 않은 3,204수로 하였다.

3) 농장 백신 접종 프로그램

표5-1. 제2농장의 백신접종 프로그램

접종시기	접종일자	백신명
0일령	2004년 5월 31일	뉴캐슬병(B1) 생독백신 분무
7일령	2004년 6월 7일	뉴캐슬병(B1)-전염성기관지염 생독 혼합백신
14일령	2004년 6월 14일	감보르병 생독백신
18일령	2004년 6월 18일	뉴캐슬병
22일령	2004년 6월 22일	감보로병 생독백신
27일령	2004년 6월 27일	뉴캐슬병(크론)-전염성기관지염 생독 혼합백신
35일령	2004년 7월 5일	뉴캐슬병사독, 계두 생독백신
46일령	2004년 7월 16일	티푸스 생독백신
56일령	2004년 7월 26일	닭 전염성후두기관염 백신
90일령	2004년 8월 29일	뇌척수염 생독백신
95일령	2004년 9월 5일	뉴캐슬병(B1)-전염성기관지염 생독 혼합백신
100일령	2004년 9월 10일	조류인플루엔자 오일백신
110일령	2004년 9월 20일	티푸스 생독백신
120일령	2004년 9월 30일	뉴캐슬-전염성기관지염혼합 오일백신

4) 시험백신의 안전성시험

시험백신의 닭에 대한 안전성을 확인하기 위하여 100일령의 건강한 닭 50마리 (시험 30마리, 대조 20마리)를 선정하여 시험군에는 대퇴부근육에 0.5ml씩 1회 접종하고 무처치 대조군과 같이 14일간 임상관찰을 실시하였다.

가) 임상증상

14일간의 임상증상관찰기간동안 선정된 50수에 대하여 정밀관찰을 실시하였던 바 백신접종에 따른 폐사, 식욕감퇴, 설사 혹은 과민반응이 관찰되지 않았으며 접종 부위의 조직반응도 인정되지 않았다.

표5-2. 제2농장의 시험백신 접종 후 임상증상 관찰 결과

구분	접종주령 및 시험수	접종량 및 접종부위	관찰 일수	임상증상				
				설사	식욕 감퇴	과민 반응	폐사	접종 반응
시험	100일령 9,096수 (30수 라벨)	0.5ml 대퇴부근육	14일	없음	없음	없음	없음	없음
대조	100일령 3,204수 (20수 라벨)	무처치	14일	없음	없음	없음	없음	없음

나) 산란율 및 비정상산란율

40주령까지의 산란율을 비교하여 보면 대조군과 백신접종군 사이에 별다른 차이가 없었다. 따라서 백신접종에 의한 산란율저하는 인정이 되지 않았다. 하지만 36주령부터 뉴캐슬병(ND) 감염에 의한 산란저하가 있었다. ND의 검사는 기관과 총배설장의 시료 및 혈액을 이용하였으며 감염여부를 혈청검사와 PCR 방법으로 확인하였다.

표5-3. 제2농장의 산란율 및 비정상란율 비교

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군(9,096수)		대조군(3,204수)	
		산란율(%)	비정상란율(%)	산란율(%)	비정상란율(%)
6	20	7.0	0.3	8.0	0.4
7	21	38.2	1.8	34.1	1.6
8	22	53.6	2.2	49.3	2.1
9	23	77.3	2.2	75.8	2.9
10	24	87.9	2.1	86.2	2.5
11	25	91.7	2.0	91.8	2.0
12	26	94.0	1.9	92.8	2.0
13	27	90.3	2.3	91.2	2.5
15	28	89.2	3.9	87.5	3.9
16	29	89.5	3.1	88.3	3.7
17	30	90.4	2.0	89.6	2.2
18	31	90.8	1.9	90.2	1.8
19	32	90.9	1.8	90.2	2.1
20	33	90.1	1.7	90.2	2.0
21	34	90.0	1.8	90.0	3.0
22	35	82.4	1.6	81.6	1.9
23	36	71.0	3.0	69.1	3.1
24	37	68.8	3.3	70.0	3.2
25	38	70.1	4.5	71.8	6.3
26	39	72.0	8.9	73.5	8.4
27	40	84.0	7.0	85.2	6.8

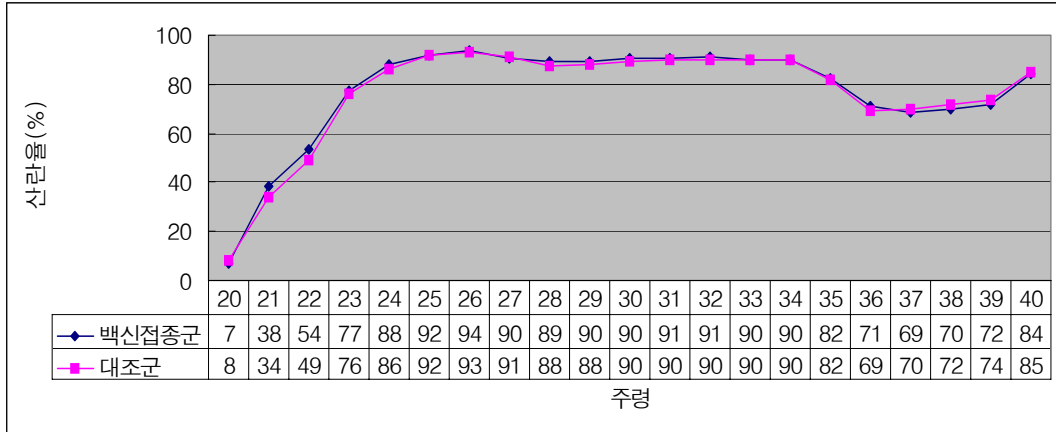


그림5-1. 제2농장의 시험백신 접종 후 산란율의 변화

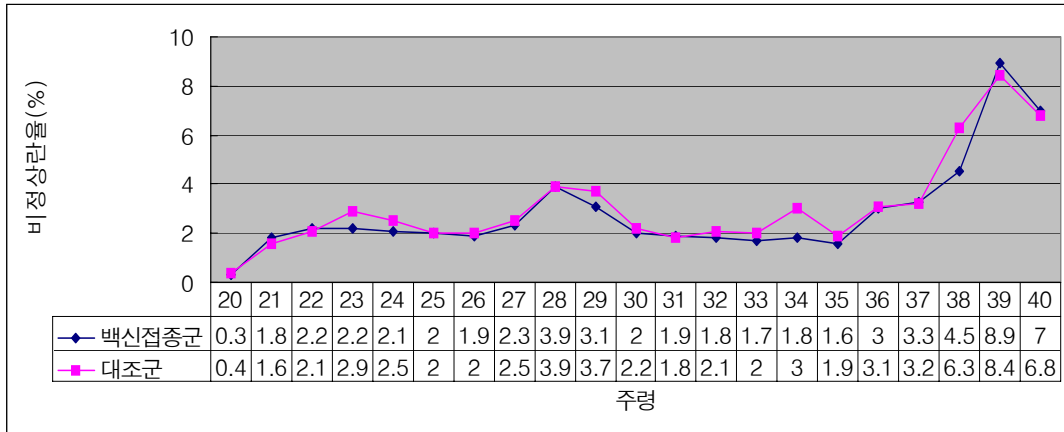


그림5-2. 제2농장의 시험백신 접종 후 비정상산란율의 변화

다) 폐사율

시험기간 동안 주간폐사율은 대조군이 백신 접종군에 비하여 다소 높게 형성이 되었으나 두 계군 모두 0.3% 이하로 국내 정상계군의 평균수준을 유지하여 백신접종으로 인한 폐사는 없는 것으로 판단되었다.

표5-4. 제2농장의 백신접종 후 주간폐사(율) 및 폐사 원인

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군(9,096수)		대조군(3,204수)	
		주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인	주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인
6	20	1(0.01)	약추	0(0)	-
7	21	2(0.02)	탈홍	3(0.09)	탈홍
8	22	3(0.03)	탈홍	4(0.12)	탈홍
9	23	4(0.04)	약추	5(0.16)	약추, 탈홍
10	24	2(0.02)	대장균	2(0.06)	대장균
11	25	3(0.03)	약추	2(0.06)	대장균
12	26	2(0.02)	약추	0(0)	-
13	27	3(0.03)	약추	3(0.09)	약추, 탈홍
15	28	8(0.09)	수란관염, 약추	3(0.09)	약추
16	29	3(0.03)	약추	1(0.03)	약추
17	30	4(0.04)	약추, 대장균	2(0.06)	약추
18	31	6(0.07)	탈홍, 약추	1(0.03)	약추
19	32	4(0.04)	복막염	0(0)	-
20	33	3(0.03)	약추	1(0.03)	약추
21	34	4(0.04)	탈수	1(0.03)	약추
22	35	5(0.05)	약추	1(0.03)	약추
23	36	6(0.07)	약추	0(0)	-
24	37	5(0.05)	복막염	0(0)	-
25	38	7(0.08)	약추	3(0.09)	탈수
26	39	5(0.05)	약추	6(0.19)	약추, 복막염
27	40	7(0.08)	탈수	3(0.09)	약추, 복막염

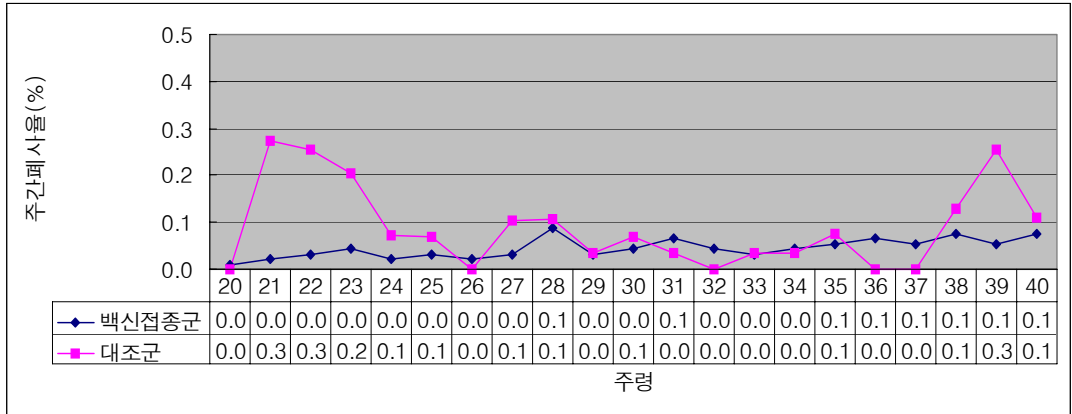


그림5-3. 제2농장의 백신접종 후 주간폐사율의 변화

5) 시험 중 조류인플루엔자 감염 여부 확인 시험

시험기간 중 농장의 조류인플루엔자의 감염여부를 파악하기 위하여 백신접종 8주 및 16주후에 분변(1 tube당 10개 분변), 기관지(1 tube당 5마리), 총배설강(1 tube당 5마리)을 swab하여 RT-PCR 방법으로 검사하였다. 양성일 경우 계란 접종을 계획하였다.

표5-5. 제2농장의 RT-PCR을 통한 조류인플루엔자 감염여부 확인

접종후 주령	실제 주령	구분	시 료		
			기관	총배설강	분변
8	23	접종군	-*	-	-
		대조군	-	-	-
16	31	접종군	-	-	-
		대조군	-	-	-

* : RT-PCR 검사 음성

6) 시험계군의 혈구응집억제(HI) 항체가

백신접종군과 대조군의 HI 항체가를 백신접종 후 20주간 정해진 시간에 검사를 하였다. 시험기간 동안 대조군에는 HI 항체가가 검출되지 않아 이 농장에는 조류인플루엔자 감염이 없었던 것으로 판단되었다. 백신접종은 1회 실시되었으며 항체

가는 백신접종 후 상승을 하였으나 접종 후 4주령부터는 감소를 시작하여 시험종료 일에는 4.1(log2)정도를 유지하였다.

표5-6. 제2농장의 주령별 혈구응집억제 항체역가 분포 및 결과

백신접종 후	실제 주령	구분	HI titer(log2)								평균항체가
			0	1	2	3	4	5	6	7	
접종전	14	접종군	30*								0
		대조군	20								0
1	16	접종군	28	2							0.1±0.3**
		대조군	20								0
2	17	접종군	3	10	6	4	5	1	1		2.2±1.6
		대조군	20								0
3	18	접종군				1	4	11	10	3	4.9±1.0
		대조군	20								0
4	19	접종군				1	2	12	12	3	5.5±0.9
		대조군	20								0
8	23	접종군				5	11	12	2		4.4±0.9
		대조군	20								0
12	27	접종군			2	3	11	12	2		4.3±1.0
		대조군	20								0
16	31	접종군			1	5	17	5	2		4.1±0.9
		대조군	20								0
20	35	접종군			1	6	15	6	2		4.1±0.9
		대조군	20								0
51	66	접종군				7	14	8	1		4.1±0.8
		대조군	20								0

* : 해당 항체에 대한 시험계의 수

** : HI 역가의 평균(log2)±표준편차

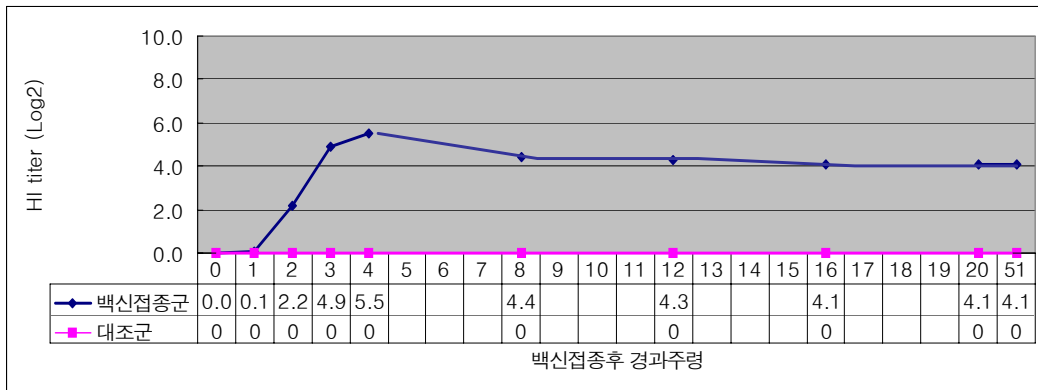


그림 5-4. 제2농장의 주령별 혈구응집억제 항체역가의 변화

다. 제3농장

1) 농장개요

- 농 장 명 : 유진농장 (기호 : Exp0401aif-T3)
- 주 소 : 경기도 여주군 가남면 금당리 606-3
- 성 명 : 김 호 정
- 전 화 : 031-882-5778
- 사육규모 : 350,000수 (무창 성계사 5동, 무창 육성사 1동)
- 시험계군
 - 품 종 : 하이라인 산란계
 - 입 추 일 : 2004년 5월 11일
 - 시 험 수 : 70,000수(5개동 중 1개동 선택)

2) 시험계군의 개요

본 농장은 산란계 전문 농장으로서 초생추 70,000수를 입식하여 자체 육추장에서 사육하고 80일령에 농장 내 5개 동의 성계사에 각각 70,000수씩 총 35만수를 입식하였다. 아외 시험은 동일한 계사에서 백신접종군 61,250수에 대하여 95일령에 0.5ml을 대퇴부근육 접종하고, 대조군은 백신을 접종하지 않은 8,750수로 하였다.

3) 농장 백신 접종 프로그램

표6-1. 제3농장의 백신 접종 프로그램

접종시기	접종일자	백 신 명
0일령	2004년 5월 11일	뉴캐슬병 생독백신
3일령	2004년 5월 13일	ING오일백신 목뒤 피하주사
10일령	2004년 5월 20일	감보로병 생독백신
12일령	2004년 5월 22일	뉴캐슬병(클론)-전염성기관지염 생독
20일령	2004년 5월 30일	감보로병 생독백신
22일령	2004년 6월 1일	뉴캐슬병(클론)-전염성기관지염 생독
30일령	2004년 6월 9일	감보로병 생독백신
35일령	2004년 6월 14일	닭 전염성 후두기관염, 계두 백신
57일령	2004년 7월 6일	티푸스 생독백신
65일령	2004년 7월 14일	BBN 오일백신 주사
87일령	2004년 8월 5일	티푸스 생독백신
95일령	2004년 8월 13일	조류인플루엔자 오일백신
100일령	2004년 8월 18일	뇌척수염 생독백신
102일령	2004년 8월 20일	BBNE 오일백신

4) 시험백신의 안전성시험

시험백신의 닭에 대한 안전성을 확인하기 위하여 100일령의 건강한 닭 50마리 (시험 30마리, 대조 20마리)를 선정하여 시험군에는 대퇴부근육에 0.5ml씩 1회 접종하고 무처치 대조군과 같이 14일간 임상관찰을 실시하였다.

가) 임상증상

14일간의 임상증상관찰기간동안 선정된 50수에 대하여 정밀관찰을 실시하였던 바 백신접종에 따른 폐사, 식욕감퇴, 설사 혹은 과민반응이 관찰되지 않았으며 접종 부위의 조직반응도 인정되지 않았다.

표6-2. 제3농장의 시험백신 접종 후 임상증상 관찰 결과

구분	접종주령 및 시험수	접종량 및 접종부위	관찰 일수	임상증상				
				설사	식욕 감퇴	과민 반응	폐사	접종 반응
시험	95일령 61,250수 (30수 라벨)	0.5ml 대퇴부근육	14일	없음	없음	없음	없음	없음
대조	95일령 8,750수 (20수 라벨)	무처리	14일	없음	없음	없음	없음	없음

나) 산란율 및 비정상산란율

40주령까지의 산란율을 비교하여 보면 대조군과 백신접종군 사이에 별다른 차이가 없었다. 따라서 백신접종에 의한 산란율저하는 인정이 되지 않았다. 그러나 39주령부터 전염성 기관지염(IB) 감염에 의한 산란저하 및 탈색란 발생이 급격히 증가하였다. IB의 검사는 기관과 총배설강의 시료 및 혈액을 이용하였으며 감염여부를 혈청검사와 PCR 방법으로 확인하였다.

표6-3. 제3농장의 시험백신 접종 후 26주까지의 산란율

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군 (61,250수)	대조군(8,750수)
		산란율(%)	산란율(%)
6	20	20.0	19.0
7	21	45.0	44.7
8	22	63.1	63.0
9	23	82.6	74.3
10	24	88.5	88.4
11	25	88.5	88.4
12	26	91.1	91.0
13	27	92.1	91.7
14	28	92.0	92.2
15	29	91.0	92.0
16	30	92.0	91.0
17	31	91.0	91.0
18	32	90.0	92.0
19	33	90.0	91.0
20	34	90.0	91.0
21	35	90.0	91.0
22	36	90.0	89.0
23	37	90.1	90.2
24	38	89.0	88.0
25	39	84.0	80.0
26	40	66.0	60.0

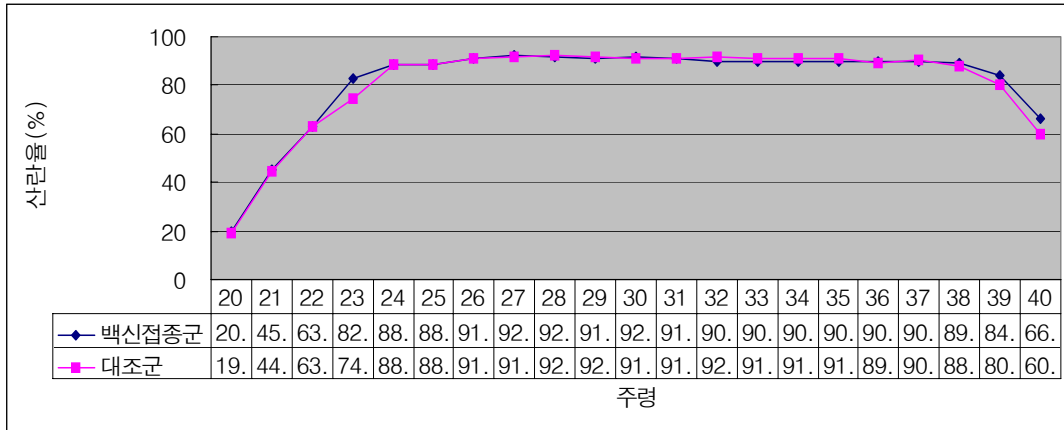


그림 6-1. 제3농장의 시험백신 접종 후 산란율의 변화

다) 폐사율

주간폐사율은 백신접종군에 비하여 대조군이 오히려 다소 높게 형성이 되었으나 두 계군 모두 0.3% 이하로 국내 정상계군의 평균수준을 유지하여 백신접종으로 인한 것으로 판단이 되지 않았다. 또한, 폐사원인도 마렉병, 복막염 등 일반적인 질병에 의한 것으로 특별히 백신접종에 의한 것으로 인정되지 않았다.

표6-4. 제3농장의 백신 접종 후 주간폐사(율) 및 폐사 원인

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군(61,250수)		대조군(8,750수)	
		주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인	주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인
6	20	114(0.19)	약추, 대장균, 마택	19(0.22)	약추, 대장균, 마택
7	21	138(0.23)	약추, 대장균, 마택	23(0.26)	약추, 대장균, 마택
8	22	126(0.21)	약추, 대장균, 마택	21(0.24)	약추, 대장균, 마택
9	23	162(0.26)	사료주입구, 기낭염	27(0.31)	사료주입구, 기낭염
10	24	132(0.22)	사료주입구, 기낭염	22(0.25)	사료주입구, 기낭염
11	25	108(0.18)	마택, 대장균	18(0.21)	마택, 대장균
12	26	138(0.23)	마택, 대장균	23(0.26)	마택, 대장균
13	27	126(0.21)	마택, 대장균	21(0.24)	마택, 대장균
14	28	120(0.20)	마택, 대장균	20(0.23)	마택, 대장균
15	29	120(0.20)	수란관, 대장균	20(0.23)	수란관, 대장균
16	30	122(0.20)	수란관, 대장균	21(0.24)	수란관, 대장균
17	31	120(0.20)	수란관, 대장균	18(0.21)	수란관, 대장균
18	32	121(0.20)	대장균, 약추	20(0.23)	대장균, 약추
19	33	122(0.20)	대장균, 약추	21(0.24)	대장균, 약추
20	34	120(0.20)	대장균, 약추	22(0.25)	대장균, 약추
21	35	120(0.20)	대장균, 약추	20(0.23)	대장균, 약추
22	36	125(0.20)	종양, 수란관염	21(0.24)	종양, 수란관염
23	37	124(0.20)	종양, 대장균	25(0.29)	종양, 대장균
24	38	125(0.20)	약추, 종양	20(0.23)	약추, 종양
25	39	120(0.20)	약추, 종양	22(0.25)	약추, 종양
26	40	125(0.20)	수란관염, 약추	22(0.25)	수란관염, 약추

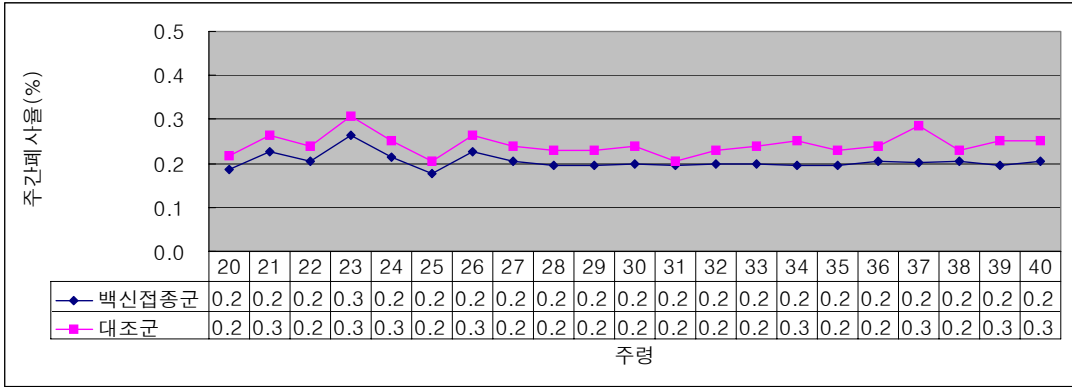


그림6-2. 제3농장의 백신접종 후 주간폐사율의 변화

5) 시험 중 조류인플루엔자 감염 여부 확인 시험

시험기간 중 농장의 조류인플루엔자의 감염여부를 파악하기 위하여 백신접종 8주 및 16주후에 분변(1 tube당 10개 분변), 기관지(1 tube당 5마리), 총배설장(1 tube당 5마리)을 swab하여 RT-PCR 방법으로 검사하였다. 양성일 경우 계란접종을 계획하였다.

표6-5. 제3농장의 RT-PCR을 통한 조류인플루엔자 감염여부 확인

접종후 주령	실제 주령	구분	시 료		
			기관	총배설장	분변
8	22	접종군	-*	-	-
		대조군	-	-	-
16	30	접종군	-	-	-
		대조군	-	-	-

* : RT-PCR 반응 음성

6) 시험계군의 혈구응집억제(HI) 항체가

백신접종군과 대조군의 HI 항체를 백신접종 후 20주간 정해진 시간에 검사를 하였다. 시험기간 동안 대조군에는 항체가 검출되지 않아 이 농장에는 조류 인플루엔자 감염이 없었던 것으로 판단된다. 백신접종은 1회 실시되었으며 항체는 백신접종 후 상승을 하였으나 접종 후 8주령부터는 감소를 시작하여 시험종료일에는 4.4(log2) 정도를 유지하였다. 시험종료후 본 계군에 대하여 67주령에 검사하였을 때 대조군에서 항체양성이 형성되어 시험종료 후 감염이 있었던 것을 알 수 있었다.

표6-6. 제3농장의 주령별 혈구응집억제 항체역가 분포 및 결과

백신접종 후 주령	실제 주령	구분	HI 항체역가(log2)								평균	
			0	1	2	3	4	5	6	7		8
접종전	13	접종군	30*								0	
		대조군	20								0	
1	15	접종군	8	8	8	5		1			2.5±1.3**	
		대조군	20								0	
2	16	접종군				3	12	11	3		1	4.6±0.9
		대조군	20								0	
3	17	접종군					1	16	10	2		5.4±0.7
		대조군	20								0	
4	18	접종군						11	12	5		5.8±0.7
		대조군	20								0	
8	22	접종군				1	13	6	7	1		4.8±1.0
		대조군	20								0	
12	26	접종군		3	8	9	5	5				4.0±1.2
		대조군	20								0	
16	30	접종군				8	11	8	2			4.1±0.9
		대조군	20								0	
20	34	접종군				4	13	7	5			4.4±0.9
		대조군	20								0	
53	67	접종군					3		4	10	13	7.0±1.2
		대조군		1	9	5	2					3.5±0.8

* : 해당 항체가에 대한 시험계의 수

** : HI 역가의 평균(log2)±표준편차

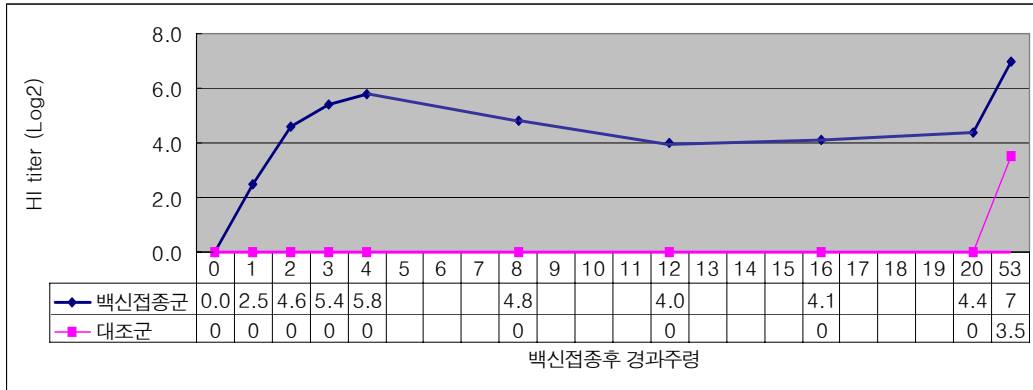


그림6-3. 제3농장의 주령별 혈구응집억제 항체역가의 변화

가. 제4농장

1) 농장개요

- 농 장 명 : 다인농장 (기호 : Exp0401aif-T4)
- 주 소 : 경상북도 의성군 다인면 신락원 29-20
- 성 명 : 최 태 만
- 전 화 : 054-862-5929
- 사육규모 : 3,160수(1계사)
- 시험계군
 - 품 종 : 하이라인 산란계
 - 입 추 일 : 2004년 5월 4일
 - 시 험 수 : 3,160수(1동)

7) 시험계군의 개요

산란계 전문농장으로서 중추전문농장에서 70일령 중추를 구입하였다. 본 농장은 매번 All in-All out을 실시하는 농장으로 질병통제가 철저한 농장이다. 본 시험은 접종군 2,340수에 대하여 120일령에 0.5ml를 대퇴부 근육에 접종하고, 대조군은 접종하지 않은 820수로 하였다.

8) 농장 백신 접종 프로그램

표7-1. 제4농장의 백신 접종 프로그램

접종시기	접종일자	백신명
0일령	2004년 5월 3일	뉴캐슬병(B1) 생독백신 분무
7일령	2004년 5월 10일	뉴캐슬병(B1)-전염성기관지염 생독 혼합백신
14일령	2004년 5월 17일	감보르병 생독백신
18일령	2004년 5월 21일	뉴캐슬병
22일령	2004년 5월 25일	감보로병 생독백신
27일령	2004년 5월 29일	뉴캐슬병(크론)-전염성기관지염 생독 혼합백신
35일령	2004년 6월 7일	뉴캐슬병사독, 계두 생독백신
46일령	2004년 6월 18일	티푸스 생독백신
56일령	2004년 6월 28일	닭 전염성후두기관염 백신
90일령	2004년 8월 2일	뇌척수염 생독백신
100일령	2004년 8월 12일	티푸스 생독백신
110일령	2004년 8월 22일	뉴캐슬-전염성기관지염혼합 오일백신
120일령	2005년 9월 2일	조류인플루엔자 오일백신

9) 시험백신의 안전성시험

시험백신의 닭에 대한 안전성을 확인하기 위하여 120일령의 건강한 닭 50 마리(시험 30마리, 대조 20마리)를 선정하여 시험군에는 대퇴부근육 0.5ml씩 1회 접종하고 무처치 대조군과 같이 14일간 임상관찰을 실시하였다.

가) 임상증상

시험백신의 닭에 대한 안전성을 확인하기 위하여 120일령의 건강한 닭 50 마리(시험 30마리, 대조 20마리)를 선정하여 시험군에는 대퇴부근육에 0.5ml씩 1회 접종하고 무처치 대조군과 같이 14일간 임상관찰을 실시하였다.

표7-2. 제4농장의 시험백신 접종 후 임상증상 관찰 결과

구분	접종주령 및 시험수	접종량 및 접종부위	관찰 일수	임상증상				
				설사	식욕 감퇴	과민 반응	폐사	접종 반응
시험	95일령 2,340수 (30수 라벨)	0.5ml 대퇴부근육	14일	없음	없음	없음	없음	없음
대조	95일령 820수 (20수 라벨)	무처리	14일	없음	없음	없음	없음	없음

나) 산란율 및 비정상란율

백신접종 후 14주(31주령)까지는 접종군과 대조군이 동일한 산란율을 보였으나, 32주령에 저병원성조류인플루엔자의 감염으로 40주령까지는 접종군이 대조군보다 10%가량 높은 산란율을 보였다. 비정상란 발생율은 두 계군 모두 1~3%정도로 동일한 양상을 보였다.

표7-3. 제4농장의 시험백신 접종 후 산란율 및 비정상란율

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군(2,340수)		대조군(820수)	
		산란율(%)	비정상란율(%)	산란율(%)	비정상란율(%)
3	20	44.0	2.0	40.0	2.0
4	21	65.4	2.0	65.9	2.0
5	22	83.4	2.0	83.0	2.1
6	23	87.4	2.1	88.2	2.0
7	24	90.1	1.7	88.2	2.0
8	25	89.3	2.0	88.4	1.8
9	26	93.0	1.3	91.0	1.2
10	27	90.6	2.4	92.6	1.2
11	28	89.2	1.9	88.8	1.8
12	29	93.7	2.0	90.8	1.4
13	30	96.7	2.1	92.4	1.4
14	31	92.2	2.5	92.1	1.4
15	32	90.8	2.4	83.2	2.2
16	33	92.2	2.4	82.3	2.2
17	34	92.6	1.6	83.3	0.9
18	35	93.4	2.1	85.7	2.2
19	36	93.0	2.5	85.4	2.4
20	37	92.5	2.6	86.0	2.3
21	38	90.0	2.0	86.8	2.2
22	39	93.0	2.9	83.1	3.4
23	40	92.2	2.5	82.9	2.7

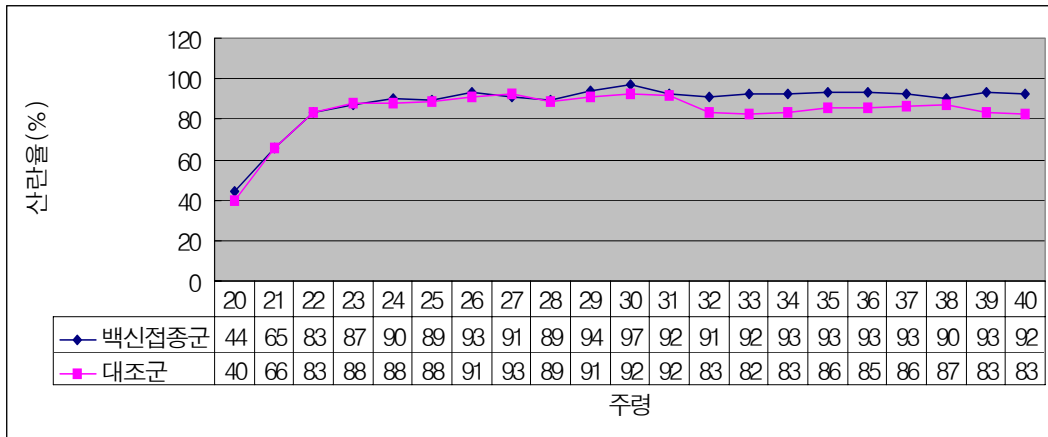


그림7-1. 제4농장의 시험백신 접종 후 산란율의 변화

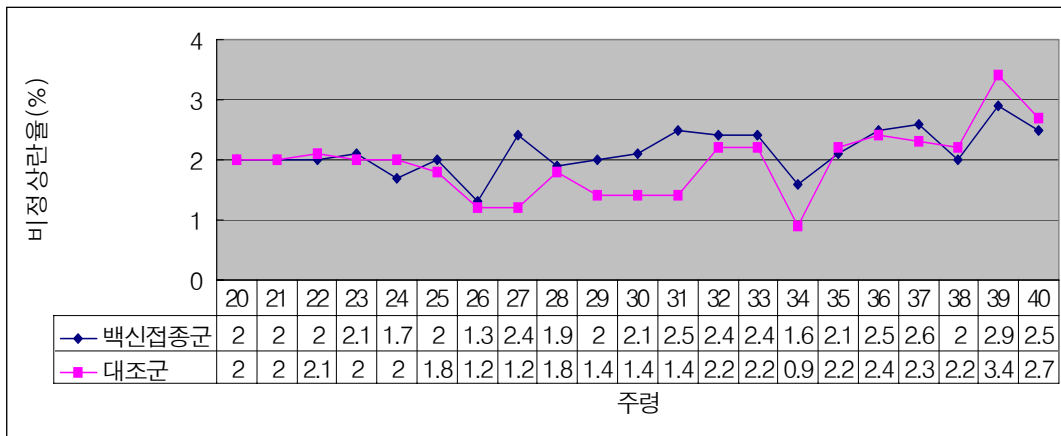


그림7-2. 제4농장의 시험백신 접종 후 비정상란율의 변화

다) 폐사율

주간폐사율은 대조군과 백신접종군간에 차이가 인정이 되지 않았으며 두 계군 모두 0.3% 이하로 국내 정상계군의 평균수준을 유지하여 백신접종에 의한 부작용은 없는 것으로 판단이 되었다. 또한, 폐사원인도 복막염 등 일반 세균성 질병에 의한 것으로 특별히 백신접종에 의한 것으로 인정되지 않았다.

표7-4. 제4농장의 시험백신 접종 후 주간폐사(율) 및 폐사 원인

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군(2,340수)		대조군(820수)	
		주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인	주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인
3	20	1(0.04)	대장균	1(0.12)	대장균
4	21	1(0.04)	탈홍	0(0)	-
5	22	1(0.04)	탈홍	0(0)	-
6	23	5(0.21)	대장균	3(0.37)	대장균
7	24	3(0.13)	대장균	1(0.12)	대장균
8	25	3(0.13)	대장균	1(0.12)	대장균
9	26	4(0.17)	복막염	1(0.12)	복막염
10	27	2(0.09)	복막염	1(0.12)	복막염
11	28	1(0.04)	대장균	0(0)	-
12	29	2(0.09)	약추	0(0)	-
13	30	2(0.09)	복막염	1(0.12)	요산침착
14	31	1(0.04)	약추	0(0)	-
15	32	0(0)	-	1(0.12)	약추
16	33	1(0.04)	복막염	0(0)	-
17	34	0(0)	-	0(0)	-
18	35	1(0.04)	약추	0(0)	-
19	36	0(0)	-	0(0)	-
20	37	0(0)	-	0(0)	-
21	38	0(0)	-	0(0)	-
22	39	0(0)	-	0(0)	-
23	40	1(0.04)	약추	0(0)	-

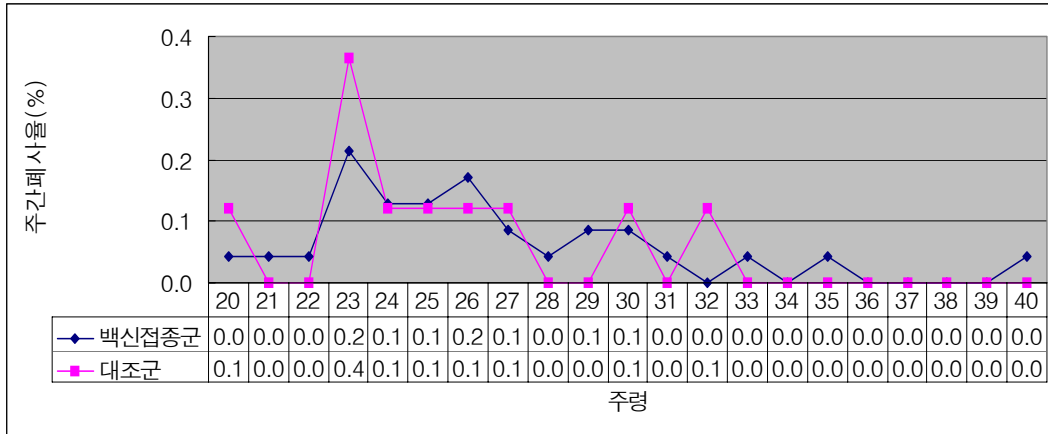


그림7-3. 제4농장의 시험백신 접종 후 주간 폐사율의 변화

10) 시험 중 조류인플루엔자 감염 여부 확인 시험

시험기간 중 농장의 조류인플루엔자의 감염여부를 파악하기 위하여 백신접종 8주 및 16주후에 분변(1개 시료 당 10개 분변), 기관(1 개 시료 당 5수의 기관), 총배설강(1 개 시료당 5수의 총배설강)시료를 채취하여 RT-PCR 방법으로 검사하였다. 혈청학적으로 조류인플루엔자 양성으로 반전이 되었으나 바이러스는 분리되지 않았다. 그 이유는 바이러스 분리 횟수가 적었다는 점과 조류인플루엔자 바이러스가 쉽게 파괴된다는 특성에 의한 것으로 추정하였다.

표6-24. 제4농장의 RT-PCR을 통한 조류인플루엔자 감염여부 결과

접종후 주령	실제 주령	구분	시 료		
			기관	총배설강	분변
8	26	백신접종군	-*	-	-
		대조군	-	-	-
16	34	백신접종군	-	-	-
		대조군	-	-	-

* : RT-PCR 검사 음성

11) 시험계군의 혈구응집억제(HI) 항체가

백신접종군과 대조군의 조류인플루엔자에 대한 항체가를 백신접종 후 20주간 정해진 시간에 검사를 하였다. 대조군에서 접종 후 8주부터 HI 항체가가 검출되어 접종 후 16주에는 급격히 상승을 하여 이 농장에는 조류인플루엔자의 감염이 있었던 것으로 판단이 되었다. 백신접종은 1회 실시되었으며 항체가는 백신접종 후 상승을 하였으나 8주령부터 감소를 시작하여 시험종료일에는 6.9(log2) 정도를 유지하였다.

표7-5. 제4농장의 주령별 혈구응집억제 항체역가 분포 및 결과

백신접종 후 주령	실제 주령	구분	HI 항체역가(log2)								평균	
			0	1	2	3	4	5	6	7		8
접종전	17	접종군	30								0	
		대조군	20								0	
1	19	접종군	7		3	7	12	1				2.5±1.6**
		대조군	20								0	
2	20	접종군	8	2	1	2	7	5	5			2.9±2.1
		대조군	20								0	
3	21	접종군		1	3	6	10	7	3			4.4±1.8
		대조군	20								0	
4	22	접종군					7	15	8			5.0±0.7
		대조군	19								0	
8	26	접종군						3	7	15	5	6.7±0.9
		대조군	15	3	1	1						1.0±0.0
12	30	접종군						4	7	12	7	6.7±1.0
		대조군	8	5	3	3	1					1.8±1.0
16	34	접종군					1	8	6	10	5	6.3±1.1
		대조군	2				5	5	5	2		5.1±1.3
20	38	접종군					2		8	6	14	6.9±1.2
		대조군					2	7	4	3	4	5.9±1.3
49	67	접종군			1	1	2	8	8	3	7	5.9±1.6
		대조군			3	5	9	3				4.3±0.9

* : 해당 항체가에 대한 시험계의 수

** : HI 역가의 평균(log2)±표준편차

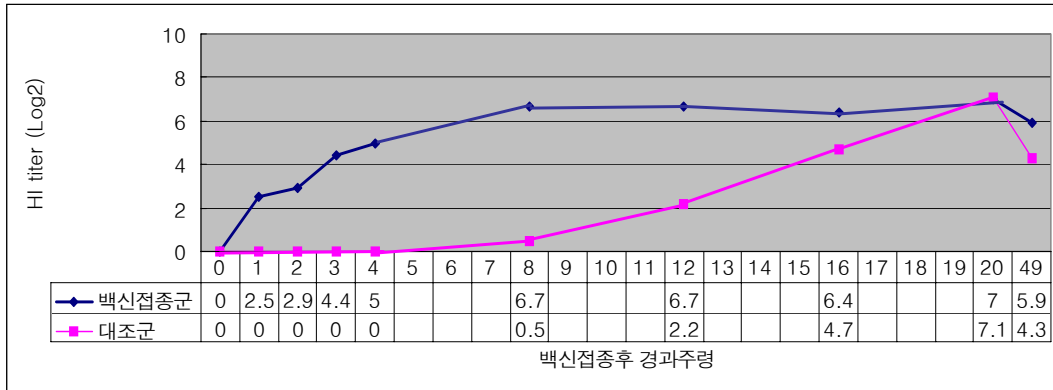


그림7-4. 제4농장의 주령별 혈구응집억제 항체역가의 변화

라. 제5농장

1) 농장개요

- 농 장 명 : 상망농장 (기호 : Exp0401aif-T5)
- 주 소 : 경상북도 영주시 상망동 산 516
- 성 명 : 이 상 원
- 전 화 : 054-633-6720
- 사육규모 : 33,000수 (1, 2, 3동)
- 시험계군
 - 품 종 : 하이라인 산란계
 - 입 추 일 : 2004년 9월 11일
 - 시 험 수 : 8,400수 3동 계사(신축건물)

2) 실험계군의 개요

본 농장은 산란계 전문농장으로 2개의 농장 중 제2농장이다. 이 농장의 계사는 2004년 10월 5일 신축된 농장으로 이번에 처음 중추를 구입하여 입식 하였다.

야외시험은 백신접종군 7,350수에 대하여 1차 82일령, 2차 125일령에 각각 0.5ml을 대퇴부근육 접종을 실시하였고, 대조군은 백신을 접종하지 않은 1,050수로 하였다.

3) 농장 백신 접종 프로그램

표8-1. 제5농장의 백신 접종 프로그램

접종시기	접종일자	백신명
0일령	2004년 9월 10일	뉴캐슬병(B1) 생독백신 분무
7일령	2004년 9월 17일	뉴캐슬병(B1) .전염성기관지염 생독 혼합백신
14일령	2004년 9월 24일	감보르병 생독백신
18일령	2004년 9월 30일	뉴캐슬병
22일령	2004년 10월 4일	감보로병 생독백신
27일령	2004년 10월 9일	뉴캐슬병(크론).전염성기관지염 생독 혼합백신
35일령	2004년 10월 17일	뉴캐슬병사독. 계두 생독백신
46일령	2004년 10월 28일	티푸스 생독백신
56일령	2004년 11월 7일	닭 전염성후두기관염 백신
82일령	2004년 12월 2일	조류인플루엔자 오일백신
90일령	2004년 12월 10일	AE음수
100일령	2004년 12월 20일	티푸스 생독백신
110일령	2004년 12월 30일	BN오일
125일령	2005년 1월 14일	조류인플루엔자 오일백신

4) 시험백신의 안전성시험

시험백신의 닭에 대한 안전성을 확인하기 위하여 82일령의 건강한 닭 50마리(시험 30마리, 대조 20마리)를 선정하여 시험군에는 대퇴부근육에 0.5ml씩 접종하였으며 125일령에 2차 접종을 추가로 실시하였다. 무처치 대조군과 같이 각각 백신접종 후 14일 동안 임상관찰을 실시하였다.

가) 임상증상

14일간의 임상증상관찰기간동안 선정된 50수에 대하여 정밀관찰을 실시하였던 바 백신접종에 따른 폐사, 식욕감퇴, 설사 혹은 과민반응이 관찰되지 않았으며 접종 부위의 조직반응도 인정되지 않았다.

표8-2. 제5농장의 시험백신 접종 후 임상증상 관찰 결과

구분	접종주령 및 시험수	접종량 및 접종부위	관찰 일수	임상증상				
				설사	식욕 감퇴	과민 반응	폐사	접종 반응
1차 접종	시험 82일령 7,350수 (30수 라벨)	0.5ml 대퇴부근육	14일	없음	없음	없음	없음	없음
	대조 82일령 1,050수 (20수 라벨)	무처치	14일	없음	없음	없음	없음	없음
2차 접종	시험 125일령 7,350수 (30수 라벨)	0.5ml 대퇴부근육	14일	없음	없음	없음	없음	없음
	대조 125일령 1,050수 (20수 라벨)	무처치	14일	없음	없음	없음	없음	없음

나) 산란율 및 비정상란율

40주령까지의 산란율을 비교하여 보면 대조군과 백신접종군 사이에 별다른 차이가 없었다. 따라서 백신접종에 의한 산란율저하는 인정이 되지 않았다. 그러나 28주령부터 뉴캐슬(ND) 감염에 의한 산란저하 및 탈색란 발생이 급격히 증가하였다. ND 검사는 기관과 총배설강의 시료 및 혈액을 이용하였으며 감염여부를 혈청검사와 PCR 방법으로 확인하였다. 바이러스는 분리되지 않았다.

표8-3. 제5농장의 시험백신접종 후 산란율 및 비정상란율

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군(7,350수)		대조군(1,050수)	
		산란율(%)	비정상란율(%)	산란율(%)	비정상란율(%)
2	20	5.0	0.5	6.0	0.4
3	21	15.0	0.6	16.0	0.5
4	22	59.0	0.6	60.0	0.6
5	23	90.0	1.2	90.4	1.0
6	24	92.2	1.3	92.3	1.2
7	25	94.0	1.1	94.3	1.1
8	26	94.1	1.0	94.3	1.0
9	27	88.0	2.3	87.0	2.5
10	28	80.2	7.5	80.5	7.9
11	29	86.0	7.8	85.2	8.0
12	30	88.1	6.8	88.9	7.0
13	31	90.1	5.2	90.4	5.0
14	32	90.8	5.0	91.0	4.6
15	33	91.5	4.9	91.8	5.0
16	34	92.4	4.8	92.2	4.5
17	35	92.6	4.5	92.8	4.7
18	36	88.4	9.0	88.7	9.1
19	37	85.2	10.2	86.2	10.7
20	38	88.0	6.5	88.2	6.9
21	39	91.5	4.5	92.0	4.3
22	40	92.5	4.0	93.0	4.1

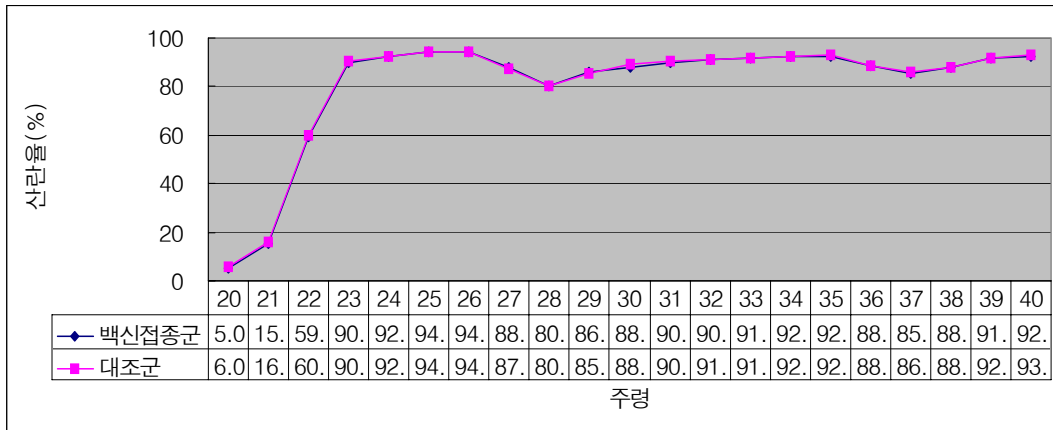


그림8-1. 제5농장의 시험백신 접종 후 산란율의 변화

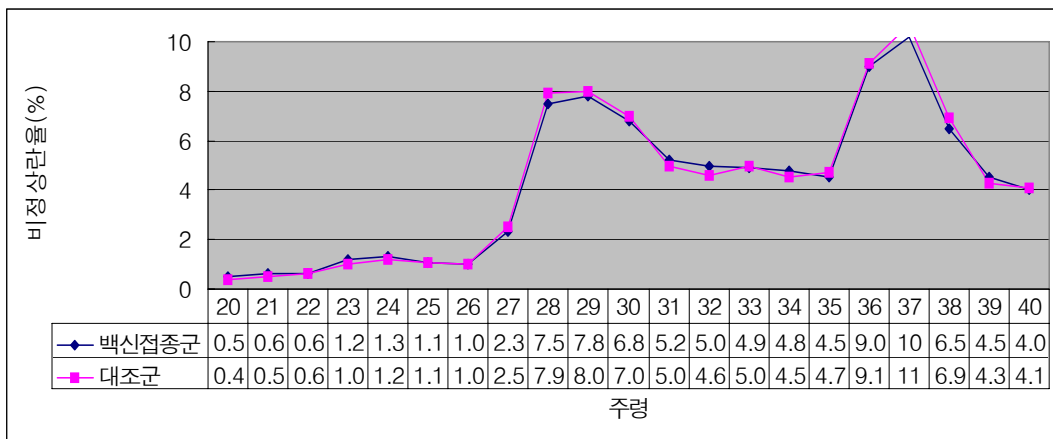


그림8-2. 제5농장의 시험백신 접종 후 비정상란율의 변화

다) 폐사율

주간폐사율은 백신접종군에 비하여 대조군이 다소 높게 형성이 되었으며 특히 34주령에서 38주령 사이에 대조군에서 좀더 많은 폐사계가 발견되었다. 이것은 마렉병과 대장균에 의한 것으로 판단이 되었다. 따라서 본 시험계군에서 백신접종에 의한 폐사는 인정되지 않았다.

표8-4. 제5농장의 백신 접종 후 주간 폐사(율) 및 폐사 확인

백신접종 후 주령	실제 주령	시험군(7,350수)		대조군(1,050수)	
		주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인	주간폐사수 및 폐사율(%)	폐사원인
2	20	1(0.01)	약추	1(0.10)	약추
3	21	2(0.03)	약추	0(0)	-
4	22	1(0.01)	약추	1(0.10)	약추
5	23	2(0.03)	약추	1(0.10)	약추
6	24	1(0.01)	약추	1(0.10)	약추
7	25	3(0.04)	대장균	1(0.10)	약추
8	26	2(0.03)	대장균	0(0)	-
9	27	2(0.03)	탈홍	1(0.10)	약추
10	28	3(0.04)	대장균	1(0.10)	대장균
11	29	1(0.01)	약추	1(0.10)	대장균
12	30	2(0.03)	대장균	1(0.10)	대장균
13	31	2(0.03)	대장균	0(0)	-
14	32	3(0.04)	약추, 대장균	1(0.10)	탈홍
15	33	4(0.05)	약추, 대장균	1(0.10)	탈홍
16	34	5(0.07)	탈홍, 대장균	3(0.29)	약추, 대장균
17	35	6(0.08)	마렉병, 약추	3(0.29)	마렉병, 대장균
18	36	7(0.10)	약추, 대장균	4(0.38)	탈홍, 수란관염
19	37	8(0.11)	대장균, 다리관절	5(0.48)	약추, 대장균
20	38	8(0.11)	수란관염, 대장균	3(0.29)	관절염, 약추
21	39	7(0.10)	대장균, 약추	4(0.38)	탈홍, 수란관염
22	40	6(0.08)	수란관염, 대장균	3(0.29)	약추, 관절염

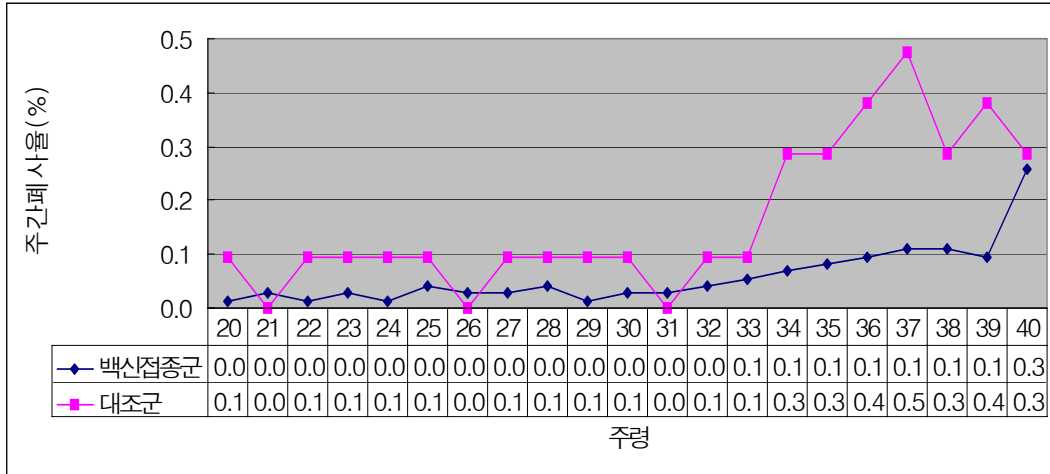


그림8-3. 제5농장의 백신접종 후 주간 배사율의 변화

5) 시험 중 조류인플루엔자 감염 여부 확인 시험

시험기간 중 농장의 조류인플루엔자의 감염여부를 파악하기 위하여 백신접종 8주 및 16주후에 분변(1개 시료 당 10개 분변), 기관(1개 시료 당 5수의 기관), 총배설강(1개 시료당 5수의 총배설강)시료를 채취하여 RT-PCR 방법으로 검사하였다. 양성일 경우 계란접종을 계획하였다.

표8-4. 제5농장의 RT-PCR을 통한 조류인플루엔자 감염여부 결과

접종후 주령	실제 주령	구분	시 료		
			기관	총배설강	분변
8	26	접종군	-*	-	-
		대조군	-	-	-
16	34	접종군	-	-	-
		대조군	-	-	-

* : RT-PCR 검사 음성

6) 시험계군의 혈구응집억제(HI) 항체가

백신 접종군과 대조군의 조류 인플루엔자 항체가를 백신접종 후 20주간 정해진 시간에 검사를 하였다. 시험기간 동안 대조군에는 HI 항체가가 검출되지 않아 이 농장에는 조류 인플루엔자 감염이 없었던 것으로 판단된다. 백신접종은 2회에 걸쳐 실

시되었으며 항체가는 백신접종 후 상승을 하였으나 12주령부터는 감소를 시작하여 시험종료일에는 6.5(log2) 정도를 유지하였다.

표8-5. 제5농장의 주령별 혈구응집억제 항체역가의 분포 및 결과

백신접종 후 주령	실제 주령	구분	HI 항체역가(log2)										평균	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8			
접종전	12	접종군	30*											0
		대조군	20											0
4	17	접종군						3	5	12	10	7.0±1.0**		
		대조군	19											0
8	22	접종군					2	2	7	19	7.4±0.9			
		대조군	20											0
12	26	접종군				3	9	11	6	6.7±0.9				
		대조군	20											0
16	30	접종군			1	1	3	12	10	3	6.3±1.1			
		대조군	20											0
20	34	접종군				2	5	14	4	5	5.7±0.8			
		대조군	20											0
24	38	접종군			1	4	9	7	9	6.6±1.2				
		대조군	20											0

* : 해당 항체가에 대한 시험계의 수

** : HI 역가의 평균(log2)±표준편차

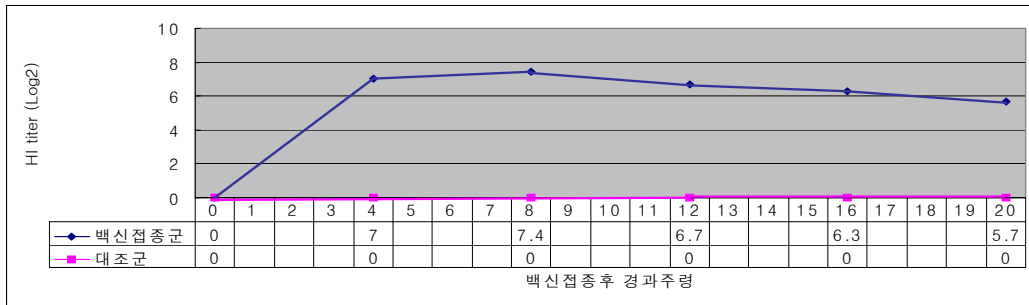


그림8-4. 제5농장의 주령별 혈구응집억제 항체역가의 변화

제4절 백신용 재조합 바이러스의 개발

1. 재조합 바이러스의 생산과 확인

재조합 바이러스 4-CE2-x을 HI test와 RT-PCR 결과 혈청형은 H9N3로 확인할 수 있었다(Table 4). 더불어 HA 단백질 분절부위에 대한 염기서열 분석결과 고병원성 인플루엔자(HPAI)의 특성인 염기성 아미노산의 배열이 존재하지 않은 약병원성 인플루엔자(LPAI)의 구조를 갖고 있음이 판명되었다.

2. Primer의 확인

AIV detection을 위해 제작된 oligonucleotide primers(H9, H5, N2 그리고 N3)는 다른 호흡기 질병 바이러스와는 반응하지 않았다(Fig. 1).

3. 병원성 조사

임상증상관찰 실험에서는 세 바이러스 접종군에서 폐사와 특별한 임상증상을 보이지 않았으나, 접종 후 3~4일경에 약간의 우울증상을 보였다. 이는 다음날 아침에 빠르게 회복하는 전형적인 약병원성 조류인플루엔자의 임상증상을 나타내었다(Lee *et al.*, 2000).

재분리 율 조사에서는 계란접종 실험결과 MS96은 접종 3일째와 5일째에 총배설강 면봉채취 시료에서 바이러스가 분리되었으며, ADL0408의 경우는 분리되지 않았다. 반면에 재조합 바이러스도 접종 3일째와 5일째에 바이러스가 총배설강 면봉채취 시료에서 분리되었다. MS96과 재조합 바이러스는 기관의 면봉 채취시료에서는 재분리가 되지 않았으며 총배설강 면봉채취 시료에서는 서로 유사한 양상을 보였다. 즉 바이러스의 배출은 기관보다는 분변으로의 배출이 다소 높은 것으로 판단되었다(Table 5)(Fig. 2).

실험의 결과를 종합적으로 살펴봤을 때 바이러스간의 분리양상은 상당히 유사하였으며, 백신후보주인 재조합바이러스는 약병원성 조류인플루엔자의 특성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.

실험중에 얻는 혈청 시료를 가지고 HI test를 H9과 H5에 대해서 한 결과 MS96접종군은 H9에서만 Hemagglutinin inhibition 경향을 보였으나 재조합 바이러스인 AI05GA에서는 H9는 MS96보다는 약하지만 비슷하게 Hemagglutinin inhibition 경향을 나타내었으며 또한 H5에 대해서도 약하게 Hemagglutinin inhibition 경향을 보여 주었다. ADL0408의 접종군에서는 바이러스 배출은 확인되지 않았으나 혈청검사에서 H5에 대한 억제 경향이 있는 것으로 보아 바이러스의 감염은 확인되었다 (Table 6 and Table 7).

4. 염기서열비교

국내분리주인 MA96, ADL0408 그리고 재조합바이러스 AI05GA의 NP, HA9그리고

NA3 유전자 차이와 유사성을 알아보기 위하여 이들 유전자의 염기서열에 대한 추정 아미노산 서열을 비교 분석하였다.

국내분리주 MS96의 NP와 HA9 유전자는 GenBank에서 염기서열을 다운로드 받았으며 ADL0408의 NP와 NA3유전자 그리고 AI05GA의 NP와 HA9 유전자는 TA vector에 넣어서 genotec. co. kr에 sequencing을 의뢰하여 유전자를 분석한 결과 NP 유전자는 1539, HA9 유전자는 1683 그리고 NA3 유전자는 1329개의 염기로 구성되어 있음을 확인하였다. Chromat program을 이용하여 이들 유전자를 추정 아미노산은 알아낸 뒤 EMBOSS-Align으로 각 아미노산 서열의 유사성을 비교분석 한 결과 AI05GA와 MS96의 NP 유전자의 아미노산은 10개(35, 77, 84, 101, 105, 146, 157, 225, 423 그리고 498)에서 차이가 있음이 확인되었으며, AI05GA와 ADL0408의 NP 유전자의 아미노산은 2개(205와 263)에서 차이가 있음이 확인되었다. 각 바이러스의 일치성은 99.3%와 99.6%로 AI05GA와 ADL0408의 일치성이 조금 더 높게 나타났다. AI05GA와 MS96의 HA9 유전자의 아미노산은 6개(112, 129, 133, 234, 235 그리고 537)에서 차이가 나타났으며 99.3%의 일치성을 보였다. AI05GA와 ADL0408의 NA3 유전자의 아미노산은 100% 일치성을 보였다(Fig. 4)(Table 8).

Table 4. Generation of AIV reassortant virus in SPF egg

Passage number	HA	HI		RT-PCR				
		H9	H5	H9	H5	N2	N3	NP
4-CE2-1	2(8)	2(8)	0	+	-	-	+	+
4-CE2-2	2(9)	2(7)	2(1)	+	-	-	+	+
4-CE2-3	2(9)	2(7)	0	+	-	-	+	+
4-CE2-4	2(10)	2(7)	0	+	-	-	+	+
4-CE2-5	2(8)	2(7)	0	+	-	-	+	+
4-CE2-6	2(9)	2(7)	0	+	-	-	+	+
4-CE2-7	2(9)	2(8)	0	+	-	-	+	+
4-CE2-8	2(9)	2(8)	0	+	-	-	+	+
4-CE2-9	2(9)	2(8)	0	+	-	-	+	+
4-CE2-10	2(8)	2(8)	0	+	-	-	+	+
4-CE2-11	2(10)	2(7)	0	+	-	-	+	+

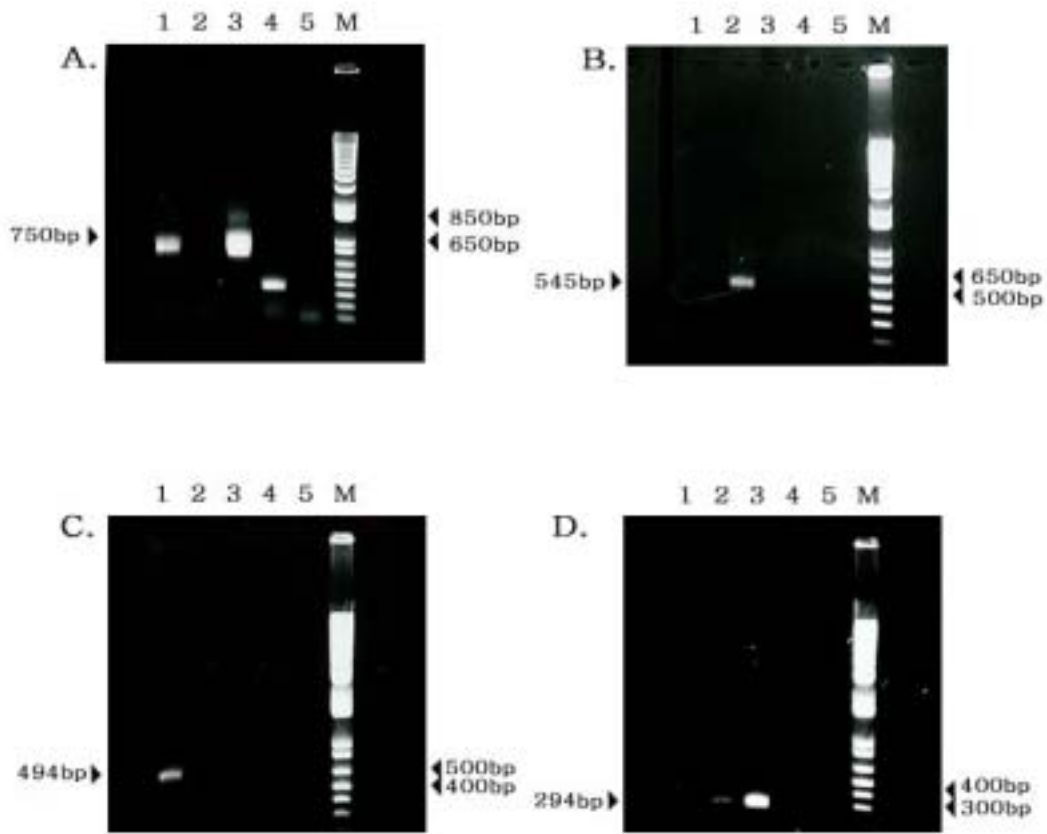


Fig. 1. Reactivity of primers against other respiratory viruses.

(A) RT-PCR by H9 primer. lane 1 : MS96, lane 2 : ADL0408, lane 3 : AI05GA, lane 4 : New Castle virus and lane 5 : Infectious Bronchiolitis virus. M means 1kb DNA ladder lane. ; (B) RT-PCR by H5 primer. ; (C) RT-PCR by N2 primer. ; (D) RT-PCR by N3 primer.

Table 5. Virus reisolation from swap samples after challenge of AI05GA, MS96 and ADL0408

Groups ¹	Virus reisolation of day post inoculation												
	0		3		5		10		14		21		
	T ²	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	
AI05GA	0/3 ³	0/3	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
MS96	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
ADL0408	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Control	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

1 : AI05GA with dose of $10^{8.4}$ EID₅₀/ml, MS96 with dose of $10^{8.7}$ EID₅₀/m and ADL0408 with dose of $10^{7.7}$ EID₅₀/ml were used for challenge

2 : T : Trachea swap, C : Cloaca swap

3 : Number of birds reisolated virus/ number of birds tested

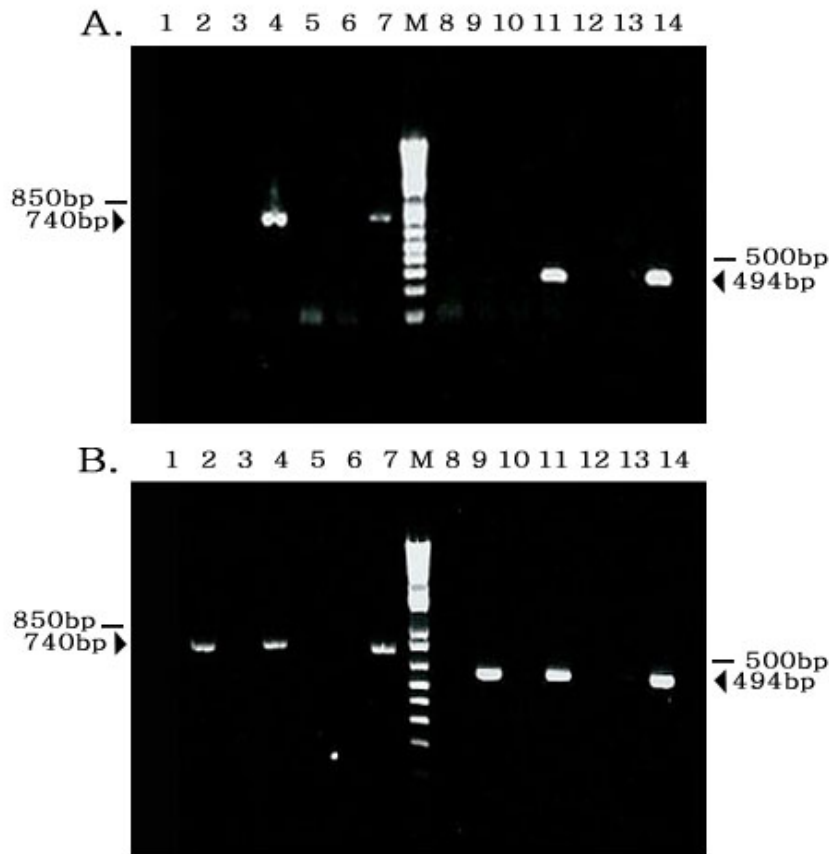
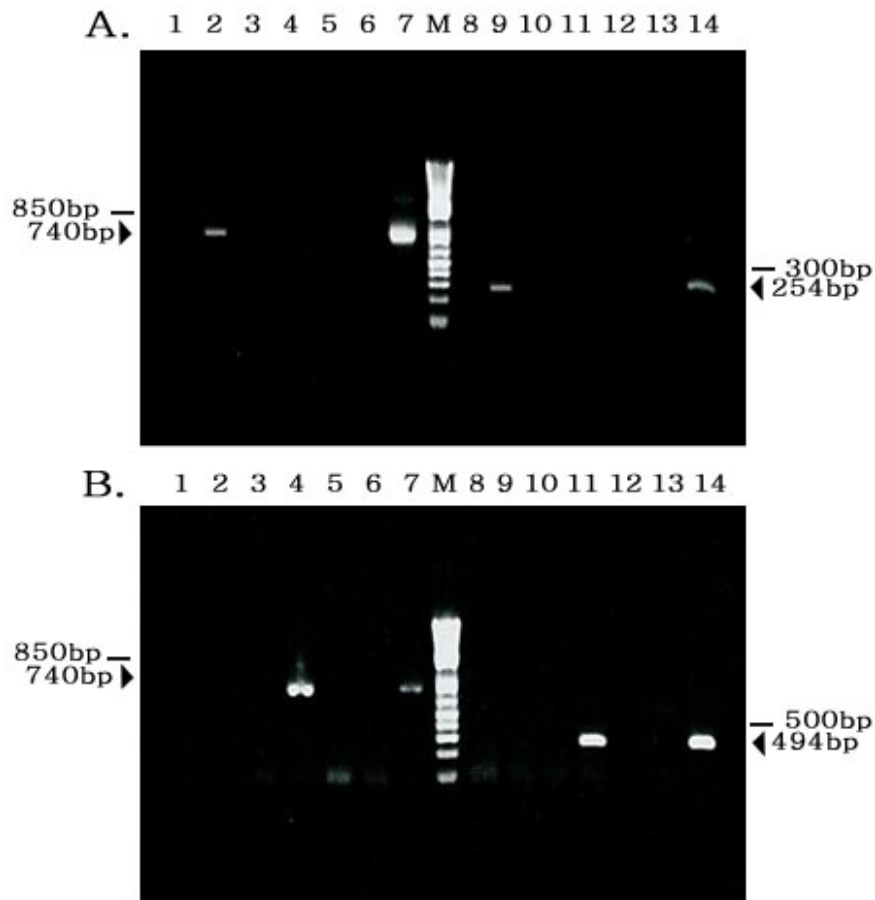


Fig. 2. Detection of H9 and N2 gene of Ms96 virus by RT-PCR.

A) lane 1~7 RT-PCR by H9 and lane 8~14 RT-PCR by N2. lane 1, 3, 5, 8, 10 and 12 samples from trachea at 3DPI respectively. lane 2, 4, 6, 9, 11 and 13 samples from cloaca at 3DPI respectively. lane 7 and 14 positive samples. M means 1kb DNA ladder lane. ; (B) lane 1~7 RT-PCR by H9 and lane 8~14 RT-PCR by N2. lane 1, 3, 5, 8, 10 and 12 samples from trachea at 5DPI respectively. lane 2, 4, 6, 9, 11 and 13 samples from cloaca at 5DPI respectively. lane 7 and 14 positive samples. M means 1kb DNA ladder lane.

Fig. 3. Detection of H9 and N3 gene of AI05GA virus by RT-PCR.

(A) lane 1~7 RT-PCR by H9 and lane 8~14 RT-PCR by N3. lane 1, 3, 5, 8, 10 and 12 samples from trachea at 3DPI respectively. lane 2, 4, 6, 9, 11 and 13 samples from cloaca at 3DPI respectively. lane 7 and 14 positive samples. M



means 1kb DNA ladder lane. ; (B) lane 1~7 RT-PCR by H9 and lane 8~14 RT-PCR by N3. lane 1, 3, 5, 8, 10 and 12 samples from trachea at 5DPI respectively. lane 2, 4, 6, 9,11 and 13 samples from cloaca at 5DPI respectively. lane 7 and 14 positive samples. M means 1kb DNA ladder lane.

Table 6. Serum titration of the SPF chicken of challenged with AI

viruses by HI test (H9).

Groups	HI titers of day post inoculation								
	5			10			21		
AI05GA	2(0)	2(0)	2(0)	2(7)	2(9)	2(8)	2(8)	2(8)	2(8)
MS96	2(0)	2(0)	2(0)	2(7)	2(8)	2(7)	2(10)	2(8)	2(9)
ADL0408	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)
Control	2(0)	2(0)	2(0)	NT	NT	NT	2(0)	2(0)	2(0)

NT : not tested

Table 7. Serum titration of the SPF chicken of challenged with AI viruses by HI test (H5).

Groups	HI titers of day post inoculation								
	5			10			21		
AI05GA	2(0)	2(0)	2(0)	2(3)	2(3)	2(3)	2(3)	2(2)	2(4)
MS96	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)	2(0)
ADL0408	2(0)	2(2)	2(0)	2(5)	2(4)	2(7)	2(6)	2(8)	2(5)
Control	2(0)	2(0)	2(0)	NT	NT	NT	2(0)	2(0)	2(0)

NT : not tested

H9N3/NP
MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGGIGRFYIQMCTELKLS

H9N2/NP
MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGAIGRFYIQMCTELKLS

H5N3/NP
MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGGIGRFYIQMCTELKLS

100

H9N3/NP
DYEGRLIQNSITIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRR

H9N2/NP
DYEGRLIQNSITIERMVLSAFDERRNRYLEEHPNAGKDPKKTGGPIYRRR

H5N3/NP
DYEGRLIQNSITIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRR

150

H9N3/NP
DGKWVRELILYDKEEIRRIWRQANNGEDATAGLTHLMIWHSNLNDA^ATYQR

H9N2/NP
EGKWMRELILYDKEEIRRIWRQANNGEDATAGLTHLMIWHSNLND^TTYQR

H5N3/NP
DGKWVRELILYDKEEIRRIWRQANNGEDATAGLTHLMIWHSNLNDA^ATYQR

200

H9N3/NP
TRALV^RTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGA AVKGVGTMVMELIRMIKRG

H9N2/NP
TRALV^RAGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGA AVKGVGTMVMELIRMIKRG

H5N3/NP
TRALV^RTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGA AVKGVGTMVMELIRMIKRG

250

H9N3/NP
INDRNFWRGENGRRTRIA YERM CN^T LKGFQTAAQRAMMDQVRESRNP GN

H9N2/NP
INDRNFWRGENGRRTRIA YERM CN^L KGFQTAAQRAMMDQVRESRNP GN

H5N3/NP
INDRNFWRGENGRRTRIA YERM CN^L KGFQTAAQRAMMDQVRESRNP GN

300

H9N3/NP
AEIEDLIFLARS^A LILRGSVAHKSLPACVYGLAVASGYDFEREGYSLVG

continued

H9N2/NP
AEIEDLIFLARSALILRGSVAHKSCLPACVYGLAVASGYDFEREGYSLVG

H5N3/NP
AEIEDLIFLARSTLILRGSVAHKSCLPACVYGLAVASGYDFEREGYSLVG

350

H9N3/NP
IDPFRLQNSQVFLIRPNENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVSSFIRGT

H9N2/NP
IDPFRLQNSQVFLIRPNENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVSSFIRGT

H5N3/NP
IDPFRLQNSQVFLIRPNENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVSSFIRGT

400

H9N3/NP
RVVPRGQLSTRGVQIASNENMETMDSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR

H9N2/NP
RVVPRGQLSTRGVQIASNENMETMDSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR

H5N3/NP
RVVPRGQLSTRGVQIASNENMETMDSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR

450

H9N3/NP
ASAGQISVQPTFSVQRNLPFERSTIMAAFTGNTEGRTSDMRTEIIRMES

H9N2/NP
ASAGQISVQPTFSVQRNLPFERATIMAAFTGNTEGRTSDMRTEIIRMES

H5N3/NP
ASAGQISVQPTFSVQRNLPFERSTIMAAFTGNTEGRTSDMRTEIIRMES

498

H9N3/NP
ARPEDVSFQGRGVFELSDEKATNPVPSFDMSNEGSYFFGDNAEEYDI

H9N2/NP
ARPEDVSFQGRGVFELSDEKATNPVPSFDMSNEGSYFFGDNAEEYDN

H5N3/NP
ARPEDVSFQGRGVFELSDEKATNPVPSFDMSNEGSYFFGDNAEEYDI

continued

50

H9N3/H9

MEIIALIAILVVTKTSNADKICIGYQSTNSTETVDTLVENNVVPVTHAKEL

H9N2/H9

MEIIALIAILVVTKTSNADKICIGYQSTNSTETVDTLVENNVVPVTHAKEL

100

H9N3/H9

LHTEHNGMLCATNLGHPLILDCTIEGLVYGNPSCDLLLGGKEWSYIVER

H9N2/H9

LHTEHNGMLCATNLGHPLILDCTIEGLVYGNPSCDLLLGGKEWSYIVER

150

H9N3/H9

SSAVNGMCYPGRRVENLEELRSFFSSARSYKRLQLFPDRTWNVTYTGTSKA

H9N2/H9

SSAVNGMCYPGKVENLEELQSFFSSARSYKRLLLLFPDRTWNVTYTGTSKA

200

H9N3/H9

CSNSFYRSMRWLTHKNGSYPIQDAQYTNDWGKNILFMWGIHHPPTDTEQI

H9N2/H9

CSNSFYRSMRWLTHKNGSYPIQDAQYTNDWGKNILFMWGIHHPPTDTEQI

250

H9N3/H9

NLYKKADTTTSITTEDINRTFKPVIGPRPLVNGQQGRIDYYWSVLKPGQT

H9N2/H9

NLYKKADTTTSITTEDINRTFKPVIGPRPLVNGPTGRIDYYWSVLKPGQT

300

H9N3/H9

LRVRSNGNLIAPWYGHILSGESHGRILKTDLSSGNCVVQCQTEKGLNTT

H9N2/H9

LRVRSNGNLIAPWYGHILSGESHGRILKTDLSSGNCVVQCQTEKGLNTT

350

H9N3/H9

LPFHNVSKYAFGNCPKYVGVKSLKLAVGLRNVPAASYRGLFGAIAAGFIEG

H9N2/H9

LPFHNVSKYAFGNCPKYVGVKSLKLAVGLRNVPAASYRGLFGAIAAGFIEG

400

H9N3/H9
GWPGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRESTQEAVDKITSKVNNIIDKMNKQ
H9N2/H9
GWPGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRESTQEAVDKITSKVNNIIDKMNKQ
450

H9N3/H9
YEIIDHEFSEIEARLNMINNKIDDQIQDIWAYNAELLVLENQKTLDEHD
H9N2/H9
YEIIDHEFSEIEARLNMINNKIDDQIQDIWAYNAELLVLENQKTLDEHD
500

H9N3/H9
ANVNNLYNKVKRALGSNAIEDGKGCFFELYHKCDDQCMETIRNGTYDRLKY
H9N2/H9
ANVNNLYNKVKRALGSNAIEDGKGCFFELYHKCDDQCMETIRNGTYDRLKY
550

H9N3/H9
EESKLERQKIEGVKLESEETYKILTIYSTVASSLVFAVGFAAFMFWAMS
H9N2/H9
EESKLERQKIEGVKLESEETYKILTIYSTVASSLVLAVGFAAFMFWAMS
560

H9N3/H9 NGSCRCNICI
H9N2/H9 NGSCRCNICI

50

H9N3/N3
MNPNQKIITIGVVNTTLSIALLIGVGNLIFNTVIHDKIGDHQTVVYPTT
H5N3/N3
MNPNQKIITIGVVNTTLSIALLIGVGNLIFNTVIHDKIGDHQTVVYPTT
100

H9N3/N3
IAPVVPNCSDTIRAETHFKSSLPLCPFRGFFPFHKDNAIRLGENKDVIVT
H5N3/N3
IAPVVPNCSDTIRAETHFKSSLPLCPFRGFFPFHKDNAIRLGENKDVIVT
150

H9N3/N3
REPYVSCDNDDCWSFALAQGALLGTKHSNGTIKDRTPYRSLIRFPIGTAP
H5N3/N3

REPYVSCDNDDCWSFALAQGALLGTKHSNGTIKDRTPYRSLIRFPIGTAP
 200
 H9N3/N3
 VLGNYKEICVAWSSSSCFDGKEWMHVCMTGNDNDASGQIMYAGKMTDSIK
 H5N3/N3
 VLGNYKEICVAWSSSSCFDGKEWMHVCMTGNDNDASGQIMYAGKMTDSIK
 250
 H9N3/N3
 SWRKDILRTQESECQCIDGTCVVAVTDGPAANSADHRIYWIREGKVIKYE
 H5N3/N3
 SWRKDILRTQESECQCIDGTCVVAVTDGPAANSADHRIYWIREGKVIKYE
 300
 H9N3/N3
 NIPKTKIQHLEECSCYVDIDVYCVCRDNWKGSNRPWMRINNETILETGYV
 H5N3/N3
 NIPKTKIQHLEECSCYVDIDVYCVCRDNWKGSNRPWMRINNETILETGYV
 350
 H9N3/N3
 CSKFHSDTPRPADPSTVSCDPSNVNGGPGVKGF^uGFKTGNDVWLGR^uTVST
 H5N3/N3
 CSKFHSDTPRPADPSTVSCDPSNVNGGPGVKGF^uGFKTGNDVWLGR^uTVST
 400
 H9N3/N3
 SGRSGFEI^uIKVTEGWINS^uPNHAKSVTQTLVSNNDWSGYSGSFIVENNGCF
 H5N3/N3
 SGRSGFEI^uIKVTEGWINS^uPNHAKSVTQTLVSNNDWSGYSGSFIVENNGCF
 450
 H9N3/N3
 QPCFYIELIRGRPNKNDDVSWTSNSIVTFCGLDNEPGSGNWPDGSNIGFM
 H5N3/N3
 QPCFYIELIRGRPNKNDDVSWTSNSIVTFCGLDNEPGSGNWPDGSNIGFM
 452

Fig. 4. Comparison of translation sequences of avian influenza virus gene of AI05GA (NP, H9, N3), MS96 (NP, H9) and ADL0408 (NP, N3). The translation sequences of MS96 (NP, H9) were obtained from Genbank. Underlines indicate different sites.

Table 8. Comparison of amin acid sequence homology of NP, HA9 and NA3 genes from avian influenza viruses(AI05GA, MS96 and ADL0408.

Viruses		Similarity (%)		
		NP	HA9	NA3
MS96*	NP	99.3	-	-
	HA9	-	99.3	-
ADL0408	NP	99.6	-	-
	NA3	-	-	100

*MS96 : GenBank accession No. AF 203787 and AF 203008

제5절 가금인플루엔자 진단용 ELISA kit 개발

1. 기존 AI 혈청학적 진단기법의 비교

기존 혈청검사법 중 보편적으로 사용빈도가 높은 검사법인 group specific 항원을 검출하는 ELISA 검사법과 subtype specific 한 항원을 검출하는 HI 검사를 sensitivity와 specificity를 비교하였다. 검사에 이용된 혈청은 충청권 산란계농가를 대상으로 하였으며 농가당 1회 시료채취를 하였다. 혈청분리와 검사방법은 일반적인 술식에 준하였다.

표3-1. 농장별 ELISA 와 HI 검사의 특이성 및 민감성 비교

혈청검사	ELISA		계
	Positive	Negative	
HI	Positive	24	27
	Negative	7	10
계	31	6	37

* HI, ELISA 항체가 검출된 농장은 전체를 양성계군으로 평가

2. AIV 국내분리주의 배양

AIV 국내 분리주는 제 1 세부과제에서 닭으로부터 분리하여 AIV H9N2 type 으로 확인된 ADL0401 strain을 사용하였다. ADL-0401의 배양은 일반적인 AIV 배양법에 따라 9-11일령 된 SPF 부화란의 요막강 내로 접종한 후 3일 후 요막강액을 수집하여 -70℃에 보관하였다.

3. AI virus의 RNA 분리

AIV 국내분리주 ADL-0401가 배양된 요막강액 250 μ l에 Trizol[®] LS reagent(Invitrogen, USA) 750 μ l를 첨가하여 가볍게 혼합한 후 실온에서 5분간 정치시켰다. Chloroform 250 μ l첨가하여 15초간 가볍게 vortexing한 후 실온에서 10분간 정치하고 이후 4℃ 12,000x g 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 수거하여 Isopropanol alcohol 500 μ l를 첨가 10분간 정치시킨 후 앞과 동일한 조건으로 pellet을 얻었다. 75% ethanol 1ml을 첨가 한 후 4℃ 7500x g에서 5분간 원심분리 하며 이 과정을 3회 반복하여 pellet을 세척한 후 이후 진공건조기 (Speed Vac)에서 5-10분간 pellet을 건조시켰다. 건조한 pellet은 30-50 μ l의

DEPC water로 용해하여 55-60°C의 water bath에서 10분간 incubation 시킨 후 -20°C에 보관하여 PCR의 template로 사용하였다.

4. AIV NP, HA, NA 유전자 염기서열 분석

가. Primer 제작

AIV NP, HA, 그리고 NA 유전자의 클로닝 및 염기서열 확인을 위한 primer는 influenza A virus(A/chicken/Mudanjiang/0823/00(H9N2))의 nucleocapsid protein(NP) 유전자(Genbank Accession No. AY496851), hemagglutinin(HA) 유전자(Genbank Accession No. AY513715), 그리고 neuraminidase(NA) 유전자(Genbank Accession No. AY451388)의 염기서열을 기초로 하여 각각의 유전자에 특이적인 forward와 reverse primers를 제작하였다(Table 1-1, 1-2, 1-3). 특히 baculovirus expression system에 사용할 것을 고려하여 NP 유전자와 HA 유전자의 forward primer에는 *Xho* I restriction site를 reverse primer에는 *Hind* III restriction site를 삽입하여 제작하였고, NA 유전자의 forward primer에는 *Bgl* II restriction site를 reverse primer에는 *Hind* III restriction site를 삽입하여 제작하였다.

Table 1-1. Primers used for AI virus(H9N2) NP gene cloning and sequencing

Primers		Sequences(5' → 3')	Positions	Size(bp)
npF	Sense	GATCTCGAGTCATGGCGTCTCAAGGCACCA	1-19	1497
npR	Antisense	ATCAAGCTTATTGTCATATTCTTCTGCA	1481-1497	
np1	Sense	CCCCAGAATGTGCTCTCTGATGCA	480-503	
np2	Sense	CAGCCAGGTCTTCAGCCTCATTAG	927-950	
np3	Antisense	GTCATACAGAATCAGTTCTCTCAT	313-336	

Table 1-2. Primers used for AI virus(H9N2) HA gene cloning and sequencing

Primer s		Sequences(5' → 3')	Positions	Size(bp)
haF	Sense	GATCTCGAGTCATGGAAATAATAGCACTAA	1-19	
haR	Antisense	ATCAAGCTTTATACAAATGTTGCATCTG	1668-1168 3	1683
ha1	Sense	TCTTTCCAGACAGAACTTGGAAATG	401-424	
ha2	Sense	TCTTTCAGGAGAAAGCCATGGAAG	801-824	
ha3	Sense	TATGAAATCATTGATCATGAGTTC	1201-1224	
ha4	Antinse	ACACATCCCATTGACAGCTGATGA	301-324	

Table 1-3. Primers used for AI virus(H9N2) NA gene cloning and sequencing

Primers		Sequences(5' → 3')	Positions	Size(bp)
naF	Sense	GATAGATCTTCATGAATCCAAATCAGAAAAT	1-20	
naR	Antisense	ATCAAGCTTTATAGGCATAAAATTGATA	1394-141 0	1410
na1	Sense	GATAGGATCCCTCATCGAACCCCTT	451-474	
na2	Sense	GGATCATAGCATTGATTCCAGTTA	924-948	
na3	Antisense	AAGTCGGATTGAGTTGTCCTTGGA	301-324	

나. RT-PCR

AIV의 NP, HA, NA에 특이적인 primer를 사용하여 Rosen 등의 방법으로

RT-PCR을 수행하였다. 즉, 순수 분리한 RNA 10 μ l에 2 μ l의 DMSO(Dimethylsulfoxide)를 첨가하고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 옮겨 5분간 방치하였다. 10,000 rpm에서 5초간 원심한 후 DEPC 처리된 증류수 20 μ l, 5 \times first strand buffer 10 μ l, 0.1 M DTT 5 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, reverse transcriptase(200 U/ μ l) 1 μ l을 순서대로 넣어 반응용량 50 μ l를 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA template 10 μ l에 DEPC 처리된 증류수 63 μ l, 10 \times PCR buffer 10 μ l, 25 mM MgCl₂ 12 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, 각각의 forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l, Taq DNA polymerase(5 U/ μ l) 1 μ l를 넣어 전체반응용량 100 μ l를 pre-PCR(95 $^{\circ}$ C, 5 min), PCR(denaturation 94 $^{\circ}$ C/45 sec, annealing 50 $^{\circ}$ C/45 sec, extension 72 $^{\circ}$ C/1 min, 30 cycles) 그리고 post-PCR(72 $^{\circ}$ C, 7 min)을 핵산증폭기(GeneAmp PCR system 2400, Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1% agarose gel 상에서 100 volt로 30분 간 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 각각의 유전자 크기는 1 kb DNA ladder(Gibco BRL)를 같이 전기 영동함으로써 확인하였다.

10일령의 SPF 부화란에서 증식시킨 AI 국내 분리주 배양액 200 μ l로부터 genomic viral RNA를 분리하고 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR을 통해 cDNA로부터 NP, HA, 그리고 NA 유전자를 증폭하여 PCR product를 1.0% agarose gel에 전기 영동한 결과, NP, HA, 및 NA 유전자의 크기가 각각 1497, 1683 및 1410 bp인 band를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 각각의 PCR products를 pBlueBac4.5/V5-His TOPO plasmid vector에 ligation 하여 pBlueBac4.5/V5-His-NP, pBlueBac4.5/V5-His-HA, pBlueBac4.5/V5-His-NA를 작제하고 이를 *E. coli* TOP10 competent cells에 transformation한 다음 ampicillin(50 μ g/ml), 30 μ l의 X-gal(50 μ g/ml), 10 μ l의 1M isopropylthio-galactoside(IPTG)가 첨가된 LB agar plate에 spreading하여 white colony를 선택하여 insert NP, HA, NA gene들을 확인할 수 있었다.

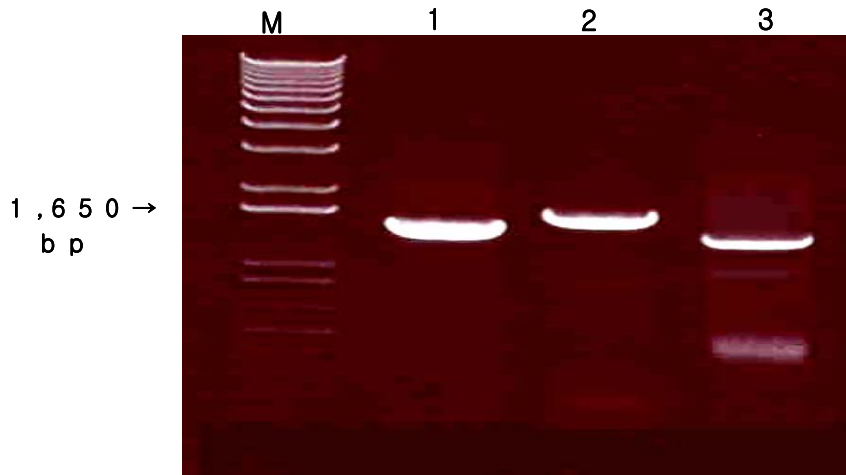


Fig. 5. RT-PCR amplification of NP, HA, and NA gene of avian influenza virus(H9N2) M: marker, 1: NP, 2: HA, 3: NA

AIV NP, HA, 그리고 NA 단백질은 baculovirus에서 발현시켰다. 이 system을 이용하면 target protein이 polyhistidine과 fusion되기 때문에 Ni-NTA resin을 이용하여 단일 step으로 fusion protein을 정제할 수 있다. AIV의 NP, HA, 그리고 NA 유전자의 염기서열분석은 RT-PCR product를 사용하여 ABI prism 310 genetic analyzer(Perkin-Elmer, USA)로 BigDye terminator cycle sequencing방법으로 수행 하였다. Nucleotide sequence data는 Collection, Analysis, SeqEd 등의 software를 이용하여 분석하였으며 Collection software로부터 얻어진 raw sequencing data는 analysis software를 사용하여 염기서열로 분석하였다. 다른 국외 AIV 분리주와의 염기서열의 비교는 Genbank data에서 얻는 reference virus의 염기서열을 이용하여 seqED software를 이용 상호 비교하였다.

AIV 국내 분리주 ADL-0401의 NP, HA, 그리고 NA 유전자에서 coding region의 염기서열을 분석한 결과, NP 유전자는 1497 bp, HA 유전자는 1683 bp 그리고 NA 유전자는 1410 bp 이었으며, 이는 국내에서 1996년에 분리 보고된 된 AIC MS96 strain(A/chicken/Korea/MS96 H9N2)의 NP, HA, 그리고 NA 유전자의 크기와 동일하였다. 또한 ADL-0401의 NP, HA, 그리고 NA 유전자의 염기서열은 MS96 strain과 비교하였을 때 93%, 94%, 그리고 95%의 상동성을 나타내었다. 하지만 외국에서 분리 보고된 동일한 subtype의 AIV(H9N2)의 NP, HA, 그리고 NA 유전자의 염기서열과 비교하였을 때 각각 88-99%, 82-98%, 그리고 84-98%의 상동성을 나타내었다. 특히 HA 유전자 에서 proteolytic enzyme cleavage site의 유전자를 분석한 결과, 아미노산의 배열이 ASDR/GLFG으로 약병원성 바이러스의 특징인 아미노산의 배열을 가지고 있었다. 국내 분리주 ADL-0401의 NP, HA, 그리

고 NA 유전자에서 coding region의 염기서열을 기초로 하여 작성한 NP, HA, 그리고 NA 유전자의 phylogenetic tree 결과는 Fig. 3-1, 3-2, 3-3과 같다.

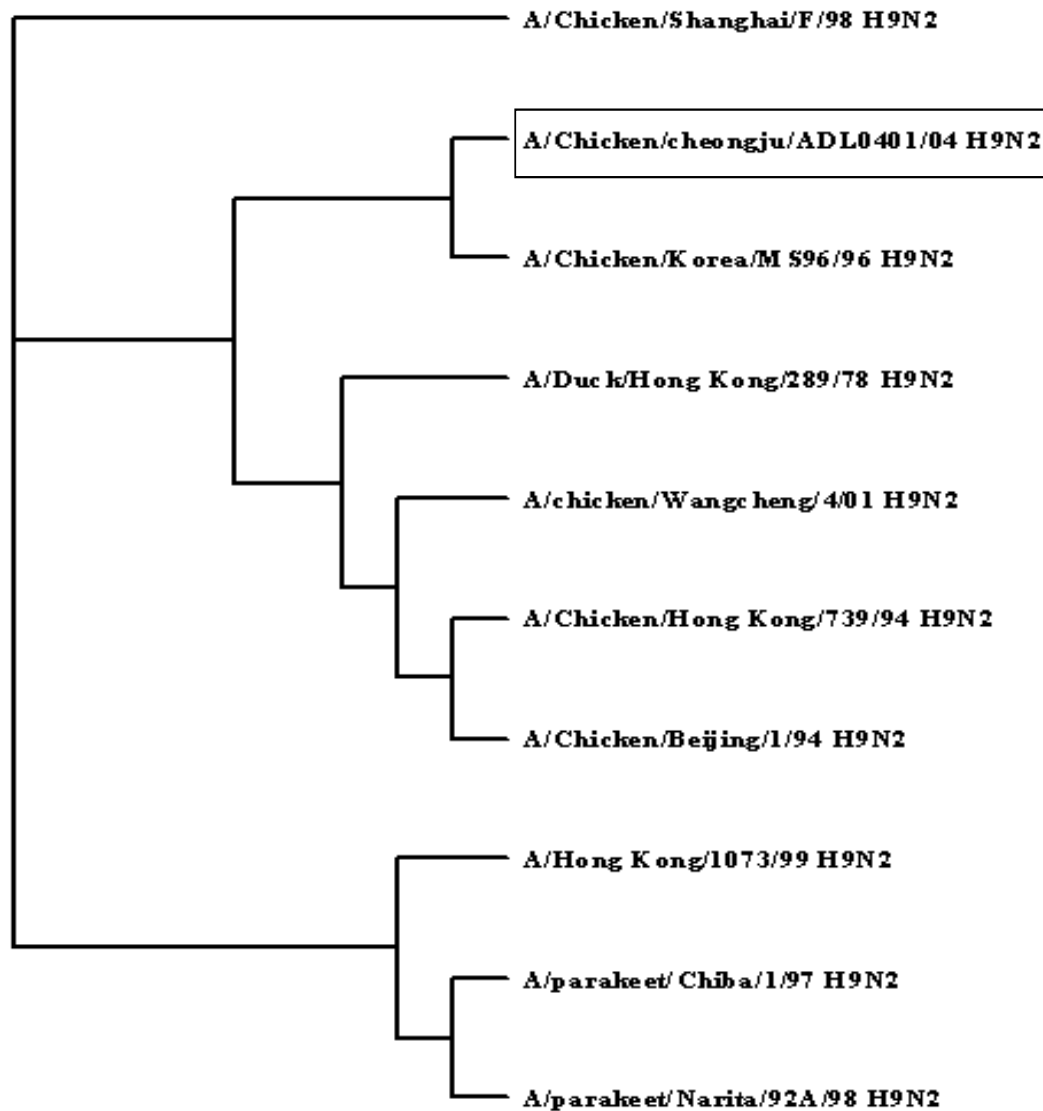


Fig. 3-1. Phylogenetic tree of AIV NP gene.

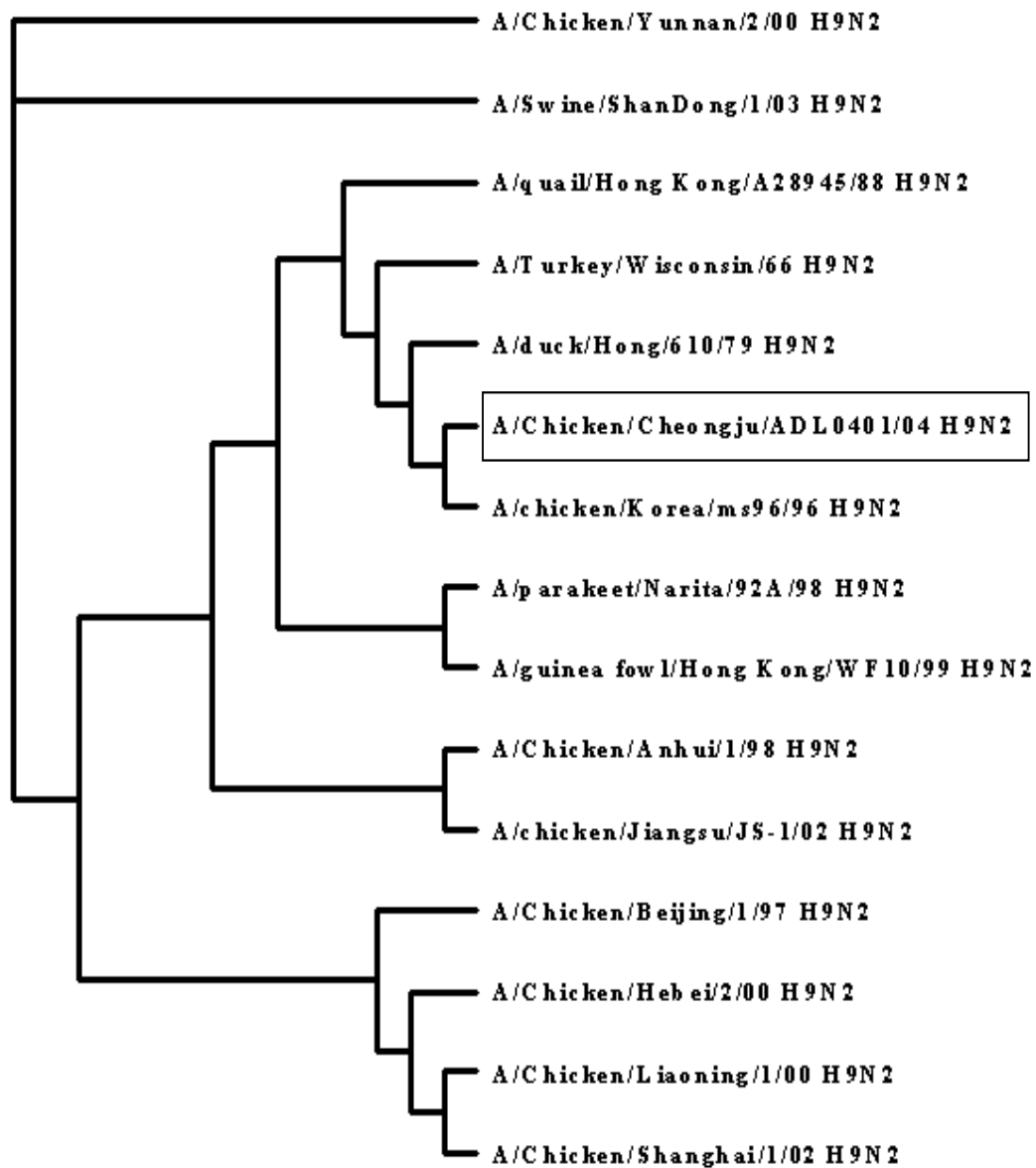


Fig. 3-2. Phylogenetic tree of AIV HA gene.

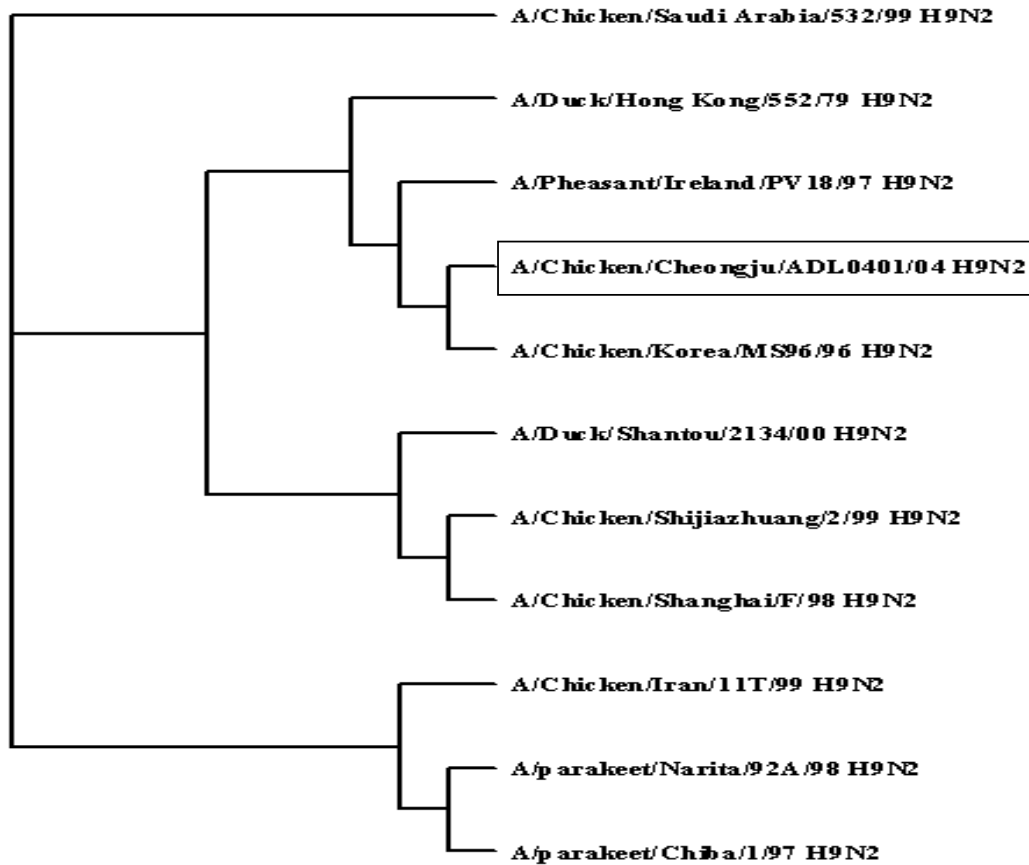


Fig. 3-3. Phylogenetic tree of AIV NP gene.

다. NP, HA, NA 유전자 발현

1) Baculovirus 발현 vector로의 클로닝

AIV NP, HA, 그리고 NA 유전자의 Baculovirus에서의 발현을 위하여 RT-PCR로 증폭한 NP, HA, 그리고 NA 유전자를 pBlueBac4.5/V5-His TOPO TA expression kit를 사용하여 pBlueBac4.5/V5-His TOPO vector로 클로닝하고 *E. coli* TOP10 competent cell로 형질 전환하였다. 형질 전환된 *E. coli* 배양액은 37°C에서 220rpm으로 1시간 동안 진탕 배양한 다음 ampicillin (50 μ g/ml)을 함유하는 LB plate에 도말하고 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 성장한 집락으로부터 *E. coli*을 취하여 5ml의 LB broth에 접종하고 37°C에서 220rpm으로 16시간 진탕 배양한 다음 클로닝 유무를 조사하기 위하여 Birnboim과 Doly 그리고 Chowdhury의 alkaline lysis method로 plasmid를 분리하고 30 μ l의 TE buffer(pH 8.0)에 용해

하였다. 분리한 plasmid DNA는 제한효소 *Xho* I과 *Hind* III(NP, HA 유전자) 또는 *Bgl* II와 *Hind* III(NA 유전자)을 가하여 37°C에서 1시간 절단하여 1.0% LE agarose gel에서 1시간 동안 전기 영동하여 클로닝 유무를 관찰하였다. 또한 NP, HA, 그리고 NA 유전자가 삽입된 방향을 확인하기 위하여 각각의 NP, HA, 그리고 NA 유전자에 해당하는 제한효소로 처리한 후 확인하거나 염기서열을 결정한 후 확인하였다.

2) 재조합 baculovirus 선발

각각의 NP, HA, 그리고 NA 유전자가 클로닝된 baculovirus transfer vector pBlueBac4.5-NP, pBlueBac4.5-HA, pBlueBac4.5-NA는 Bac-N-blue Transfection kit를 사용하여 Bac-N-blue wild type DNA와 함께 제조사의 술식에 따라 Sf9 세포로 cotransfection하였다. 먼저 4 μ l의 재조합 transfer plasmid DNA(1 μ g/ μ l)에 Bac-N-blue wild type DNA 10 μ l, Grace's insect media(w/o FCS) 1ml, Cellfectin reagent 20 μ l를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 반응시켰다. 15분 후, 혈청이 첨가되지 않은 Grace's insect media로 3회 세척한 Sf9 세포에 한방울 씩 떨어뜨린 다음 4시간 동안 반응시키고 10% 혈청이 첨가된 complete Grace's insect media 1ml을 가하고 27°C에서 72시간 동안 배양하였다. 상호유전자 감염용액에서 재조합 baculovirus를 선발하기 위하여 O'Reilly 등의 방법에 따라 플라크 검정을 실시하였다. 먼저 십진 희석한 상호유전자 감염용액을 미리 100mm 세포배양 petridish에서 배양한 Sf9 세포에 감염시키고 60분간 배양한 다음 배양액을 제거하고 여기에 2.5% agarose 5ml, complete Grace's insect media 5ml 및 15 μ l의 X-gel(50mg/ml)을 가하고 실온에서 균한 다음 27°C에서 8일간 배양하였다. 8일간 배양 후, 형성된 plaque 중 푸른색의 plaque만을 선발하여 Sf9 세포에 0.1-1 m.o.i로 감염시켜 27°C에서 5일간 배양하고 일부 세포 및 배양액을 회수하여 NP, HA, 그리고 NA 유전자의 재조합 유무를 확인하였다. NP, HA, 그리고 NA 유전자가 재조합된 것으로 확인된 것은 1,500g에서 15분간 원심하여 얻은 상층액을 Sf9 세포에 0.1-1 m.o.i로 감염시켜 고역가의 재조합 baculovirus stock을 만들어 일부는 보관하고 일부는 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3) NP 유전자의 발현 및 확인

가) PCR

Plaque법으로 순수분리한 재조합 바이러스로부터 DNA를 추출하여 RT-PCR에 사용한 각각의 AIV NP, HA, 그리고 NA 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 NP, HA, 그리고 NA 유전자의 삽입유무를 확인하였다. 또한 forward primer인 5-TTTACTGTTTTTCGTAACAGTT TTG-3'와 reverse primer

인 5'-CAACAACGCACAGAATCTAGC-3'를 사용하여 PCR을 수행하여 NP, HA, 그리고 NA 유전자의 삽입유무를 확인하였다.

Plaque법으로 순수 분리한 재조합 바이러스로부터 DNA를 추출하여 RT-PCR에 사용한 NP 유전자에 특이적인 primer로 PCR을 수행하여 NP 유전자의 삽입유무를 확인한 결과, 재조합 바이러스에서 1497 bp 크기의 band가 확인되어 NP 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3, lane 1). 또한 baculovirus에 특이적인 polyhedrin forward primer인 5'-ACCATCTCGCAA TAA-3'와 baculovirus reverse primer인 5'-ACAACGCACAGAATCTAGC-3'를 사용하여 PCR을 수행한 결과, NP 재조합 바이러스에서 1,816 bp 크기의 band가 확인되어 NP 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3-4, lane 4).

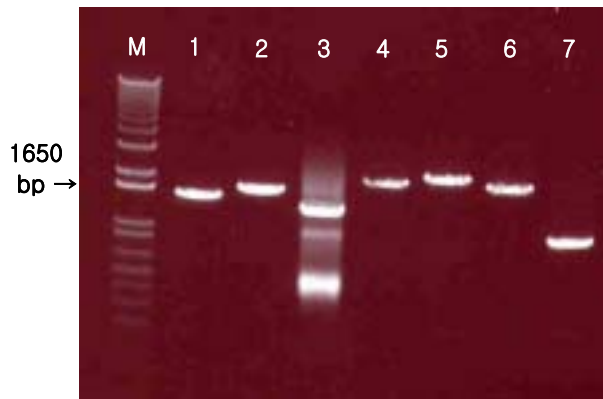


Fig. 3-4. Confirmation of NP, HA and NA gene in the recombinant baculovirus by PCR.

- lane 1: NP gene with NP-specific primers
- lane 2: HA gene with HA-specific primers
- lane 3: NA gene with NA-specific primers
- lane 4: NP gene with baculovirus-specific primers
- lane 5: HA gene with baculovirus-specific primers
- lane 6: NA gene with baculovirus-specific primers
- lane 7: wt baculovirus gene with baculovirus-specific primers

나) 세포변성효과 및 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody: IFA)

Plaque assay로 순수 분리한 recombinant 바이러스가 각각의 AIV NP, HA, 그리고 NA 단백을 발현하는가를 확인하기 위하여 IFA를 실시하였다. 즉, Sf9 세포가 배양된 96-well plate에 각각의 recombinant 바이러스를 접종하여 48시간 배양한

후 80% acetone으로 고정하였다. 1차 항체로 polyhistidine에 특이적인 단클론항체(Anti-His₆ antibody, IG Therapy Co., Ltd.), NP와 HA에 특이적인 단클론항체(#2 for NP, #17 for HA, 국립수의과학검역원) 그리고 chicken AIV 항혈청을 1:2,000, 1:1,000 그리고 1:1,000으로 각각 희석하여 50 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후 phosphate buffer saline(PBS)로 5회 세척하였다. 2차 항체로 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.) 또는 FITC-conjugated goat anti-chicken IgG(Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:100으로 희석하여 50 μ l씩 넣어 1시간 배양 후 PBS로 5회 세척하고 mounting buffer를 넣어 형광현미경으로 형광발현 유무를 관찰하였다.

Recombinant 바이러스에 의한 세포변성효과(Cytopathic effect: CPE)를 확인하기 위해 recombinant 바이러스를 Sf9 세포에 감염시킨 결과, Fig. 3-5와 같은 CPE를 관찰할 수 있었다. 즉, mock-infected Sf9 세포(A)에서는 어떠한 CPE를 관찰할 수 없었으나 NP 유전자가 발현된 recombinant 바이러스에 의해 감염된 Sf9 세포(B)에서는 감염 후 48시간부터 세포의 수가 증가하지 않고 감염된 세포는 커지는 등의 recombinant 바이러스 감염 시 나타나는 특유의 CPE를 관찰할 수 있었다. 또한 wild type baculovirus 감염 시 나타나는 세포질 내 과립은 관찰되지 않았다.

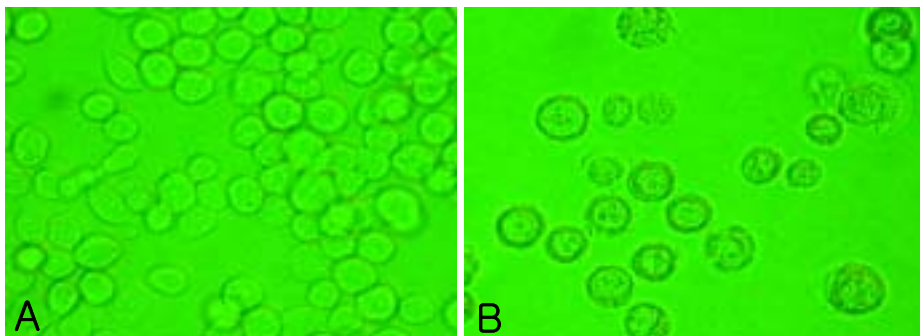


Fig. 3-5. Cytopathic effects of Sf9 cells infected with AIV NP recombinant virus. A: mock-infected Sf9 cells B: AIV NP recombinant virus infected Sf9 cells

순수 분리한 각각의 recombinant 바이러스가 NP 유전자를 발현하는가를 확인하기 위하여 1차 항체로 polyhistidine에 특이적인 단클론항체, NP에 특이적인 단클론항체, 그리고 chicken avian influenza 바이러스(H9N2) 항혈청을 사용하여 IFA를 실시한 결과, Fig. 3-6과 같이 polyhistidine에 특이적인 단클론항체(B), chicken

H9N2 항혈청(C), 그리고 NP에 특이적인 단클론항체(D)로 반응시킨 Sf9 세포에서만 형광이 관찰되었다. Preimmune chicken serum으로 처리한 Sf9 세포 대조군(A)에서는 어떠한 형광도 관찰되지 않았다.

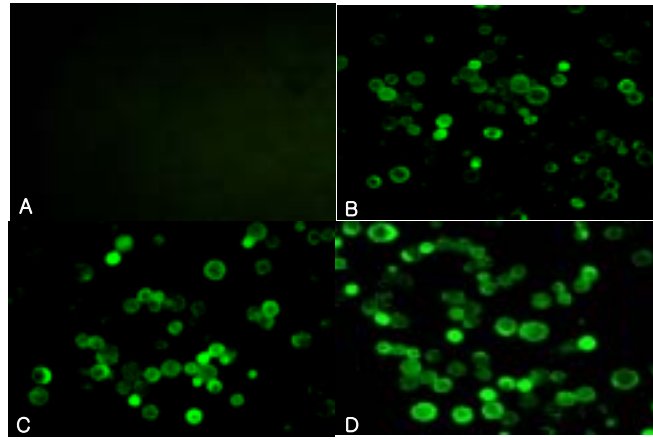


Fig. 3-6. Immunofluorescence of Sf9 cells infected with recombinant virus. Sf9 cells infected with AIV NP recombinant virus were reacted with preimmune serum(A), Anti-his₆ monoclonal antibody(B), chicken AIV antiserum (C), and NP-specific monoclonal antibody(D), respectively, and stained with FITC-conjugates.

다) Western blotting

Recombinant 바이러스의 NP 단백질 발현 유무 및 성상을 확인, 분석하기 위하여 polyhistidine에 특이적인 단클론항체와 NP에 특이적인 단클론항체를 사용하여 Western blotting을 실시한 결과는 Fig. 6과 같다. NP 유전자가 삽입된 recombinant 바이러스를 감염시킨 Sf9 cell lysate와 상층액에서 polyhistidine과 NP에 특이적인 단클론항체로 반응시킨 결과, 60 KDa의 크기에서 band가 확인되어 NP 단백질이 정상적으로 발현됨을 확인할 수 있었다.

Recombinant 바이러스에 NP, HA, 그리고 NA 단백질의 발현 유무 및 성상을 확인 분석하기 위하여 Towbin 등의 방법에 따라 Western blotting을 실시하였다. 즉, recombinant 바이러스를 접종하여 27℃에서 48시간 동안 배양하여 수확한 Sf9 세포와 대조군으로 바이러스를 접종하지 않은 Sf9 세포를 flask로부터 떨어뜨려 원심 분리한 뒤 얻은 상층액과 pellet을 Western blot의 샘플로 사용하였다. 각각의 cell pellet은 lysis buffer로 처리한 후 원심 분리하여 상층액만을 취하였다. 각각의 배양 상층액과 pellet 상층액을 sample buffer(60mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS,

25% glycerol, 1.44mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 1:5의 비율로 섞어 100℃에서 5분간 끓여 denaturation시켰다. 이를 10% SDS-polyacrylamide gel에서 2시간 동안 80 volt로 전기영동을 한 다음 gel을 꺼내어 transfer buffer(15.6mM Tris base, 120mM glycine, pH 8.1-8.4)에 30분간 담구어 두었다. 미리 transfer buffer에 담겨 놓은 filter paper(Bio-rad)와 nitrocellulose paper (NEN™ Life Science Products)사이에 gel을 넣어 semi trans-blot(Bio-rad)를 이용하여 13V에서 20분간 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% non-fat dry milk/tris buffered saline(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5: TBS)에서 하룻밤 동안 blocking 시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. Polyhistidine에 특이적인 단클론항체, AIV 특이 chicken 항혈청, 그리고 AIV NP, HA 특이 단클론항체를 1:1,000으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 흔들며 반응시켰으며 TBS로 3회 세척하였다. 그리고 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG(Kirkegaard Perry Laboratory) 또는 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-chicken IgG을 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 뒤 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로 NBT/BCIP stock solution (Boehringer mannheim) 200 μ l을 alkaline phosphatase buffer(0.1M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂) 10ml에 섞어 사용하였다.

4) HA 유전자의 발현 및 확인

가) PCR

Plaque법으로 순수 분리한 재조합 바이러스로부터 DNA를 추출하여 NP 유전자 확인과 같은 방법으로 HA 유전자의 삽입유무를 확인한 결과, HA 재조합 바이러스에서 1683 bp와 2522 bp 크기의 band가 확인되어 HA 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3-7, lane 2 and 5).

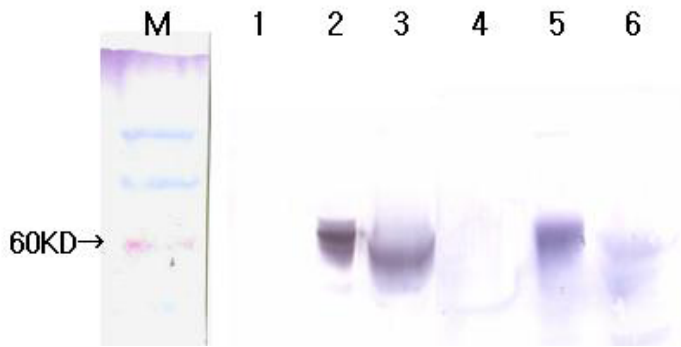


Fig. 3-7. Analysis of expressed AIV NP gene by Western blotting.

Mock-infected Sf9 cell lysates(lane 1, 4) and Sf9 cell lysates(lane 2, 5) or supernatants(lane 3, 6) infected with AIV NP recombinant virus were reacted with Anti-his₆ monoclonal antibody(lane 1-3), and NP-specific monoclonal antibody(lane 4-6), respectively.

나) 세포변성효과 및 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody: IFA)

NP 유전자와 마찬가지로 HA recombinant 바이러스로 감염된 Sf9 세포에서만 CPE를 관찰할 수 있었다. 또한, polyhistidine에 특이적인 단클론항체, H9N2 항혈청, 그리고 HA에 특이적인 단클론항체로 반응시킨 Sf9 세포에서만 형광이 관찰되었다.

다) Western blotting

Recombinant 바이러스의 HA 단백 발현 유무 및 성상을 확인, 분석하기 위한 Western blotting 실험은 진행 중에 있다.

5) NA 유전자의 발현 및 확인

가) PCR

Plaque법으로 순수 분리한 재조합 바이러스로부터 DNA를 추출하여 NP 유전자 확인과 같은 방법으로 NA 유전자의 삽입유무를 확인한 결과, NA 재조합 바이러스에서 1410 bp와 2249 bp 크기의 band가 확인되어 NA 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3-8, lane 3 and

나) 세포변성효과 및 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody: IFA)

NP 유전자와 마찬가지로 NA recombinant 바이러스로 감염된 Sf9 세포에서만 CPE를 관찰할 수 있었다. 또한, polyhistidine에 특이적인 단클론항체, chicken H9N2 항혈청으로 반응시킨 Sf9 세포에서만 형광이 관찰되었다.

다) Western blotting

Recombinant 바이러스의 NA 단백 발현 유무 및 성상을 확인, 분석하기 위한 Western blotting 실험은 진행 중에 있다.

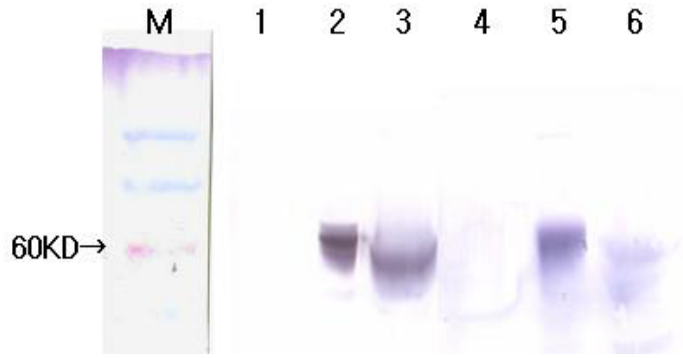


Fig. 3-8. Analysis of expressed AIV NP gene by Western blotting. Mock-infected Sf9 cell lysates (lane 1, 4) and Sf9 cell lysates (lane 2, 5) or supernatants (lane 3, 6) infected with AIV NP recombinant virus were reacted with Anti-his₆ moAb (lane1-3), and NP-specific moAb (lane4-6).

RT-PCR and cloning

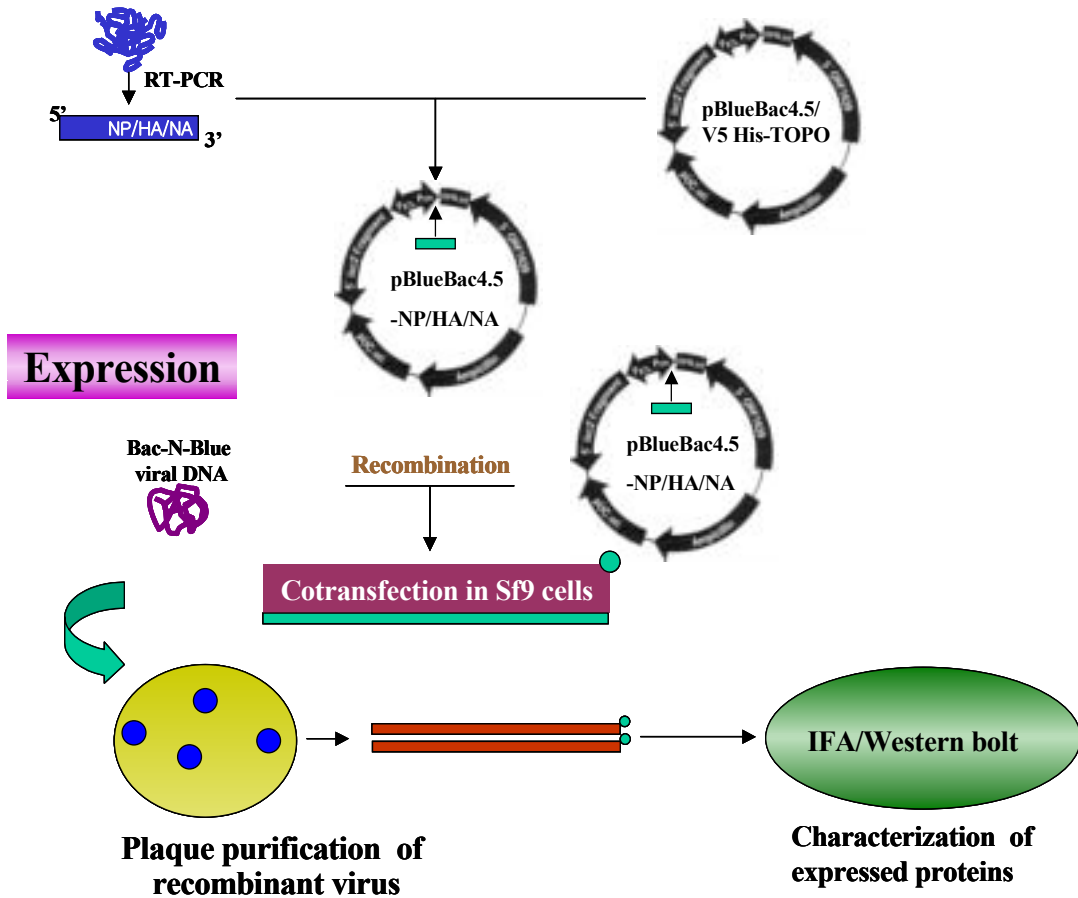


Fig. 1. Schematic diagram of avian influenza virus NP, HA and NA gene expression in baculovirus expression system

6) Baculovirus 발현 vector로의 클로닝

AIV NP, HA 그리고 NA 유전자의 baculovirus에서의 발현을 위하여 RT-PCR 로 증폭한 NP, HA 그리고 NA 유전자를 pBlueBac4.5/V5-His TOPO TA expression kit(Invitrogen)를 사용하여 pBlueBac4.5/V5-His TOPO vector로 클로닝 하고 *E. coli* TOP10 competent cell로 형질 전환하였다. 형질 전환된 *E. coli* 배양 액은 37°C에서 220rpm으로 1시간 동안 진탕 배양한 다음 ampicillin(50 μ g/ml)을 함유 하는 LB plate에 도말하고 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 성장한 집락으로부터

*E. coli*을 취하여 5ml의 LB broth에 접종하고 37°C에서 220rpm으로 16시간 진탕 배양한 다음 클로닝 유무를 조사하기 위하여 Birnboim과 Doly 그리고 Chowdhury의 alkaline lysis method로 plasmid를 분리하고 30 μ l의 TE buffer(pH 8.0)에 용해하였다. 분리한 plasmid DNA는 제한효소 *Xho* I과 *Hind* III(NP, HA 유전자) 또는 *Bgl* II와 *Hind* III(NA 유전자)을 가하여 37°C에서 1시간 절단하여 1.0% LE agarose gel에서 1시간 동안 전기 영동하여 클로닝 유무를 관찰하였다.

가) 재조합 baculovirus 선발

각각의 NP, HA 그리고 NA 유전자가 클로닝된 pBlueBac4.5-NP, pBlueBac4.5-HA 그리고 pBlueBac4.5-NA transfer vector는 Bac-N-blue Transfection kit(Invitrogen)를 사용하여 Bac-N-blue wild type DNA와 함께 제조사의 술식에 따라 Sf9 cell로 cotransfection하였다.

나) 재조합 baculovirus 확인

(1) 중합효소연쇄반응법(Polymerase chain reaction: PCR)

Plaque법으로 순수분리한 재조합 바이러스로부터 DNA를 추출하여 RT-PCR에 사용한 각각의 AIV NP, HA 그리고 NA 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 NP, HA 그리고 NA 유전자의 삽입유무를 확인하였다. 또한 baculovirus forward primer인 5'-TTTACTGTT TTCGTAACAGTTTTG-3'와 reverse primer인 5'-CAACAACGCACAGAATCTAGC-3'를 사용하여 PCR을 수행하여 NP, HA 그리고 NA 유전자의 삽입유무를 확인하였다.

(2) 세포변성효과 및 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody: IFA)

Plaque법으로 순수 분리한 recombinant 바이러스가 각각의 AIV NP, HA 그리고 NA 단백을 발현하는가를 확인하기 위하여 IFA를 실시하였다.

(3) Western blotting

Recombinant 바이러스에 NP, HA 그리고 NA 단백질의 발현 유무 및 성상을 확인 분석하기 위하여 Towbin 등의 방법에 따라 Western blotting을 실시하였다.

라. 발현단백질 이용 ELISA 개발

가검 닭 혈청으로부터 AIV 항체를 확인할 수 있는 ELISA법을 확립하기 위하여 baculovirus에서 발현된 NP 단백을 이용하여 다음과 같은 방법으로 연구를 수행하였다.

1) Coating antigen의 정제 및 적정 농도

ELISA법에 사용할 coating antigen은 baculovirus에서 발현된 NP 단백을

Ni-NTA agarose column을 이용하여 제조사의 술식에 따라 정제하였으며, ELISA법에 사용할 coating antigen의 적정농도는 checkerboard 적정법으로 결정하였다.

ELISA법에 사용할 coating antigen으로 baculovirus에서 발현된 NP 단백질을 Ni-NTA agarose column을 이용하여 제조사의 술식에 따라 정제한 결과, 농도는 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 순수 정제한 NP 단백질을 checkerboard 적정법으로 coating antigen으로 적정농도를 조사한 결과 0.25 $\mu\text{g}/\text{well}$ 로 나타났다(Fig 8-A).

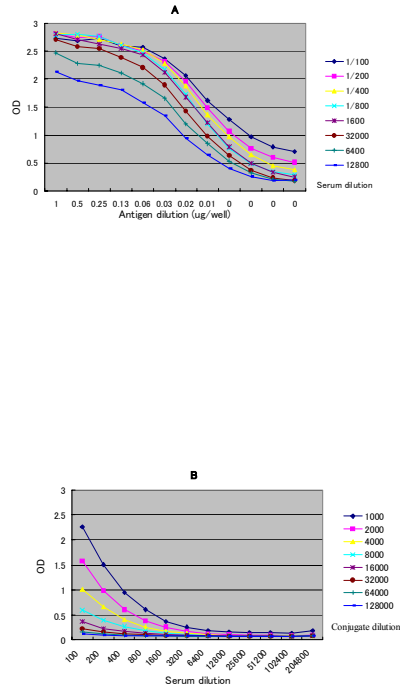


Fig. 8. Determination of optimal concentration of coating antigen(A) and conjugate(B).

2) 검사혈청의 적정 희석농도 및 positive/negative ratio 조건 설정

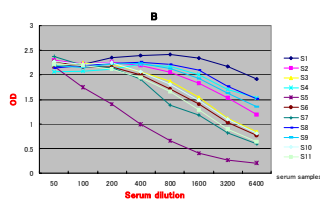
실험에서 확인된 적정농도로 NP 항원을 coating시킨 plate에 AIV 양성(AIV 자연 감염된 닭과 시험 AIV 백신을 접종한 닭으로부터 분리한 혈청으로 HI 양성으로 확인)과 음성(SPF) 닭혈청을 1:50부터 시작하여 1:6400까지 2배 단계 희석하여 각각의

well에 첨가하고 이후, conjugate와 기질을 차례로 첨가하여 반응시킨 후 OD 값을 측정하여 검사혈청의 적정 희석농도 및 positive/negative ratio 조건을 설정하였다.

3) Conjugate의 적정농도

ELISA법에 사용할 conjugate의 적정농도를 결정하기 위하여 가), 나) 실험에서 결정된 coating antigen 및 가검 혈청의 희석 농도로 반응시킨 후 conjugate를 1:1,000부터 시작하여 1:128,000까지 2-fold serial dilution하여 첨가하여 반응시킨 후 발색시켜 conjugate의 적정농도를 결정하였다. 실험에서 결정된 coating antigen 및 가검 혈청의 희석 농도로 반응시킨 후 conjugate를 1:1,000부터 시작하여 1:128,000까지 2-fold serial dilution하여 첨가하여 반응시킨 후 발색시켜 conjugate의 적정농도를

결과, 1:2000-1:4,000이 적정농도로 확인되었다(Fig 8-B)



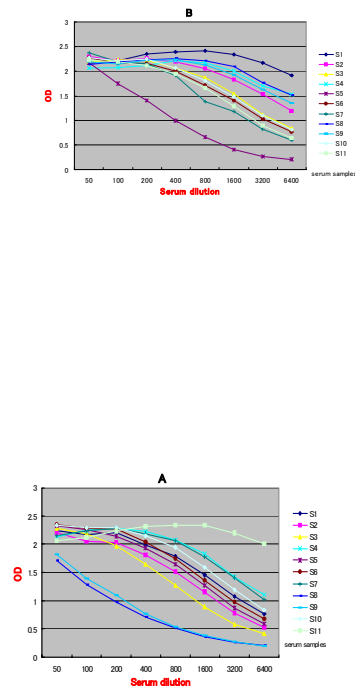


Fig. 9. Determination of optimal dilution of chicken serum and positive/negative ratio. Purified recombinant NP protein was coated with a concentration of $0.25\mu\text{g}$ /well and reacted with serially 2-fold diluted sera from naturally AIV infected(A), AIV vaccinated(B and C: high and low HI titers, respectively) and SPF(D) chickens.

4) ELISA의 민감도, 특이성 시험 및 타 진단법과의 비교

본 연구에서 확립된 ELISA법의 민감도 (sensitivity)와 특이성 (specificity)을 조

사하기 위하여 HI법에 의하여 AIV 양성 및 음성으로 확인된 닭 가검혈청을 사용하여 ELISA를 수행하고 그 결과를 분석하여 민감도 및 특이성을 다음과 같은 공식에 의하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{Sensitivity (test X)} &= 100 \times \frac{\text{Number of positive in both X and reference test}}{\text{Total number of positive in the reference test}} \\ \text{Specificity (test X)} &= 100 \times \frac{\text{Number of negative in both X and reference test}}{\text{Total number of negative in the reference test}} \end{aligned}$$

마. 야외 감염 감별 진단법 개발

AIV에 대한 사독백신을 접종할 경우, 백신접종에 의하여 형성된 항체와 AIV 자연감염에 의하여 형성된 항체를 구분하는 것은 AIV 방역에 있어서 매우 중요하다. 이러한 이유로 본 연구에서는 AIV의 유전자 중 NS(Nonstructural protein) 유전자에 의하여 발현되는 단백질을 이용하여 백신접종에 의하여 형성된 항체와 AIV 자연감염에 의하여 형성된 항체를 구분할 수 있는 진단법 개발을 계획하였다. 이를 위하여 NS 유전자를 baculovirus에서 발현시키고 발현된 NS 단백을 이용하여 ELISA법을 수행하였다.

1) NS 단백질 발현

Genomic viral RNA를 분리하여 NS 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 890bp인 NS 유전자를 확인할 수 있었다(Fig. 10-A). RT-PCR products를 pBlueBac4.5/V5-His TOPO plasmid vector에 ligation하여 pBlueBac4.5/V5-His-NS를 작제하고 이를 *E. coli* TOP10 competent cells에 transformation한 다음 ampicillin, X-gal 및 isopropylthio-β-galactoside(IPTG)가 첨가된 LB agar plate에 spreading하여 blue colony를 선택하여 insert NS gene을 확인할 수 있었다. Plaque법으로 순수 분리한 재조합 바이러스로부터 DNA를 추출하여 RT-PCR에 사용한 NS 유전자에 특이적인 primer로 PCR을 수행하여 NS 유전자의 삽입유무를 확인한 결과, 재조합 바이러스에서 890bp 크기의 band가 확인되어 NS 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 10-B, lane 1). 또한 baculovirus에 특이적인 polyhedrin forward primer와 reverse primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과, NS 재조합 바이러스에서 1,379bp 크기의 band가 확인되어 NS 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 10-B, lane 2). NS 유전자가 삽입된

recombinant 바이러스의 경우, NP 유전자가 삽입된 recombinant 바이러스와 마찬가지로 polyhistidine에 특이적인 단클론항체, chicken H9N2 항혈청으로 반응시킨 Sf9 세포에서만 형광이 관찰되고 preimmune chicken serum으로 처리한 Sf9 세포 대조군에서는 어떠한 형광도 관찰되지 않았다. 또한 Western blotting법으로 발현된 NS 단백을 확인한 결과, NS 유전자가 삽입된 recombinant 바이러스를 감염시킨 Sf9 cell lysate에서 polyhistidine과 chicken H9N2 항혈청으로 반응시킨 것에서만 54KDa의 크기에서 band가 확인되어 NS 단백질이 정상적으로 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 11).

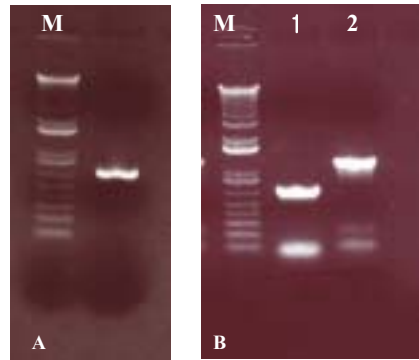


Fig. 10. RT-PCR amplification of NS gene(A) and confirmation of NS gene in the recombinant baculovirus by PCR(B). lane 1: NS gene with NS-specific primers
lane 2: NS gene with baculovirus-specific primers



Fig. 11. Analysis of expressed AIV NS gene by Western blotting. Sf9 cell lysates infected with AIV NS recombinant virus were reacted with Anti-his₆ monoclonal antibody(lane 2) and chicken anti-AIV serum(lane 1 and lane 3), respectively.

2) 감별 ELISA 개발

백신집중에 의하여 형성된 항체와 AIV 자연감염에 의하여 형성된 항체를 구분할 수 있는 ELISA법을 개발하기 위하여 앞에 기술한 AIV의 NP에 대한 ELISA법 개발과 동일한 방법으로 연구를 수행한 결과 Fig. 12와 같이 coating antigen의 적정 농도는 0.25 μ g/well로 나타났다.

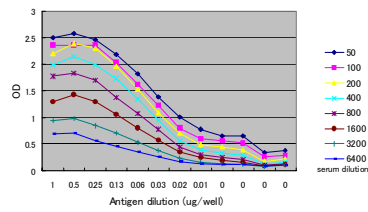
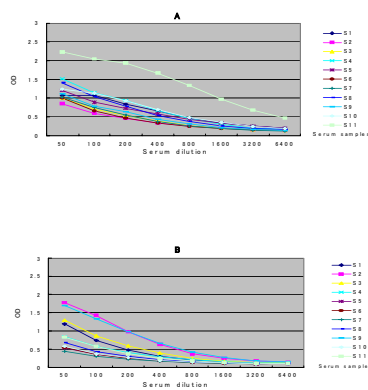


Fig. 12. Determination of optimal concentration of coating antigen for NS protein



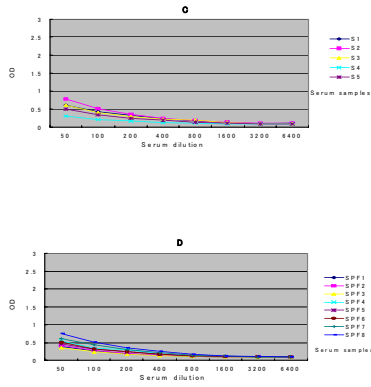


Fig. 13. Determination of optimal dilution of chicken serum and positive/negative ratio. Purified recombinant NS protein was coated with a concentration of $0.25\mu\text{g}$ /well and reacted with serially 2-fold diluted sera from naturally AIV infected(A), AIV vaccinated(B and C: high and low HI titers, respectively) and SPF(D) chickens.

NS protein을 $0.25\mu\text{g}$ /well의 농도로 coating시킨 plate를 사용하여 검사혈청의 적정희석 농도 및 positive/negative ratio 조건 설정을 위한 실험 결과는 Fig. 13과 같다. 검사혈청을 1:50과 1:100으로 희석하여 검사한 경우, 야외 감염으로 인하여 형성된 항체와 백신접종에 의하여 형성된 항체 중 낮은 HI 역가를 가지고 있는 것은 일부 가검 혈청을 제외하고 구별이 가능하였지만(Fig. 13-A와 13-C) 백신접종에 의하여 형성된 항체 중 높은 HI 역가를 가지고 있는 것과는 전혀 구별이 되지 않았다(Fig. 13-A와 13-B). 이러한 이유로 백신접종에 의하여 형성된 항체와 AIV 자연감염에 의하여 형성된 항체를 감별할 수 있는 ELISA법은 ELISA 조건을 다르게 하는 것과 NS protein에 대한 단크론항체를 생산하여 이를 이용한 경쟁적 ELISA법 개발 연구를 병행하여 진행 중에 있다.

제6절 가금인플루엔자 신속간이 진단키트 개발

1. 가금 인플루엔자(Avian influenza: AI) 바이러스 특이 단크론항체 생산

가. 바이러스 및 세포

본 실험에서 단크론항체 생산에 항원으로 사용한 AIV 국내 분리주는 제 1 세부과제에서 닭으로부터 분리하여 AIV H9N2 type으로 확인된 ADL-0401 strain을 사용하였다. ADL-0401의 배양은 일반적인 AIV 배양법에 따라 9-11일령 된 SPF 부화란의 요막강 내로 접종한 후 3일 후 요막강액을 수집하여 -70°C 에 보관하며 사용하였다. 단크론항체 생산에서 사용한 myeloma 세포주인 SP2/0 세포는 소태아혈청(Fetal calf serum: FCS)이 10% 함유되어 있는 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C , 5% CO_2 조건하에서 배양하였다.

나. 단크론항체 생산 및 특성 확인

1) 항원 준비

AIV H9N2 감염 요막강액을 3,000rpm에서 30분간 원심하여 상층액을 수집하였다. 상층액을 다시 25,000rpm(Beckman, SW 28 rotor)에서 2시간 동안 원심하여 바이러스를 침전시키고 침전된 바이러스를 소량의 phosphate buffered saline(PBS)에 부유하였다. Tri-HCl 완충용액에 sucrose를 60%, 30%, 15%(w/v) 되도록 용해한 후, 초고속원심분리용 12ml tube에 각각의 sucrose용액을 3ml씩 첨가하여 discontinuous gradient를 만들고 최종적으로 침전하여 부유시킨 AIV 용액을 상층에 첨가하여 25,000rpm에서 2시간 동안 원심하였다. 2시간 원심한 후, 60% sucrose 용액 상층부에 하얀 band로 나타나는 AIV를 주사 바늘을 이용하여 수집하였다. 수집한 AIV는 sucrose를 제거하기 위하여 Tri-HCl 완충용액에 희석하여 다시 25,000rpm에서 2시간 동안 원심하여 상층액은 제거하고 침전물을 소량의 PBS에 부유하여 mouse 접종용 항원으로 사용하였다.

2) Mouse 면역

가) 복강 내 접종

6주령 된 숫컷 BALB/c mouse에 AIV 감염 요막강액으로부터 정제한 항원을 Freund's complete adjuvant와 동량으로 혼합하여 복강 내로 0.5ml 씩 1차 접종하였다. 2차와 3차 접종은 각각 접종 3주 후 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 동량으로 혼합한 후 0.5ml 씩 복강 내로 접종하였다. 3차 접종 후 마우스의 미정맥으로부터 채혈하여 AIV에 대한 항체역가를 확인하였다. 항체역가가 세포융합하기에 낮을 경우에는 3차 접종과 같은 방법으로 추가 접종하였다.

나) Food-pad 접종

세포융합에 사용할 mouse를 면역시키는데 3주 간격으로 3-4회 접종할 경우 적어도 면역에만 2개월이 소요되는 단점이 있어 이를 보완하기 위하여 mouse의 foot pad에 접종하는 방법을 함께 시도하였다. 즉, 6주령의 숫컷 BALB/c mouse에 semi-purify한 AIV 항원을 Freund's complete adjuvant와 동량으로 혼합하여 각각의 mouse foot pad로 50 μ l 1차 접종하였다. 2차와 3차 접종은 각각 마지막 접종 3일 후 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 동량으로 혼합한 후 같은 부위에 50 μ l씩 접종하였다.

3) 세포융합 및 양성 hybridoma 선별

세포융합은 Kohler와 Milestein의 방법과 Saif 등의 방법에 따라 실시하였다. 복강 내로 면역을 시킨 경우, 세포융합 전 3일에 AIV 항원 50 μ l를 정맥 주사하고 mouse의 비장을 무균적으로 채취하여 serum-free medium(SFM)으로 3회 세척하였다. Food-pad로 면역시킨 경우, 세포융합은 3차 접종 후 3-4일에 세혜부 림프절과 액와 림프절이 종대되어 있는 것을 확인한 후, mouse를 안락사시켜 각각의 림프절을 무균적으로 채취하여 면역세포를 분리하고 SFM으로 3회 세척하였다. 3회 세척한 면역세포에 미리 준비한 SP2/0 myeloma cell과 1:5로 혼합하여 1회 원심한 뒤 PEG/DMSO를 이용하여 세포를 융합시켰다. 이 세포들을 HAT배지로 부유시킨 다음, 96-well microplate에 well당 200 μ l씩 분주하여 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 3-4일 간격으로 HAT배지를 교체하였으며 세포융합 10일 후 colony가 well의 1/3이상 형성된 융합세포의 배양 상층액을 채취한 후 AIV에 대한 항체유무를 IFA법으로 확인하였다. IFA법은 96-well plate에 배양된 Sf9 세포에 2차 년도에 작성한 AIV nucleocapsid(NP), hemagglutinin(HA), neuraminidase(NA), nonstructural protein(NS) 유전자에 특이적인 recombinant virus를 접종 후, CPE가 관찰될 때 80% 아세톤으로 고정된 뒤 PBS로 두 번 세척하고 검사하고자 하는 융합세포의 배양 상층액을 well당 100 μ l 첨가하였다. Plate를 37 $^{\circ}$ C, incubator에서 45분간 방치한 후 각 well을 PBS로 3회 세척하였다. PBS로 50배 희석된 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse Ig(G+A+M)을 well 당 50 μ l씩 접종한 후 위와 같은 조건으로 45분간 방치한 다음 PBS로 3회 세척 후 형광현미경으로 관찰하였다. 각각의 NP, HA, NA 그리고 NS에 특이적인 항체를 생산하는 융합세포는 limiting dilution법으로 3회 이상 cloning을 실시하여 single clone을 선별하고 선별된 hybridoma 세포를 pristane으로 미리 감각시킨 BALB/c mouse의 복강 내로 접종하여 복수를 생산하였다.

4) 단클론항체의 특성 확인

가) 단클론항체의 Isotype 결정

생산된 단클론항체의 isotype을 결정을 위해 monoclonal antibody isotyping

kit(Sigma)를 제조사의 술식에 따라 사용하였다.

나) 단크론항체의 단백질특이성 결정

단크론항체의 NP, HA, NA, NS 단백질특이성은 Western blotting법으로 조사하였다. 즉, mouse 접종용 항원 제조와 같은 방법으로 농축한 AIV 또는 baculovirus에서 발현된 NP, HA, NA, NS 단백을 농축하여 6X sample buffer(0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)에 섞어 5분간 boiling한 후 12.5% SDS-polyacrylamide slab gel에서 전기 영동하였다. 전기영동 후, gel을 transfer buffer(20 mM Tris-HCl, 170 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol)로 평형시킨 후 semi-trans blot(Bio-rad)을 이용하여 transfer buffer로 평형시킨 PVDF membrane에 13 volt에서 20분간 전이시켰다. 5% non-fat-dry milk로 2시간 동안 membrane을 blocking 시킨 후 1:100으로 희석된 단크론항체 복수와 실온에서 1시간 반응시킨 후 Tris-buffered saline(Tris 20mM, NaCl 500mM, pH7.5)으로 5분씩 3회 세척하였다. 세척 후, 1:2,000으로 희석한 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG와 1시간 반응시킨 후 발색제로 NBT-BCIP를 사용하여 반응시킨 후 결과를 관찰하였다.

다) 단크론항체의 혈구응집억제능 확인

생산된 단크론항체가 혈구응집을 억제하는가는 일반적인 HI법으로 수행하였다.

라) 단크론항체와 다른 바이러스와의 반응성 확인

생산된 단크론항체와 다른 조류 바이러스인 Newcastle disease virus(NDV), infectious bursal disease virus(IBDV), infectious bronchitis virus(IBV) 그리고 avian reovirus와의 반응성은 간접형광항체법으로 확인하였다.

Table 5-1. Characterization of AIV-specific monoclonal antibodies(MAbs)

MAb	Isotype	Protein specificity ¹	HI titer ²	Reaction with other avian viruses ³			
				NDV	IBDV	IBV	ReV
5E7	G2a	NP	<2	-	-	-	-
5D7	G2a	NP	<2	-	-	-	-
6B5	G2a	NP	<2	-	-	-	-
17E1	G1	HA	<2	-	-	-	-
18E10	G2b	HA	64	-	-	-	-
20B6	G2b	HA	<2	-	-	-	-
21D7	G1	HA	<2	-	-	-	-
23D12	M	HA	128	-	-	-	-
24F7	M	HA	<2	-	-	-	-
8H9	G1	NA	<2	-	-	-	-
9D7	G2a	NA	<2	-	-	-	-
1A4	G1	NS	<2	-	-	-	-
1F12	G1	NS	<2	-	-	-	-
2E1	G1	NS	<2	-	-	-	-
3B9	G1	NS	<2	-	-	-	-
4H5	G2a	NS	<2	-	-	-	-
5E6	G1	NS	<2	-	-	-	-

¹NP: nucleocapsid, HA: hemagglutinin, NA: neuraminidase, NS: nonstructural protein

²HI titer of each MAb was determined against AIV H9N2.

³NDV: Newcastle disease virus, IBDV: infectious bursal disease virus, IBV: infectious bronchitis virus, ReoV: Reovirus

Table 5-2. Reactivity pattern of AIV-specific monoclonal antibodies(MAbs) with NP, HA, NA and NS recombinant virus

MAb	H9N2				H5N3		
	NP ¹	HA ²	NA ³	NS ⁴	HA	NA	NS
5E7	+++	-	-	-	-	-	-
5D7	+++	-	-	-	-	-	-
6B5	+++	-	-	-	-	-	-
17E1	-	+++	-	-	-	-	-
18E10	-	+++	-	-	-	-	-
20B6	-	+++	-	-	-	-	-
21D7	-	+	-	-	-	-	-
23D12	-	+++	-	-	-	-	-
24F7	-	+++	-	-	-	-	-
8H9	-	-	++	-	-	-	-
9D7	-	-	++	-	-	-	-
1A4	-	-	-	++	-	-	++
1F12	-	-	-	++	-	-	++
2E1	-	-	-	++	-	-	++
3B9	-	-	-	++	-	-	++
4H5	-	-	-	++	-	-	++
5E6	-	-	-	++	-	-	++

Sf9 cells infected with NP, HA, NA and NS recombinant baculovirus of AIV H9N2 or 5N3 were reacted with each AIV-specific MAb and stained with FITC-conjugated with goat anti-mouse IgG.¹NP: nucleocapsid, ²HA: hemagglutinin, ³NA: neuraminidase, ⁴NS: nonstructural protein

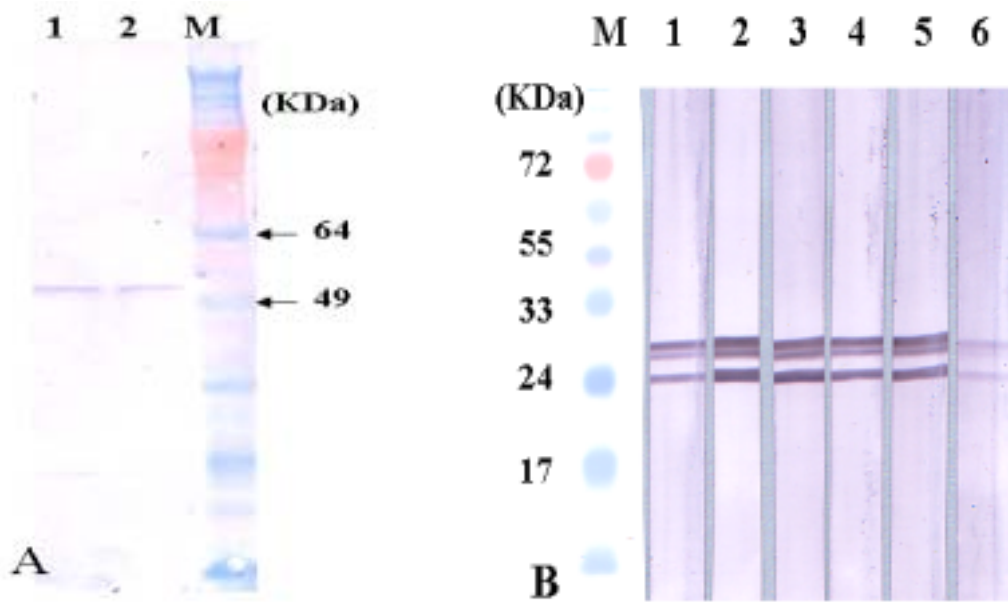


Fig. 5-1. Determination of viral protein specificity of AIV-specific monoclonal antibodies(MAbs) by Western blotting
 A: NP-specific MAbs(1: 5E7, 2: 6B5)
 B: NS-specific MABs(1: 4H5, 2: 2E1, 3: 1A4, 4: 1F12, 5: 5E6, 6: 3B9)

3. AIV 특이 단클론항체를 이용한 신속 진단키트 개발

AIV를 검출하기 위하여 colloidal gold와 AIV 특이 단클론항체를 사용하여 Fig. 4-1의 원리를 이용하여 AIV 항원 검출용 진단키트를 제작하였다.

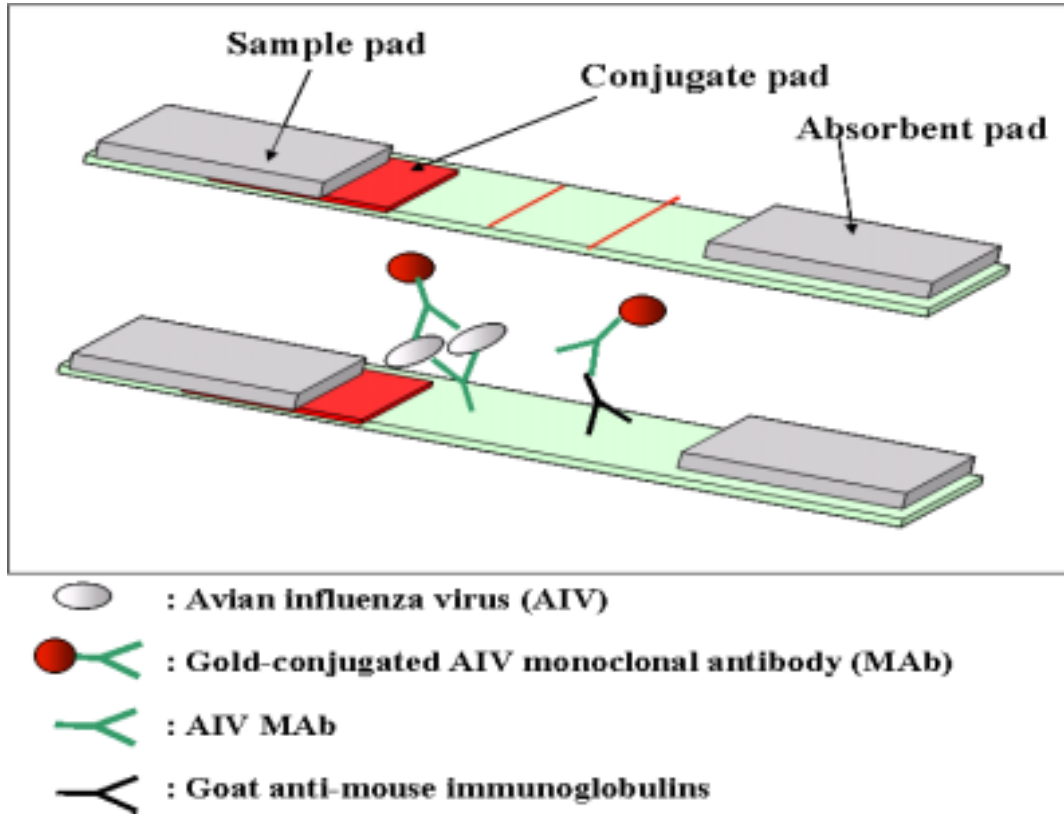


Fig. 4-1. Schematic diagram of AIV rapid diagnostic kit

가. 단클론항체 정제 및 선별

Protein G agarose column를 사용하여 immunoaffinity chromatography법으로 복수로부터 immunoglobulin을 정제하고 정제된 단클론항체의 양을 측정한 결과, 정제된 단클론항체는 모두 99% 이상 순수하고 AIV 단클론항체 5E7의 단백질농도는 3.0 mg/ml 그리고 6B5는 2.0mg/ml로 나타났다(Fig. 5-2). AIV nucleocapsid(NP) 단백 특이 단클론항체를 각각의 조합으로 하여 detector antibody와 capture antibody를 immunochromatography법으로 확인한 결과, 단클론항체 5E7은 capture antibody로 그리고 단클론항체 6B5는 detector antibody로 사용하는 것이 진단키트의 민감도 및

특이성과 관련하여 효과적인 것으로 나타났다.

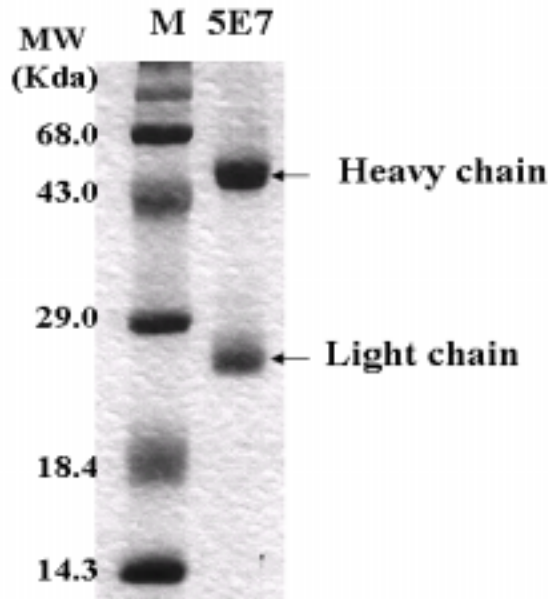


Fig. 5-2. Purification of IgG from ascites

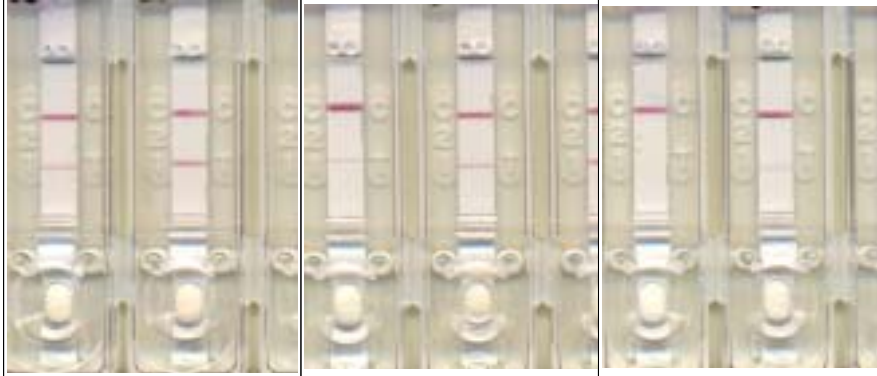
AIV-specific IgG was purified using protein G-agarose column and its purity was confirmed by SDS-PAGE.

M: molecular weight marker, 5E7: AIV-specific monoclonal antibody

나. 진단키트의 제작 및 반응조건 확립

1) Capture antibody의 적정농도 및 반응시간

검사선 항체(Anti-AI monoclonal antibody)와 대조선 항체(Goat anti-mouse immunoglobulin G)의 포화점을 찾아 민감도와 특이도 모두에 가장 최적의 조건을 선택하기 위하여 각각의 항체를 1.5, 2.5, 3.0mg/ml의 농도로 희석하고 검사시간을 3, 5, 10, 15, 20분 후 판독하여 최적 농도 및 검사시간을 결정한 결과, AIV 단클론항체의 경우 2.5mg/ml, goat anti-mouse immunoglobulin G의 경우 2.5mg/ml로 코팅하였을 경우 검사선과 대조선 밴드 두께의 포화점을 나타냈다(Fig. 5-3). 이는 한 스트립 당 0.4 cm이므로 총단백질 각각 1 μ g에서 포화 되는 것이다. 검사시간은 고역가의 항원의 경우 수분 내에 판독이 가능하며, 낮은 역가 항원의 경우 15분 내에서 양성으로 확인하였으므로 검사 시간은 15분으로 결정하였다(Fig. 5-4). 15분 이상부터 시험한 디바이스를 방치할 경우 역류 현상이 간혹 있어 음성 검체가 양성으로 판독될 가능성이 있다.

Positive(AIV)	$1 \times 10^{6.0}$ EID ₅₀			$1 \times 10^{5.0}$ EID ₅₀			$1 \times 10^{4.0}$ EID ₅₀		
Conc. of coating Aby (mg/ml)	1.5	2.5	3.0	1.5	2.5	3.0	1.5	2.5	3.0
Result									
	++	+++	+++	+	++	++	+/-	++	+


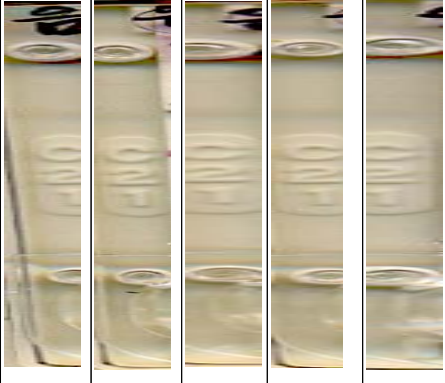

Negative	Negative 1 ₁			Negative 2			Negative 3		
Conc. of coating Aby(mg/ml)	1.5	2.5	3.0	1.5	2.5	3.0	1.5	2.5	3.0
Results									
	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-

Fig. 5-3. Determination of optimal concentration of coating antibody for test

and control line

Sample	Negative 1					1x10 ^{6.0} EID ₅₀				
Time/min	3	5	10	15	20	3	5	10	15	20
Results										
	-	-	-	-	+/-	++	++	+++	+++	+++



Sample	1x10 ^{5.0} EID ₅₀					1x10 ^{4.0} EID ₅₀				
Time/min	3	5	10	15	20	3	5	10	15	20
Results										
	+	+	++	++	++	-	-	+/-	+	+

Fig. 5-4. Determination of optimal reaction times for AIV rapid diagnostic kits

2) Conjugate의 최적농도

Conjugate의 최적농도를 결정하기 위하여 앞 실험에서 정한 coating 항체의 농도와 AIV monoclonal antibody-gold conjugate의 O.D₅₂₀ = 10을 각각 25 μ l, 50 μ l, 100 μ l로 하여 AIV 양성 및 음성 표준품을 검사하여 conjugate의 포화점을 찾아 민감도와 특이도 모두에 가장 최적의 조건을 선택하여 농도를 확인한 결과, 50 μ l를 적용하였을 때 검사선 밴드와 대조선 밴드 두께의 포화점을 나타냈다(Fig. 5-5).

Positive(AIV)	1x10 ^{6.0} EID ₅₀			1x10 ^{5.0} EID ₅₀			1x10 ^{4.0} EID ₅₀		
Conc. of conjugate (μ l)	25	50	100	25	50	100	25	50	100
Results									
	++	+++	+++	+	++	++	-	+	++

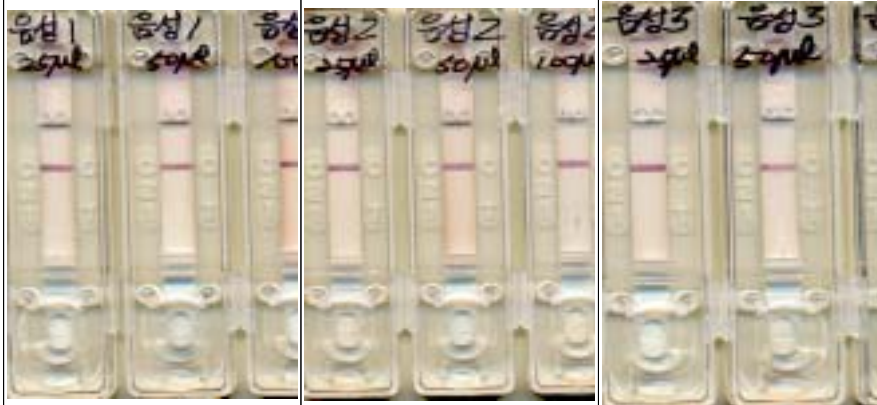
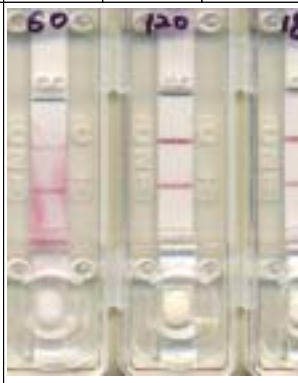
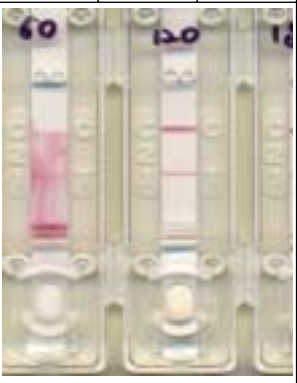

Negative	Negative 1 ₁			Negative 2			Negative 3		
Conc. of conjugate(μl)	25	50	100	25	50	100	25	50	100
Results									
	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 5-5. Determination of optimal concentration of AIV monoclonal antibody-gold conjugate for AIV rapid diagnostic kits

3) 전개용액의 적정량 결정

PBS에 triton X-100(0.05%, v/v)와 보존제로 sodium azide(0.01%, w/v)를 첨가하여 앞 실험에서 확인한 coating antibody와 conjugate의 농도대로 coating 및 conjugation하여 용액을 적정하여 AIV 양성 및 음성 표준품을 검사하여 포화점을 찾아 민감도와 특이도에 적합한 양을 결정한 결과, 전개용액 60 μl 는 gold conjugate를 충분히 용해시키지 못하였으며 120 μl 이상에서 gold conjugate를 완전히 용해시키고, chromatography에 충분한 양이므로 120 μl 이상으로 결정하였다(Fig. 5-6). 이는 통상 rapid test에 요구되는 수준이다.

Positive(AIV)	$1 \times 10^{6.0}$ EID ₅₀			$1 \times 10^{5.0}$ EID ₅₀			$1 \times 10^{4.0}$ EID ₅₀		
Amounts of diluent(μ l)	60	120	180	60	120	180	60	120	180
Results									
	++	+++	+++	+	++	++	-	+	++




Negative	Negative 1			Negative 2			Negative 3		
Amounts of diluent(μ l)	60	120	180	60	120	180	60	120	180
Results									
	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 5-6. Determination of optimal volume of dispensing media applied to AIV rapid diagnostic kits

다. 신속 진단키트의 특이성 확인

제작된 신속 진단키트의 특이성을 국내에서 분리된 여러 가지 혈청형(H3, H4, H5, H6, H7, H9)의 AIV 감염 요막강액을 사용하여 확인한 결과, 거의 모든 AIV에서 band가 확인되었다(Fig. 5-7). 또한 조류에서 문제가 되고 있는 Newcastle disease virus(NDV), infectious bursal disease virus(IBDV), infectious bronchitis virus(IBV) 그리고 avian reovirus 감염 조직배양액을 사용하여 확인한 결과, 모든 바이러스에서 음성으로 나타났다.



Fig. 5-7. Specificity of AIV rapid diagnostic kit

AIV isolates with different H type (H3, H4, H5, H6, H7, H9) were tested using AIV rapid diagnostic kit.

라. 신속 진단키트의 민감도 확인

제작된 신속 진단키트의 민감도를 확인한 결과는 Fig. 5-8과 같다. AIV의 역가가 $10^{7.0}$ EID₅₀/ml인 ADL-0401 strain을 10배 단계 희석하여 반응정도를 확인한 결과, 10^{-2} 희석배수까지는 뚜렷하게 확인할 수 있었으며 10^{-3} 희석배수에서도 band가 확인되어 $10^{4.0}$ EID₅₀/ml까지 검색할 수 있음을 확인하였다.

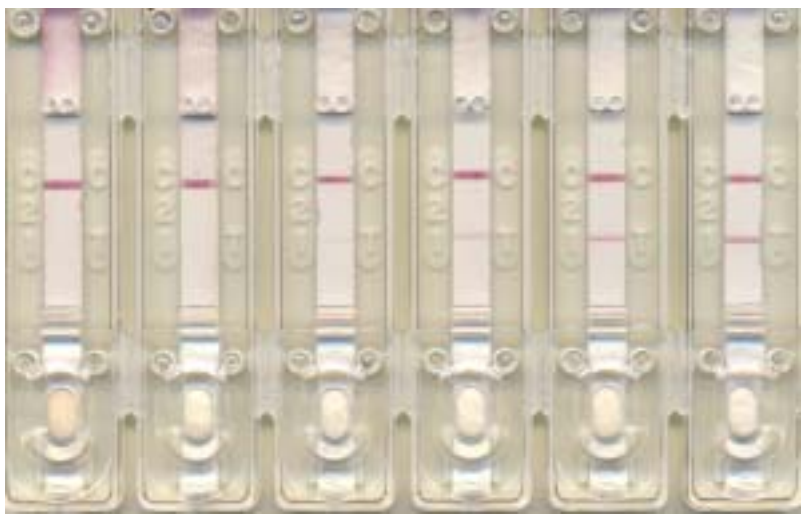
AIV(EID ₅₀ /ml)	1x10 ²	1x10 ³	1x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁶	1x10 ⁷
Results	-	-	+	++	+++	+++
						

Fig. 5-8. Sensitivity of AIV rapid diagnostic kit

AIV ADL-0401 strain (H9N2: 10^{7.0} EID₅₀/ml) was diluted from 10⁰ to 10⁵ and tested using AIV rapid diagnostic kit.

마. 신속 진단키트의 야외 시험

제작된 신속 진단키트를 이용하여 실험적으로 AIV H9N2를 감염시킨 SPF 닭으로부터 cloacal swab을 하여 AIV 존재 유무를 확인한 결과는 Table 5-3과 같다. AIV H9N2 감염 후 3일에 한 마리의 닭(I-3)에서 양성으로 나타났으며 감염 후 5일에는 매우 강한 반응으로 나타났다. 또한 3마리의 닭(I-1, I-2, I-5)에서는 감염 후 5일에 양성으로 나타났으나 1마리(I-4)에서는 실험기간 동안 음성으로 나타났다. 반면에 AIV가 감염되지 않은 대조군에서는 모두 음성반응으로 나타났다. 현재 동일한 가검물을 가지고 RT-PCR법으로 AIV H9N2를 확인하는 실험이 진행 중이다.

Table 5-3. Results of rapid diagnostic kit for AIV detection from field samples

Group	No.	Days post-infection(DPI)			
		0	3	5	7
Infected	I-1	-	-	+	-
	I-2	-	-	+	-
	I-3	-	-	-	-
	I-4	-	+	++	-
	I-5	-	-	+	-
Control	C-1	-	-	-	-
	C-2	-	-	-	-
	C-3	-	-	-	-
	C-4	-	-	-	-
	C-5	-	-	-	-

면역크로마토그래피(Immunochromatography) 원리를 이용한 진단법은 민감도와 특이성이 우수한 진단법으로 알려져 있으며 무엇보다 간단하고 신속하게 결과를 확인할 수 있는 방법으로 사람의 의학 분야에서는 여러 가지 질병에 대하여 널리 사용되고 있다. 현재 수의학 분야에서는 애완동물의 진단법으로 이러한 신속 진단키트가 개발되어 사용되고 있다. 즉, 개 파보바이러스와 심장사상충 등의 진단법을 예로 들 수 있으며 최근에 국립수의과학검역원에서는 구제역을 단시간 내에 진단할 수 있는 신속 진단키트를 개발하여 보고하고 실제 야외에서 활용한 적이 있다.

앞의 연구에서는 닭 혈청으로부터 AIV 특이항체를 확인할 수 있는 ELISA법을 개발하였으나 본 연구에서는 AIV 항원을 직접 검색할 수 있는 신속 진단키트를 면역크로마토그래피 원리를 이용하여 개발하였다. 먼저 신속 진단키트 개발에 사용할 AIV 특이 단클론항체를 일반적인 세포 융합법으로 생산하였다. 총 17개의 AIV 특이 단클론항체를 생산하였는데 3개의 단클론항체가 nucleocapsid(NP) 단백질에 특이적인 것으로 나타났다. AIV 피막에 존재하고 있는 hemagglutinin(HA)과 neuraminidase(NA)에 특이적인 단클론항체를 생산하기 위하여 baculovirus에서 발현

된 HA와 NA 재조합 바이러스 단백을 양성 hybridoma 검색용으로 사용하여 각각 6개와 2개의 단클론항체를 생산하였는데 이들 6개의 HA 특이 단클론항체 중 2개 (18E10, 23D12)는 혈구응집억제능력이 있는 것으로 나타났다. AIV의 HA 당단백은 중화항체형성에 관여하며 방어에 중요한 역할을 하는 AIV 단백질로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 생산된 2개의 단클론항체는 HA 당단백에서 중화항체형성과 관계가 있는 epitope에 대한 것으로 추정되며 나머지는 중화항체형성과 관계가 없는 epitope에 대한 것으로 추정된다. 생산된 단클론항체와 다른 조류 바이러스인 Newcastle disease virus(NDV), infectious bursal disease virus(IBDV), infectious bronchitis virus(IBV) 그리고 avian reovirus와의 바이러스와는 반응하지 않아 생산된 단클론항체가 모두 AIV에 특이적인 것을 확인할 수 있었다.

3개의 AIV NP 단백질 특이 단클론항체를 사용하여 신속 진단키트에 사용할 detector와 capture antibody를 여러 가지의 조합을 만들어 실험한 결과, detector antibody로는 6B5, 그리고 capture antibody로는 5E7이 가장 적당한 것으로 확인되었다. 본 연구에서 개발된 진단키트에서는 capture antibody와 detector antibody로 모두 AIV의 NP 단백을 사용하였는데 NP 단백질은 AIV에서 공통항원으로 작용을 하고 피막 안쪽에 위치하고 있다. 하지만 M2 단백질은 피막에 위치하여 바이러스 입자의 바깥쪽으로 노출되어 있고 또한 AIV 간에 상당히 conserved되어 있어 M2 단백질에 대한 항체를 사용하면 진단키트의 민감도를 보다 증강시킬 수 있을 것으로 생각된다. 개발된 신속 진단키트의 특이성을 국내에서 분리된 여러 가지 혈청형(H3, H4, H5, H6, H7, H9)의 AIV와 조류에서 문제가 되고 있는 Newcastle disease virus(NDV), infectious bursal disease virus(IBDV), infectious bronchitis virus(IBV) 그리고 avian reovirus를 사용하여 확인한 결과, 거의 모든 AIV에서 band가 확인되었으나 AIV 이외의 다른 조류 바이러스에서는 모두 음성으로 나타나 개발된 진단키트가 국내에서 문제점 없이 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 제작된 신속 진단키트의 민감도를 AIV의 역가가 $10^{7.0}$ EID₅₀/ml인 ADL-0401 strain을 10배 단계 희석하여 반응정도를 확인한 결과, $10^{4.0}$ EID₅₀/ml까지 검색할 수 있음을 확인하였다. 본 연구에서 수행된 신속 진단키트 개발 기술을 기본으로 하여 현재 전 세계적으로 문제가 되고 있는 고병원성 AIV를 특이적으로 확인할 수 있는 진단키트의 개발도 H5에 특이적으로 반응하는 항체를 개발하면 가능할 것으로 사료된다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구를 수행함으로써 국내에서 처음으로 조류인플루엔자 사독백신을 개발하였으며 산업화에 성공을 하였다. 국가로부터 품목허가를 받게되면 농가에 공급함으로써 국내 산란계의 대부분이 감염되고 있는 약병원성 조류인플루엔자로부터 경제적피해를 줄일 수 있을 것이다. 또한, 본 연구에서 조류인플루엔자의 감염을 신속히 진단할 수 있는 ELISA kit와 신속진단 kit가 개발되었기 때문에 백신과 함께 관련 방역기관에 공급이 된다면 국가차원에서 효율적인 방역이 이루어질 것으로 판단된다. 따라서, 본 사업을 시작할 때 추구하였던 백신개발과 진단키트개발의 목표는 충분히 달성하였다고 보며 구체적인 기여도를 정리하면 아래와 같다.

기술적 측면

- 첫째는 임상증상이 뚜렷하지 않은 약병원성 가금인플루엔자 바이러스의 숙주와의 병성기전연구에 realtime RT-PCR 법을 활용함으로써 답변만 아니라 다른 축종 등의 만성 소모성질병관련 연구에 본 기술을 응용할 수 있다.
- 둘째는 국내분리주에 대한 ELISA 검사법을 확립하고함으로써 언제든 국내 유입이 가능한 다양한 형의 가금인플루엔자에 대한 모니터링 방법이 확립될 수 있다.
- 셋째는 야외감염과 백신접종 항체를 구별할 수 있는 kit를 개발함으로써 앞으로 다양한 혈청형이 존재하는 조류 인플루엔자에 대한 효과적인 방제 방법을 제시할 수 있다.

경제 · 산업적 측면

- 본 연구를 수행함으로써 가장 중요한 기여는 현재 약 50%의 감염율을 보이고 있는 산란계 등에서 조류인플루엔자에 의한 경제적 손실을 최소화 할 수 있다는 것이다.
- 또한, 본 연구를 통하여 개발된 백신을 양계농가에 접종하여 현장문제를 해결함으로써 국가의 방역정책이 농가로부터 신뢰를 구축할 수 있을 것으로 판단됨.

제5장 연구개발 결과의 활용계획

○ 산업화계획방안

본 연구를 통하여 개발된 조류 인플루엔자 사독백신은 이미 산업화가 진행이 되어 국가기관에 품목허가 신청중이며 혈청검사 진단 키트는 향후 산업화를 진행할 예정이다.

○ 현장보급 방안

개발된 백신에 대한 품목허가가 이루어 지면 바로 국가검정을 거쳐 농가에 보급될 것이다. ELISA 진단키트는 현재 외국으로부터 수입이 되고 있으나 국내에서 대량생산이 되면 국산대체효과를 얻을 것이다.

○ 기술이전 방안

본 연구를 통하여 확립된 기술은 참여기업을 통하여 기술이전을 할 예정이다

○ 현장애로해결

본 사업을 통하여 이미 야외실증실험이 종료되었으며 그 효과가 인정이 되었기에 현장에서의 문제해결에 대한 가능성은 매우 높은 상태이며 향후 산업화 및 현장보급을 통하여 적극적인 현장애로해결을 할 것이다.

○ 추가연구의 필요성

본 연구사업을 추진하는 과정 중에 제작된 재조합 바이러스를 이용하여 사독백신을 개발할 필요가 있음. 1년 정도의 단기간 연구를 통하여 가능하며 이와 같이 재조합 바이러스를 이용한 백신개발은 다른 형의 조류인플루엔자 백신개발에도 이용될 수 있는 기술로 지속적인 지원이 필요하다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

<해당사항 없음>

제7장 참고문헌

1. Alexander, D.J. Avian influenza-recent developments. Vet. Bull. 52:341-359. 1982
2. Barr, D.A., A.P.Kelly, R.T. Badman, A.R. Compey and M.D. O'Rourke. Avian influenza on a multi-age chicken farm. Aust. Vet. J. 63: 195-196. 1986.
3. Beard, C.W. Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. Bull. World Health Organ. 42: 779-785. 1970.
4. Beard, C.W. Avian influenza. In: Isolation and identification of avian pathogens, S.B. Hitchner, C.H.Domermuth, H.G. Purchase and J.E. Williams. American Association of Avian Pathologists, Ithaca. Pp.174-181. 1975.
5. Becker, W.B. The isolation and classification of tern virus influenza virus A/Tern/South Africa/1961. J. Hyg. 64: 309. 1966
6. Brugh, M. and C. W. Beard. Influence of dietary calcium stress on lethality of avian influenza viruses for laying chickens. Avian Dis. 30: 672-678. 1986
7. Chen, H., Subbarao, k., Swayne, D., Chen, Q., Lu, X., Katz, J., Cox, N. and Matsuoka, Y. Generation and evaluation of a high-growth reassortant H9N2 influenza A virus as a pandemic vaccine candidate. 16:1974-1979. 2003
8. Eckroade, R.J., L.A. Silverman Bachin and H.M. Acland. Avian influenza in Pennsylvania. Proc. 33rd Western Poultry Dis. Conf. Pp.1-2. 1984
9. Lang, G., A.E. Ferguson, M.C. Connell and C.G. Wills. Isolation of an unidentified hemagglutinating virus from the respiratory tract of turkeys.

- Avian Dis. 9: 495-504. 1965.
10. Lee, C.W., Senne, D.A. and Suarez, D.L. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. 78:8372-8381. 2004
 11. Mo, I. P., M. Brugh, O. J. Fletcher, G. N. Rowland and D.E. Swayne. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. Avian Dis. 41:125-136. 1997
 12. Naeem, K. and Siddique, N. Use of strategic vaccination for the control of avian influenza in Pakistan. Dev Biol. 124:145-150. 2006.
 13. Newman, J., D. Halvorson and D. Karunakaran. Complications associated with avian influenza infections. In: Proc. 1st Int. Symp. Avian Influenza. R.A. Bankowski, ed. Carter Printing Co., Richmond, Virginia. pp. 8-12. 1981.
 14. Nili, H. and Asasi, K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian Pathol. 31:247-252. 2002.
 15. Pereira, H.G., B. Tumova and V.G. Law. Avian influenza A viruses. Bull. World Health Organ. 32: 855-860. 1965
 16. Stephenson, I., Nicholson, K.G., Gluck, R. and Mischler, R. Safety and antigenicity of whole virus and subunit influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) vaccine in healthy adults: phase I randomised trial. Lancet. 13:1959-1966. 2003.
 17. Utterback, W. Update on avian influenza through February 21, 1984 in Pennsylvania and Virginia. Proc. 33rd Western Poultry Dis. Conf. pp.4-7. 1984.