

SPF 닭에서 재조합 H9N3 조류 인플루엔자 백신의 효능과 안전성 평가

신정화, 모인필

충북대학교 수의과대학 수의학과 조류질병학교실

Abstract

To reduce the economic impact and control Low pathogenic avian influenza (LPAI), vaccination with inactivated vaccine has been considered in this country. We tried to develop inactivated vaccine with reassorted H9N3 AI virus which has different type of neuraminidase compare to those of field AI virus.

Before reassorted vaccine was produced, we confirm the virus as master seed by limiting dilution, RT-PCR and sequencing method. Also, we evaluate the biological characteristics of the virus to find out the possibility of prevention against field infection of AI virus. Finally, we evaluate the safety and efficacy of the vaccine made of reassorted AI virus in the specific pathogen free (SPF) chickens.

After limiting dilution, we choose RV7CE4 as a vaccine candidate and compare the gene sequence of this vaccine strain to those of AI05GA which is parents strain. Compared to amino acid sequences of specific gene of AI05GA and RV7CE4, exhibited a high degree of amino acid sequence homology. In the safety and efficacy test, there were no specific clinical signs or mortality. Reassorted H9N3 viruses were reisolated in cloaca swab on 5 days post inoculation. In the vaccine study, once or twice vaccination was performed and

challenged with H9N2 field virus (01310). Vaccine has no adverse effect on birds and formed good immune capability which reduce viral shedding in the birds infected with 01310.

Based on the above result, we developed reassorted H9N3 vaccine which will efficiently prevent the low pathogenic AIV (H9N2) infection in the poultry farms.

▶ **Key Words** : avian influenza vaccine, H9N3

서론

조류인플루엔자 바이러스(AIV)에 감염되면 임상증상이 없는 불현성 감염과 산란율 감소 및 약한 호흡기 증상에서부터 전신감염까지 다양한 임상증상을 수반한다. 전신감염은 고병원성 조류 인플루엔자(High-pathogenic avian influenza : HPAI)바이러스에 의한 것으로 닭이나 가금류에 감염되면 여러 장기에서 증식하여 심한 임상증상과 함께 높은 폐사율을 야기한다. 불현성 감염과 산란율 감소 및 약한 호흡기 증상의 형태는 약병원성 조류 인플루엔자(Low-pathogenic avian influenza : LPAI)바이러스 감염에 의한 것이다. 국내에서는 1996년 3월 경기도 화성 등 3개 지역 5개 농장에서 처음 발생되었으며 모두 약병원성 바이러스(A/Chicken/Anyang/MS96 :H9N2)가 분리되었다. 현재는 전국의 산란계 농장으로 확산되어 양계산업에 막대한 손실을 초래하고 있다. 본 연구의 목적은 LPAI로 인한 경제적 손실을 효과적으로 방제할 수 있는 사독백신을 개발하는 것이며, 또한 사독백

신의 단점인 AIV 필드바이러스 감염 시 혈청학적인 간섭 현상을 보완하기 위하여, 국내 유행주인 H9N2 바이러스와 Hemagglutinin 혈청형은 동일하며 Neuraminidase 혈청형은 다른 재조합 H9N3 바이러스를 이용하여 백신을 개발하고 그 안전성과 효능을 평가하는 것이다.

재료 및 방법

백신을 제조하기 전 재조합 H9N3바이러스(AI05GA)를 계란에 접종 후 Limiting dilution 기법을 이용하여 Biological cloning을 실시한 후 백신후보주(RV7CE4)를 선정하였다. 또한 이 바이러스를 QR T-PCR, Cloning, Sequencing을 통하여 AI05GA와 비교하였다. 재조합바이러스의 생물학적 특성을 조사하기 위해서 RV7CE4를 계란에 접종한 후 시간대별로 HA역가의 변화를 관찰하였으며, 필드유래 바이러스인 H9N2(01310)를 이용하여 이중항원에 대한 바이러스 중화능을 시험하였다. 또한 병원성과 바이러스 재분리율을 시험하기 위하여 4주령의 SPF 닭에 01310과 RV7CE4를 접종하고 2주간 매일 관찰하였다. 백신의 제조는 0.1% Formalin을 이용하여 RV7CE4를 4°C에서 24시간 동안 불활화 시킨 후 ISA 70(Paris, France)을 7대 3 비율로 섞어 제조하였다. 백신에 대한 안전성을 평가하기 위하여 4주령의 SPF 닭에 백신을 권장용량(0.3ml)과 그 두 배 용량(0.6ml)을 접종하여 임상증상과 폐사율을 관찰하였고 또한 면역형성능을 시험하였다. 백신에 대한 효능을 평가하기 위하여 4주령의 SPF 닭에 백신을 1차 혹은 2차에 걸쳐 접종한 후 01310으로 공격 접종하여 임상증상과 폐사율을 관찰하고 혈청 역가의 변화와 조직 내 바이러스 함량을 관찰하였다.

결과 및 고찰

RV7CE4와 AI05GA의 아미노산 서열을 비교한 결과 RV7CE4는 오염이 없고 더 이상의 변화가 없는 생물학적으로 완전한 바이러스임이 입증되었다. RV7CE4의 HA 역가 비교실험 결과 72시간에서 가장 높은 역가를 나타내었다. 또한 01310과의 이중항원에 대한 중화능력을 시험한 결과 01310과 RV7CE4간의 항원성에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 바이러스 접종 후 임상증상 관찰 실험에서는 두 바이러스 모

두 폐사는 없었으며, 특별한 임상증상이 관찰되지 않았다. 바이러스 재분리율 조사에서는 01310은 접종 후 3일에서는 기관지, 신장, 총배설강에서 모두 검출이 되었으며, 5일째에는 총배설강에서만 검출이 되었다. RV7CE4는 접종 후 5일째의 분변에서만 검출이 되어 분변으로의 배출이 다소 높은 것으로 판단되었다. 상기의 결과로 RV7CE4는 약병원성 조류 인플루엔자의 특성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 백신의 안전성 시험결과 폐사율 및 임상증상은 전혀 관찰되지 않았으며 6.5 ± 1.05 으로 높은 수준의 항체역가를 형성함을 확인할 수 있었다. 또한 백신을 접종한 후 01310으로 공격접종하여 바이러스 배출을 실험한 결과 백신을 접종한 그룹이 대조군에 비하여 바이러스 접종 초기부터 지속적으로 바이러스의 증식을 억제함을 확인할 수 있었다. 즉 재조합 H9N3 인플루엔자 백신은 SPF 닭에 안전하며 H9N2에 감염된 계란에 대해 임상증상 및 바이러스 배출을 감소시킬 수 있는 것을 확인하였다. 향후, 생산된 재조합 H9N3 백신의 야외 효능 실험이 수행되어야 하며, 재조합H9N3 백신과 야외H9N2바이러스의 감염 시 혈청학적으로 감별할 수 있는 진단기법이 개발이 되어, 현재의 막대한 경제적 손실로부터 농가 보호에 기여해야 할 것이다.

참고문헌

1. Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF. 2002 Development of a DIVA(Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. Avian Pathology. 32, 47-55.
2. J. S. Lee, D.H. Ha, J. E. Kim, B. D. Ha and I. P. Mo. 2005 Evaluation on efficacy and safety of avian influenza isolate (ADL0401) as a candidate for the inactivated vaccine against low-pathogenic avian influenza. Korean J. Poult. Sci. 32, 2, 113-123.
3. David L. Suarez. 2005 Overview of avian influenza DIVA test strategies. Biologicals. 33, 221-226.