

PoulShot[®] MG-F 백신의 마이코플라즈마 감염증에 대한 산란계 농장에서의 야외 효능 평가

전은옥¹ · 우창곡¹ · 원호근² · 모인필^{1,†}

¹충북대학교 수의과대학, ²중앙백신연구소 QA 개발팀

Evaluation of Efficacy of PoulShot[®] MG-F Vaccine against *Mycoplasma gallisepticum* Infection in the Layer Farms

Eun Ok Jeon¹, Chang Gok Woo¹, Ho Keun Won² and In Pil Mo^{1,†}

¹College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

²Department of QA/R&D, Choongang Vaccine Laboratory, Daejeon 305-348, Korea

ABSTRACT *Mycoplasma gallisepticum* (MG) infection results in severe economic loss in the poultry industry. In the previous reports, F strain, one of the MG live vaccine strains, could protect the bird from field infection of MG strains. In this study, efficacy of PoulShot[®] MG-F vaccine against mycoplasma gallisepticum infection was evaluated for field application in commercial layers. Commercial layers from two different farms received with PoulShot[®] MG-F, MG-F live vaccine at 9~14 weeks of age. Serological immune response to MG vaccine, the persistency of MG vaccine strain in the upper respiratory tracts and egg production rate were evaluated in the vaccinated, contacted or nonvaccinated flocks. The serological response was first detected at 3 weeks after vaccination (WAV) and persisted for 31 WAV. The MG vaccine strains were also persisted for 31 WAV based on the reisolation and PCR detection. There was no difference between the vaccinated or non-vaccinated flocks in the egg production rate but in the abnormality rate of eggs. Based on the above results, we suggested that the PoulShot[®], MG-F live vaccine was fully immunogenic and had characteristics of long persistence in the upper respiratory trachea which will reduce economic loss caused by MG infection in the layer farms.

(Key words : *Mycoplasma gallisepticum*, F strain, live vaccine)

서 론

Mycoplasma gallisepticum(MG)의 감염은 1905년 칠면조에서 처음 발생 보고(Dodd, 1905)되었으며, 닭에서는 1935년에 전염성 코라이자와 연관된 coccobacilliform bodies로 기술되었다(Nelson, 1935). MG는 가금에서 주로 만성 호흡기 질환을 유발시킴으로써 산란계와 종계에서는 산란율, 수정율, 부화율을 감소시키고, 육계에서는 사료 효율 저하 및 세균 감염에 의한 도체 폐기율의 증가와 상품성 하락을 야기함으로써 양계 산업에 막대한 경제적 손실을 끼쳐왔다(Ley, 2008). 또한 상부 호흡기 점막 상피세포에 부착하여 호흡기 상피세포의 섬모 운동을 정지 혹은 둔화시켜 대장균, 전염성 기관지염 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스 등 호흡기성 원인체의 2

차 감염을 용이하게 함으로써 상승 작용에 의한 폐사율 증가를 특징으로 한다(Ley, 2008). 따라서 대부분의 양계 산업 국가에서 MG 감염을 방지하기 위하여 다양한 노력을 시도한 결과, 선진 양계 국가에서는 괄목한 성과를 보여 왔지만, 아직도 많은 나라에서는 MG가 근절되지 않고 있다.

MG 감염의 근절이 어려운 이유는 근본적으로 본 질병의 몇 가지 특성에 기인한다. 첫째는 전파 방법의 다양성이다. 즉, MG균의 전파는 수직 감염의 대표적 방법인 난계대 전염 뿐만 아니라 오염된 비말 또는 먼지의 흡인, 직접 접촉과 같은 수평 감염에 의해서도 이루어진다(Papazisi et al., 2002). 둘째는 감염 시 전파 속도가 빨라 계군 전체에 순식간에 전파되며, 감염 후에도 상부 호흡기에 지속적으로 존재함으로써 수직, 수평 전파가 용이한 특성을 가지고 있다(Papazisi et

[†] To whom correspondence should be addressed : moip@cju.ac.kr

al., 2002, Reinhardt et al., 2005). 또한, 양계 산업에 있어서 많은 수의 산란계 농장은 아직도 다일령 계군으로 구성되어 있어 all-in, all-out이 현실적으로 어려워 농장 내 순환 감염이 계속 이루어짐으로써 더욱 더 MG 방제를 어렵게 하고 있다. 따라서, MG 감염 계군을 조기에 도태하는 것이 근본적이고 확실한 질병 통제 방법이지만, MG에 대한 농장 양성율이 높아 만연이 되어 있는 경우에는 감염 계군의 도태는 현실적으로 적용시키기 어렵다(Abd-El-Motelib et al., 1993, Sasipreeyajan et al., 1987). 이와 같이 MG가 만연이 된 경우에는 양성 계군의 도태 혹은 살처분보다는 백신 접종을 하는 것이 산란계 농장에서 현실적으로 MG 감염을 방어 또는 근절시키는 가장 좋은 방법이 될 것이라고 추천된 바가 있다(Kleven et al., 1998).

MG 백신은 사균 백신과 생균 백신 두 가지 모두 개발되어 현재 전 세계적으로 사용되고 있다(McLaren et al., 1996, Papazisi et al., 2002). 현재까지 두 종류의 백신 모두 가금에서 안전성과 효능성을 인정받고 있다. 사균 백신의 경우 체액성 면역을 증가시킴으로써 야외 감염 시 산란을 감소와 난계대 감염을 어느 정도 예방하는 것으로 알려져 있다. 그러나 사균 백신은 동형 균주에 대하여 효율적으로 방어를 할 수 있으나, 이형 야외주의 감염에 대해서는 종종 효능을 갖지 못하는 것으로 보고되어 왔다. 그 이유는 사균 백신이 야외주의 표현형 변이에 효율적으로 대응하지 못하여 야외주의 상부 호흡기에서의 집락 형성을 막지 못하는 현상이 나타나기 때문이다. 하지만 생균 백신의 경우 이러한 표현형 변이는 사균 백신에 비하여 크게 문제가 되지 않는 것으로 보고된 바 있다(Evans et al., 1992).

MG 생독 백신은 현재 전 세계적으로 F, ts-11, 6/85 세 종류가 사용되고 있으며, 병원성, 기관 내 지속성, 항체 형성능에서 서로 다른 특징을 가지고 있다(Biro et al., 2006). 이상적인 MG 생균 백신은 질병 발생뿐만 아니라 수직 및 수평 전파를 효율적으로 막을 수 있어야 하며, 모든 가금종에 대하여 안전해야 한다. 또한 다일령 농장에 적용하기 위해서는 농장에 이미 오염된 야외 MG균을 대체할 수 있는 능력이 있어야 하며, 궁극적으로는 생균 백신 접종을 중단하였을 때 용이하게 MG 청정 상태를 유지할 수 있어야 한다(McLaren et al., 1996). 현재 사용 중인 세 가지 생균 백신 중 F 주는 야외주에 대한 방어능이 뛰어나며, 감염 이전에 백신을 접종해야 하는 다른 백신과는 달리 이미 감염된 계군에서도 F주가 야외주를 대체할 수 있는 것으로 알려져 있다(McLaren et al., 1996). 또한 F주는 ts-11주 및 6/85주보다 백신 접종 시 뚜렷한 항체 형성 능력을 보여주며, 오랜 기간 동안 기관 내에

서 존재하는 장점이 있다고 보고된 바 있다(Abd-El-Motelib et al., 1993).

이와 같이 F주 생균 백신의 우수성은 전 세계적으로 입증되어 왔으나(Kleven et al., 1998), 국내에서는 F주 백신이 개발되어 있음에도 불구하고 호흡기 등의 부작용이 있을 수 있다는 우려로 인하여 사용되어 오지 않았다. 그러나 실제 F주의 부작용은 닭보다는 칠면조에서 나타나는 현상이며, 국내에서는 칠면조 사육이 거의 없고 과거보다 상대적으로 양계 산업 전반적으로 위생 상태가 좋아졌기 때문에 백신 접종 시 2차 세균 감염의 기회가 낮으므로 다양한 장점이 있는 F주 생독 백신의 사용을 적극적으로 고려하여야 한다. 따라서, 본 연구에서는 국내에서 기 개발된 F주 생균 백신을 국내 양계 농가에 공급함으로써 마이코플라즈마에 의한 피해를 최소화 하고자 F주 생균 백신의 안전성과 효능을 일반 산란계 농장을 대상으로 야외 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시험 농장

MG-F의 안전성과 효능을 평가하기 위하여 충청북도 진천군에 위치한 KM 산란계 농장과 경기도 안성시에 위치한 NS 산란계 농장을 선정하였다. 두 농장 모두 사육 품종은 하이 라인 브라운이었으며, 총 사육 규모는 KM 농장은 100,000수, 2계군, NS 농장은 194,000수, 7계군이였다. 시험 계군의 규모는 KM 농장의 경우 총 56,000수, NS 농장의 경우 65,000수이였다. 이 중 KM 농장에서는 50수, NS 농장에서는 약 16,000수를 백신 접종을 하지 않고 동일 계사에서 사육함으로써 백신 접촉군으로서의 역할을 하였다. 두 농장의 백신 접종군의 규모가 서로 다른 것은 계사의 구조, 특히 사료 급이 체계가 다르기 때문이었다.

2. 백신 접종

본 실험에 사용한 생독 백신은 (주)중앙백신연구소(대전 유성구)에서 F주를 이용하여 제조한 PoulShot® MG-F를 사용하였다. MG-F는 집안 접종으로 제조회사의 기준에 의하여 수당 1수분을 접종하였으며, 백신 접종 시기는 KM 농장의 경우 9주령, NS 농장의 경우에는 14주령에 접종하였다.

3. 공격 접종

백신 접종 후 백신의 효능을 평가하기 위하여 야외 분리주인 R(MG-R)주로 공격 접종하였다(Rodriguez and Kleven,

1980, Papazisi et al., 2002). 공격 접종량은 1수당 $10^{7.4}$ color changing units(CCU)로 기관 내로 접종하였다. MG-R주의 공격 접종은 백신 접종 후 9주(KM 농장), 혹은 12주(NS 농장)에 대상 실험 닭을 공격 접종 계사(충청남도 단천 중앙백신 실험 농장)로 이동하여 실시하였다.

4. 시료 채취

두 곳의 실험 농장 모두 백신 접종 후 0, 1, 3, 5, 7, 9주에 채혈 및 뒤콧구멍 틈새(choanal cleft)와 기관에서 면봉을 이용하여 시료를 채취하였다. NS 농장의 경우에는 KM 농장과는 달리 백신 접종 후 12주에 동일한 시료를 채취하였다. 공격 접종 후 1, 2, 3주에도 백신 접종 후 채취한 시료와 마찬가지로 두 곳의 농장 모두에서 동일한 시료를 채취하였으며, 조직학적 병변을 관찰하기 위하여 기관을 추가로 채취하여 10% 중성 포르말린액으로 고정하였다.

5. 혈청학적 검사

MG에 대한 항체를 측정하기 위한 혈청학적 검사로서 RSA(Rapid serum plate agglutination) 검사, HI(Haemagglutination inhibition) 검사, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)검사를 실시하였다. 혈청 검사에 앞서 비특이 반응을 없애기 위하여 채취한 모든 혈청에 대해서는 56°C, 30분간 비동화하였다. RSA 검사에 사용한 진단액은 국립수의과학 검역원(경기도 안양)에서 분양 받았으며, HI 검사에 필요한 항원은 (주)중앙백신연구소에서 분양 받은 F주를 본 실험실에서 PPLO 액체 배지에서 20~26시간 동안 37°C 항온기에서 배양 후 사용하였으며, 검사 술식은 국제동물보건기구(OIE) 진단 매뉴얼에 따라 실시하였다. ELISA는 IDEXX사(Westbrook, Maine, USA)의 MG ELISA kit를 사용하였으며, IDEXX사의 매뉴얼에 따라 시료의 역가가 1,076 이상일 때 또는 S/P ratio가 0.5 이상일 때, 양성으로 판단하였다.

6. MG균 배양 배지

중균 배지로 PPLO 액체 배지(Difco, Franklin Lakes, USA)와 PPLO 고형 배지(Difco, Franklin Lakes, USA)를 사용하였으며, 배지에는 비동화시킨 10% 돼지 혹은 말 혈청(Difco, Franklin Lakes, USA)를 첨가하였다. 시료 수송용 배지로는 중균 배지와 동일한 조성에 항생제 함량을 두 배로 늘린 PPLO 액체 배지를 일반 시험관에 2.5~3 mL씩 분주하여 사용하였다.

7. MG 균의 재분리 및 확인

멸균된 동일한 면봉을 이용하여 뒤콧구멍 틈새와 기관에

서 시료를 채취하여 PPLO 액체 배지에 배양하였다. 시료 채취 후 수송 배지에 면봉을 넣어 냉장 온도를 유지하며 실험실로 이동하였고, 실험실 도착 즉시 시료가 충분히 혼합이 될 수 있도록 진탕을 하였으며, 바로 PPLO 액체 배지에 계대 배양을 하였다. 이 후 37°C 항온기에서 유지하였으며, 액체 배지에서 MG균이 확인될 때까지 매일 계대하였고, 매번 계대 시 기존의 배지에 10%의 혈청을 추가하였다. MG균이 배양되면 pH 변화에 의해 배지색이 노란색을 띠며, 이 때 집락을 확인하기 위하여 PPLO 고형 배지에 도말하여 다시 37°C에서 16시간 이상 배양하였다. 배양 중인 PPLO 고형 배지는 매일 저배율($\times 40$)로 현미경 관찰하여 MG균의 특징인 이중 용기상의 집락 형성 여부를 확인하였다. 일주일 동안 계대 배양 후에도 배지의 색 변화가 없는 시료는 모두 PPLO 고형 배지에 도말, 배양하여 최종적으로 MG 특이 집락을 관찰하였다. 이때 음성인 고형 배지인 경우 모두 폐기 처분하였다.

8. MG균의 유전학적 동정

Restriction enzyme polymerase chain reaction(RE-PCR)을 통하여 본 실험에서 사용한 MG-F 백신균주와 공격 접종주인 MG-R을 구분하였다(Biro et al., 2006). 균 분리를 위하여 채취한 동일 시료를 RE-PCR용 시료로 사용하였다. 이때 RE-PCR은 PPLO 고형 배지에서 확인된 시료의 액체 배지를 선택하여 Viral gene spin[®](Intron biotechnology, 경기 성남)으로 DNA를 추출하였고, MG 특이 primer를 사용하여(Biro et al., 2006) PCR을 하였다. PCR 검사를 통해서 MG 양성으로 판단되면, PCR product를 제한 효소 처리하여 전기영동을 통해 잘라진 band의 크기를 확인함으로써 MG-F와 MG-R을 구분하였다.

9. 조직학적 검사

기관의 조직학적 병변을 그 정도에 따라 4등급으로 구분하였으며, 각 등급의 판정의 기준은 Grade 1=normal, Grade 2=focal, Grade 3=multifocal, Grade 4=diffuse로 하였다. 기관에서의 조직병리학적 평가는 MG 감염 시 주로 나타나는 상피 세포의 손상, 기관 상피세포의 화생, 면역세포 침윤을 수치화하여 측정하였다.

10. 통계 분석

본 실험에서 얻은 결과에 대한 통계 분석은 Statistical Analysis System의 T-test (SAS, 2002)를 이용하여 분산분석을 실시하였다.

결 과

1. MG-F균의 배양 및 HA

HI 검사를 위한 MG-F주 배양 시 접종 후 시간에 따른 혈구 응집 역가의 변화는 Fig. 1과 같다. HI 검사 항원으로 사용되는 MG 배양액은 혈구 응집능이 있음이 확인되었으며, PPLO 액체 배지에 접종 16시간 이후 HI 검사가 가능한 역가인 $2^{4.5}$ 에 도달하였으며, 배양 후 20~24시간에 HA 역가의 최고치를 보였으며, 접종 26시간 후부터는 HA 역가가 하락하기 시작하였다.

2. 백신 접종 및 공격 접종 후 항체 변화

MG-F 생균 백신 접종 후 백신 접종군과 백신 접촉군 모두 호흡기 증상 등과 같이 MG 감염 시 발현되는 임상 증상은 관찰되지 않았다.

MG-F 백신 접종에 의한 혈청 역가 변화를 관찰하기 위해 백신 전과 백신 후 1, 3, 5, 7, 9, 12주에 혈청 역가를 측정하였다. 백신 전 채취한 혈청에서는 RSA 검사, HI 검사, ELISA 검사에서 두 농장 모두 MG 항체가 검출되지 않았다(Fig. 2, Fig. 4, Fig. 6). 본 실험에서 실시한 혈청 검사는 동일한 검사 혈청에 대하여 RSA 검사, HI 검사, ELISA 검사를 모두 실시하여 항체 역가의 변화를 비교하였다.

RSA 검사에서는 백신 접종 3주 이후부터 백신 접종군에서 MG-F에 대한 항체가 검출되었으며, NS 및 KM 농장 모두 항체 양성율이 백신 접종 5주까지 지속적으로 상승하여 최적점에 도달한 후 하락하는 경향을 보였다. 그러나 NS 농장의 경우, 하락하던 양성율이 백신 접종 후 12주에 다시 상승하는 경향을 보였으며, 이 양성율은 본 실험 종료일인 백신 접종 후 31주에 백신 접종군과 백신 접촉군 모두 90% 이상이었다. 하지만 KM 농장의 경우에는 실험 종료일인 백신

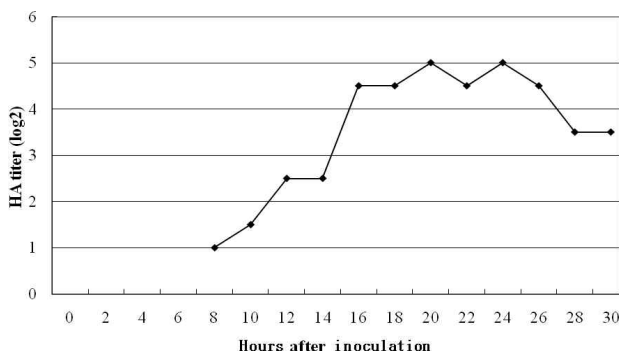


Fig. 1. The changes of HA titer of MG-F strain after inoculation in the PPLO broth.

접종 후 23주에 백신 접종군과 백신 접촉군 모두 MG-F에 대한 항체가 검출되지 않았다(Fig. 2, Fig. 3).

HI 검사에서는 백신 접종 후 3주부터 항체가 검출되기 시작하여 백신 접종 후 5주 또는 7주 때 가장 높은 역가 분포를 보인 후 하락하는 경향을 보여주었다(Fig. 4). 이 후부터

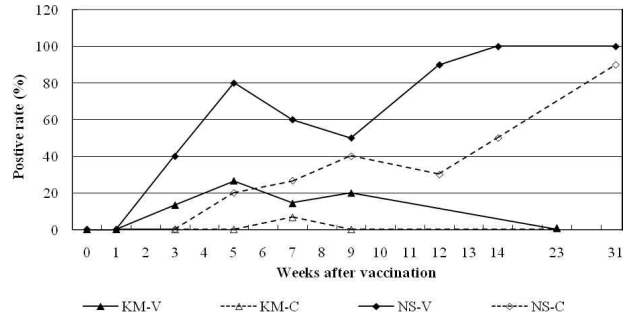


Fig. 2. Comparison of the positive rate of RSA test for vaccinated (KM-V, NS-V) and contacted flocks (KM-C, NS-C) in the two different farms (KM and NS) after vaccination of MG-F.

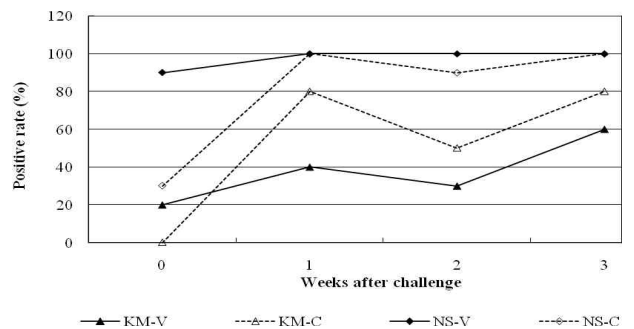


Fig. 3. The changes of the RSA positive rate for vaccinated (KM-V, NS-V) and contacted flocks (KM-C, NS-C) in the two different farms after challenge with MG-R.

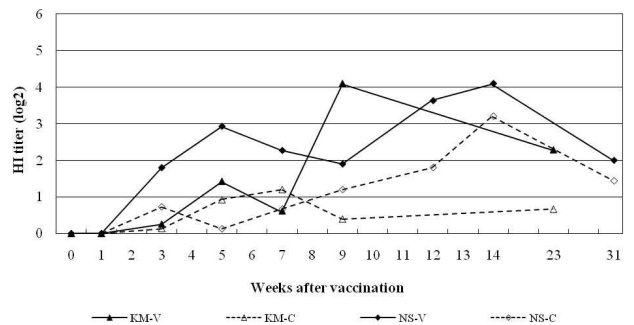


Fig. 4. Comparison of the HI titer for vaccinated (KM-V, NS-V) and contacted flocks (KM-C, NS-C) in the two different farms (KM and NS) after vaccination of MG-F.

는 앞에서 언급한 RSA 검사의 성적과 마찬가지로 KM 농장에서는 백신 접종 후 9주, NS 농장에서는 12주에 다시 혈청 역가의 상승이 확인되었다. 또한, 항체 역가의 지속 기간을 확인하기 위해 백신 접종 후 23주(KM 농장) 및 31주(NS 농장)에도 HI 검사를 한 결과, 두 농장 모두 양성 역가를 유지하고 있어 항체가 지속적으로 존재하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 공격 접종 후에 항체 역가의 변화는 백신 접종군과 백신 접종군 모두 항체가 상승하였으나, 백신 접종 후 초기에 항체 역가가 백신 접종군에 비하여 낮게 형성되었던 백신 접종군의 상승폭이 상대적으로 높았다(Fig. 4, Fig. 5).

ELISA 검사에서 NS 농장의 경우에는 백신 접종 후 3주, KM 농장에서는 백신 접종 후 5주부터 양성 개체가 확인되었으며, 7주 이후 계군 전체가 양성으로 반전이 되었다. 대체적으로 ELISA 항체도 RSA 및 HI 항체와 거의 비슷한 시기에 항체 역가 상승이 관찰되었으며, 두 농장 모두 본 실험 종료 시까지 항체를 지속적으로 유지하였다(Fig. 6, Fig. 7).

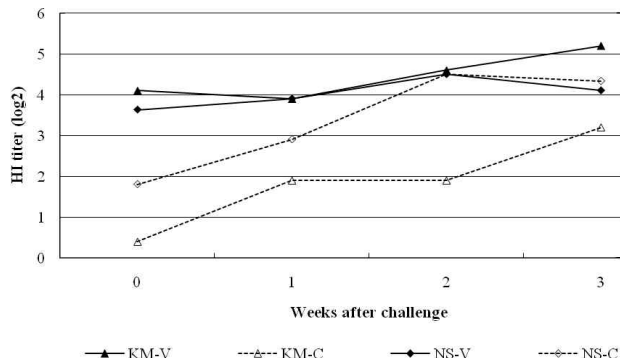


Fig. 5. The changes of the HI titer for vaccinated (KM-V, NS-V) and contacted flocks (KM-C, NS-C) in the two different farms after challenge with MG-R.

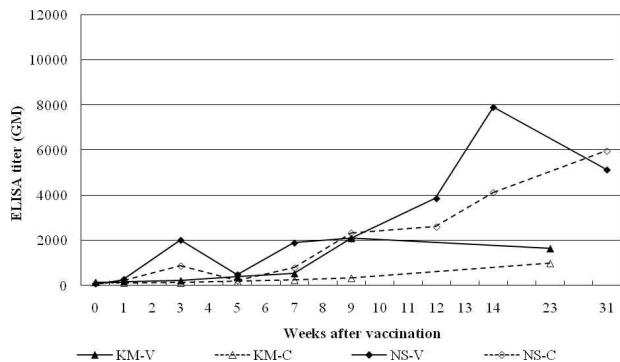


Fig. 6. Comparison of ELISA titer for vaccinated (KM-V, NS-V) and contacted flocks (KM-C, NS-C) in the two different farms (KM and NS) after vaccination of MG-F.

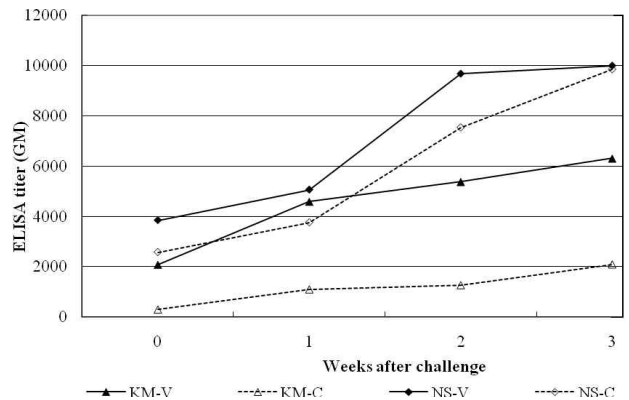


Fig. 7. The changes of ELISA titer for vaccinated (KM-V, NS-V) and contacted flocks (KM-C, NS-C) in the two different farms after challenge with MG-R.

3. MG 백신 주(MG-F) 및 공격 접종 주(MG-R)의 분리

백신 접종 후 MG-F균의 상부 호흡기에서의 집락 형성을 확인하기 위해 살아있는 개체를 임의로 선발하여 멸균 면봉으로 시료를 채취하였다. 이 실험은 농장 여건상 NS 농장에서만 실시되었다. 백신 접종 후 5주부터 백신 접종군(NS-V)에서는 MG-F균의 기관 내 양성율이 50% 이상이었으나, 백신 접종군(NS-C)의 경우에는 백신 접종군에 비하여 재분리율이 낮았다. 백신 접종 후 12주에는 MG-R균으로 공격 접종을 한 결과, 두 실험군 모두 높은 분리율을 나타내었다. 그러나 공격 접종 후의 일부 자료는 실험상의 실수로 MG-F와 MG-R균의 구별을 하지 못해 두 균주 모두 포함된 성적이다 (Table 1).

4. 백신 접종 후 MG-F 유전자 검출

상부 호흡기에서 MG-F균을 재분리하는 실험과 동일한 시료를 접종한 PPLO 액체 배지에서 PCR 방법으로 MG-F주의 유전자를 검출하였다. 두 실험 농장 모두 백신 접종 후 3주

Table 1. Comparisons of reisolation rate of MG strain each flock after vaccination and challenge in the NS farm

| Flock | Treatment | Weeks after vaccination | | | | | | |
|-------|------------|-------------------------|------|------|-----------------|-------|-------|------|
| | | 5 | 7 | 9 | 12 ^a | 13 | 14 | 15 |
| NS-V | Vaccinated | 7/10 ^b | 6/10 | 6/10 | 6/10 | 10/10 | 10/10 | 5/10 |
| NS-C | Contacted | 5/10 | 4/10 | 2/10 | 3/10 | 9/10 | 10/10 | 2/10 |

^aNS-V and NS-C flocks were challenged with MG-R strain at 12 weeks after vaccination.

^bNumber of positive / Number of tested samples.

부터 MG 유전자가 검출되기 시작하여 본 실험의 종료 시기인 백신 접종 후 23주 혹은 31주까지 지속적으로 검출이 되었다(Table 2). NS 농장의 경우 백신 접종군(NS-V)과 백신 접종군(NS-C)의 백신 접종 후 시료 채취 시기별 양성율의 차이가 크지 않았던 반면에 KM 농장의 경우, 백신 접종군과 백신 접종군간의 양성 발현 시기와 양성율의 차이가 인정이 되었다. KM 농장의 백신 접종군(KM-C)은 백신 접종 후 9주에 처음으로 MG-F 유전자가 검출된 반면, NS 농장의 경우 백신 접종 후 3주부터 두 계군 모두 양성으로 확인되었다.

5. 공격 접종 후 MG-F 및 MG-R 유전자 검출

공격 접종 후 MG-F와 MG-R의 유전자를 구별하여 검출하였다. 일부 시료에서는 실험실적 실수로 인하여 MG-F와 MG-R의 구분이 용이하지 않아 MG 공통 유전자만 검출하였다(Table 2, Table 3). 공격 접종 후 3주까지 두 농장의 백신 접종군, 백신 접종군 대부분 MG-F 유전자가 검출되었으나 KM농장의 백신 접종군에서는 공격 접종 후 2주에 일부만 양성이었으며, 접종 후 1주 및 3주에는 모두 음성이었다. 공격 접종주인 MG-R은 KM 농장의 경우 공격 접종 후 1주부터 검출이 되기 시작하여 2주, 3주까지 지속되었다. NS 농장의 경우, 공격 접종 후 1주에 백신 접종군에서는 검출이 되지 않았으나, 3주에는 두 계군 모두에서 MG-R 유전자를 확인할 수 있었다. 그러나, 공격 접종 후 1주(NS-C)와 2주에는 MG-F와 구별이 되지 않아 정확한 양성율을 확인할 수 없었다.

6. 공격 접종 후 기관의 병리조직학적 관찰

공격 접종 후 3주에 모든 실험계를 도태시켰으며, 부검 시 채취한 기관을 10% 포르말린 액에 고정하여 조직학적 병변을 관찰하였다(Table 4). MG-R의 공격 접종에 의한 기관의 섬모 손실, 림프구 침윤, 상피세포의 화생이 관찰되었으며,

Table 3. Comparisons of detection rate of MG-F and MG-R strain using restriction enzyme-PCR after challenge in the layer farms

| Flocks | Treatment | Detected strains | Weeks after challenge | | | |
|--------|------------|------------------|-----------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| NS-V | Vaccinated | MG-F | 3/5 ^a | 4/5 | 3/5 ^b | 3/5 |
| | | MG-R | 0/5 | 0/5 | | 3/5 |
| NS-C | Contacted | MG-F | 5/5 | 9/10 ^b | 4/5 ^b | 2/5 |
| | | MG-R | 0/5 | | | 2/5 |
| KM-V | Vaccinated | MG-F | 4/5 | 4/5 | 2/5 | 5/5 ^b |
| | | MG-R | 0/5 | 3/5 | 3/5 | |
| KM-C | Contacted | MG-F | 4/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 |
| | | MG-R | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 3/5 |

^aNumber of positive / Number of tested samples.

^bThe data showed no differentiated between MG-F and MG-R strain.

Table 4. Comparisons of histological lesion score in the trachea between the vaccinated (NS-V) and contacted (NS-C) flocks after challenge with MG-R strain

| Flocks | Treatment | Histological lesion ^a | | |
|--------|------------|------------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | | Loss of cilia | Lymphocytic infiltration | Epithelial metaplasia |
| NS-V | Vaccinated | 1.4 ^b ±0.7 ^A | 2.4±1.0 ^A | 2.6±1.6 ^A |
| NS-C | Contacted | 1.5±0.8 ^A | 2.9±0.9 ^A | 2.8±0.9 ^A |

^aData represent the mean±SD. Means with different superscript letters (^A, ^B) in the same column are significantly different by ($P<0.05$).

^bHistological lesion score was graded as follow: 1=normal, 2=focal, 3=multifocal, 4=diffuse.

Table 2. Comparisons of detection rate of MG-F strain using PCR after vaccination in the KM and NS farms

| Flocks | Treatment | Weeks after vaccination | | | | | | | | |
|--------|------------|-------------------------|------|------|------|------|-----|-----------------|-----|-----|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 12 | 23 | 31 |
| KM-V | Vaccinated | 0/10 ^a | 0/10 | 3/10 | 6/10 | 7/10 | 4/5 | NT ^b | 4/5 | NT |
| KM-C | Contacted | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 4/5 | NT | 4/5 | NT |
| NS-V | Vaccinated | 0/10 | NT | 5/5 | 4/5 | 7/10 | 4/5 | 3/5 | NT | 4/5 |
| NS-C | Contacted | 0/10 | NT | 3/5 | 4/5 | 5/10 | 2/5 | 5/5 | NT | 2/5 |

^aNumber of positive / Number of tested samples.

^bNT: Not tested.

병변의 정도를 점수화한 결과, 백신 접종군과 백신 접종군 모두에서 조직 손상이 관찰되었으나, 두 계군 간의 통계학적 차이는 인정되지 않았다.

7. 백신 접종에 따른 생산성의 변화

생산성에 미치는 MG-F 백신의 효능을 두 농장의 MG-F 백신 접종군과 백신 비접종계군의 산란율과 오판란율을 비교하였다(Fig. 8, Fig. 9). 두 농장의 백신 비접종계군은 본 백신 실험 이전에 동일 농장, 동일 계사에서 사육되었던 계군을 선정하였다. KM 농장의 경우, 백신 비접종계군의 산란율이 산란 초기에는 다소 높았으나, 34주령 이후에는 별다른 차이가 없었다. NS 농장의 경우, 산란 초기에는 백신 접종군이 다소 높은 산란율을 보였으나, 26주령에서 조사 종료 기간인 34주령까지는 백신 비접종계군이 다소 높은 양상을 보였다. 그러나, 전 산란 기간을 비교하였을 때 두 농장의 두 계군 간 산란율의 차이는 인정이 되지 않았다. 반면에 두 농장 모

두 오판란율을 백신 접종군과 백신 비접종군 간을 비교하였을 때는 MG-F 접종군이 백신 비접종군에 비하여 월등하게 오판란율이 낮은 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$).

고찰

MG-F 백신주는 ts-11주, 6/85주와는 달리 백신 접종 시 농장의 상황 등에 따라 약한 호흡기 증상을, 특히 칠면조에서 동반하는 것으로 보고되고 있다(Rodriguez et al., 1980). 본 실험의 대상 농장인 NS 및 KM 농장에서는 이 같은 호흡기 이상 증상이 관찰되지 않아, 이미 여러 연구자에 의해 보고된 바와 같이 MG-F 백신 접종을 한 닭의 경우 어린 일령이 아닌 이상 크게 우려할 바는 아니라는 것을 보여주었다(Carpenter et al., 1981, Glisson and Kleven, 1984).

본 연구에서 확인된 바와 같이, MG-F 백신의 장점은 백신 접종 후 항체가 ts-11이나 6/85에 비하여 신속하게 형성된다는 것이다(Abd-El-Motelib and Kleven, 1993). 본 연구에서 사용한 RSA 검사는 MG 감염에 대한 모니터링에서 흔히 사용하는 혈청 검사법(Kempf et al., 1997)으로 주로 혈청 내 IgM을 검출한다. 기존의 실험 결과에 의하면 IgM은 감염 후 2주까지는 검출이 되지 않으나(Papazisi et al., 2002), 4주 후부터 뚜렷한 양성 반응이 나타나며, 백신 접종 후 12주까지 지속되었다(Abd-El-Motelib et al., 1993). 본 실험에서도 MG-F 접종 3주후부터 항체 양성으로 반전이 이루어진 후 지속적으로 유지함으로써 다른 연구자들의 실험 결과와 일치하였다. 이러한 혈중 항체 역가는 백신 접종 후 23주 혹은 31주까지도 지속되었으며, 고무적인 사실은 MG-F도 동일한 기간까지 검출이 된 것이다. 이러한 결과를 Brown et al.(1995)이 백신 접종 후 33주령까지 상부 호흡기에서 마이코플라즈마가 존재함을 증명하고 연계를 볼 때 MG-F의 지속적인 존재가 항체를 오랜 기간 유지하게 한 것으로 추정되지만, 정확한 증명을 하기 위해서는 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다. HI항체는 MG-F 접종 후 5주에 최고 수준에 도달하였다. 백신 접종군의 경우, 백신 접종군보다 낮은 항체가 형성됨이 관찰되었다. 이는 칠면조에서 마이코플라즈마 접종 실험 후 실시한 HI 검사와 유사한 결과이며(Dingfelder et al., 1991) 마이코플라즈마 접종 후 6주 내지 10주에 높은 HI 역가가 형성된다는 답에서 실시한 기존 실험 결과(Kleven et al., 1988)보다는 백신 접종에 의한 혈청 역가 반전이 빠르게 나타났다. Kleven 등(1988)은 HI 항원으로 여러 주의 혼합 항원을 사용함으로써 다양한 MG에 반응하는 장점은 있

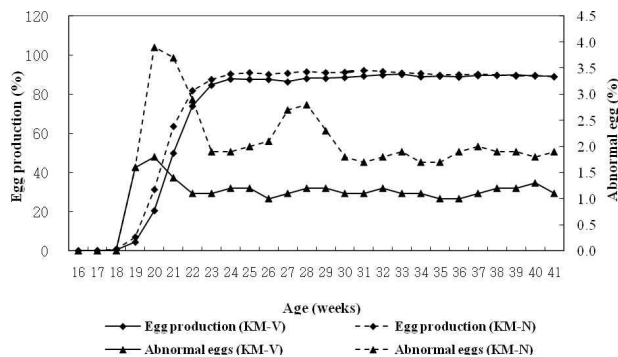


Fig. 8. Comparison of the rate of egg production and abnormal eggs of KM farm for vaccinated (KM-V) and non-vaccinated (KM-N) flocks.

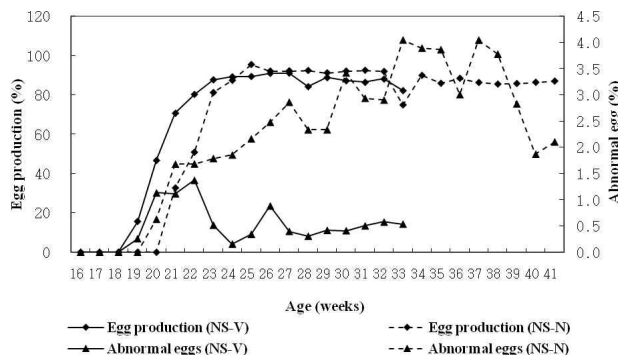


Fig. 9. Comparison of the rate of egg production and abnormal eggs of NS farm for vaccinated (NS-V) and non-vaccinated (NS-N) flocks.

나, 민감도가 낮다고 기술하였다. 이는 혼합 항원 사용 시 각각의 특이 항원양이 상대적으로 적어짐으로써 민감도가 낮아진 것으로 판단된다. 따라서 단일 항원만을 사용한 본 실험의 민감도가 상대적으로 높아 MG-F 항체를 보다 조기에 검출할 수 있었던 것으로 추정된다. ELISA는 대부분의 실험실에서 MG 진단에 일반적으로 사용하는 검사법이다(Kempf et al., 1997). Abd-El-Motelib et al.(1993)은 ELISA 항체 역가는 백신 접종 후 12주까지 지속적으로 상승하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 측정된 ELISA 항체 수준 또한 Abd-El-Motelib et al.(1993)이 보고한 실험 결과와 비슷한 양상을 보여줌으로써 ELISA 검사가 안정적으로 MG 항체를 검출하는 것으로 판단된다.

NS 및 KM 농장을 대상으로 실시한 RSA, HI, ELISA 검사 모두에서 NS 농장의 혈청 역가가 KM 농장의 역가보다 높게 나타났다. 이는 호흡기성 질병 또는 환경적 요인 등의 스트레스가 MG의 감염을 더 촉진시킬 수 있다는 실험 결과를 고려할 때(Naylor et al., 1992, Reinhardt et al., 2005) NS 농장이 다일령 계군 농장이며, 동일 농장 내 타 계군에서 살모넬라 감염증이 발생하는 등 농장의 미흡한 차단 방역이 MG균의 전파를 확산시켰기 때문으로 판단된다. 또한 백신 접종 후 4~9주 사이에 혈청 역가가 하락하는 현상이 세 가지 혈청 검사 모두에서 나타났는데, 이는 백신 접종 후 4~6주에 점막 면역 반응에 의하여 원인체의 감소로 인한 것으로 판단되며, 이는 앞선 실험에서도 확인된 바 있다(Papazisi et al., 2002).

본 실험에서는 백신 접종 후 오랜 기간 상부 호흡기에서 지속적으로 MG-F 재분리가 이루어졌다. Brown et al.(1995)은 10주령에 MG-F 백신주를 접종 후 33주(43주령)까지 뒤쿠구멍 틈새에서 마이코플라즈마가 분리됨을 보고하였고, Reinhardt et al.(2005)은 야외 주인 MG41-91의 접종 실험에서 감염 후 150일 동안 재분리됨을 밝힌 바 있다. 본 실험에서도 MG-F 백신주가 오랫동안 상부 호흡기에서 집락을 형성하는 것이 확인됨으로써 MG-F 생독 백신의 점막 및 국소 방어 가능성을 높게 하였다. 생균 백신의 위와 같은 특성은 마이코플라즈마의 특성상 숙주세포 내에 침투하여 세포 내 생존할 수 있는 능력에 기인한 것으로 보고된 바 있다(Reinhardt et al., 2005).

MG-R 공격 접종 후 2주에 기관 병변이 가장 심하다고 보고된 바 있으나(Gaunson et al., 2006), 본 실험에서는 공격 접종 후 혈청 역가 변화를 좀 더 지켜보기 위하여 공격 접종 후 3주령에 도태시켰다. 공격 접종에 의한 기관 섬모 손실, 림프구 침윤, 상피세포의 화생이 관찰되었으며, 이는 이미 밝혀진 MG 감염에 의한 상부 호흡기의 일반적인 조직학적

병변과 일치하였다(Mohammed et al., 2007). 그러나 본 실험에서는 농장 현실 여건 상 백신 비접종군이 없었기 때문에 비교 가능한 백신 접종군과 백신 접촉군과의 병리조직학적 병변을 비교하였으나 차이가 인정되지 않았다. 그 이유는 백신 접종군과 백신 접촉군은 동일 계사에서 사육되어 수평 전파가 용이하게 이루어졌기 때문이다. 이러한 결과는 백신 접종군과 백신 접촉군을 무작위 선별하여 이동시킨 후 공격 접종하였을 때도 임상 증상, 균 분리율 등에서도 크게 다르지 않은 사실과 일치한다.

동일 농장에서 백신 접종군과 비백신 접종군을 동일 사육할 수 없어 과거 동일 계사에서 사육되었던 과거 계군의 사육성을 백신 비접종군의 성적으로 하여 백신 접종군과 비교하였다. 산란율의 변화는 농장과 주령 및 주변 환경에 따라 차이가 있어 절대적인 비교가 되지 않았지만 오판율의 경우에는 두 농장 모두 실험 기간 내내 백신 접종군이 비백신 접종군보다 항상 낮아 유의한 차이가 인정되었다($P < 0.05$). 이는 백신 접종에 의해 야외주의 집락 형성을 억제함으로써, 야외주 감염 시 일반적으로 나타나는 난질 하락을 방어한 것으로 판단된다(Burnham et al., 2002, Vance et al., 2008). 이러한 결과는 백신 접종에 의한 생산성 관련 효능을 평가하는데 있어 매우 유용한 결과로 판단되었다. 실제 MG 백신의 효능은 산란율의 하락 방지와 계란의 품질 저하 방지에 있지만(Carpenter et al., 1981, Mohammed et al., 1987) 마이코플라즈마 감염 시 산란율의 하락은 뚜렷하게 구별되지 않기 때문에 오판율의 저하 방지는 농가에 경제적 실익을 가져올 수 있는 매우 의미 있는 결과로 판단된다.

본 실험의 결과에 따르면, PoulShot® MG-F 생균 백신은 백신 접종 후 항체를 오랜 기간 형성함으로써 충분한 면역원성이 인정되는 동시에 닭에게 안전하며 백신 균주가 상부 호흡기에서 지속적으로 집락을 형성함으로써 마이코플라즈마 야외 감염을 효율적으로 방어할 수 있다는 것이 인정되었다.

적 요

본 연구에서는 *Mycoplasma gallisepticum* F 주 생독 백신(PoulShot® MG-F)의 안전성과 효능을 평가하였다. 충청북도 진천과 경기도 안성 지역의 산란계 농장을 선정하여, 백신과 야외주 공격 접종에 따른 혈청 역가 변화, 상부 호흡기에서의 마이코플라즈마균 재분리, 조직학적 병변과 백신 접종군 및 백신 미접종군 간의 산란율 및 오판율의 차이를 농장

별로 평가하였다.

백신 접종에 의한 혈청 역가 변화는 백신 접종 후 3주부터 확인되었으며, 농장에 따라 접종 후 23주에서 31주까지 지속됨으로써 백신 항체가 오랫동안 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 상부 호흡기에서 MG-F 재분리 및 PCR에 의한 유전자 검출도 백신 접종 후 31주까지 양성이었다. 이러한 항체 및 항원의 지속적인 검출은 상부 호흡기에 MG-F 백신주의 집락 형성이 오랫동안 지속된다는 것을 의미하는 것이다. 동일한 방법으로 백신 접종군에 대한 야외주 공격 접종 후 상부 호흡기에서의 백신주 집락 형성을 분석한 결과, 공격 접종 후 3주까지 백신주의 집락 형성율이 야외주보다 동등하거나 높은 것으로 확인됨으로써 야외주 공격에 대한 백신주의 방어력이 입증되었다.

MG-F의 안전성과 생산성 측면에서의 효능을 야외 농장에서 검증하기 위하여 두 실험 농장에서 백신 접종군과 백신 미접종군간의 산란율 및 오판란율을 비교하였다. 그 결과, MG-F 접종에 따른 임상적 부작용과 산란율 하락은 발견되지 않았으며, 오히려 백신 접종군의 오판란율이 백신 미접종군보다 평균 1~3% 낮은 것으로 분석됨으로써 백신 접종에 의한 난질 개선 효과가 있음이 확인되었다.

따라서, PoulShot[®] MG-F 생균백신을 산란계에 접종하였을 때 임상적으로 안전하였으며, 오랜 기간 야외 감염에 방어할 수 있는 항체 형성과 상부 호흡기에서의 지속성이 확인됨으로써 마이코플라즈마 야외 감염을 효율적으로 방어할 수 있을 것으로 판단된다.

(색인어: 마이코프라즈마, 백신, 야외효능, 산란계)

사 사

이 논문은 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었다.

인용문헌

Abd-El-Motelib TY, Kleven SH 1993 A comparative study of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in young chickens. Avian Dis 37:981-987.

Biro J, Erdei N, Szekely I, Stipkovits L 2006 Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strain using molecular methods. Acta Veterinaria Hung 54:437-448.

Brown JE, Branton SL, May JD 1995 Effect of isolation and sanitation on the recovery of F-strain *Mycoplasma gallisepticum* from chronically infected hens held in biological isolation units. Avian Dis 39:263-268.

Burnham MR, Peebles ED, Branton SL, Jones MS, Gerard PD, Maslin WR 2002 Effects of F-strain *Mycoplasma gallisepticum* inoculation at twelve weeks of age on digestive and reproductive organ characteristics of commercial egg laying hens. Poultry Sci 81:1884-1891.

Carpenter TE, Mallinson ET, Miller KF, Gentry RF, Schwartz LD 1981 Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. Avian Dis 25:404-409.

Dingfelder RS, Ley DH, McLaren JM, Brownie C 1991 Experimental infection of turkeys with *Mycoplasma gallisepticum* of low virulence transmissibility, and immunogenicity. Avian Dis 35:910-919.

Dodd S 1905 Epizootic pneumo-enteritis of the turkey. J Comp Pathol Ther 18:239-245.

Ellakany H, Favian K, Stipkovits L 1997 Immunoblot examination of humoral response of chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum* at various ages. Comp Immun Microbiol Infect Dis 20:319-333.

Evans RD, Hafez YS 1992 Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. Avian Dis 36:197-201.

Evans RD, Hafez YS, Schreurs CS 1992 Demonstration of the genetic stability of a *Mycoplasma gallisepticum* strain following *in vivo* passage. Avian Dis 36:554-560.

Gaunson JE, Philip CJ, Whithear KG, Browning GF 2006 The cellular immune response in the tracheal mucosa to *Mycoplasma gallisepticum* in vaccinated and unvaccinated chickens in the acute and chronic stages of disease. Vaccine 24:2627-2633.

Gaunson JE, Philip GJ, Whithear KG, Browning GF 2006 Age related differences in the immune response to vaccination and infection with *Mycoplasma gallisepticum*. Vaccine 24:1687-1692.

Glisson JR 2003 Effective vaccination against avian mycoplasma. World Poultry 16-18.

Glisson JR, Kleven SH 1984 *Mycoplasma gallisepticum* vacci-

- nation: Effects on egg transmission and egg production. Avian Dis 28:406-415.
- Kempf I, Gesbert F 1998 Comparison of serological tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in eggs and chicks hatched from experimentally infected hens. Vet Microbiol 60:207-213.
- Kempf I, Gesbert F, Guittet M 1997 Experimental infection of chickens with an atypical *Mycoplasma gallisepticum* strain: Comparison of diagnostic methods. Res Vet Sci 63:211-213.
- Kleven SH 1998 Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. Poult Sci 77:1146-1149.
- Kleven SH, Fan HH, Turner KS 1998 Pen trial studies on the use of live vaccines to displace virulent *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. Avian Dis 42:300-306.
- Kleven SH, Morrow CJ, Whithear KG 1988 Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. Avian Dis 32:731-741.
- Levisohn S 1984 Early stages in the interaction between *Mycoplasma gallisepticum* and the chick trachea as related to pathogenicity and immunogenicity. Jir J Med Sci 20:982-984
- Ley DH 2008 *Mycoplasma gallisepticum* infection. Pages 807-834 In: Diseases of Poultry 12thed. Wiley-Blackwell, USA.
- McLaren JM, Ley DH, Berkhoff JE, and Avkian AP 1996 Antibody response of chickens to inoculation with *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins in immunostimulating complexes. Avian Dis 40:813-822.
- Mohammed HO, Yamamoto R, Carpenter TE, Ortmyer HB 1987 Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. Avian Dis 31:477-482.
- Mohammed J, Frasca S Jr, Cecchini K, Rood D, Nyaoke AC, Geary SJ, Silbart LK 2007 Chemokine and cytokine gene expression profiles in chickens inoculated with *Mycoplasma gallisepticum* strains Row or GT5. Vaccine 25:8611-8621.
- Naylor CJ, Al-Ankari AR, Al-Afaleq AI, Bradbury JM, Jones RC 1992 Exacerbation of *Mycoplasma gallisepticum* infection in turkeys by rhinotracheitis virus. Avian Pathol 21:295-305.
- Nelson JB 1935 Cocco-bacilliform bodies associated with an infectious fowl coryza. Science 82:43-44.
- Papazisi L, Silbart LK, Frasca S, Rood D, Liao X, Gladd M, Javed MA, Geary SJ 2002 A modified live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine to protect chickens from respiratory disease. Vaccine 20:3709-3719.
- Reinhardt AK, Gautier-Bouchardon AV, Gicquel-Bruneau M, Kobisch M, Kempf I 2005 Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance. Vet Microbiol 106:129-137.
- Rodriguez R, Kleven SH 1980 Pathogenicity of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in broiler chickens. Avian Dis 24:879-889.
- SAS 1996 SAS User Guide. Release 6.12 edition. SAS Inst Inc Cary NC. USA.
- Sasipreeyajan J, Halvorson DA, Newman JA 1987 Effect of *Mycoplasma gallisepticum* bacterin on egg-transmission and egg production. Avian Dis 31:776-781.
- Vance AM, Branton SL, Collier SD, Gerard PD, Beebles ED 2008 Effects of prelay ts11-strain *Mycoplasma gallisepticum* inoculation and time-specific F-strain *M. gallisepticum* inoculation overlays on internal egg and eggshell characteristics of commercial laying hens. Poultry Sci 87:1358-1363.
- Yoder HW Jr 1989 Nonspecific reactions to mycoplasma serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. Avian Dis 33:60-68.

(접수: 2010. 5. 27, 수정: 2010. 6. 14, 채택: 2010. 6. 14)