

<원 저>

한국호흡기형 닭전염성기관지염 생독백신주의 작성

최강석^{1,*} · 전우진¹ · 이은경² · 계수정¹ · 박미자¹ · 권준현¹

농림수산검역검사본부 동식물위생연구부 ¹조류질병과, ²동물약품평가과
(투고: 2011년 6월 23일, 수정: 2011년 7월 17일, 게재승인: 2011년 7월 18일)

Development of an attenuated vaccine strain from a korean respiratory type infectious bronchitis virus

Kang-Seuk Choi^{1,*}, Woo-Jin Jeon¹, Eun-Kyoung Lee², Soo-Jeong Kye¹, Mi-Ja Park¹, Jun-Hun Kwon¹

¹Avian Diseases division, and

²Veterinary Medicine and Biologics Division, Department of Animal and Plant Health Research, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-757, Korea

(Received: June 23, 2011; Revised: July 17, 2011; Accepted: July 18, 2011)

Abstract : An attenuated vaccine strain AVR1/08 of Korean respiratory type of infectious bronchitis virus (IBV) was developed by 89th passages of IBV D85/06 strain in chicken eggs. The AVR1/08 strain had higher virus titer at least 20 times ($10^{1.3}$) than the parent virus D85/06 by egg inoculation method. The AVR1/08 strain had a single point mutation (S to Y) at position 56 of spike protein of IBV compared to parent virus IBV D85/06 strain. The mutation was observed consistently at viruses after 47th passage in chicken eggs. The AVR1/08 strain showed no virulence even after 6 passages in chickens and all chickens inoculated induced anti-IBV antibody 14 days after vaccination. The AVR1/08 strain had broad protective efficacy against QX type Korean nephropathogenic virus (Q43/06 strain), KM91 type Korean nephropathogenic virus (KM91 strain) and Korean respiratory virus (D85/06 strain). In contrast, Massachusetts (Mass) type attenuated vaccine strain H120 showed protection of 37.5 to 50% against these three viruses. Our results indicate that the AVR1/08 strain has potential as an attenuated vaccine effective in controlling IBVs circulating in Korea.

Keywords : attenuation, infectious bronchitis, live vaccine, protection

서 론

닭 전염성 기관지염(infectious bronchitis, IB)은 닭의 급성 호흡기성 전염병으로 양계산업이 있는 대부분의 국가에서 발생하고 있다. 이 질병은 육계(broiler)의 경우 어린 연령에 감염시 심한 호흡기 증상, 신장염과 성장 지연에 따른 증체율 저하를, 산란계(layer)와 종계(breeder)의 경우 심한 산란율 저하와 비정상 기형란 발생 증가 등을 유발하여 양계의 생산성을 크게 악화시킨다 [4].

IB를 유발하는 병원체는 Family *Coronaviridae*의 coronavirus group 3에 속하는 닭 전염성기관지염 바이

러스(infectious bronchitis virus, IBV)이다 [4]. IBV는 현재 전 세계적으로 수 백개 이상의 다양한 혈청형이 존재하고 있는 것으로 추정되고 있다 [2]. IBV 혈청형은 지역별로 다양하게 나타나고 있기 때문에 그 지역에서 유행하는 바이러스와 동일한 바이러스 혈청형으로 제조한 백신을 사용하여야 가장 이상적인 예방 효과를 기대할 수 있다 [2].

국내의 경우 1986년 국내 산란계 농장에서 심한 호흡기 증상과 기형란 발생 및 산란율 저하 등을 유발하는 IB가 처음으로 확인되었으며 [29], 1990년대 초 어린 닭에서 신장염을 특징적으로 보이며 높은 폐사율과 산란계에서의 산란저하 피해를 유발하는 변이형 IB가 출현

*Corresponding author

Tel: +82-31-467-1821, Fax: +82-31-467-1814

E-mail: kchoi0608@korea.kr

하였다 [15, 16]. 최근 IBV의 S1유전자의 염기서열을 기초로 국내에서 유행하는 IBV의 유전형을 조사한 결과, 한국 호흡기형(KI형) IB와 한국 신장형(KII형)이 주로 유행하고 있는 것으로 보고되었다 [5, 14, 17-20, 26, 32].

국내의 경우 닭에서의 IB 발생 피해를 예방하기 위하여 1980년대 후반부터 IBV 백신 접종을 지속적으로 실시하여 왔다. IB 발생이 처음 확인된 직후인 1980년대 후반부터 지금까지 Mass혈청형 IBV 예방 백신이 생독 및 사독 백신 형태로 사용되고 왔다 [32]. 그 후 1997년 이후 KII형 IBV 분리주인 KM91주를 이용한 사독 백신이 개발되어 KII형 IB예방을 위하여 사용되기 시작하였다. 최근에는 KM91주와 유전형이 동일한 생독백신 K2주가 개발되었다 [18]. 그러나 KI형 IB의 경우 심한 호흡기 증상과 산란저하 등으로 인한 생산성 피해가 국내 양계농장에서 빈번하게 나타나고 있다 [17]. 또한 이들 KI형 IBV는 현재 국내에서 사용중인 Mass형 IB백신주 뿐만 아니라 KII형 IB백신주와도 혈청형이 다른 것으로 보고되어 있다 [5, 15]. 따라서 KI형 IB를 예방하기 위한 효과적인 새로운 IB 생독백신주의 개발이 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 한국 호흡기형 IBV야외 분리주를 종란 계대 배양을 통하여 약독화시켜 KI형 IB 생독 백신주를 개발하여, 국내에서 최근 유행하고 있는 IB에 대하여 생독 백신으로서의 방어효능을 평가하였다.

재료 및 방법

바이러스

농립수산검역검사본부 동식물위생연구부 조류질병과에서 보유중인 Kr/D85/06주, Kr/Q43/06주, H120주, KM91주 등 4주의 IBV가 본 실험에서 사용되었다. Kr/D85/06주는 심한 호흡기 증상을 나타내는 80일령 산란계에서 분리된 KI형 IBV이며, IBV Kr-Q43/06는 35일령 육계에서 분리된 QX타입 KII형 IBV이다 [17]. 이 중 IBV Kr-D85/06주는 본 연구에서 KI형 IB생독백신주 개발을 위한 야외분리주로 선정하여 사용되었다. H120주 (Mass타입)[22]와 KM91주(KM91타입 KII형)[16]는 국내에서 현재 백신주로 사용되고 있는 바이러스이다. 공시한 IBV는 9~10일령 특정병원체부재(specific pathogen free, SPF) 종란에 접종하여 37°C 배양기에서 3~5일간 증식한 다음 본 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

바이러스 약독화

KI형 IB생독 백신주를 개발하기 위하여 KI형 IBV D85/06 주를 종란접종법으로 9~11일령의 SPF 종란에 연속으로 계대하여 바이러스 독력을 순화시켰다. 즉 IBV

D85/06 주를 9~11일령의 SPF 종란에 접종하고, 48~72 시간 배양 후에 종란의 allantoic fluid를 채취하여 0.01M phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4로 1:100배 희석하여 동일한 방법으로 다시 새로운 SPF 종란에 접종하는 방법으로 IBV를 반복 계대하였다. 계대 배양한 IBV는 매 10대 계대할 때마다 접종 종란의 allantoic fluid를 RT-PCR법으로 검사하여 IBV의 존재 여부를 조사하였다. IBV D85/06주를 SPF 종란에서 89대 연속 계대하 다음 채득한 IBV를 AVR1/08 주로 명명하였다.

RT-PCR

IBV존재 여부는 역전사효소중합연쇄 반응법(reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR)로 확인하였다. 바이러스 유전자의 추출을 위하여 증식바이러스가 함유된 요막강액(allantoic fluid)를 사용하였다. 바이러스 RNA 추출은 Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction Kit(iNtRON Biotech, Korea)을 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 의거하여 실시하였다. 유전자 염기서열 분석을 위하여 IBV S1 hyper-variable region(HVR) 과 NP 유전자를 증폭부위로 삼았다. IBV S1 HVR증폭을 위한 primer set는 Mase 등 [23]이 사용한 forward primer IBV-S1(5'AGGAATGGTAAAGTTRCTRTGTWAGAG-3') 및 reverse primer IBV-S2(5'-GCCCAGTACCRTRAYAAAATAAGC-3')를 사용하였다. 그 다음, RT-PCR은 상기의 추출 유전자와 primer set를 사용하여 AccuPower RT/PCR premix kit로 실시하였다. IBV S1와 IBV NP 유전자를 증폭하기 위한 PCR은 Mase 등 [23]이 제시한 반응조건에 따라 실시하였다. RT-PCR 증폭산물은 1%(w/v) 아가로스 겔에서 전기영동을 실시한 다음, Gel extraction kit(Qiagen)를 이용하여 RT-PCR 증폭산물을 추출하여 마크로젠사(Macrogen, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 핵산 염기서열 교정(editing), 아미노산 서열예측 및 alignments는 MEGA version 4.0을 이용한 Clustal W Method로 분석하였다.

바이러스의 증식성

IBV의 증식성은 SPF 종란 접종법을 사용하여 측정하였다. 즉 10진 단계 희석한 바이러스액을 희석당 5개의 종란에 접종하여 상기와 같은 방법으로 37°C 부란기에 넣고 5일간 배양하였다. 배양 후 각 접종 종란의 allantoic fluid를 채취하고 계태아를 작출하였다. 바이러스 증식여부는 작출한 종란 계태아의 특징적인 소견(stunting, curling, dwarfing) 존재여부를 관찰하고, 동일 종란에서 채취한 allantoic fluid로부터 RT-PCR법으로 IBV특이 유전자 검출여부로 최종 확인하였다. 바이러스의 증식 역가는 종란의 50%를 감염시키는 바이러스액 희석 배수

의 역수를 Reed 와 Muench [28]의 방법에 따라 계산하여 EID₅₀ 나타내었다.

역계대 시험

IBV AVR1/08주의 병원성 회복 여부를 SPF닭 접종시험을 통하여 조사하였다. 이를 위하여 3~5일령 SPF 닭 최소 3수에 IBV AVR1/08주를 수당 0.1 mL($10^{4.5}$ EID₅₀)씩 점안 접종하였다. 접종 5일째 닭을 안락사시킨 후 기관을 채취하였다. 이들 조직 시료는 RT-PCR 방법으로 바이러스 존재 여부를 확인하였다. 그 후 기관을 무균적으로 유제한 다음 수당 0.1 mL씩 최소 3수씩 점안 접종하였다. 이러한 방법으로 닭에서 5회 반복 계대한 후, SPF 닭에서의 병원성을 조사하였다.

병원성 및 면역원성 조사

본 실험의 IBV에 대한 병원성은 5일령 SPF 닭에 접종하여 조사하였다. 바이러스 병원성 측정은 D85/06주 접종그룹(n=10), AVR1/08주 접종그룹(n=14), 역계대 AVR1/0주 접종그룹(n=10) 그리고 대조군(n=10) 등 네 그룹으로 나누었으며 그룹당 10수의 SPF닭이 사용되었다. 바이러스 접종 그룹의 경우 IBV를 병아리 1수당 $10^{4.5}$ EID₅₀씩 바이러스를 점안 경로(eye drop)로 접종하였으며, 대조군의 경우 PBS 완충용액을 동일한 방법으로 접종하였다. 인공 감염 후 14일 동안 침울, 호흡기 증상 등 임상증상과 폐사 여부를 관찰하였다. 모든 실험은 음압이 유지되는 무균사육시설에서 실시하였다. 실험에 사용된 모든 닭에 대하여 접종 후 5일째 이후 두 도말을, 접종 14일째 실험종료 후 기관(trachea)과 신장(kidney)을 채취하여 바이러스 분리검사를 실시하였다. AVR1/08주의 면역원성 조사를 위하여 각 그룹별로 접종 전과 접종 14일 후에 각각 채혈하였다. 혈청시료는 항체검사를 실시하기 전에 56°C 30분 동안 비동화 처리하였다.

국내유행 IB에 대한 방어 효능 평가

IBV AVR1/08 주로 면역시킨 닭을 대상으로 최근 국내 유행하는 IBV에 대한 방어 효능을 측정하였다. 바이러스 병원성 측정은 AVR1/08주 접종그룹, H120주 접종그룹 그리고 대조군 등 네 그룹으로 나누었으며 그룹당 27수의 3주령 SPF닭이 사용되었다. 백신 접종군의 경우 AVR1/08 주와 H120주는 각각 수당 $10^{3.5}$ EID₅₀씩 점안으로 접종하였다. 음성 대조군은 3주령 SPF 닭 24수에 PBS 용액을 동일한 방법으로 접종한 것을 사용하였다. 면역 후 3주가 경과한 시점에서 각 그룹은 다시 8수씩 세부 그룹을 나누었다. 각 그룹의 세부그룹별로 IBV Q43/06 주, KM91주, D85/06주를 수당 $10^{4.5}$ EID₅₀씩 점

안으로 공격 접종을 실시하였다. 각 그룹별 남아있는 3수의 닭은 백신대조 세부그룹으로 두었다. 그 후 5일간 임상증상 및 폐사여부를 관찰하고, 접종 5일째에 닭을 모두 안락사시킨 후 부검하여 병변을 관찰하였고, 바이러스 분리를 위하여 기관 및 신장 조직시료를 무균적으로 채취하였다. 장기로부터의 바이러스 분리 검사는 종란내 접종법으로 실시하였다.

Indirect ELISA

IBV 항체 역가 측정은 indirect ELISA를 사용하여 측정하였다. 즉 PBS buffer로 1 µg/mL되게 희석한 IBV특이 단클론항체 3F5 [31]를 Maxisorp ELISA(Nunc, Roskilde, Denmark) plate의 각 well에 50 µL씩 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켜 coating하였다. 그 후 PBST buffer(0.002 M PBS, 0.05% Tween20)로 3회 세척한 다음, blocking buffer(0.01 M PBS, 0.05% tween 20, 3% skimmed milk)로 10^7 EID₅₀되게 희석한 IBV D85/06주를 각 well 당 50 µL씩 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 동일한 방법으로 희석한 SPF 종란의 allantoic fluid를 음성 대조항원으로 포함하였다. 그 후 PBST buffer로 3회 세척하여 반응하지 않은 부산물을 제거하였다. 그 후, blocking buffer로 1:160배 희석한 검사혈청을 well당 50 µL씩 분주하고, 37°C에서 1시간 동안 반응하게 하였다. 상기 반응이 끝난 후, PBST로 3회 세척하고 blocking buffer로 2,000배 희석한 anti-chicken immunoglobulins peroxidase conjugate(Kirkegaard-Perry Laboratories, USA) 용액을 각 well에 50 µL씩 첨가한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응하게 하였다. 상기 반응이 끝난 후, 세척용 완충용액으로 3회 반복 세척한 후 TMB용액(Sigma, USA)을 well당 50 µL씩 첨가하여 10분간 실온에서 발색시킨 다음, 반응중지용액(1 M HCl)을 well당 50 µL씩 첨가하여 발색을 중지시켰다. 흡광도는 ELISA reader(Tecan, Austria)를 이용하여 A450 nm에서 측정하였다. 동일 희석배수에서의 음성혈청의 평균 흡광도에 표준편차 3배를 더한 값(mean OD + 3SD)보다 클 경우 ELISA 반응이 유의한 것(항체 양성반응)으로 판단하였다.

결 과

IBV AVR1/08 주의 작성

IBV D85/06주를 종란에서 89대 연속 계대하여 AVR1/08 주를 작성하였다. 바이러스 계대수가 증가할수록 종란 치사시간이 점차적으로 단축되는 경향을 보였으며, 종란의 계대아 병변은 보다 명확하게 나타났다. 또한 바이러스의 증식성은 계대수가 40대 이하에서는 바이러스 증식성의 차이는 없었으나 47대 이후부터는 바이러스

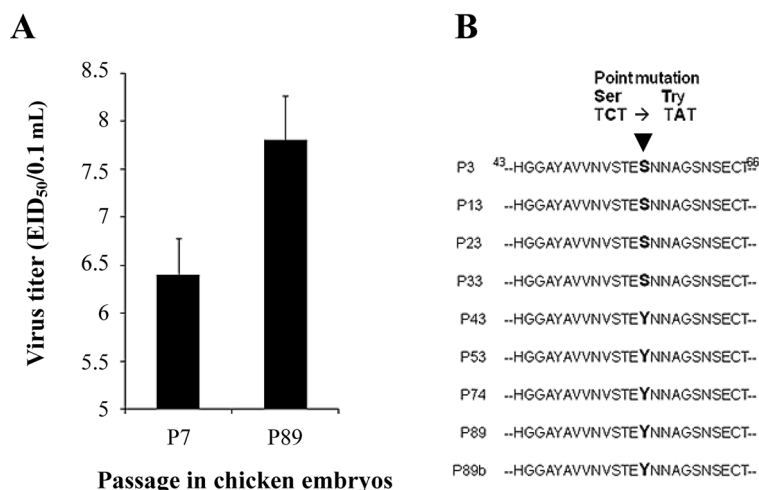


Fig. 1. Virus growth (A) and single point mutation at residue 56 of the S1 protein (B) of infectious bronchitis virus (IBV) D85/06 strain after serial passages in specific pathogen free (SPF) chicken eggs. Each virus was titrated for allantoic fluid harvested 48 h after inoculation with approximately 10^5 EID₅₀. PX represents number X of passage in SPF chicken eggs. P89b represents the virus back passaged 6 times in chickens after 89th passages in SPF chicken embryos.

Table 1. Attenuation effects of infectious bronchitis virus (IBV) AVR1/08 strain in 5-day-old specific pathogen free chickens

Group	Inoculum*	No. of birds	Clinical sign [†]	Death	Virus isolation [‡]	
					5 dpi	14 dpi
AVR1/08	AVR1/08	10	0/10 [§]	0/10	10/10	3/10
AVR1/08b	AVR1/08b*	10	0/10	0/10	10/10	3/10
D85/06	D85/06	10	3/10	0/10	10/10	6/10
Control	PBS	10	0/10	0/10	0/10	0/10

*Each virus of $10^{4.5}$ EID₅₀ per bird was inoculated into specific pathogen free (SPF) birds via eye drop route.

[†]Clinical sign including respiratory signs (coughing, sneezing, ocular or nasal discharge) and diarrhea observed during 14 day of observation period.

[‡]Virus isolation was performed using SPF chicken egg inoculation method. Samples used for virus isolation were oropharyngeal swabs for 5 days postinoculation (dpi) and trachea and kidney for 14 dpi.

[§]No. of birds positive/No. of birds examined.

*AVR1/08b represents AVR1/08 strain collected after 6th back passages in chickens.

증식성이 증가하기 시작하였다. 종란에 7대 계대한 바이러스(IBV D85/06주)의 종란에서의 증식 역가는 $10^{6.4 \pm 0.38}$ EID₅₀이었으나 89대까지 연속 계대하여 작성한 AVR1/08 주의 증식 역가는 $10^{7.8 \pm 0.46}$ EID₅₀이었다(Fig. 1A). 이러한 결과는 종란 계대를 통하여 약독화 하는 과정에서 종란에서의 바이러스 증식성이 약 20배($10^{1.3}$) 향상되었음을 나타낸다. 작성된 IB 생독백신주 AVR1/08주의 유전적 돌연변이 발생 여부를 조사하기 위하여, IBV S1 HVR유전자 부위(약 640 bp)를 RT-PCR로 증폭하여 IBV D85/06주의 아미노산 염기서열과 비교 분석하였다. 그 결과 IBV AVR1/08 주의 S1 단백질의 56번째 아미노산이 serine(S)에서 tyrosine(Y)으로 대체되어 있었다. 이 부위에서의 아미노산 돌연변이는 47대 계대 이

후 일관성 있게 나타났다(Fig. 1B). 그러나, IBV S1 HVR 유전자내 다른 부위에서는 어떠한 아미노산 서열의 변화가 관찰되지 않았다.

IBV AVR1/08 주의 닭에 대한 병원성

그 다음 본 연구에서 작성한 IBV AVR1/08주가 실제로 attenuation되었는지를 조사하기 위하여 SPF닭에 접종하여 병원성을 조사하였다. 비교분석을 위하여 AVR1/08주 접종그룹(n = 10), D85/06주 접종그룹(n = 10), 역계대 AVR1/08주 접종그룹(n = 10), 그리고 대조군 그룹(n = 10)을 두어 임상증상, 바이러스 재분리 등을 비교 조사하였다(Table 1). D85/06 주 접종그룹의 경우 접종 3 일째부터 임상증상이 관찰되기 시작하였으며, 접종 5~6

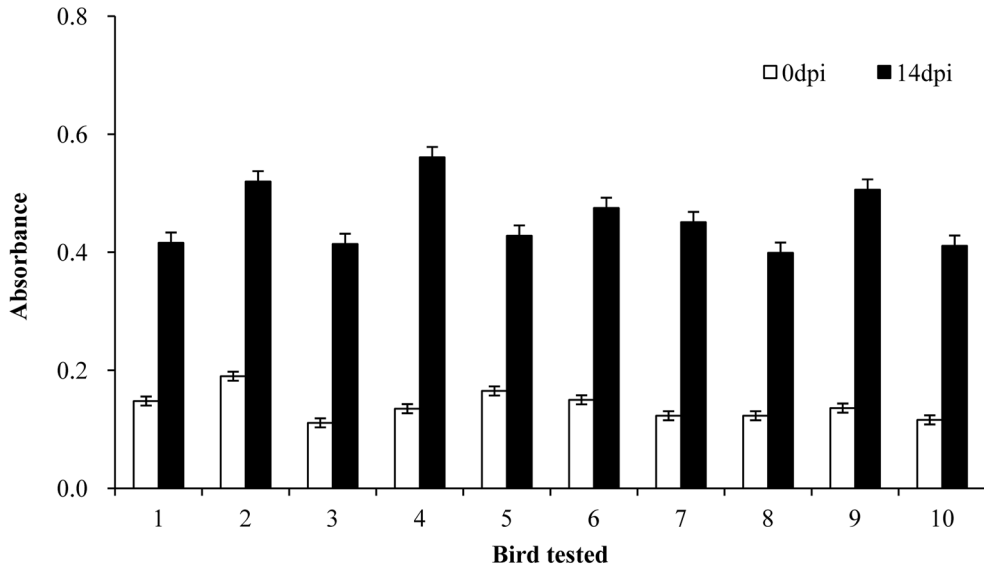


Fig. 2. The detection of anti-IBV antibodies in chicken at 0 and 14 days after eye drop inoculation with IBV AVR1/08 strain, as determined by indirect ELISA.

일찌 호흡기 증상이 가장 심하게 나타났다. 임상증상 발현율은 30%이었다. AVR1/08주 접종그룹의 경우 대조군 그룹과 마찬가지로 14일간의 관찰기간 동안 어떤 닭에서도 호흡기 반응을 나타내지 않았다. 또한 역계대 AVR1/08주 접종그룹의 경우에도 실험기간 동안 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 AVR1/08주는 종란 계대 과정에서 D85/06주의 병원성이 약독화되었으며, 닭에서 역계대 후에도 병원성이 회복되지 않았음을 보여준다. 각 접종그룹별 접종 닭으로부터 바이러스 감염 지속성 여부를 분석하기 위하여 접종 후 5일과 접종 후 14일 두 번에 걸쳐 바이러스 분리 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 모든 닭에 대해 접종 5일째의 경우 인후두 도말(oropharyngeal swab)을, 실험종료 시점인 접종 14일째 기관(trachea)과 신장(kidney)를 채취하여 바이러스 분리를 시도하였다. 그 결과, 접종 5일 후 조사 결과, AVR1/08주 접종그룹, 역계대 AVR1/08주 접종그룹, D85/06주 접종그룹 모두 인후두 도말시료로부터 바이러스가 재분리되었다. 그러나, 접종14일 후 조사 결과, D85/06주 접종그룹의 경우 바이러스 재분리율이 80%(8/10)인데 반하여 AVR1/08주 접종그룹의 경우 바이러스 재분리율은 40%(4/10)이었다. 대조군 그룹의 경우 접종 5일째와 14일째 어떠한 바이러스도 분리되지 않았다. 이러한 결과로 볼 때, AVR1/08주 접종그룹의 경우 D85/06주 접종그룹에 비해 보다 빨리 바이러스가 감염 닭에서 제거됨을 알 수 있었다. IBV AVR1/06주 접종그룹의 경우 접종 전 및 접종 14일 후 각각 채혈한 혈

청시료를 대상으로 indirect ELISA로 IBV 항체 형성여부를 측정하였다. 그 결과 접종 닭 모두에서 ELISA 항체가 검출되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 AVR1/08주를 접종 후 접종 닭 모두에서 IBV에 대한 면역반응이 유도되었음을 말해 준다.

국내유행 IB에 대한 방어 효능 평가

본 연구에서 작성한 AVR1/08 주가 국내유행 IBV강독주에 대한 방어 효능이 있는 지를 조사하기 위하여, SPF 닭을 AVR1/08 주로 면역시킨 다음 3주 후 IBV로 공격 접종하여 방어 효능을 측정하였다. 닭에서의 방어효능은 Lee 등 [19]이 평가한 방법대로 공격 접종 5일 후 기관과 신장조직으로부터 바이러스 재분리 여부를 통하여 평가하였다(Table 2). IBV AVR1/08 주로 백신 접종한 닭에서는 IBV Q43/05주와 IBV KM91주에 대하여 87.5%(7/8)의 방어율을 나타내었으며, IBV D85/06주에 대하여 100% 방어대하여 87.5%(7/8)을 나타내었다. 반면, IBV H120 주로 백신 접종한 닭에서는 IBV Q43/06주에 대하여 37.5%(3/8), IBV KM91주에 대하여 50.0%(4/8)의 방어율을 나타내었으며, IBV D85/06주에 대하여 37.5%(3/8)을 나타내었다. 백신접종을 실시하지 않는 닭에 IBV Q43/06주, IBV KM91주 및 IBV D85/06주를 공격 접종한 닭의 경우 모두 IBV가 검출되었다. 공격접종을 하지 않은 대조군 그룹의 경우 어떤 닭에서도 IBV가 검출되지 않았다.

Table 2. Results of efficacy tests of AVR1/08 strain in 3-week-old specific pathogen free chickens

Vaccine Group	Virus challenge*											
	IBV Q43/06			IBV KM91			IBV D85/06			Control		
	Total	Tra	Kid	Total	Tra	Kid	Total	Tra	Kid	Total	Tra	Kid
AVR1/08	1/8 [†]	0/8	1/8	1/8	0/8	1/8	0/8	0/8	0/8	0/3	0/3	0/3
H120	5/8	3/8	3/8	4/8	0/8	4/8	5/8	3/8	3/8	0/3	0/3	0/3
Control	8/8	8/8	6/8	8/8	8/8	6/8	8/8	8/8	7/8	0/4	0/4	0/4

*Vaccinated chickens were challenged with virulent IBV ($10^{4.5}$ EID₅₀ per dose) via eye drop route in 3 weeks after vaccination.

[†]No. of birds with virus isolation/No. of birds examined. All birds were examined for virus isolation in trachea and kidney 5 dpi using chicken egg inoculation.

고 찰

본 연구에서 우리는 국내에서 주로 유행하는 KI형 IBV 국내 분리주인D85/06주를 선발하여 종란 계대 과정을 거쳐 IB 생독 백신주를 작성하였다. 본 연구에서 작성한 KI형 IB 생독 백신주는 다음과 같은 장점을 가질 수 있다. 첫째, 국내에서 유행하는 바이러스로 만든 백신주이기 때문에 혈청형이 다른 생독 백신주를 사용하였을 때 나타날 수 있는 불완전한 교차면역으로 인한 야외바이러스의 변이 위험성을 최소화할 수 있다 [2]. 둘째, 국내에서 유행하는 IBV유래 백신주는 모두 KII형 백신주이며 현재까지 KI형 백신주는 개발되어 있지 않은 실정이다. 그러므로 본 연구의 KI형 생독 백신주를 백신 기초면역하고 KII형 백신주로 보강접종을 실시할 경우 국내에서 유행하는 KI형 IB 및 KII형 IB에 대하여 광범위 방어면역(broad protection) 효과를 유발할 수 있다 [2]. 셋째, 본 연구에서 작성한 AVR1/08주는 호흡기 친화성 바이러스이기 때문에 [17], AVR1/08주를 생독 백신으로 사용할 경우 호흡기 점막에 강한 국소 점막면역을 유발할 수 있다. 넷째, KI형 IBV는 KII형 IBV에 비해 닭에서의 병원성이 상대적으로 약한 IBV이기 때문에 약독화 과정 후에 병원성 복귀로 인한 피해 위험이 매우 낮다.

본 연구에서 우리는 생독 백신주를 작성하기 위하여 종란 접종법을 사용하였다. 이러한 종란 계대 배양법은 IBV독력 순화과정에 잘 알려져 있는 고전적인 방법이다 [11-13, 18, 21, 22]. 일부 백신 주의 경우 종란에 70대 이하 계대 때까지는 여전히 IBV독력이 남아있고 [11, 21], 반면 일부 백신 주에서 보고된 바와 같이 종란에서 100대 이상 계대할 경우 오히려 방어효능이 저하되는 위험이 있기 때문에 [8, 21], IB 생독백신의 안전성과 방어효능을 충분히 확보하기 위하여 본 연구에서는 D85/06주를 89대까지 종란에 연속 계대하였다. 작성한 IBV 생독 백신주의 유전적 변이 여부를 조사한 결과에 의하

면, 이러한 계대 배양과정에서 IBV S1유전자의 56번째 아미노산이 치환(S→Y)되었음을 확인하였다. 향후 IBV S1유전자의 56번째 아미노산의 치환이 약독화나 바이러스 증식성에 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 추가 연구가 필요하다. 그러나 S1 HVR 부위에서의 다른 변이 부위는 관찰되지 않아 다른 IBV 생독 백신 주의 작성 과정에 나타난 돌연변이 빈도에 비해 상대적으로 적게 나타났다 [1, 11, 12, 18]. 바이러스 돌연변이 빈도수의 차이에 대한 원인은 본 연구에서 구명할 수 없었다. 다만, 최근 국내에서 유행하는 KI형 IBV D85/06주의 경우 본 연구에서 보는 바와 같이 공격접종 닭의 70%가 무증상일 만큼 닭에서 호흡기 증상이 강하지 않는 호흡기 친화성 바이러스로서, 닭에서 상당히 적응된 상태일 가능성도 배제할 수 없다.

현재 국내에서 유행하고 있는 IBV는 KII형과 KI형이 주된 유행 유전형으로 보고되고 있다 [5, 14, 17-20, 26, 32]. 국내에서 IB를 예방하기 위하여 KII형 백신주와 함께 Mass타입 IB 백신 주가 사용되어 왔다. 특히 H120주와 같은 Mass타입 IB 생독 백신은 1980년대 후반부터 IB예방을 위하여 국내에 광범위하게 사용하기 시작하였다. 최근 국내에서 Mass타입 IBV가 거의 분리되지 않는 것으로 보아 [17-19], Mass타입 백신의 광범위한 사용은 국내 양계농장에서 Mass타입 IBV를 예방하는 데 어느 정도 효과를 거둔 것으로 보인다. 그러나, 중요하게도 본 연구 결과에서 보는 바와 같이 Mass타입 생독 백신주의 경우, 현재 국내에서 유행하는 주요 IBV에 대한 방어 효과가 37.5-50% 정도로 방어효과가 낮은 것으로 나타나고 있다. 이와 유사한 결과는 여러 연구자들에게 의해서도 이미 보고되었다 [18, 33]. 이것은 현재 국내에서 사용 중에 있는 Mass형 생백신이 국내에서 유행하는 IB를 예방하는 데 한계가 있다는 것을 말해준다. 또한 여러 연구자에 의해 이미 보고된 바와 같이 [9, 14, 20, 24], 불완전한 예방 효과로 인하여 국내에서 유행하는 IBV들에서 유전적 변이를 가속화시킬 위험성을 가

지고 있다.

국내에서 유행하는 KII형의 경우 크게 KM91타입 KII형과 QX타입 KII형이 존재하는 것으로 보고되고 있다. 최근 최 등의 연구결과에 의하면 QX타입 KII형 IBV는 KM91타입 KII형 IBV와 유의성이 있는 항원적 차이가 존재하고 있는 것으로 보고되었다 [5]. 신장형 IB의 경우 90년대부터 2000년대 중반까지 주로 KM91타입 KII형 IB가 유행하였으며, 2000년 중반 이후에는 QX타입 KII형 IB의 유행이 두드러지고 있는 상황이다 [17, 18, 20]. 이러한 국내 IB 유행양상의 변화는 90년대 말 이후 국내에서 KM91타입 KII백신의 광범위한 사용과도 어느 정도 관련성이 있어 보인다. 흥미롭게도 본 연구에서 작성한 IBV AVR1/08주는 현재 국내에서 유행하고 있는 KI형 IB뿐만 아니라 QX타입 KII형 IB에 대해서도 87.5%의 방어효과를 나타내었다. IBV의 경우 심지어, 간혹 실험적 조건하에서 homologous strain으로 생독 백신을 접종한 경우에서도 10%의 닭에서는 방어면역을 형성되지 않는다는 연구결과들이 여러 연구자들에 의해 보고되고 있는 점을 감안한다면 [2, 3, 7, 10, 25, 27], 본 연구에서의 QX타입 KII형 IB에 대한 방어 효과가 인정된다고 판단할 수 있다. 그러나 본 연구에서 이러한 교차방어능이 어떻게 가능한지는 구명하지 못했다. 다만 IB방어면역에서 체액성 면역(humoral immunity)뿐만 아니라 세포매개성 면역(cellular mediated immunity)도 IB 방어에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 [6, 30], cytotoxic T cell에 의한 세포매개성 면역(cellular immunity)을 유도하는 IBV NP단백질이 관련되어 있을 가능성이 있다. 또한 IB 국내분리주중 호흡기형 IBV의 경우 신장형 IB까지 교차방어 효능을 보이는 예가 현재까지 보고가 본 연구에서는 처음으로 국내 호흡기형 IBV 분리주를 이용한 백신 후보주가 국내 신장형 IBV감염을 거의 완벽히 방어하는 효능을 보이는 결과가 나와 KM91형과 QX형 재조합 IBV 등 다양한 유전적 유형의 IBV가 국내에 존재하므로 [15, 16, 20, 26], 개발 백신주가 이들 바이러스에 대한 광범위한 방어효능을 가지고 있을지는 추가적으로 확인해 볼 필요가 있다. 또한 본 연구에서는 점안접종법을 이용하여 개발백신주의 면역 원성과 안전성 시험을 평가하였기 때문에 현재 야외농장에서 IB피해 예방을 위한 백신으로 상용화되기 위해서는 1일령 병아리에서의 분무 접종이나 농장에서의 음수접종 등 다른 접종경로로 접종하여 안전성과 면역원성을 확인할 필요가 있다.

결 론

본 연구에서 우리는 국내에서 주로 유행하는 한국호

흡기형(K-Ib) IBV D85/06주를 SPF 종란에서 89대 계대 하여 IBV AVR1/08 생독 백신 주를 작성하였다. IBV AVR1/08 주는 D85/06주보다 약 20배($10^{1.3}$) 높은 바이러스 증식 역가를 나타내었다. IBV AVR1/08주의 S1 단백질 염기서열을 분석한 결과 D85/06주의 56번째 아미노산이 serine(S)에서 tyrosine(Y)으로 치환되어 있었다. 본 연구에서 작성된 IBV AVR1/06주는 SPF 닭에 인공감염시켰을 때 어떠한 호흡기 증상도 나타내지 않았으며, SPF 닭에서 6대 역계대를 실시한 후에도 바이러스의 병원성은 회복되지 않았다. 또한 IBV AVR1/06주를 접종한 SPF 닭에서 모두 IBV항체가 형성되었다. IBV AVR1/08 주의 SPF 닭에서의 방어효능을 조사한 결과, OX타입 KII형(IBV AVR1/08 주)과 KM91타입 KII형(IBV KM91주)에 대하여 87.5%, KI형(IBV D85/06주)에 대하여 100% 방어율을 나타내었다. 결론적으로 본 연구에서 작성한 IBV AVR1/08주는 현재 국내에서 유행하고 있는 KI형 IB뿐만 아니라 QX타입 KII형 IB에 대하여 방어효능을 발휘하였다.

감사의 글

본 연구는 국립수의과학검역원(농림수산검역검사본부의 전신) 수의과학기술개발연구사업(B-AD15-2007-08-01)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Ammayappan A, Upadhyay C, Gelb J Jr, Vakharia VN. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of avian infectious bronchitis virus strain Arkansas DPI. Arch Virol 2009, **154**, 495-499.
2. Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet Res 2007, **38**, 281-297.
3. Cavanagh D, Elus MM, Cook JKA. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection *in vivo*. Avian Pathol 1997, **26**, 63-74.
4. Cavanagh D, Naqi SA. Infectious bronchitis. In: Saif YM (ed.). Diseases of Poultry. 11th ed. pp. 101-119, Iowa State Press, Ames, 2003.
5. Choi KS, Lee EK, Jeon WJ, Park MJ, Kim JW, Kwon JH. Pathogenicity and antigenicity of a new variant of Korean nephropathogenic infectious bronchitis virus. J Vet Sci 2009, **10**, 357-359.
6. Collisson EW, Pei J, Dzielawa J, Seo SH. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious

- bronchitis virus in poultry. *Dev Comp Immunol* 2000, **24**, 187-200.
7. **Cook JKA, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB.** Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol* 1999, **28**, 477-485.
 8. **Geerligs HJ, Boelm GJ, Meinders CAM, Stuurman BGE, Symons J, Tarres-Call J, Bru T, Vila R, Mombarg M, Karaca K, Wijmenga W, Kumar M.** Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens. *Avian Pathol* 2011, **40**, 93-102.
 9. **Hewson KA, Ignjatovic J, Browning GF, Devlin JM, Noormohammadi AH.** Infectious bronchitis viruses with naturally occurring genomic rearrangement and gene deletion. *Arch Virol* 2011, **156**, 245-252.
 10. **Hofstad MS.** Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 1981, **25**, 650-654.
 11. **Huang YP, Wang CH.** Development of attenuated vaccines from Taiwanese infectious bronchitis virus strains. *Vaccine* 2006, **24**, 785-791.
 12. **Huang YP, Wang CH.** Sequence changes of infectious bronchitis virus isolates in the 3' 7.3 kb of the genome after attenuating passage in embryonated eggs. *Avian Pathol* 2007, **36**, 59-67.
 13. **Jackwood MW, Hilt DA, Brown TP.** Attenuation, safety and efficacy of an infectious bronchitis virus GA98 serotype vaccine. *Avian Dis* 2003, **47**, 627-632.
 14. **Jang JH, Sung HW, Song CS, Kwon HM.** Sequence analysis of the S1 glycoprotein gene of infectious bronchitis viruses: identification of a novel phylogenetic group in Korea. *J Vet Sci* 2007, **8**, 401-407.
 15. **Kim JH.** Serological differentiation, pathogenicity and immunogenicity of avian bronchitis viruses isolated in Korea. PhD thesis. Seoul National University, Seoul, 1994.
 16. **Kim JH, Song CS, Mo IP, Kim SH, Seong HW, Yun HS.** An outbreak of nephropathogenic infectious bronchitis in commercial pullets. *Res Rep Rural Dev Adm (Suweon)* 1992, **34**, 28-31.
 17. **Lee EK, Jeon WJ, Lee YJ, Jeong OM, Choi JG, Kwon JH, Choi KS.** Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolates in Korea between 2003 and 2006. *Avian Dis* 2008, **52**, 332-337.
 18. **Lee HJ, Youn HN, Kwon JS, Lee YJ, Kim JH, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS.** Characterization of a novel live attenuated infectious bronchitis virus vaccine candidate derived from a Korean nephropathogenic strain. *Vaccine* 2010, **28**, 2887-2894.
 19. **Lee SK, Sung HW, Kwon HM.** S1 glycoprotein gene analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Korea. *Arch Virol* 2004, **149**, 481-494.
 20. **Lim TH, Lee HJ, Lee DH, Lee YN, Park JK, Youn HN, Kim MS, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS.** An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea. *Infect Genet Evol* 2011, **11**, 678-685.
 21. **Liu S, Zhang X, Gong L, Yan B, Li C, Han Z, Shao Y, Li H, Kong X.** Altered pathogenicity, immunogenicity, tissue tropism and 3'-7kb region sequence of an avian infectious bronchitis coronavirus strain after serial passage in embryos. *Vaccine* 2009, **27**, 4630-4640.
 22. **MacDonald JW, McMartin DA.** Observations on the effects of the H52 and H120 vaccine strains of infectious bronchitis virus in the domestic fowl. *Avian Pathol* 1976, **5**, 157-173.
 23. **Mase M, Tsukamoto K, Imai K, Yamaguchi S.** Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan. *Arch Virol* 2004, **149**, 2069-2078.
 24. **McKinley ET, Jackwood MW, Hilt DA, Kissinger JC, Robertson JS, Lemke C, Paterson AH.** Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virus Res* 2011, **158**, 225-234.
 25. **Nix WA, Troeber DS, Kingham BF, Keeler CL Jr, Gelb J Jr.** Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. *Avian Dis* 2000, **44**, 568-581.
 26. **Park JY, Park SI, Sung HW, Kim JH, Song CS, Lee CW, Kwon HM.** Variations in the nucleocapsid protein gene of infectious bronchitis viruses isolated in Korea. *Virus Genes* 2005, **31**, 153-162.
 27. **Picault JP, Drouin P, Guittet M, Bennejean G, Protais J, L'Hospitalier R, Gillet JP, Lamande J, Bachelier A.** Isolation, characterisation and preliminary cross-protection studies with a new pathogenic avian infectious bronchitis virus (strain PL-84084). *Avian*

- Pathol 1986, **15**, 367-383.
28. **Reed LJ, Muench H.** A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 1938, **27**, 493-497.
 29. **Rhee YO, Kim JH, Kim JH, Mo IP, Youn HJ, Choi SH, Namgoong S.** Outbreaks of infectious bronchitis in Korea. *Korean J Vet Res* 1986, **26**, 277-282.
 30. **Seo SH, Wang L, Smith R, Collisson EW.** The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *J Virol* 1997, **71**, 7889-7894.
 31. **Song CS, Kim JH, Lee YJ, Kim SJ, Izumiya Y, Tohya Y, Jang HK, Mikami T.** Detection and classification of infectious bronchitis viruses isolated in Korea by dot-immunoblotting assay using monoclonal antibodies. *Avian Dis* 1998, **42**, 92-100.
 32. **Song CS, Lee YJ.** Molecular and epidemiological characteristics of infectious bronchitis virus isolated in Korea. *Korean J Poult Sci* 2000, **27**, 91-98.
 33. **Sun C, Han Z, Ma H, Zhang Q, Yan B, Shao Y, Xu J, Kong X, Liu S.** Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenicity and evaluation of protection induced by Massachusetts serotype H120 vaccine against QX-like strains. *Avian Pathol* 2011, **40**, 43-54.