

면역조직화학기법을 이용한 뉴캐슬병 백신바이러스의 조직친화성 비교

김민정 · 권용국 · 성환우 · 강신영¹ · 모인필^{1*}

국립수의과학검역원

¹충북대학교 수의과대학 동물의학연구소

(계재승인: 2004년 11월 27일)

Comparison of tissue tropism of Newcastle disease vaccine viruses by Immunohistochemistry techniques

Min-Jeong Kim, Yong-Kuk Kwon, Hwan-Woo Seong, Shien-Young Kang¹ and In-Pil Mo^{1*}

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea

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

(Accepted: November 27, 2004)

Abstract : Mean death time of inoculated embryonated egg is one of the methods to determine the virulence of the Newcastle disease viruses (NDV). Evaluation of tissue tropism of NDV in the host has been proposed as an another way to determine the pathogenicity of NDV based on the principal site of viral replication. To evaluate the tissue tropism among NDV, an immunohistochemistry(IHC) technique using monoclonal antibody was applied in one-day-old SPF chickens inoculated with different ND vaccine strains such as Ulster 2C, VG/GA and B1 viruses by eye drop instillation. The tissues used for this comparison were trachea, intestine, Harderian gland and cecal tonsil, which were collected at 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 14 days post inoculation. Among test groups, chickens inoculated with B1 viurs, which is known to replicate in the respiratory system, have IHC positive staining mainly in the trachea and those inoculated with Ulster 2C have IHC positive staining mainly in the intestine. However, chickens inoculated with VG/GA strain have IHC positive staining in both the trachea and intestine. Therefore, a differences in tissue tropism among ND vaccine strains has been proved by the IHC technique. Based on this results, the IHC staining technique could be used to classify the NDV or to study the pathogenesis of NDV in chickens.

Key words : Newcastle disease virus, immunohistochemistry, B1 vaccine strain, Ulster 2C vaccine strain, VG/GA vaccine strain

서 론

뉴캐슬병(Newcastle disease: ND)은 닭, 꿩, 칠면조, 타조 등의 가금과 기타 조류에 감염되는 급성 전염성 질병으로 1926년에 인도네시아와 영국에서 최초로 발생 보고되었다 [12, 25]. ND의 원인체인 ND 바이러스

(Newcastle disease virus: NDV)는 *Paramyxoviridae* 과의 *Rubulavirus* 속에 속하고 피막이 있으며 genome은 negative sense single-stranded RNA로 그 크기는 15,186 bp 이다. NDV의 genome은 hemagglutinin-neuraminidase protein(HN)을 포함한 6종류의 단백질을 coding 한다 [3]. NDV는 병원성에 따라 강병원성, 중병원성, 약병원성으

이 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

*Corresponding author: In-Pil Mo

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
[Tel: +82-43-261-3356, Fax: +82-43-261-3224, E-mail: moip@cbu.ac.kr]

로 구분되며 이 중 강병원성은 발현되는 주요 임상증상에 따라 장친화성 NDV(Velogenic viscerotropic NDV: vvNDV)와 신경친화성 NDV(Velogenic neurotropic: vnNDV)로 구분되고 있다 [12]. 양계산업에 막대한 경제적 손실을 주는 vvNDV는 약병원성 NDV들을 이용한 백신으로 방제하고 있으며 생독백신과 사독백신이 있다. ND 생독백신 접종에 따른 면역반응은 주로 체액성 면역반응(Humoral immunity)으로 혈액을 순환하는 IgG가 관여하는 하는 것으로 알려져 있다. 그러나, NDV 생독백신을 접종한 후 공격 접종하였을 경우, 항체가 생성되지 않는 시기인 감염 후 2~3일부터 방어가 가능한 것으로 보아 생독 백신 접종에 의한 면역은 체액성 면역반응 이외에도 백혈구가 담당하는 세포성 면역반응(Cell-mediated immunity)도 관여하는 것으로 알려져 있다 [4, 15, 37]. 위의 면역반응들 이외에 호흡기나 소화기 점막에서의 면역반응도 NDV를 방어하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 호흡기, 소화기의 점막에서 생성되는 IgA가 주로 관여하는 국소적 면역반응으로 점막 면역(Mucosal immunity)으로 불리고 있다 [20, 30, 32].

점막에서 생성되는 항체인 IgA를 검출하기 위해서 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법이 이용되었으나 최근에는 점막에서 단클론항체나 다클론항체를 이용하여 절편된 조직상에서 바이러스의 존재여부를 확인하는 면역조직화학법(Immunohistochemistry: IHC)이 개발되었다. IHC는 동결된 생조직에 형광물질이 접합된 항체를 적용하여 발색반응을 유도하는 면역형광항체법(Immunofluorescence: IF)과 파라핀 포매조직에 horseradish peroxidase(HRP)나 alkaline phosphatase(AP)와 같은 효소가 접합된 항체를 적용하는 면역효소법(Immunoperoxidase: IP)으로 구분된다. 최근에는 바이러스의 핵산을 조직상에서 검출할 수 있는 *in situ* PCR과 *in situ* hybridization 방법들이 개발되었다 [9, 18, 35].

지금까지 강병원성 바이러스를 이용한 병원성 구별이나 병성기전 연구에 IHC 기법이 자주 이용되어 왔으나 약병원성 NDV와 숙주와의 관계를 연구한 경우는 미흡하였다. 이전에는 주로 바이러스의 재분리 실험, 형광 항체법, 항체역가의 측정법, 병리조직학적 관찰, 방어율 조사 등을 통해 접근되었으나, IHC 기법을 이용하여 조직과의 관계를 밝힌 연구는 아직 미흡한 실정이다 [6, 31, 34].

따라서, 본 실험은 ND 생독백신 중에서 3가지 약병원성 NDV 백신바이러스(Ulster 2C, VG/GA, B1)를 1일령 SPF 병아리에 점안 접종하여 바이러스가 조직에 분포하는 양상, 즉, 조직친화성을 비교 연구하여 각 백신주의 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

특정병원체부재(Specific pathogen free: SPF) 종란(SPF eggs and avian service[®], Charles River Laboratory, Inc. USA)에서 부화된 1일령 병아리를 무균 사육장치에서 사육하였으며 소독된 물과 사료를 무제한으로 급여하였다.

백신 바이러스

국내에서 시판하는 생독백신 Ulster 2C바이러스(Poulvac NDW[®], Fort-dodge Inc., 브라질), VG/GA바이러스(AVINEW[®], Merial Co., 프랑스), 그리고 B1바이러스(바이오백[®], Bayer Korea Co.)를 구입하여 인산완충용액(Phosphate buffered saline: PBS, pH7.2)을 50 ml 첨가하여 희석하였다. 희석된 백신 바이러스의 역가는 50 µl 당 각각 10^{7.0}EID₅₀, 10^{5.0}EID₅₀, 10^{5.7}EID₅₀ 이었다.

실험설계

PBS를 접종한 대조군과 Ulster 2C바이러스, VG/GA 바이러스, B1바이러스를 접종한 시험군으로 나누었으며 각 시험군당 40수의 병아리를 사육하였다. 백신은 수당 50 µl 씩을 점안접종하여 14일령까지 사육하였다. 접종 후 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 14일령에 각 시험군당 5수를 안락사 시켜 개체별로 기관, Harderian gland, 십이지장, 맹장편도, 식도, 기낭, 흉선, F낭을 채취하여 병리조직학 검사 및 면역염색에 사용하였다. 혈청검사와 바이러스 분리시료는 접종 후 8일과 14일에 채혈한 혈액, 기관 및 분변을 포함하는 직장을 사용하였다. 채취한 바이러스 분리시료는 -20°C에 냉동보관 하여 사용하였다.

바이러스 재분리

시험군별로 5수의 병아리에서 무균적으로 채취한 기관과 분변을 3% amikacin을 녹인 PBS 3 ml에 넣어 -70°C에서 냉동과 해동을 3회 반복한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 상층액을 0.45 µm 여과기로 여과하여 10일령 SPF 발육란의 요막강 내에 시료 당 0.2 ml 씩 접종하였다. 접종한 발육란은 37°C에서 5일간 배양하고 4°C에서 12시간 chilling한 후 요양막강액을 채취하였다. 바이러스를 맹목적 계대배양하기 위하여 앞에서 채취한 요양막강액을 여과하여 위와 같은 방법으로 10일령 SPF 발육란에 재접종하고 37°C에서 5일간 배양 후 요양막강액을 채취하였다. NDV의 존재여부는 10% 닭적혈구를 사용하여 혈구응집반응(Hemagglutination: HA)법으로 확인하였다. 간략히 기술하면, 평판에 확인하고자 하는 요양막강액 25 µl와 10% 닭적혈구 25 µl를 잘 혼합하여 실온에서 3분간 반응시

킨 다음 혈구 응집여부를 관찰하였다. HA 반응에서 양성으로 판정된 요양막강액들은 NDV 특이 항혈청을 이용한 혈구응집억제반응법으로 NDV 존재여부를 확인하였다. 즉, 혈구응집반응을 나타내는 요양막강액과 NDV 특이 항혈청 동량을 평판에서 혼합하여 실온에서 20분간 반응시킨 후, 닭적혈구를 첨가하여 NDV 항혈청에 의해 혈구응집이 억제되는가를 확인하였다.

혈청검사

각각의 ND 백신 접종 후 형성된 항체역가는 혈구응집억제반응(Hemagglutinin inhibition: HI)법으로 측정하였다 [5]. U자형 96-well micro plate의 모든 well에 PBS 25 μ l 씩 분주하여 첫 번째 well에 8일과 14일에 각 시험군 별로 5수씩 채혈하여 분리한 혈청을 25 μ l 넣어 혼합하였다. 혼합 희석한 혈청 25 μ l를 다음 well에 넣어 다시 2진희석을 하였다. 모든 well에 NDV 항원 25 μ l 씩 분주하여 20분간 반응시킨 후, 1% 닭적혈구를 모든 well에 25 μ l 씩 분주하여 실온에서 40분간 정치시킨 후, 혈구응집억제가 일어나는 최고희석배수를 항체역가로 표시하였다. 본 실험에서는 4HA unit의 NDV항원을 사용하였다.

병리조직검사

시료 채취 시 출혈, 충혈, 삼출액 저류 등의 육안적 병변을 검사하고, 기관, 식도, 폐, 기낭, 장관, Harderian gland, 흉선, 망상편도, F낭을 적출하여 10% 중성 포르말린용액에 24시간 고정하였다. 고정된 장기들은 일반적인 조직 제조과정을 거쳐 파라핀 포매 후 4 μ m 두께로 절편하고 H&E 염색하여 조직병변을 관찰하였다. 조직의 병변정도는 객관화하기 위하여 각각의 병변 정도를 정상, 국소적, 다재국소성, 미만성 또는 심한 국소적 병변에 따라 각각 0, 1, 2, 3의 병변지수로 구분하였다.

면역조직화학검사

면역조직화학(Immunohistochemistry: IHC) 검사는 68°C에서 16시간 동안 고정된 조직절편 슬라이드를 이용하였다 [33]. 각 슬라이드에서 파라핀을 제거하고 합수화 과정을 거친 후, endogenous peroxidase의 활성을 제거하기 위한 quenching과정을 실시하였다. Quenching 과정은 30% 과산화수소수를 메탄올에 1:9로 희석하여 30분간 적용시켰다. 증류수로 5분씩 3회 세척한 후 조직 내 항원을 노출시키기 위하여 0.1% CaCl₂과 0.1% trypsin 용액(pH7.8)을 첨가하여 15분간 반응시켰다. PBS로 5분간 3회씩 세척한 후, 조직 내 비특이반응을 줄이기 위하여 PBS에 10% skim milk와 2차 항체와 origin이 같은 정상혈청을 첨가하여 조직상에 20분간 반응시켰다. 세

척을 하지 않은 채로 endogeneous avidin과 biotin의 활성을 제거하기 위하여 Avidin-biotin blocking solution kit[®] (SP-2001, Vector, Laboratory, Inc. Burlingame, CA)를 이용하여 각각 15분간 blocking을 실시하였다. Blocking 후 PBS로 1분간 세척한 후, 일차항체로 NDV에 대한 단클론항체 Q24(provided by Dr.Hooper, CSIRO, Queensland, Australia)를 1:100으로 희석하여 30분간 반응시켰다. PBS로 세척한 후 biotin이 결합되어 있는 anti-mouse IgG를 30분간 반응시켰다. Avidin-biotin을 결합시키기 위하여 반응 30분 전에 ABC 용액을 ABC Elite kit[®](PK-6102, Vector, Laboratory, Inc.)를 사용하여 준비하였다. ABC 용액을 조직상에 30분간 반응시키고 세척한 후, 조직 내 항원을 발색시키기 위하여 기질인 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) kit[®](SK-4100, Vector, Laboratory, Inc.)를 증류수에 희석하여 5분간 반응시키고 흐르는 물에 5분간 세척하였다. Hematoxylin으로 대조염색을 하였고 탈수와 세정 후 검사하였다.

결 과

바이러스 재분리

ND 백신접종 후 8일과 14일에 대조군을 포함하여 Ulster 2C바이러스, VG/GA바이러스, 그리고 B1바이러스 접종군의 기관과 분변에서 각각 바이러스 분리를 시도하였다. 그 결과 Ulster 2C바이러스 접종군에서는 5수 중 1수에서만 기관과 분변에서 접종 후 8일과 14일에 각각 NDV가 분리되었다. VG/GA바이러스 접종군은 접종 후 8일에 기관에서만 바이러스가 분리되었으며, B1 바이러스 접종군은 접종 후 8일에 기관과 분변에서 NDV가 분리되었다. 대조군의 기관과 분변에서 NDV의 분리결과는 모두 음성이었다. 요양막강액을 여과처리하여 10일령 SPF 발육란에 맹목적 계대배양한 결과, 대부분의 접종군에서의 바이러스 재분리는 맹목적 계대배양 이전의 결과와 일치하였다. 그러나, VG/GA바이러스 접종군에서 접종 후 14일에 채취한 기관과 B1 바이러스 접종군의 접종 후 14일에 채취한 분변에서는 계대배양을 한 결과 추가적으로 바이러스가 분리되었다(Table 1).

혈청검사

백신접종 후 8일과 14일에 채취한 혈청에서 NDV 항체역가를 측정하기 위해 HI 검사를 실시하였다. 접종 후 8일에는 B1바이러스 접종군을 제외한 나머지 그룹에서는 NDV에 대한 특이항체가 검출되지 않았으나 접종 후 14일에는 대조군을 제외한 모든 접종군에서 NDV 특이항체가가 1.25~2.71 수준으로 형성되었다(Table 2).

Table 1. Virus reisolation from trachea and feces of chicken inoculated with different ND vaccine viruses

| Group | Sample | Reisolation ¹⁾ | | | |
|-----------|---------|---------------------------|--------|-------------|--------|
| | | 1st passage ²⁾ | | 2nd passage | |
| | | 8 DPI ³⁾ | 14 DPI | 8 DPI | 14 DPI |
| Control | Trachea | 0/5 ⁴⁾ | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Feces | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| Ulster 2C | Trachea | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 0/5 |
| | Feces | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 |
| VG/GA | Trachea | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 |
| | Feces | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| B1 | Trachea | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 |
| | Feces | 3/5 | 0/5 | 3/5 | 2/5 |

- 1) SPF chicken embryo was used for virus reisolation
- 2) Passage number in SPF chicken embryo
- 3) Days post inoculation
- 4) Number of positive/number of tested

병리조직검사

기관에서는 출혈, 상피세포 섬모의 소실, 상피세포의 변성, 그리고 림프구 침윤과 같은 병변들을 관찰하였으며 소장에서는 출혈, 장 상피세포의 변성, 림프구 침윤을 관찰하였다. Harderian gland에서는 부종, 형질세포와 림프구 침윤을 관찰하였다(Fig. 1. A, B).

기관의 병변을 비교하여 볼 때, Ulster 2C바이러스 접

Table 2. HI titers from chickens inoculated with different ND vaccine viruses

| Group | HI titer ¹⁾ | |
|-----------|------------------------|-----------|
| | 8 DPI ²⁾ | 14 DPI |
| Control | 0.0±0.0 ³⁾ | 0.0±0.0 |
| VG/GA | 0.0±0.0 | 1.25±0.79 |
| B1 | 0.10±0.30 | 2.71±2.52 |
| Ulster 2C | 0.0±0.0 | 1.25±0.66 |

¹⁾ log₂

²⁾ Days post inoculation

³⁾ Geometric mean titer(mean±standard deviation)

종군은 다른 접종군보다 병변이 가장 미약하였다. VG/GA바이러스 접종군은 접종 후 5일과 8일에 미약하게 기관 상피세포의 섬모소실과 변성이 관찰되었으나, B1 바이러스 접종군에서는 다른 접종군들의 병변보다 심하였다. 즉, 접종 후 0.5일부터 섬모의 소실과 상피세포의 변성이 관찰되었으며 접종 후 2일부터는 다른 접종군에서 관찰할 수 없었던 점막에서의 림프구 침윤도 관찰되었다. 접종 후 8일에는 출혈을 동반하였으며 병변지수는 2.7로 가장 높았다. 소장의 병변은 Ulster 2C바이러스와 VG/GA바이러스를 접종한 그룹에서 장상피세포의 변성과 림프구 침윤이 관찰되었지만 출혈소견은 어느 접종군에서도 관찰되지 않았다. Ulster 2C바이러스 접종군은 접종 후 3일부터 병변이 나타나기 시작하였으며 접종 후 14일에는 병변지수가 1.1로 가장 높았다. 그러나, VG/GA바이러스 접종군은 접종 후 1일부터 14일까지 미

Table 3. Comparison of histopathologic lesion scores of chickens inoculated with different ND vaccine viruses

| Group | Organ | Days post inoculation (DPI) | | | | | | | |
|-----------|------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 5 | 8 | 10 | 14 |
| Control | Trachea | 0.0 ¹⁾ | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | Intestine | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | HG ²⁾ | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Ulster 2C | Trachea | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.5 | 0.1 |
| | Intestine | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.6 | 0.8 | 0.7 | 1.1 |
| | HG | NT ³⁾ | 0.0 | 0.0 | 1.5 | 0.9 | 1.7 | 1.8 | 1.4 |
| VG/GA | Trachea | 0.3 | 0.5 | 0.1 | 0.0 | 0.7 | 0.7 | 0.3 | 0.2 |
| | Intestine | 0.0 | 0.3 | 0.3 | 0.2 | 0.7 | 0.6 | 0.6 | 0.4 |
| | HG | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 1.5 | 1.2 | 2.3 | 1.1 | 1.3 |
| B1 | Trachea | 0.4 | 0.2 | 0.5 | 0.9 | 1.5 | 2.7 | 1.3 | 0.9 |
| | Intestine | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.6 | 0.2 | 0.2 |
| | HG | 0.2 | 0.1 | 0.3 | 0.4 | 1.1 | 2.4 | 1.6 | 1.0 |

¹⁾ Mean of lesion score(0: normal, 1: focal, 2: multifocal, 3: diffuse or severely extensive)

²⁾ HG : Harderian gland

³⁾ NT : Not tested

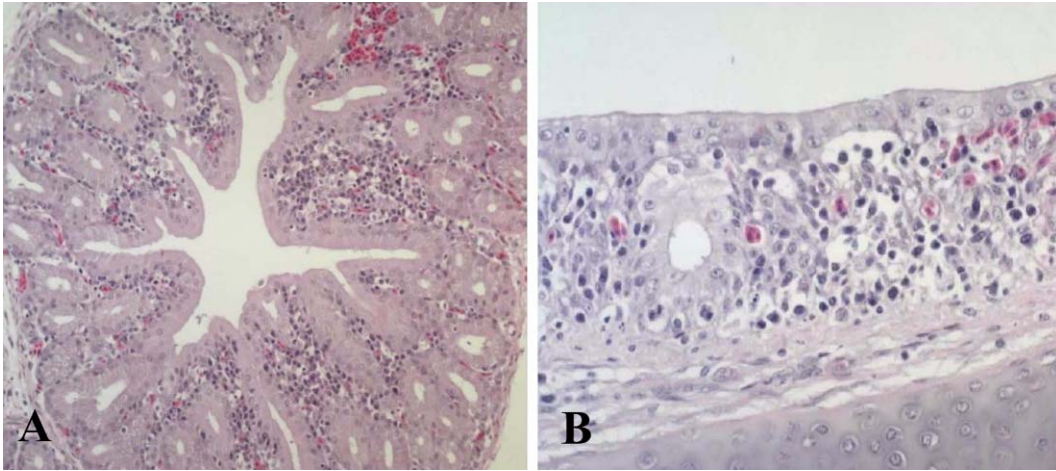


Fig. 1. Severe lymphocytic cellular infiltration was observed in the mucosa of A) Harderian's gland inoculated with Ulster 2C virus and B) Trachea of chickens inoculated with B1 virus.

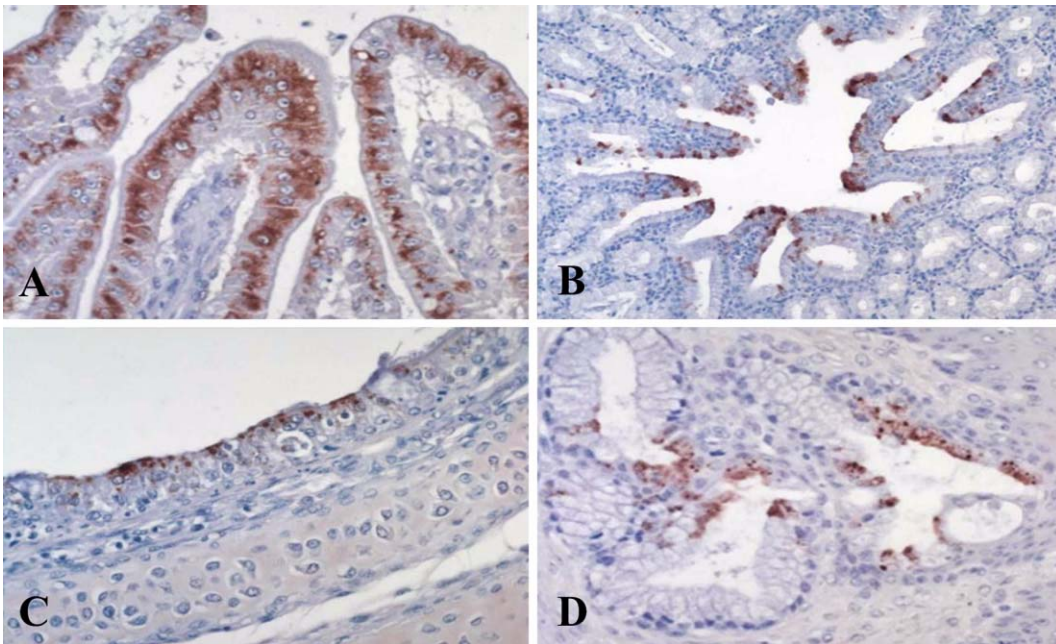


Fig. 2. Immunohistochemical positive staining was found in the cytoplasm of A) Intestinal epithelium of chickens inoculated with Ulster 2C virus. B) Harderian gland of the chickens inoculated with VG/GA virus. C) Tracheal epithelium of the chickens inoculated with B1 virus and D) Esophageal epithelium of the chickens inoculated with B1 virus.

약하지만 지속적으로 장 상피세포의 변성과 림프구의 침윤이 관찰되었다. B1바이러스 접종군의 소장 병변은 접종군 중에서 병변지수가 1미만으로 가장 낮았다.

대조군을 제외한 모든 접종군에서 나타난 Harderian gland의 병리조직학 소견은 림프구 침윤과 형질세포의

증식이 특징적으로 관찰되었다. Ulster 2C바이러스와 VG/GA바이러스를 접종한 그룹은 접종 후 3일부터 Harderian gland의 상피세포사이에 형질세포 증식과 림프구의 침윤이 관찰되었고 B1바이러스 접종그룹은 접종 후 0.5일부터 형질세포가 관찰되었으며 접종 후 8일

에는 부종까지 관찰되어 2.7의 높은 병변지수를 나타내었다(Table 3).

면역조직화학검사

3종류의 백신을 접종한 시험군에 대하여 면역조직화학(Immunohistochemistry: IHC)으로 검사한 결과 Fig. 2 A, B, C, D에서와 같이 각 조직의 상피세포의 세포질에서만 양성반응이 국한적으로 나타났다. Ulster 2C바이러스의 접종군은 Harderian gland와 소장, 기낭에서 양성반응이 관찰되었으며 이외에도 맹장편도와 F낭에서 낮은

비율로 양성반응이 관찰되었다. 접종 후 1일부터 10일까지 기낭에서 양성반응이 있었으며 접종 후 2일에는 기관, 흉선, 식도를 제외한 모든 장기에서 양성반응이 관찰되었다. VG/GA바이러스 접종군은 대부분 장기에서 양성반응이 관찰되었다. 즉, 접종 후 1일부터 소장과 맹장편도에서 양성반응을 나타내기 시작하여 접종 후 2일에서 5일까지 거의 모든 장기에서 양성반응이 관찰되었다. 소장과 Harderian gland, 맹장편도, F낭, 그리고 기낭에서 주로 양성반응이 나타났으며 흉선과 식도는 접종 후 3일에만 양성반응이 관찰되었다. B1바이러스 접종군

Table 4. Comparison of immunohistochemistry(IHC) results among chickens vaccinated with different ND vaccine viruses

| Group | Organ | Days post inoculation (DPI) | | | | | | | |
|-----------|--------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 5 | 8 | 10 | 14 |
| Control | Trachea | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Intestine | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | HG ¹⁾ | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | CT ²⁾ | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | F.bursa | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Thymus | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Air sac | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Eso. ³⁾ | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| Ulster 2C | Trachea | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Intestine | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | HG | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 2/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 |
| | CT | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | F.bursa | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Thymus | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Air sac | 0/5 | 5/5 | 1/5 | 2/5 | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 |
| | Eso. | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| VG/GA | Trachea | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 1/4 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Intestine | 0/5 | 3/5 | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | HG | 0/5 | 0/5 | 4/5 | 4/5 | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 |
| | CT | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 |
| | F.bursa | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 | 3/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 |
| | Thymus | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Air sac | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 | 3/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 |
| | Eso. | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| B1 | Trachea | 0/5 | 1/5 | 3/5 | 3/5 | 4/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Intestine | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | HG | 1/5 | 5/5 | 3/5 | 4/5 | 4/4 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | CT | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | F.bursa | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/4 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Thymus | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Air sac | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 3/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | Eso. | 0/5 | 0/5 | 3/5 | 2/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

¹⁾Harderian gland

²⁾Cecal tonsil

³⁾Esophagus

은 기관과 Harderian gland에서 각각 접종 후 1일과 0.5일부터 5일까지 양성반응이 관찰되었다. 이외에도 기낭과 식도에서 양성반응을 확인할 수 있었다. 그러나, 접종 후 8일 이후에는 B1바이러스를 접종한 모든 장기에서 양성반응이 관찰되지 않았다(Table 4).

고 찰

현재까지 가금산업에서는 ND를 효과적으로 예방하기 위해서 백신접종방법을 사용하고 있으며 백신접종에 따른 숙주의 면역반응에 대하여 다양하게 연구가 수행되어져 왔다 [10, 16, 23]. 본 연구에서는 ND 생독백신 중 3종류의 약병원성 ND 백신바이러스(Ulster 2C, VG/GA, B1)의 조직친화성을 immunohistochemistry(IHC)기법을 이용하여 바이러스 항원이 분포하는 숙주의 표적장기들을 직접적으로 확인, 비교하고자 하였다.

본 실험에서 사용한 ND 백신인 Ulster 2C바이러스, VG/GA바이러스, B1바이러스를 SPF 병아리에 접종시킨 후, 감염여부를 확인하기 위하여 혈청검사를 한 결과, 접종 후 7일에는 B1바이러스 접종군에서 항체역가가 나타났으며 접종 후 14일에는 3개의 접종군 모두 항체역가가 나타났다. Beard 등 [6]과 Gough 등 [16]은 NDV 생독백신인 Ulster 2C바이러스, VG/GA바이러스, 그리고 B1바이러스를 점안접종이나 분무접종을 실시하였을 때 혈청의 Hemagglutinin inhibition(HI)역가는 접종 후 7일부터 14일 이내에 나타났고 B1바이러스 접종군의 HI역가가 다른 접종군보다 높다고 보고하였다. 본 실험의 혈청검사 결과도 이러한 실험결과와 유사한 양상을 보였으며 B1바이러스가 상대적으로 다른 백신바이러스보다 혈청역가가 높은 이유는 면역원성이 높기 때문이라고 추정된다 [6]. 접종군의 항체형성 결과를 볼 때, 접종군은 ND 백신바이러스에 본 실험의 목적대로 감염이 되어 면역반응을 일으켰다는 사실을 확인할 수 있었다.

NDV의 감염여부를 확인하기 위한 다른 방법으로 접종 후 8일과 14일에 대조군과 접종군의 기관과 분변에서 바이러스 재분리를 시도하였다. Russell 등[32]은 Ulster 2C바이러스를 점안 접종하여 바이러스를 재분리하였을 때, 접종 후 3일에 소장, 맹장편도와 분변에서 바이러스 분리율이 높은 것을 확인하였으며 이는 Ulster 2C바이러스의 증식이 주로 장에서 이루어졌기 때문이라고 분석하였다. Gough 등 [16]은 Ulster 2C바이러스를 접종하였을 때 소장, 맹장편도 뿐만 아니라 기관, 폐, F낭, 신장에서도 감염 후 1일부터 4일까지 바이러스가 분리되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 Ulster 2C바이러스가 기관과 분변에서 낮은 비율로 분리되었는데 그 이유는 바이러스가 국소 장기에서 증식을 끝내고 소멸되

어가는 시점인 접종 후 8일과 14일에 바이러스 분리를 늦게 시도하였기 때문이라고 생각된다.

또한, 본 실험에서 VG/GA바이러스 접종군의 경우 접종 후 8일과 14일에 분변에서는 분리되지 않고 기관에서만 낮은 비율로 분리되었는데 그 이유는 VG/GA바이러스가 약병원성 NDV이며 Ulster 2C바이러스의 경우와 마찬가지로 바이러스의 분리 시기가 늦었기 때문이라고 추정된다. 본 실험에서 B1바이러스를 재분리한 결과는 접종 후 8일과 14일에 분변에서 높은 비율로 나타났다. 이러한 결과는 B1주를 점안으로 접종하였을 때 주로 기관에서 B1바이러스가 분리되었고 분변에서는 전혀 분리가 되지 않았다는 Russell 등 [32]의 결과와 일치하지 않았다. 일반적으로 B1바이러스는 주로 호흡기 계통의 조직에서 증식한다는 일반적인 통념과도 일치하지 않았다. 그 이유는 B1바이러스를 점안으로 접종하면 Harderian gland에서는 바이러스의 양을 다른 종류의 바이러스가 증식되는 양보다 10배 정도로 증가시키고 [32], 증가된 바이러스는 Harderian gland의 림프관을 통하여 친화성이 있는 장기인 기관에서 주로 증식하는 것으로 알려져 있다 [13]. 따라서 바이러스가 림프관으로 유입되어 친화성이 있는 장기로 이동하는 과정 중에 다른 장기로도 이동이 가능하다고 생각된다. 본 실험에서 분리를 시도한 시간이 늦음에도 불구하고 높은 비율로 분변에서 분리된 것을 고려한다면 앞에서 설명한 증식된 바이러스의 이동에 따른 결과라고 생각된다. 또한, 본 실험의 IHC 결과상에서 B1바이러스를 접종한 병아리의 식도에서 접종 후 2일부터 5일까지 IHC 양성반응이 관찰되어 B1바이러스가 주로 기관에서 증식이 되나 식도와 같은 소화기 점막에서도 증식함을 설명해 주고 있다. Beard 등 [6]은 B1바이러스를 접종한 후, 강병원성이며 장에 친화성이 있는 vvNDV로 공격 접종하였을 경우 장에 친화성이 있는 백신바이러스로 예방접종하였을 때보다 방어수준이 비슷하거나 더 높게 나타나는 것을 확인하였다. 이는 장관에서 주로 증식하여 폐사를 유발시키는 vvNDV를 효과적으로 예방하기 위해서는 장관 내 뿐만 아니라 호흡기에서도 면역형성이 반드시 이루어져야 한다는 사실을 확인해 주고 있다.

병리조직학 검사결과 Harderian gland의 형질세포 증가와 림프구 침윤이 공통적으로 관찰되었는데 이는 각 백신 바이러스의 접종경로를 점안으로 하여 눈에 위치한 Harderian gland에서 바이러스의 증식에 대한 면역반응이 활발히 일어났기 때문으로 생각된다 [24]. Ulster 2C바이러스 접종군은 주로 장에서 미약한 림프구의 침윤을 관찰할 수 있었으며, VG/GA바이러스는 기관과 장에 같은 병변을 관찰할 수 있었고 B1바이러스 실험군에서는 기관 상피세포섬모의 소실과 림프구의 심한 침윤

과 같은 기관병변이 관찰되었다. 이와 같은 병변은 접종 후 전 실험기간동안 관찰되었으며 접종 후 5일부터 10일까지 병변지수가 높았다. Hamid 등[17]은 Ulster 2C 바이러스와 병원성 및 조직 친화성에서 유사한 V4바이러스와 Ulster 2C바이러스를 각각 구강과 점안으로 접종하여 병리조직학 검사 결과를 각각 비교하였다. 이 실험에서 V4바이러스를 접종하였을 때 기관, 장, 비장과 F낭에 림프구가 침윤한다는 것을 보고하였는데 이러한 병변은 본 실험의 결과와도 비슷하였지만 관찰한 장기의 종류가 달라 완벽한 비교는 할 수 없었다. Kotani 등 [24]은 B1바이러스를 분무접종하였을 때, 접종 후 1일부터 국소적으로 기관상피세포 섬모의 상실을 관찰할 수 있었으며 시간이 지날수록 이러한 병변이 더욱 심해진다는 것을 보고하였다. 그리고, 접종 후 3일에는 림프구의 증가와 충혈소견이 관찰되었으며 접종 후 4일에는 점액이 증가되고 상피세포의 막 하층에 림프구, 형질세포의 침윤이 활발히 이루어졌다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 실험의 결과와 접종방법이 다름에도 불구하고 병리학적 소견이 일치하였는데 이는 분무접종의 의한 것도 점안접종과 마찬가지로 기관점막을 자극하기 때문이라고 생각된다.

병리조직학 결과들을 종합해 보면 본 실험에서 접종의 NDV의 종류가 모두 약병원성이므로 상피세포에서만 증식을 하기 때문에 조직학 병변이 상피세포에서만 국한되어 관찰되었다. 결국, 병리조직학 병변으로 NDV의 증식장소를 추정할 수 있었으며 그 때 병변 정도를 분석하여 바이러스의 병원성도 구분할 수 있었다 [1, 11, 24].

바이러스와 조직의 관련성을 알기 위하여 IHC기법을 적용하였을 때, 실험한 접종군 모두 Harderian gland의 상피세포에서 양성반응을 관찰할 수 있었으나 다른 조직에서는 실험 백신주에 따라 양성반응이 다르게 나타났다. Ulster 2C바이러스 접종군의 IHC 양성반응은 기낭과 Harderian gland, 그리고 장에서 주로 관찰되었으나 맹장편도와 F낭에서는 낮은 비율로 양성반응을 관찰할 수 있었다. 반면에 VG/GA바이러스 실험군의 IHC 결과는 실험한 모든 조직에서 양성반응이 관찰되었고, Harderian gland, 맹장편도, F낭, 흉선과 같은 면역장기와 기관과 식도 등에서 감염 후 3일째에 가장 높은 양성율을 나타내었다. 이와 같이 면역장기를 포함하여 장과 호흡기에서 모두 바이러스가 증식하는 것으로 보아 VG/GA바이러스가 vvNDV에 대한 방어 수준이 높을 것으로 판단되지만 이 부분에 대한 연구는 더 필요할 것으로 생각된다. 일반적으로 VG/GA바이러스는 장친화성 백신바이러스로 알려져 있으나 [2] 이번의 IHC 실험결과로 미루어 볼 때 호흡기 장기인 기관과 기낭에서도 양

성반응이 확인되어 집중적인 연구가 필요하다.

B1바이러스 접종군에 대한 IHC 결과에서 Harderian gland의 양성반응은 접종 후 12시간부터 관찰되었고 기관에서의 양성반응은 접종 후 1일부터 5일까지 높은 비율로 관찰되었으며 기낭과 식도에서는 양성반응율이 낮아 호흡기에 좀 더 친화성이 있는 것으로 생각되었다. Brown 등 [9]은 강병원성과 약병원성 NDV의 병성기전 연구를 위하여 B1바이러스를 접종한 후 각각의 장기에서의 IHC 반응을 비교한 결과, 접종 후 2일과 5일에 기낭과 심장에서 양성반응이 나타났다고 보고하였다. 기낭에서의 양성반응은 본 실험 결과와 동일하였으나 심장시료는 본 실험에서 채취하지 않았기 때문에 비교할 수 없었다. Hooper 등 [21]은 약병원성 ND 백신인 La Sota바이러스의 기관에서의 증식여부를 확인하기 위하여 IHC 실험을 적용한 결과 기관의 상피세포 세포질에서 접종 후 2일부터 양성반응이 관찰됨을 확인하였다. Brown 등 [9]과 Hooper 등 [21]의 보고는 본 실험에서 양성반응이 나타난 시점과 동일하였으며 B1바이러스가 호흡기에 친화성이 있다는 사실을 다시 한번 확인할 수 있었다.

Gough 등 [16]과 Russell 등 [32]이 실시한 조직 내 바이러스 재분리 결과를 살펴보면 접종하는 바이러스에 따라 재분리율과 분리되는 장기가 서로 다를 수 있다. Ulster 2C바이러스의 경우 기관을 포함한 여러 장기에서 바이러스가 재분리 되었으며 그 중 장에서 바이러스 재분리율이 가장 높았다. 그리고, B1바이러스를 접종한 실험에서의 바이러스 분리결과는 접종부위인 Harderian gland와 기관에서만 분리되었다고 보고하였다. 위의 실험에서 바이러스가 분리되는 장기들과 본 실험에서 바이러스가 재분리되는 장기들은 각각 달랐다. Thijs 등 [36]이 공작 종류인 comorants에서 실시한 바이러스 재분리와 IHC 검사 결과를 살펴보면 본 실험과 마찬가지로 서로 일치하지 않음을 확인하였다. 그러므로, 조직에서 바이러스의 존재유무를 확인하기 위해서 바이러스 분리 방법만으로는 미흡한 것으로 생각된다.

Russell 등 [31]과 Borland 등 [7]은 바이러스를 조직 내에서 검출하기 위한 또 다른 방법으로 B1바이러스와 La Sota바이러스, V4바이러스를 접종한 후 냉동조직에 IF 방법을 적용하여 기관 및 맹장편도의 상피세포에서 항원을 확인하였는데 이 결과는 효소를 이용한 IP 방법으로 실험을 한 결과와도 일치함을 보고하였다. 이러한 결과들로 미루어 보아 항원을 검출하기 위해서는 감수성이 높은 실험방법으로 IF와 IP가 적합하며 그 중에서 영구적으로 보존이 가능하고 병리학적인 조직소견과 동시에 관찰이 가능한 IP 방법 [22]이 더 유용한 방법이라고 생각된다.

Brown 등 [8]과 Ojok 등 [28]은 vvNDV의 종류인 CA 1083바이러스, 90-14968바이러스, 93-28710바이러스를 점안 접종한 후, 바이러스의 증식장소를 조사하기 위하여 IHC 실험을 한 결과, 비장, 소장, 맹장에서 주로 양성반응을 확인하였다. 마찬가지로 Lockaby 등 [26]도 vvNDV에 속하는 Fontana 1083바이러스를 가지고 같은 실험을 했을 경우 결막, 비장, 흉선, 선위, 소장, 기관, 폐를 포함한 거의 모든 장기에서 양성반응이 나타남을 확인하였다. 그러나, Hansson 등 [19]은 약병원성 NDV를 접종하였을 경우에 장과 호흡기의 상피세포에서만 IHC 양성반응이 나타났다고 보고하였는데 이러한 결과는 약병원성 NDV를 사용한 본 실험의 결과와도 동일하였다. 이전의 보고에서 강병원성과 약병원성 NDV의 IHC 양성 반응의 양상이 다르게 나오는 이유는 바이러스 자체가 가지고 있는 감염능과 F protein의 분절에 필요한 효소의 여부에 따라 달라지는 것으로 알려져 있다. 약병원성 NDV가 감염되기 위하여 F protein이 효소에 의해 분절이 이루어져야 하나 그 효소는 조직 자체의 특이적인 효소이기 때문에 제한적이다. 그러나, 강병원성 NDV는 숙주의 특이적, 비특이적 분해 효소들을 모두 이용하므로 숙주 세포의 침입이 쉽기 때문에 혈관내피세포에서 증식하여 혈류를 통해 림프구에 감염된 후 친화성이 있는 체내 모든 장기로 분포한다 [14, 27, 29].

NDV의 조직 내 분포를 확인하여 NDV 조직친화성을 밝히기 위해서 적합한 실험기법인 IHC는 약병원성의 NDV 뿐만 아니라 다른 종류의 NDV의 조직 내 분포를 밝혀 숙주와 원인체와의 상관관계를 규명하는 병성기전 연구에도 적합하기 때문에 이 분야에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결 론

국내에서 ND 예방에 사용하는 생독백신인 Ulster 2C 바이러스, VG/GA바이러스, B1바이러스의 조직 내 분포하는 양상을 비교 연구하여 실험 백신바이러스간의 특성을 밝히고자 하였다. 바이러스의 조직분포를 수행하기 위해서 1일령 SPF 병아리에 실험 백신바이러스들을 점안으로 접종한 후, 혈청 HI 역가실험, 바이러스 분리 실험, 일령별로 시료를 채취하여 H&E 염색법으로 병리조직학적 소견을 관찰하고 NDV에 대한 단클론항체를 이용하여 면역조직화학기법을 수행하였다.

병리조직학적 검사결과, Ulster 2C바이러스 접종군에서는 주로 소장에서 미만성의 림프구 침윤이 관찰되었으며 B1바이러스 접종군에서는 기관상피세포의 섬모의 소실과 기관점막층의 림프구 침윤이 관찰된 반면 VG/GA바이러스 접종군에서는 기관과 소장에서 미만성의

림프구 침윤이 관찰되었다. Harderian gland의 형질세포의 증가와 림프구 침윤이 세 종류 ND 백신바이러스를 접종한 개체에서 공통적으로 관찰되었다.

또한, 세 종류의 ND 생독백신을 접종하여 IHC검사로 조직친화성을 비교한 결과, Ulster 2C바이러스 접종군에서는 기낭, Harderian gland, 소장, 맹장편도 그리고, F낭의 순서대로 양성반응을 보였으며 VG/GA바이러스 접종군에서는 Harderian gland, 소장, 맹장편도, F낭, 기관 그리고, 흉선의 순서대로 양성반응을 보였다. B1바이러스 접종군에서는 Harderian gland, 기관, 식도 그리고, 기낭의 순서대로 양성반응을 보였다. 따라서, 위와 같은 병리조직검사와 IHC검사 결과를 종합하여 볼 때 현재 국내에서 사용되는 세 종류의 백신바이러스는 닭에서의 조직 친화성이 서로 다름이 확인되었다.

참고문헌

1. Abdul-Aziz, T. A. and Arp, L. H. Pathology of the trachea in turkeys exposed by aerosol to lentogenic strains of Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 1983, **27**, 1002-1011.
2. Alexander, D. J. Characteristic of the VG/GA strain. *Avian Pathol.* 1994, **24**, 3-10.
3. Alexander, D. J. Newcastle disease and other avian *Paramyxoviridae* infections. *Disease of Poultry.* pp. 541-569, 10th ed. Iowa State University Press, Iowa, 1997.
4. Alexander, D. J., Mackenzie, R. J. and Russell, P. H. Use of monoclonal antibodies in the characterization of avian paramyxovirus type 1(Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. *Avian Pathol.* 1987, **16**, 553-565.
5. Beard, C. W. and Wikes, W. J. A. Simple and rapid microtest procedure for determining Newcastle hemagglutination-inhibition (HI) antibody titer, in *Proceedings, 77th Annual Meeting of the US Animal Health Association*, 1973, 596-600.
6. Beard, C. W., Villegas, P. and Glisson, R. Comparative efficacy of the B-1 and VG/GA vaccine strains against velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in chickens. 1993, *Avian Dis.* **37**, 222-225.
7. Borland, L. J. and Allan, W. H. Laboratory tests for comparing live lentogenic Newcastle disease vaccines. *Avian Pathol.* 1980, **9**, 45-49.
8. Brown, C. C., King, D. J. and Seal, B. S. Comparison of pathology based techniques for detection of viscerotropic velogenic Newcastle disease virus on

- chickens. *J. Comp. Pathol.* 1999, **120**, 383-389.
9. **Brown, C. C., King, D. J. and Seal, B. S.** Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet. Pathol.* 1999, **36**, 125-132.
 10. **Bruce, S. S., Daniel, J. K. and Holly, S. S.** The avian response to Newcastle disease virus. *Develop. Comp. Immunol.* 2000, **24**, 257-268.
 11. **Cheville, N. F., Stone, H., Riley, J. and Ritchie, A. E.** Pathogenesis of virulent Newcastle disease in chickens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1972, **161**, 169-179.
 12. **Doyle, T. M.** A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filterpassing virus. *J. Comp. Pathol. Therap.* 1927, **40**, 144-169.
 13. **Frederick, A. M., Paul, J. G., Marian, C. H. and Michael, J. S.** *Veterinary Virology*. pp. 97-100, 2nd ed. Academic press, San Diego, 1999.
 14. **Glickman, R. L. and Syddall, R. T.** Quantitative basis residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J. Virol.* 1988, **62**, 354-356.
 15. **Gough, R. E. and Alexander, D. J.** The speed of resistance to challenge induced in chickens vaccinated by different routes with a B1 strain of live NDV. *Vet. Rec.* 1973, **92**, 563-564.
 16. **Gough, R. E. and Allan, W. H.** The potential as an aerosol vaccine of Ulster 2C strain, Newcastle disease virus. *Vet. Rec.* 1974, **95**, 263-265.
 17. **Hamid, H., Campbell, R. S. F. and Lamichhane, C. M.** The pathology of infection of chickens with the lentogenic V4 strain of Newcastle disease virus. *Avian Pathol.* 1990, **19**, 687-696.
 18. **Hamid, H., Campbell, R. S. F., Lamihhance, C. M. and Graydon, R.** Indirect immunoperoxidase staining for Newcastle disease virus (NDV). In *Proceedings. 2nd Asian/Pacific Poultry Health Conf. Aust. Vet. Poult. Assoc.* 1988, 425-427.
 19. **Hansson, E., Young, J. G., Hooper, P. T. and Della-Porta, A. J.** Virulence and transmissibility of some Australian and exotic strains of Newcastle disease virus used in some vaccines. *Aust. Vet. J.* 1999, **77**, 51-52.
 20. **Holmes, H. C.** Resistance of the respiratory tract of the chicken to Newcastle disease virus infection following vaccination: The effect of passively acquired antibody on its development. *J. Comp. Pathol.* 1979, **89**, 11-20.
 21. **Hooper, P. T., Russell, G. M., Morrow, C. J. and Sehgal, Y.** Lentogenic Newcastle disease virus and respiratory disease in Australian broiler chickens. *Aust. Vet. J.* 1999, **77**, 17-18.
 22. **Jonsson, L. G. O. and Engstrom, B. E.** Immunohistochemical detection of infectious bursal disease and infectious bronchitis viral antigens in fixed, paraffin-embedded chicken tissues. *Avian Pathol.* 1986, **15**, 385-393.
 23. **Kim, S. J., Spradbrow, P. B. and Chung, Y. S.** The serological response of chickens to Australian lentogenic strains of Newcastle disease virus. *Aust. Vet. J.* 1978, **54**, 430-436.
 24. **Kotani, T., Odagiri, Y., Nakamura, J. and Horiuchi, T.** Pathological change of mucosa in chickens infected with lentogenic Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 1987, **31**, 491-497.
 25. **Kraneveld, F. C.** A poultry disease in the Dutch East Indies. *Ned. Indisch. B1 Diergeneeskd.* 1926, **38**, 448-450.
 26. **Lockaby, S. B., Hoerr, F. J., Ellis, A. C. and Yu, M. S.** Immunohistochemical detection of Newcastle disease virus in chickens. *Avian Dis.* 1993, **37**, 433-437.
 27. **Nagai, Y., Klenk, H. D. and Rott, R.** Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of NDV. *Virology.* 1976, **72**, 494-508.
 28. **Ojok, L. and Brown, C. C.** An immunohistochemical study of the pathogenesis of virulent viscerotropic Newcastle disease in chickens. *J. Comp. Pathol.* 1996, **115**, 221-227.
 29. **Rott, R.** Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxoviruses. *Arch. Virol.* 1979, **59**, 285-298.
 30. **Russell, P. H.** Newcastle disease virus: Virus replication in the Harderian gland stimulates lacrimal IgA; the yolk sac provides early lacrimal IgG. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1993, **37**, 151-163.
 31. **Russell, P. H.** Newcastle disease virus vaccines: differences between Line C and Line 151 chickens with respect to virus replication and IgA responses in the gut and Harderian gland. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994, **42**, 357-365.
 32. **Russell, P. H. and Koch, G.** Local antibody forming cell responses to the Hitchner B1 and Ulster strains of Newcastle disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1993, **37**, 165-180.
 33. **Sally, J. N.** *Handbook of immunohistochemical staining methods.* 17th ed. DAKO Co. 1989.
 34. **Spanoghe, L., Peeters, J. E., Cotlear, J. C., Devos,**

- A. H. and Viaene, N.** Kinetics of serum and local hemagglutination inhibition antibodies in chicks following vaccination and experimental infection with Newcastle disease virus and their relation with immunity. *Avian Pathol.* 1997, **6**, 101-109.
35. **Suzan, H. M., Claassen, E., Boonstra-Blom, A. G., Vervelde, L. and Janse, E. M.** Immunocytochemical techniques to investigate the pathogenesis of infectious micro-organism and the concurrent immune response of the host. *Develop. Comp. Immunol.* 2000, **24**, 141-21.
36. **Thijs, K., Wobeser, G., Leighton, F. A., Haines, D. M., Chelack, B., Bogdan, J., Hassard, L., Heckert, R. A. and Riva, J.** Pathology of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan with comparison of diagnostic methods. *J. Wildl. Dis.* 1999, **35**, 8-23.
37. **Timms, L. and Alexander, D. J.** Cell-mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines. *Avian Pathol.* 1977, **6**, 51-59.