

닭 전염성 후두기관염 생독백신의 안전성과 효능

한명국, 이오수, 김재홍

국립수의과학검역원

(제재승인 : 2002년 5월 28일)

Safety and efficacy of modified-live infectious laryngotracheitis vaccines

Myung-Guk Han^{*}, O-Soo Lee, Jea-Hong Kim

National Veterinary Research and Quarantine Service

(Accepted : May 28, 2002)

Abstracts : Modified-live (ML) infectious laryngotracheitis (ILT) vaccines have been widely used as a preventive measure in Korea since the first outbreak of ILT. Recently, it has been observed that chickens vaccinated with the commercially available ML ILT vaccine have sometimes exhibited adverse clinical signs. In this study, we evaluated the quality of the vaccines by comparing titer of each vaccine batch and testing the stability of ILT virus (ILTV) in vaccine diluents and compared the safety and efficacy of vaccines in specific pathogen free (SPF) chickens.

The ratio of maximum titer to minimum titer of vaccine produced by most manufacturers was 2 to 15. However, 2 out of 11 manufacturers produced vaccines of which the ratio was 74 to 478. Most vaccines examined were maintained vaccine titers suitable for national regulations within expiry date. However, some vaccines did not keep the titer required for the national regulations.

In the test for stability of ILTV in various diluents, ILTV was highly stable in lactose-phosphate-glutamine-gelatin solution, sucrose-phosphate-glutamine-albumin solution and some vaccine diluents produced by manufacturers.

The safety of ML ILT vaccines was assessed in 10-day-old SPF chicks. Mortality in SPF chicks inoculated intratracheally with one dose of vaccine varied depending on vaccines and some vaccines produced 50-85% mortality. Seven-week-old SPF chickens were vaccinated intraocularly with ML ILT vaccines and then challenged intratracheally with ILT challenge virus 14 days after vaccination. The protection rate was assessed by clinical signs and reisolation of the ILT challenge virus from tracheas taken at day 4 after challenge. There were slight respiratory reactions in some vaccinated chickens after vaccination but these reactions disappeared within 5 days after vaccination. No further clinical signs and death were observed. Protection rate determined by clinical signs and mortality was 100% in all vaccinated groups. However, the challenge virus was isolated from all tracheas of chickens vaccinated with vaccine B or control groups. The challenge virus was also isolated in the trachea of one in five chickens vaccinated with either vaccine F or K, but not in tracheas of chickens vaccinated with other vaccines. In the present study, the stability of vaccine diluents, pathogenicity and protection rate based on reisolation test of the challenge virus were different depending on vaccines produced by eleven manufacturers.

Key words : Infectious laryngotracheitis, vaccine, safety, efficacy, stability

서 론

닭 전염성 후두기관염(infectious laryngotracheitis, ILT)

은 기침, 재채기, 호흡곤란 및 개구호흡 등의 호흡기 증상, 10-40%의 폐사율 그리고 산란저하를 특징으로 하는 닭의 바이러스성 호흡기 질병이다¹. ILT는 전세계에서

* Corresponding author : Myung-guk Han

Avian Disease Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, 480, Anyang, Kyunggi, 430-824,
Republic of Korea, Phone : +82-31-467-1808, FAX : +82-31-467-1814 (E-mail : hanmg@nvrqs.go.kr)

발생하고 있으며 국내에서는 1982년 2월에 경기도 강화군 불은면 소재의 136,000마리의 산란계를 사육한 양계단지에서 처음 발생하였다². 이후 ILT는 급속히 확산되어 같은해 3월에는 충남 홍성, 4월에는 인천, 경기도 고양, 충남 공주 및 전북 고창에서 발생하였으며 5월에는 경기도 부천, 안양 및 파주, 충북 청주, 경북 김천 및 경산, 전북 익산 및 전남 순천지역에서도 발생하였다. 그리고 6월에는 경기도 김포, 연천, 양평 및 송탄, 충남 논산, 전북 전주, 전남 나주, 고흥 및 함평, 경북 의성 그리고 경남 삼천포에 발생하여 전국적으로 확산되었다^{3,4}.

ILT의 원인체인 ILT 바이러스(ILT virus, ILTV)는 단일 혈청형이 존재하며^{5,6} 다른 닭 질병에 비하여 백신이 일찍 개발되어 1930년대부터 생독백신이 사용되었다. 초창기에 개발된 ILT 생독백신은 병원성이 높은 바이러스를 총배설강으로 접종하였으나¹ 이후에 병원성이 순화된 바이러스를 이용한 백신이 개발되었으며 다른 접종법에 비하여 높은 면역을 형성하는 접안접종법이 현재 사용되고 있다^{6,7}. 국내에서 ILT 생독백신 사용은 최초발생 이후에 긴급방역을 위하여 외국으로부터 백신을 도입하면서 시작되었다⁸.

ILT 백신 바이러스는 순화정도에 따라 병원성에 차이가 있으며 다른 *herpesvirus*와 같이 백신의 안전성이 낮아 백신주 자체가 병원성을 나타낼 수 있다. Kotiw *et al*⁹은 약병원성 ILTV를 닭에 3회 계대접종하였을 때 호흡기 증상의 증가가 확인되었고 6회 계대접종부터는 병원성

ILTV 감염에 의하여 나타나는 증상과 같은 심한 증상이 나타남을 보고하였다. Guy *et al*¹⁰은 순화된 ILT 백신 바이러스를 감수성이 있는 닭에 계대접종하였을 때 백신 바이러스의 병원성이 증가됨을 보고하였다. 이러한 연구 결과는 안전성이 낮은 ILT 생독백신이 접종제로부터 감수성이 있는 닭에 감염되어 계대된다면 ILT 백신 바이러스도 병원성이 증가할 수 있다는 것을 시사하고 있다.

국내에서는 1982년 이후부터 유래가 다양한 ILT 생독백신이 사용되고 있으며 야외계군에서 백신 접종후 호흡기 증상 및 결막염등의 백신접종 부작용이 발생하는 경우가 있다. 본 연구는 국내에서 사용되고 있는 ILT 생독백신의 안전성과 효능을 조사하고자 실시하였으며 백신의 제조번호별 및 보존기간별 역가변화와 ILTV의 백신 회석액에서의 안정성을 조사하여 제조사의 품질관리 능력을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

백신 및 ILTV

실험에 사용한 ILT 생독백신은 92년-96년에 국내에서 사용된 계태아 유래 백신 10종과 조직배양 유래 백신 1종을 사용하였다(Table 1). 보존기간별 백신의 역가조사에는 동물용의약품 국가검정 보관품을 사용하였다. ILT 공격 바이러스는 국내분리주인 N91B01을 10일령된 특정병원체부재(specific pathogen free, SPF) 발육종란의 장

Table 1. The list of modified-live infectious laryngotracheitis (ILT) vaccines

Manufacturer	Trade name	Origin of vaccine ¹
Green Cross Veterinary Products Co., Ltd.	ILT live vaccine	CEO
Daesung Microbiological Lab. Co., Ltd.	ILT vaccine	CEO
Chongang Animal Disease Lab.	ILT live vaccine	CEO
Korea Microbiological Lab., Ltd.	ILT live vaccine	CEO
Bayer Korea, Ltd.	Bayovac ILT live vaccine	CEO
TAD Pharmazeutisches Werk GMBH	ILT-vac	CEO
Solvay Animal Health, Inc.	Laryngo-vac	CEO
Sterwin Laboratories, Inc.	BroilertrakeTM	CEO
Intervet International B.V.	Laryngo-vac	CEO
IVAZ s.r.l.	LT-vac	TCO/CEO
Vineland Laboratories	Fowl laryngotracheitis vaccine	CEO

¹CEO : chicken-embryo origin, TCO : tissue-culture origin

노막(chorioallantoic membrane, CAM)에서 증폭하여 사용하였다¹¹.

종란 및 실험동물

실험에 사용한 종란은 Hy-Vac사(USA)에서 생산한 SPF 종란을 사용하였으며 닭은 SPF 종란을 부화하여 격리된 장소에서 사육한 닭을 사용하였다.

세포배양

닭 신장(chicken kidney, CK) 세포배양은 Witter *et al*¹²이 제시한 방법에 준하여 실시하였다. 즉 3-4주령 SPF 닭의 신장을 무균적으로 채취하여 0.25% trypsin으로 37°C에서 2-4회 소화시킨 후 원심하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포에 혼입된 적혈구를 제거하기 위하여 수확한 세포에 적혈구 용혈용액(0.01M Tris-HCl, 0.83% NH₄Cl, pH 7.5, Sigma)을 첨가하여 실온에서 10분간 정치한 후 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS, 0.1M, pH 7.4)로 2회 세척하였다. 세포는 1x10⁶/ml 되게 증식용 배지를 첨가한 다음 37°C가 유지되는 CO₂ 배양기에서 배양하였다. CK 세포 증식용 배지는 tryptose phosphate broth(TPB, Life Technologies)와 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Life Technologies)을 각각 10%씩 첨가한 Earle's minimum essential medium(Life Technologies)에 penicillin(10,000 units/ml), streptomycin sulfate(10,000 µg/ml) 그리고 amphotericin B(25 µg/ml)를 첨가하였으며 CK 세포 유지용 배지는 FBS를 2% 첨가한 것을 제외하고는 증식용 배지와 동일한 조성으로 제조하였다.

백신의 역기축정

백신의 역가는 SPF 발육계란에서 측정하였다. 백신을 PBS(0.1M, pH 7.4)에 재부유한 다음 PBS로 10진 회석하여 10일령 SPF 발육란의 CAM상에 접종하고 37°C에서 5일간 배양하였다. 역가는 CAM에 ILTV 특유의 포크가 형성된 것을 양성으로 하여 Reed와 Muench가 제시한 방법으로 median embryo infective dose(EID₅₀)를 산출하였다¹³.

백신의 안정성 조사

제조후 12, 18 및 24개월이 경과한 백신의 역가를 위해서 기술한 방법으로 측정하여 백신의 보존기간별 안정성을 조사하였다.

백신 회석액에서 ILTV의 안정성 조사

제조사가 생산한 11종의 ILT 백신 회석액과 실험실에서 제조한 lactose-phosphate-glutamine-gelatin 용액(LPGG),

sucrose-phosphate-glutamine-albumin 용액(SPGA), Dulbecco's balanced salt 용액(DBSS), Hank's balanced salt 용액(HBSS), Earle's balanced salt 용액(EBSS), 마렉 병 백신 회석액(diluent for Marek's disease vaccine, MDD), 생리식염수(0.8%), TPB(Life Technologies) 및 Medium 199(Life Technologies)에서 ILTV의 안정성을 조사하였다. LPGG(lactose 74.62g, sodium glutamate 20.0g, gelatin 20.0g, KH₂PO₄ 0.517g, K₂HPO₄ 1.25g, distilled water 1,000ml), SPGA¹⁴, DBSS¹³, HBSS¹³, EBSS¹³, MDD¹⁵ 및 생리식염수는 조성에 따라 실험실에서 제조하였으며 TPB 및 Medium 199은 제조사가 제시하는 방법에 따라 제조하였다.

ILT의 회석액에서의 안정성은 Sharma and Raggi¹⁶의 방법을 변형하여 실시하였다. 실온에 보관된 백신 회석액으로 ILTV를 10진 회석하여 4°C에서 18시간 보관한 다음 22°C에서 2시간 방치한 후 10일령 SPF 발육란의 CAM상에 접종하였다. 접종한 종란은 매일 검란하면서 37°C에서 5일간 배양하였다. 접종후 24시간 이내에 폐사한 종란은 접종사로 처리하고 나머지 접종란은 위에 기술한 방법으로 ILTV의 역가를 산출하였다. 역가는 2회 반복 측정한 값의 평균값으로 하였으며 역가의 표준 편차가 0.5이상인 경우에는 실험을 반복하였다.

백신 회석액의 pH는 pH 측정기(Corning, USA)를 표준 시약(Corning)으로 pH를 교정한 다음 동일한 조건에서 백신 회석액의 pH를 측정하였다.

백신의 병원성 조사

백신의 병원성은 10일령 SPF 닭과 1, 3 및 7주령 SPF 닭에서 조사하였다. 먼저 백신을 25 µl에 1수분이 함유되도록 PBS(0.1M, pH 7.4)로 회석하여 20수의 10일령 SPF 병아리의 기관내로 접종하였다. 접종후 10일 동안 매일 임상증상을 관찰하면서 폐사수를 기록하였다. 비접종 대조군은 PBS(0.1M, pH 7.4)를 기관내로 동량 접종하였으며 접종후 1일 이내에 폐사한 개체는 접종에 의한 사고사로 간주하였다. 또한 1, 3 및 7주령 SPF 닭에 제조사가 제시하는 방법에 따라 백신을 회석하여 수당 30 µl씩 각각 15수씩 접안접종하고 눈물, 안검종창 및 호흡기음 등의 임상증상을 14일간 관찰하였다.

백신의 효능조사

백신의 효능을 동물용의약품 국가검정기준에 제시한 방법과 공격접종후 기관에서 공격바이러스 분리율로 조사하였다. 백신을 PBS(0.1M, pH 7.4)로 회석하여 백신접종군당 15수씩 접안접종하고 14일후에 병원성 ILTV인 N91B01을 개체당 4 x 10^{2.0} CID₅₀/100 µl(10^{3.1} EID₅₀/100 µl)씩 기관내로 공격접종하였다. 공격접종 4일후에 백

신접종군 별로 5수씩 희생시켜 공격접종 바이러스를 분리하고자 기관을 채취하였으며 나머지 10수는 14일동안 임상증상과 폐사율을 조사하였다. 채취한 기관은 유제하여 원심분리한 다음 상층액을 단층이 형성된 CK 세포에 접종하여 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. ILTV 특유의 CPE가 관찰된 세포는 공격접종 바이러스가 분리된 것으로 간주하였다. 백신의 방어율은 임상증상과 폐사율에 근거하여 산출하였으며 공격바이러스 분리율과 비교하였다.

결 과

제조번호별 ILT 백신의 역가

제조번호별 ILT 백신의 역가변화를 백신 제조사별로 조사한 결과 최소역가에 대한 최고역가의 비는 2~478 수준이었다(Table 2). 백신의 역가는 국가검정기준($10^{2.5}$ EID₅₀/dose) 이상이었으나 1개 제조사가 생산한 조직배양용 백신은 국가검정기준이하의 역가를 보였다. 백신의 평균역가 분포를 보면 A 및 D사 백신은 다른 제조사에 비하여 높았으며 H 및 I사의 백신은 낮았다. 또한 J사를 제외하고 제조번호별 역가변화는 F, C 및 G사 순으로 작았으며 반대로 H, A 및 D사 순으로 심하였다. 특히 A 및 D사가 생산한 백신중에는 최고역가가 $10^{4.5}$ EID₅₀/dose

로 조사한 백신중에서 최고역가를 나타내었다.

보존기간별 ILT 백신의 역가변화

백신의 안정성을 조사하고자 백신제조후 12, 18 및 24개월 경과시점에서 백신의 역가를 조사하였다. 그 결과 유효기간이 12, 17 및 18개월인 백신은 유효기간 완료시점에서의 역가가 제조시 역가에 비하여 다소 낮거나 대등한 수준을 보여 안정성이 양호하였다(Table 3). 또한 A 및 D사는 제조 24개월후에도 낮은 역가감소를 보여 국가검정기준 이상의 역가를 유지하였으며, B 및 C사는 제조일로부터 18개월후까지 국가검정기준 이상의 역가를 유지하였다. 그러나 유효기간이 24개월인 I사의 백신은 제조 24개월 후에도 제조시 역가와 유사한 수준의 역가를 보였으나 F와 G사의 백신중 일부는 국가검정기준 이상의 역가가 유지되었으나 기준이하의 역가를 보인 백신도 있었다. 특히 J사의 백신은 유효기간 완료시점의 역가는 모두 기준이하로 낮은 역가를 나타내었다.

백신 희석액에서 ILTV의 안정성

실험실에서 선발한 희석액과 제조사가 제조한 ILT 백신 희석액에서의 ILTV의 안정성을 비교하였다. ILTV는 LPGG에서 가장 높은 안정성을 보여 PBS(0.1M, pH 7.4)에 희석한 다음 즉시 종란에 접종하여 측정한 ILTV의

Table 2. Vaccine titer of modified-live infectious laryngotracheitis vaccines depending on vaccine batch

Manufacturer	No. of batch examined	Vaccine titer (log EID ₅₀ /dose)			B/A
		Minimum (A)	Maximum (B)	Mean \pm SD ¹	
A	4	3.32	4.50	3.74 \pm 0.56	15
B	5	2.83	3.68	3.40 \pm 0.33	7
C	3	3.17	3.50	3.39 \pm 0.19	2
D	5	2.63	4.50	3.73 \pm 0.71	74
E	5	3.00	3.84	3.56 \pm 0.39	7
F	6	2.83	3.32	3.17 \pm 0.18	3
G	8	3.17	3.83	3.56 \pm 0.28	5
H	5	2.50	3.50	2.90 \pm 0.48	10
I	7	2.68	3.38	2.94 \pm 0.36	5
J	6	0.70	3.38	2.43 \pm 0.92	478
K	5	3.17	4.17	3.53 \pm 0.41	10

¹Standard deviation

Table 3. Vaccine titer of infectious laryngotracheitis live vaccines stored for 12, 18 or 24 months after manufacturing

Manufacturer	The term of validity	Batch No.	Vaccine titer (log EID ₅₀ /dose) after manufacturing (month)			
			0	12	18	24
A	12	a-1	3.83	- ¹	-	3.50
		a-2	3.32	3.07	3.63	3.38
B	12	b-1	3.68	-	-	2.08
		b-2	2.83	2.50	2.68	1.83
		b-3	3.50	3.52	3.68	-
		b-4	3.50	3.83	-	-
C	12	c-1	3.50	-	2.75	2.63
		c-2	3.17	3.17	3.00	-
D	12	d-1	3.68	-	-	2.83
		d-2	3.68	-	3.06	3.36
		d-3	4.17	3.75	3.50	-
E	12	e-1	3.83	-	-	2.57
		e-2	3.00	3.38	2.83	2.50
		e-3	3.83	3.38	-	-
F	24	f-1	3.17	-	-	2.66
		f-2	2.83	-	-	2.38
		f-3	3.32	-	-	2.32
G	24	g-1	3.17	-	-	2.37
		g-2	3.50	-	-	2.54
		g-3	3.50	-	-	3.17
H	17	h-1	2.50	-	2.73	-
		h-2	2.50	-	2.63	-
		h-3	2.68	-	-	3.28
I	24	i-1	3.38	-	-	3.28
		i-2	3.32	-	-	3.17
		i-3	2.68	-	-	2.73
J	24	j-1	2.83	-	-	1.83
		j-2	2.50	-	-	1.68
		j-3	2.30	-	-	1.83
K	18	k-1	3.17	-	3.10	-
		k-2	3.17	-	3.68	-

¹not tested

Table 4. The stability of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in diluents

Diluent	Virus titer ¹ (Log EID ₅₀ /100 μl)	% maximum titer
LPGG ²	3.83±0.03 ³	100
SPGA ⁴	3.31±0.12	30
Phosphate buffered saline	3.13±0.28	20
MDD ⁵	2.73±0.14	8
Normal physiological saline	2.75±0.35	8
Hank's balanced salt solution	2.28±0.15	3
Tryptose phosphate broth	1.73±0.14	1
Earle's balanced salt solution	0.82±0.26	0.1
Medium 199	0.63±0.00	0.1
Control	3.57±0.09	55

¹The ILTV ($10^{3.57}$ EID₅₀/100 μl) serially diluted in each diluent were kept in 4°C and 22°C for 18 and 2 hours, respectively and then titrated in 10-day-old embryonated chicken eggs

²Lactose-phosphate-glutamine-gelatin solution

³Mean ± standard deviation

⁴Sucrose-phosphate-glutamine-albumin solution

⁵Diluent for Marek's disease vaccine

Table 5. The stability of infectious laryngotracheitis virus in vaccine diluents produced by manufacturers and pH of diluents¹

Vaccine diluent	Virus titer (Log EID ₅₀ /100 μl)	% maximum titer	pH
A	2.34±0.23 ²	8	4.5
B	0.50±0.00	0.1	6.8
C	3.38±0.00	100	6.6
D	2.28±0.15	8	4.6
E	2.83±0.00	28	6.9
F	3.38±0.00	100	6.9
G	2.00±0.24	4	4.8
H	2.83±0.00	28	6.7
I	2.61±0.32	17	7.0
J	2.82±0.19	28	7.3
K	1.57±0.09	2	4.9

¹The ILTV ($10^{3.57}$ EID₅₀/100 μl) serially diluted in each diluent were kept in 4°C and 22°C for 18 and 2 hours, respectively and then titrated in 10-day-old embryonated chicken eggs

²Mean ± standard deviation

최초역가인 $10^{3.57}$ EID₅₀/100 μl 보다 높은 역가를 나타내었 다(Table 4). 다음으로 ILTV는 SPGA에서 안정하였으며 PBS에서는 최초역가에 비하여 $10^{0.44}$ EID₅₀/100 μl 감소하 였으나 나머지 희석액에서는 현저한 역감소를 보였다.

제조사가 제조한 ILT 백신 희석액에서 ILTV의 안정

성을 비교한 결과 제조사별로 현저한 차이를 보였다 (Table 5). ILTV는 C 및 F사의 백신 희석액에서 최초역 가에 비하여 $10^{0.19}$ EID₅₀/100 μl의 감소를 보여 높은 안 정성을 보였다. 다음으로 E, H, I 및 J사는 최초역가에 비하여 $10^{0.75}$ - $10^{0.96}$ EID₅₀/100 μl의 감소를 보였으며 D 및

Table 6. The pathogenicity of modified-live infectious laryngotracheitis (ILT) vaccines in SPF chickens

Vaccine	Vaccine titer (log EID ₅₀ /dose)	No. of chickens died ¹	No. of chickens showed clinical signs (week) ²		
			1	3	7
A	3.17	4	3	3	0
B	3.50	2	2	0	0
C	3.50	4	2	0	1
D	3.17	17	4	5	4
E	3.00	8	4	3	3
F	3.32	3	3	0	0
G	3.53	10	5	2	3
H	2.50	5	3	0	1
I	2.68	6	5	0	2
J	2.50	0	0	0	0
K	3.17	12	9	5	3

¹Twenty 10-day-old SPF chickens were inoculated intratracheally with 1 dose of ILT vaccines and observed the clinical signs for 10 days post-inoculation

²Fifteen 1-, 3- and 7-week-old SPF chickens were vaccinated intracocularly with ILT vaccines according to manufacturer's recommendations and observed the clinical signs for 14 days after vaccination

K사 회석액에서는 최초역가보다 20-100배 낮은 역가가 유지되었다. 그러나 B사의 회석액에서 ILTV의 안정성은 현저히 감소하여 제조사중에서 가장 낮은 안정성을 나타내었다. 회석액의 pH는 대부분 6.6-7.3수준이었으나 ILTV의 역가감소가 큰 회석액의 pH는 4.5-4.9로 낮았다 (Table 5).

ILT 백신의 안전성

백신의 안전성을 10일령 SPF 병아리에서의 폐사율과 접안접종후 임상증상으로 비교하였다(Table 6). 10일령 SPF 병아리에 백신 1수분을 기관내로 접종한 결과 폐사율은 백신에 따라 큰 차이를 보였다. 즉, 백신 D 접종군에서는 85%(17수/20수)의 폐사율을 보여 가장 높았으며 다음으로 백신 K 및 G로 폐사율은 각각 60%(12수/20수) 및 50%(10수/20수)였다. 폐사는 기관내 접종후 3일부터 시작되었으며 접종후 4-7일에 증가하다가 이후부터 감소하여 접종후 8일부터 증상이 회복되기 시작하였다. 그러나 백신 D와 G 접종군에서는 폐사가 접종 후 9-10일까지 지속되었다.

백신을 접안으로 접종하고 눈물, 기침 등의 백신접종 반응을 조사한 결과 1주령 SPF 병아리에서는 백신 J를 제외한 모든 백신에서 접종반응이 관찰되었으나 접종일령이 증가함에 따라 접종반응을 보이는 개체수도 감소하고 접종반응도 미약하였다. 특히 7주령 SPF 닭에서

백신접종반응은 백신 접종후 3-4일에 관찰되었으며 접종 5일후부터는 회복되기 시작하여 이후에는 관찰되지 않았다.

백신의 효능비교

ILT 백신의 효능을 임상증상 방어율과 공격접종 바이러스 분리율로 비교하였다. 백신 접종계는 병원성 ILTV로 공격접종하였을 때 호흡기음, 눈물, 폐사 등의 임상증상이 관찰되지 않아 조사한 모든 백신이 100%의 방어율을 나타내었다. 그러나 공격접종 4일 후에 채취한 기관에서 ILTV를 분리한 결과 백신접종군에 따라 분리율에 차이를 보였다. 즉, 백신 B 접종군에서는 검사한 5수에서 모두 ILTV가 분리되었으며 백신 F 및 K 접종군에서는 각각 1수에서 ILTV가 분리되었다. 그러나 나머지 백신 접종군의 기관에서는 ILTV가 분리되지 않았다. 백신 미접종 대조군에서는 공격접종 2일 후부터 호흡기증상이 나타나기 시작하였으며 폐사는 접종후 3-4일부터 발생하여 40%의 폐사율을 보였다. 또한 공격접종 후 4일에 생존한 5마리의 기관에서 ILTV를 분리한 결과 검사한 모든 개체에서 ILTV가 분리되었다.

고찰

ILT 백신 바이러스는 제조사에 따라 순화된 정도가

Table 7. The vaccine efficacy of modified-live infectious laryngotracheitis vaccines

Vaccine	Vaccine titer (log EID ₅₀ /dose)	Protection	Reisolation of challenge virus
A	3.50	10/101	0/52
B	3.48	10/10	5/5
C	3.50	10/10	0/5
D	4.50	10/10	0/5
E	3.32	10/10	0/5
F	3.32	10/10	1/5
G	3.83	10/10	0/5
H	3.32	10/10	0/5
I	2.83	10/10	0/5
J	3.38	10/10	0/5
K	4.17	10/10	1/5
Control	-	0/10	5/5

¹No. of chickens protected/No. of chickens inoculated with challenge virus

²No. of chickens from which challenge virus was isolated/No. of tested chickens

달라 병원성과 면역원성에 차이가 있으며 백신의 품질 관리 능력도 제조사에 따라 다르다. 국내에서 사용이 허가된 11개 제조사가 생산한 백신의 역가를 비교한 결과 제조번호별로 역가 차이가 큰 제조사가 있었다. 특히 조직배양용 백신을 생산한 제조사는 바이러스 역가가 국가검정이하의 수준으로 생산하였으며 효능시험에서도 27-53%의 방어율을 나타내어 백신으로는 부적합하였다. 또한 제조사가 제시한 유효기간내 백신의 역가를 보면 일부 백신은 제조당시 역가에 비하여 현저한 감소를 보여 백신의 품질관리가 제조사에 따라 큰 차이가 있음을 알 수 있다.

ILT는 열에 대한 저항성이 낮으므로 백신접종시 백신 회석액에서 ILTV의 안정성 유지는 백신접종계군의 균일한 면역유도를 위하여 매우 중요한 부분이다. 따라서 ILT 백신 회석액은 백신을 접종하는 동안 백신의 역가감소가 없도록 안정성을 제공하여야 한다. 시험결과 ILTV는 LPGG 및 SPGA에서 높은 안정성을 나타내었으며 PBS에서도 안정성이 높았다. 또한 ILTV는 일부 제조사가 제조한 ILT 백신 회석액에서도 SPGA 수준의 안정성을 보였다. 그러나 제조사가 생산한 대부분의 백신 회석액에서 ILTV의 역가는 현저히 감소되어 안정성이 낮았다. ILTV에 대한 안정성이 낮은 백신 회석액의 pH는 4.5-4.9수준으로 안정성이 높은 회석액의 pH 6.7-7.3 수준보다 낮았다. 백신 회석액의 ILTV에 대한 안정성이 낮은 원인이 백신 회석액 조성이 제조사에 따라 다르므

로 조성차이에 의한 것이지 아니면 회석액의 낮은 pH가 그 원인인지를 밝히기는 곤란하지만 낮은 pH도 안정성에 큰 영향을 미친 것으로 추정된다.

ILT 백신은 다른 백신에 비하여 안전성이 낮다. 계태아 유래 ILT 백신을 SPF 닭에 계대접종하면 조직배양 유래 백신과는 달리 병원성이 증가하는 것이 보고되었다¹⁰. ILT 백신 바이러스는 접종계로부터 백신을 접종하지 않은 닭에 백신 바이러스가 전파될 수 있으므로 닭에 계대되어 병원성을 회복하여 질병을 유발할 수 있다^{17,18}. Kotiw *et al*⁹은 약병원성 ILTV를 SPF 닭에 계대접종하였을 때 병원성이 증가하여 병원성 ILTV와 유사한 임상증상이 나타나는 것을 보고되었다. 야외상황에서 ILT 백신의 병원성은 백신주 자체의 병원성 회복과 다른 질병 및 환기불량등의 제2의 요인 의하여 증가할 수 있다. Han and Kim¹¹은 ILT 발병예에서 분리한 ILTV의 병원성을 SPF 닭에서 조사한 결과 분리주중에 백신 접종계와 유사한 임상증상을 유발하는 분리주를 보고하였으며 이들 분리주가 야외상황에서 질병을 야기한 원인은 다른 질병이나 스트레스가 복합적으로 작용한 결과라고 분석하였다. ILT 백신 접종후 반응은 다른 호흡기 질병, 면역억제성 질병 및 환기불량과 백신 바이러스의 병원성이 복합적으로 작용하여 증가할 수 있다^{19,20}. 본 연구에서 조사한 11개 백신의 10일령 SPF 병아리에서의 폐사율 및 1, 3 및 7주령 SPF 닭에서의 임상증상 유발정도를 비교한 결과 큰 차이를 보였다. 따라서 ILT 백신접종

후에 관찰되는 반응은 사용한 백신종류, 다른 호흡기 질병과의 복합감염이나 환기불량정도에 따라 정도에 차이가 있을 수 있으며 경우에 따라서는 ILT가 발병할 수도 있을 것으로 추정된다.

백신 바이러스를 포함한 ILTV는 삼차신경절에 잠복감염을 일으킨다²¹. 잠복감염된 ILTV는 이동, 산란개시 등의 스트레스 요인에 의하여 재활성화되어 기관내로 바이러스가 배출될 수 있으므로²² ILT 백신은 병원성 ILTV의 잠복감염을 방어하여야 한다. ILTV의 방어면역은 다른 *herpesvirus*와 마찬가지로 세포성 면역(cellular immunity)이 관여한다^{23,24}. 계군의 항체수준은 병원성 ILTV에 대한 방어수준과 상관성은 있으나 개체별 혈중 항체 수준은 방어력과의 관련성은 낮다^{6,25,26}. 따라서 혈청학적인 방법으로 백신의 효능을 평가하기는 어렵다. 미국의 code of federal regulations(CFR), European Pharmacopoeia 및 국가검정기준은 공격접종에 의한 임상증상 방어율로 백신의 효능을 평가하고 있다. 본 연구에서 위의 기준에 따라 백신의 효능을 평가한 결과 조사한 11개의 백신이 100%의 방어율을 보였다. 그러나 공격접종 4일후에 공격접종 ILTV를 분리한 결과 백신 접종군에 따라 분리율에 차이를 보였다. 즉 100%의 임상증상을 방어한 백신일지라도 기관에서 공격접종 ILTV의 증식을 억제하는 능력에는 차이가 있으며 ILTV의 증식부위인 기관에서 병원성 ILTV의 증식을 차단하지 못하면 잠복감염을 유발할 수 있다.

ILT 백신의 공격바이러스의 잠복감염 방어수준을 평가하기 위하여는 ILTV의 잠복감염 부위인 삼차신경절에서의 바이러스 분리 및 검출이 요구된다. 잠복감염된 *herpesvirus*의 분리 및 검출에는 면역염색법^{27,28}, in situ hybridization²⁹, 열 충격³⁰ 및 감염조직 배양법³¹이 보고되었다. 잠복감염된 ILTV 분리와 관련된 연구결과를 보면 감염 107일후에 기관배양법으로 ILTV가 분리된 바 있다³². 또한 삼차신경절에서 ILTV 항원과 DNA 검출은 보고되었으나^{21,33} ILTV 분리는 보고된 바 없다. 백신의 병원성 ILTV의 잠복감염 방어능은 CFR 및 국가검정기준으로는 평가하기 곤란하다. 또한 삼차신경절에서 검출되는 항원과 DNA도 백신 바이러스와 병원성 바이러스를 구분하기 곤란하므로 백신의 잠복감염 방어능 평가에 적용하기 어렵다. 최근에 Han and Kim³⁴은 ILTV 백신주와 야외 분리주를 감별하는 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP)를 보고하였다. 이를 이용하여 백신접종후 공격접종한 닭의 삼차신경절에서 검출한 유전자를 분석한 결과 백신에 따라 공격바이러스의 검출율에 차이를 보였으므로(data not shown) 백신의 잠복감염 방어율의 평가에

PCR-RFLP가 적용 가능할 것이다. ILT 백신은 혈중항체 수준으로 계군의 면역상태와 면역지속기간을 측정하기 곤란하므로 질병발생에 의한 피해를 최소화하기 위하여는 효능이 우수한 백신을 사용하는 것이 무엇보다도 중요하다. 그러므로 ILT백신의 효능은 야외 바이러스의 잠복감염 방어수준에 의한 평가와 같은 방법으로 측정하는 것이 요구된다.

결 롬

본 연구에서는 11개 백신 제조사를 대상으로 제조번호 및 유효기간별 백신역가 변화, 백신 희석액에서 ILTV의 안정성 및 SPF 닭에서 백신의 안전성과 효능을 조사하여 제조사별 품질관리 능력을 평가하고자 하였다. 제조번호별 백신역가 변화를 최소역가에 대한 최고역가 비(ratio)로 비교한 결과 대부분 제조사는 2-15 수준이었으나 2개 제조사는 74와 478로 제조번호별 역가변화가 심하였다. 백신의 유효기간내 역가는 국가검정기준 이상의 역가를 유지하고 있었으나 유효기간이 24개월인 백신중 일부는 국가검정기준 이하의 역가를 나타내었다. 제조사가 생산한 ILT 백신 희석액에서 ILTV 안정성은 제조사별로 큰 차이를 보였으며 일부 백신희석액에서 ILTV는 최초역가보다 $10^{1.57}$ - $10^{3.07}$ EID₅₀의 역가감소를 보였다.

ILT 백신의 병원성을 10일령 SPF 병아리의 기관내 접종과 1, 3 및 7주령 SPF 닭의 점안접종하여 각각 폐사율과 임상증상 발현율로 조사하였다. 10일령 병아리에서의 폐사율은 0-85%로 백신에 따라 큰 차이를 보였으며 높은 폐사율을 보인 백신은 점안접종후 임상증상을 보인 개체가 많았다. 백신의 효능을 병원성 ILTV를 공격접종하여 임상증상과 기관에서 공격용 바이러스 분리율로 비교한 결과 조사한 모든 백신은 임상증상을 100% 방어하였으나 기관에서 공격용 바이러스의 분리율은 백신에 따라 차이가 있었다. 이상의 결과를 종합하면 제조번호별 백신역가, 희석액에서 ILTV의 안정성, 닭에서의 병원성 및 효능은 백신 제조사에 따라 차이를 보였으며 특히 백신의 효능을 공격용 바이러스 분리율로 비교한 결과 백신에 따라 현저한 차이를 보였다.

Acknowledgement

The authors thank Mr. Hwang-woo Lee for excellent technical assistance. This study was supported by national project grant from the National Veterinary Research and Quarantine Service.

참고문헌

- Bagust TJ, Guy JS. Laryngotracheitis. In Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, et al, ed. *Diseases of Poultry*, 10th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 527~539, 1997.
- Choi CO, Kim JH, Kwon JH. Outbreaks of infectious laryngotracheitis in Korea. In Della-Porta AJ, ed. *Veterinary Viral Diseases: Their Significance in South-East Asia and the Western Pacific*, Academic Press Australia, North Ryde, Australia, 355~356, 1985.
- 김순복, 김봉환. 삼천포지방에 집단 발병한 닭의 후두기관염. 대한수의사회지, 18:20~23, 1982.
- 최정옥. 닭 전염성 후두기관염. 대한수의사회지, 18:22~26, 1982.
- Cover MS, Benton WJ. The biological variation of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis*, 2:375~383, 1958.
- Shibley GP, Luginbuhl RE, Helmboldt CF. A study of infectious laryngotracheitis virus. I. Comparison of serologic and immunogenic properties. *Avian Dis*, 6:59~71, 1962.
- Alls AA, Ipson JR, Vaughan WD. Studies on an ocular infectious laryngotracheitis vaccine. *Avian Dis*, 13:36~45, 1969.
- 박근식. 닭 전염성 후두기관염(Infectious laryngotracheitis: ILT)의 예방대책연구. 대한수의사회지, 18:8~19, 1982.
- Kotiw MK, Wilks CR, May JT. The effect of serial in vivo passage on the expression of virulence and DNA stability of an infectious laryngotracheitis virus strain of low virulence. *Vet Microbiol*, 45:71~80, 1995.
- Guy JS, Barnes HJ, Smith L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian Dis*, 35:348~355, 1991.
- Han MG, Kim SJ. Comparison of virulence and restriction endonuclease cleavage patterns of infectious laryngotracheitis viruses isolated in Korea. *Avian Pathol*, 30:337~344, 2001.
- Witter RL, Solomon JJ, Burgoyne GH. Cell culture techniques for primary isolation of Marek's disease-associated herpesvirus. *Avian Dis*, 13: 101~118, 1969
- Schat KA, Purchase HG. Cell-culture methods. In Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, et al, ed. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 2nd ed, Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa, 167~175, 1990.
- Sharma JM. Marek's disease. In Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, et al, ed. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 2nd ed, Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa, 89~94, 1990.
- Palya V. Materials and media. *Manual for the production of Marek's disease, Gumboro disease and inactivated Newcastle disease vaccines*, FAO, Rome, 65~74, 1991.
- Sharma JM, Raggi LG. A plaque system for study of infectious laryngotracheitis virus in adult chicken kidney cultures. *Avian Dis*, 13:268~279, 1969.
- Guy JS, Barnes HJ, Munger LL, et al. Restriction endonuclease analysis of infectious laryngotracheitis viruses : comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Dis*, 33:316~323, 1989.
- Guy JS, Barnes HJ, Munger LL. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses : Comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Dis*, 34:106~113, 1990.
- Morris MP, Davison SA, Eckroade RJ. Laryngotracheitis outbreak limited to a part of a chicken flock exposed to smoke and chemicals. *Avian Dis*, 30:843~846, 1986.
- Motha MXJ. Effects of reticuloendotheliosis virus on the response of chickens to infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol*, 11:475~486, 1982
- Williams RA, Bennett M, Bradbury JM, et al. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol*, 73:2415~2420, 1992.
- Hughes CS, Gaskell RM, Jones RC, et al. Effects of certain stress factors on the reexcretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. *Res Vet Sci*, 46:274~276, 1989.
- Fahey KJ, York JJ, Bagust TJ. Laryngotracheitis herpesvirus infection in the chicken. II. The adoptive transfer of resistance with immune spleen cells. *Avian Pathol*, 13:265~275, 1984.
- Robertson GM. The role of bursa-dependent responses in immunity to infectious laryngotracheitis. *Res Vet Sci*, 22:281~284, 1977.

25. Fahey KJ, Bagust TJ, York JJ. Laryngotracheitis herpesvirus infection in the chicken: the role of humoral antibody in immunity to a graded challenge infection. *Avian Pathol*, 12:505~514, 1983.
26. Hitchner SB. Infectious laryngotracheitis: the virus and the immunity. *Am J Vet Res*, 36:518~519, 1976.
27. Gutekunst DE. Latency pseudorabies virus infection in swine detected by RNA-DNA hybridization. *Am J Vet Res*, 40:1568~1572, 1979.
28. Rziha HJ, Mettenleiter TC, Ohlinger V, et al. Herpesvirus (pseudorabies virus) latency in swine: occurrence and physical state of viral DNA in neural tissues. *Virology*, 155:600~613, 1986.
29. Brown TM, Osorio FA, Rock DL. Detection of latent pseudorabies virus in swine using in situ hybridization. *Vet Microbiol*, 24:273~280, 1990.
30. Sawtell NM, Thompson RL. Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol*, 66:2150~2156, 1992.
31. Bastian RO, Rabson AS, Yee CL, et al. Herpesvirus hominis: isolation from human trigeminal ganglia. *Science*, 178:306~307, 1972.
32. Turner AJ. Persistence of virus in respiratory infections of chickens. *Aust Vet J*, 48:361~363, 1972.
33. Bagust TJ, Calnek BW, Fahey KJ. Gallid-1 herpesvirus infection in the chicken. 3. Reinvestigation of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis in acute and early post-acute respiratory disease. *Avian Dis*, 30:179~190, 1986.
34. Han MG, Kim SJ. Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol*, 83:321~331, 2001.