

육계의 뉴캐슬병 방어역가 측정에 있어서 ELISA 검사법의 효용성

김중녀 · 허 원¹ · 모인필*

충북대학교 수의과대학, ¹(주)대성미생물연구소
(게재승인: 2006년 5월 28일)

Efficacy of ELISA for measurement of protective newcastle disease antibody level in broilers

Jong-Nyeo Kim, Heo won¹, In-Pil Mo*

Research Institute of Veterinary Medicine/College of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju 361-736, Korea

¹Daessung Microbiological Labs. Co. Ltd., Uiwang 437-815, Korea

(Accepted: May 28, 2006)

Abstract : Newcastle disease (ND) is a highly contagious disease of poultry that can cause severe economic losses throughout the world. Vaccination has been used for a long time and proved as one of the most effective method to reduce the economic loss due to ND virus infection. The measurement of antibody titer such as hamagglutination-inhibition (HI) test with sera has been used as a useful method to evaluate the immunity level of host. However, HI test is gradually being replaced by the enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA). To evaluate the efficacy of ELISA in the chickens vaccinated with different procedure, present study has been performed. After SPF chicks and commercial broilers were vaccinated with different kinds of live vaccines such as V4, VG/GA and/or B1 at various time, the antibody level has been measured using both HI test and ELISA. Challenge test with velogenic viscerotropic NDV was also performed to measure the protective level of antibody. In the SPF chickens, the mean ELISA titer after vaccination and survival rate after challenge was increased and correlated with days post inoculation. More than 80% of chickens with higher than 1,000 ELISA titer after vaccination were survived after challenge with velogenic ND virus and had good correlation between survival rate and antibody titer. In commercial broiler chickens, most of them at market age had low level of ELISA titer regardless of the number of vaccination, and had a low correlation between survival rate and ELISA titer. However, the ELISA titer of remaining birds after challenge was increased. This result indicated that ELISA titer had good response against velogenic NDV infection compared to HI titer.

Key words : Newcastle disease, HI, ELISA, challenge infection

서 론

뉴캐슬병은 대부분의 조류에서 발생 보고된 급성 전염성 질병으로 [6] 양계산업에 가장 큰 경제적 손실을 일으키는 질병 중 하나이며 국제수역사무국(Office

International des Epizooties : OIE)에서 list A 질병으로 구분하고 있으며, 국내에서는 제 1종 법정전염병으로 정하고 있다.

뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus : NDV)는 병원성이 다양하여 계태아의 평균치사시간(Mean death

본 연구는 (주)메덱스의 연구비 지원에 의하여 수행되었음

*Corresponding author: In-Pil Mo

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-736, Korea
[Tel: +82-43-261-3356, Fax: +82-43-261-3224, E-mail: moip@cbu.ac.kr]

time : MDT), 1일령 병아리의 뇌내 병원성지수(Intracerebral pathogenicity index : ICPI), 6주령 닭의 정맥내 병원성지수(Intravenous pathogenicity index : IVPI) [4], F0 cleavage site 분석법 [18] 등을 통하여 강병원성, 중병원성, 약병원성, 비병원성으로 구분되며 강병원성은 다시 장친화성(Viscerotropic velogenic newcastle disease : VVND)과 신경친화성(Neurotropic velogenic newcastle disease : NVND)으로 구분된다 [5]. NDV의 감염력 및 병원성은 NDV의 표면에 돌기를 형성하고 있는 fusion(F) protien 및 hemagglutinin-neuraminidase(HN) protein과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다 [5, 16, 23, 34]. 이와 같이 병원성이 다양한 다섯종류의 pathotype은 Avulavirus속의 avian paramyxovirus 혈청형 중 모두 동일한 혈청형인 제 1형(Avian paramyxovirus type-1 : APMV-1)으로 분류되어 있다 [10].

NDV 감염에 대한 방어에는 세포성 면역 [19, 34]과 전신성 체액성 면역 [23]이 모두 관여하는 것으로 알려져 있으며, 최근 Reynold 등의 실험을 통해 체액성 면역는 뉴캐슬병의 임상증상 발현을 감소시키고, 세포성 면역는 호흡기에서의 바이러스 증식을 감소시킨다는 점이 확인된 바 있다. 또한 IgA에 의해 매개되는 국소 점막면역 [13, 14, 17, 24, 29]은 전신면역과는 독립적으로 작용하여 호흡기를 방어하는 것으로 알려져 있다.

국내에서는 뉴캐슬병 방제를 위해 백신접종정책을 실시하고 있으며, 전신성 체액성 면역 뿐 아니라 세포성 면역와 국소 점막면역을 유도하여 감염을 차단하는 생독백신과, 혈액 중에 높은 항체역가를 유도하여 장기간 면역 작용을 나타내는 불활화 백신이 사용된다 [8].

백신접종 후 계군의 면역상태를 예측할 수 있는 가장 정확한 방법은 강독 NDV 공격접종에 대한 방어율 측정이지만 실험소요시간이 길고, 방역문제 때문에 야외에서 수행하기는 불가능하다 [8]. 현재 ND에 대한 면역 측정을 위해 실시하고 있는 혈청검사법으로는 바이러스 중화시험법(Virus neutralisation test : VN test), 혈구응집억제반응법(Hemagglutination inhibition test : HI test) [8], ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)가 있다. VN test는 virus 중화능력이 있는 항체역가를 측정할 수 있는 가장 정확한 방법이지만 대규모의 샘플을 검사하는 데는 부적합하며 전문적인 장비와 기술이 필요하고 검사 소요시간이 긴 단점이 있다. HI 검사는 HN 단백질에 대한 항체를 검출하며 감염에 대한 방어와 높은 상관관계가 인정되어 현재까지 표준 방법으로 채택되어 사용되고 있다. ELISA는 HN뿐만 아니라 다른 단백질에 대한 항체도 검출하며 대규모의 샘플을 검사할 수 있는 장점이 있다. 표준 검사방법인 HI 검사와는 직접적인 상관관계가 부족하다고 알려져

있으나 [21, 35] 높은 상관관계를 보고한 연구결과도 있다 [2, 23].

최근 국내에는 뉴캐슬병의 방제방법으로 전국의 양계 농가를 대상으로 혈청검사를 실시하고 있으며 효율적인 검사를 위하여 HI와 ELISA 검사법을 공식적으로 채택하고 있다. 현재 국내에서는 상품화된 ND ELISA kit가 광범위하게 사용되고 있으나 국내 강독형 NDV에 관련하여 ELISA역가에 대한 기초 자료가 부족한 실정이다. 본 실험은 ND 생독백신 접종 후 ELISA에 의해 검출되는 백신 역가의 수준, 검출시기 등 ELISA 역가 추이를 관찰하고, 강독 NDV의 감염에 방어할 수 있는 ELISA 역가를 측정하여 계군의 ND 면역 측정에 있어서 ELISA의 유용성을 알아보고, 국내 실정에 맞는 ELISA 역가의 기초 자료를 제공하여 ND발생을 예방하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용한 SPF닭은 SPF종란(SPAFAS[®], Charles River Laboratories, USA)을 구입하여 실험실에서 부화하여 사용하였다. 1일령 SPF종란을 부화기에 넣고 포르말린 훈연소독을 하였으며 부화 후에는 실험종료시까지 무균사육장치에서 사육하였다.

일반육계를 위한 실험은 충북 음성군 소재 육계농장 중 생독백신을 각각 2회, 3회 접종하고 있는 농장 2개를 선정하여 시기별로 시료를 채취하였으며, 부화장에서 서로 다른 종류의 백신을 분무 접종한 1일령 병아리 2개 계군을 선정하여 실험육계를 구입한 후 자체 사육 시설에서 사육하며 실험하였다.

백신 바이러스

장친화성 비병원성주인 VG/GA주(AVINEW[®], Merial, France), V4주(내열성 ND생백[®], 대성미생물연구소, 한국)와 호흡기친화성 약독주인 B1주(바이오백[®], Bayer Korea, Germany)로 제조된 상품화된 백신을 사용하였다.

분무접종

일반육계계군의 1일령 기초 분무 접종은 부화장에서 실시하였으며, 150 μ m 이상의 거친 분무입자를 방출하는 Spra-Vac자동분무기(Merial, France)를 사용하였다.

공격접종용 바이러스 및 공격시험

공격접종에 사용한 바이러스는 국내 분리 강병원성 NDV인 교정원주를 이용하였으며 이 바이러스는 국립수의과학검역원으로부터 분양받았다. 공격실험은 국립

Table 1. Experimental design for efficacy test of ELISA using the SPF chickens without maternal antibody

Group	No. of chickens	Vaccine ¹⁾	Days at vaccination	Days at sampling and challenging					
				1	7	14	21	28	35
I-1	70	-	-		ST ²⁾ (20) ³⁾ CHAL ⁴⁾ (9)	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)
I-2	60	VG/GA ⁵⁾	1	-	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)
I-3	40	VG/GA BI ⁴⁾	1 14	-	-	-	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)
I-4	30	VG/GA BI	1 14, 21	-	-	-	-	ST(20) CHAL(9)	ST(20) CHAL(9)

- 1) Vaccinated by eye and oral route
- 2) ST : serum collected and tested using HI and ELISA
- 3) Parenthesis is the number of chickens
- 4) CHAL : Challenged with 10^{5.0}EID₅₀ of Kyojeongwon
- 5) Name of vaccine; VG/GA (apathogenic strain), BI (lentogenic strain)

수의과학검역원 내 공격접종용 계사에서 실시하였다. 교정원주에 대한 감염역가를 측정하기 위하여 교정원주를 멸균 PBS로 10진 희석하고 각 희석배수 당 5개의 10일령 SPF 종란의 장노막강 내로 0.1 ml씩 접종하였다. 바이러스 접종 24시간 후부터 60시간까지 폐사한 종란을 선별하여 냉장한 후 평판혈구응집반응을 하여 50% 감염역가를 Reed and Muench법 [26]에 의하여 산출하였다. 교정원주의 독력을 측정 후 희석하여 1수에 10^{5.0}EID₅₀/0.1 ml 해당하는 용량을 비강경로로 접종하였다. 접종 후 접종군 별로 격리 사육하면서 14일 동안 폐사수를 기록하고 14일 이후 생존한 개체에 대하여 채혈을 실시하였다.

SPF 계군의 실험설계

1일령 SPF 병아리 200수를 Table 1과 같이 백신 미접종 대조군 70수, 백신 1회 접종군 60수, 백신 2회 접종군 40수 그리고 백신 3회 접종군 30수로 배정하였다. 1일령에 대조군 70수를 제외한 130수에 대하여 1차 백신을 접종하여 각각 격리된 무균사육장치에서 사육하였다. 14일령에는 백신 접종한 130수중 70수를 무작위 선택하여 2차 백신을 접종한 후 접종군 별로 격리 사육하였다. 이후 21일령에 백신 2회 접종한 70수중 30수를 선택하여 3차 백신을 접종한 후 접종군 별로 격리 사육하였다. 1차 백신은 1일령에 VG/GA주, 2차와 3차 백신은 각각 14일령과 21일령에 BI주 백신을 사용하였다. 용량은 각 제품의 제조사가 권장하는 1수분 용량을 1/2수분은 점안으로 1/2수분은 경구로 접종하였다. 채혈과 공격시험은 백신을 접종하기 전에 각 계군별로 실시하였다. 1일령부터 5주령까지 주령별로 대조군에서는 10수씩, 접종군에서는 20수씩 채혈하였

다. 1주령부터 5주령까지 주령별로 대조군 5수, 접종군 9수를 무작위 선택하여 교정원주로 공격 접종한 후 접종군 별로 격리 사육하면서 14일간 폐사수를 기록하였다.

일반육계 계군의 실험설계

VG/GA주 생독백신을 각각 2회, 3회 접종하고 있는 충북음성군 소재 농장 2개를 선정하여 시기별로 시료를 채취하였으며, 부화장에서 각각 V4주와 VG/GA주 백신을 분무 접종한 1일령 병아리 2개 계군을 구입하여 자체 사육시설에서 사육하며 실험하였다. 계군의 분류는 Table 2와 같다. 1일령과 2, 3, 4주령에 계군 당 매회 20수씩 채혈하여 혈청역가를 비교하였으며, 2주령 3주령 4주령 때는 계군 당 매회 10수씩 무작위 선택하여 교정원으로 공격 접종한 후 접종군 별로 격리사육하면서 14일 동안 폐사수를 기록하였다.

혈구응집억제반응법(Hemagglutination inhibition test : HI test)

채혈한 혈액을 응고시킨 후 혈청을 분리하여 β-Procedure micromethod로 HI test를 다음과 같이 실시하였다 [8]. U자형 96-well microplate의 전체 well에 PBS 25 μl를 분주하고 첫 번째 well에 혈청을 25 μl 넣어 2진 단계 희석하였다. 4 hemagglutination unit (HAU)으로 조정된 ND 항원(대성 뉴캐슬병 진단액®, 대성미생물연구소, 한국)을 전체 well에 25 μl씩 분주하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 1% 닭 적혈구 부유액을 25 μl 분주하여 실온에서 40분간 정치시킨 후 판독하였다. 100% 혈구응집이 억제된 최고 희석배수의 역수를 항체역가로 표시하였다.

Table 2. Experimental design for efficacy test of ELISA using the commercial broilers

Group	No. of chickens	Vaccine	Days at vaccination	Days at sampling and challenging			
				1	14	21	28
II-1	60	V4 ¹⁾	1	ST ²⁾ (20) ³⁾	ST(20) CHAL ⁴⁾ (10)	ST(20) CHAL(10)	ST(20) CHAL(10)
II-2	60	VG/GA ¹⁾	1	ST(20)	ST(20) CHAL(10)	ST(20) CHAL(10)	ST(20) CHAL(10)
II-3	60	VG/GA	1, 12	ST(20)	ST(20) CHAL(10)	ST(20) CHAL(10)	ST(20) CHAL(10)
II-4	60	VG/GA	1, 16, 23	ST(20)	ST(20) CHAL(10)	ST(20) CHAL(10)	ST(20) CHAL(10)

1) name of vaccine; V4 (apathogenic strain), VG/GA (apathogenic strain)

2) ST : serum collected and tested using HI and ELISA

3) Parenthesis is the number of chickens

4) CHAL : Challenged with 10^{5.0}ELD₅₀ of Kyojeongwon

Table 3. Comparison of HI titers among SPF chicken groups at various time

Group	No. of Vaccination	Days at sampling					
		1	7	14	21	28	35
I-1	-	0 ± 0 ¹⁾ (0) ²⁾	0 ± 0 (0)	0 ± 0 (0)	0 ± 0 (0)	0 ± 0 (0)	0 ± 0 (0)
I-2	1	-	0.14 ± 0.48 (342.86)	4.60 ± 2.01 (43.70)	3.85 ± 1.98 (51.43)	4.55 ± 2.06 (45.27)	3.88 ± 1.02 (26.29)
I-3	2	-	-	-	6.15 ± 1.39 (22.60)	6.10 ± 1.37 (22.46)	5.10 ± 1.25 (24.51)
I-4	3	-	-	-	-	6.00 ± 1.21 (20.17)	5.32 ± 0.75 (14.10)

1) Mean of log₂ HI titer ± standard deviation

2) Parenthesis is coefficient of variation (%).

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

NDV항체를 측정하기 위해 상품화된 ELISA kit (FlockChek* NDV[®], IDEXX Laboratories, Inc., USA)를 구입하여 제조사가 권장하는 방법에 준하여 검사하였다. 방법을 요약하면 dilution buffer로 500배 희석된 혈청을 항원이 코팅된 ELISA plate에 100 µl 분주하여 실온에서 30분간 반응시킨후 증류수로 5회 세척하였다. 여기에 anti-chicken HRP conjugate(Peroxidase goat anti-chicken IgG) 100 µl를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 다시 5회 세척한 다음 100 µl의 tetramethylbenzidine(TMB)용액으로 10분간 발색시킨 뒤 stop solution으로 발색반응을 정지시켰다. ELISA reader(Molecular Devices Emax[®], USA.)로 650 nm에서 흡광도를 측정한 후 xChek[™] 프로그램(Version 2.20, IDEXX Laboratories, Inc., USA)을 이용하여 ELISA 역가를 계산하였다.

통계처리

본 실험의 자료는 T-test, 상관분석 및 회귀분석(SPSS 10.0, SPSS Inc., USA)을 사용하여 통계처리하였다.

결 과

SPF 계군의 H 항체 역가 변화

SPF 계군에서 NDV 백신접종에 대한 항체를 HI법으로 측정한 결과는 Table 3에 요약하였다. 백신 미접종 대조군에서는 전 실험기간 동안 NDV에 대한 항체는 검출되지 않았다. 백신 접종군에서는 14일령에 20수중 9수에서 2이상의 역가가 검출되었고 평균역가는 4.60이었으며, 실험종료시인 35일령까지 유지되는 추세를 나타냈다. 백신 2회와 3회 접종군은 21일령에 평균역가가 6.15를 나타내어 최고치에 도달한 후 감소되었고 두 계군의 평균역가의 변화는 큰 차이를 보이지 않았다.

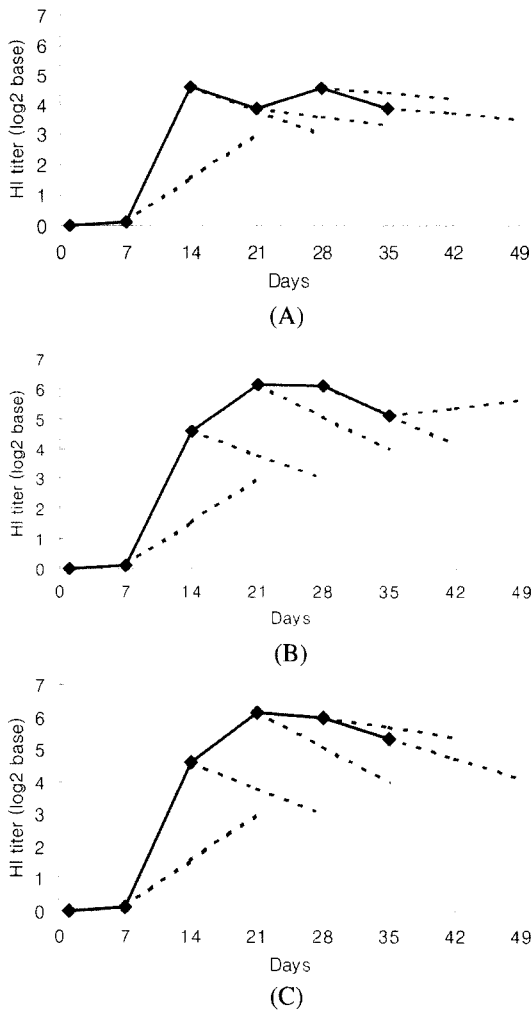


Fig. 1. Comparison of HI titers among SPF chicken groups between non-challenged (—◆—) and challenged(---). HI response was measured in all survived chickens after challenge with Kyojeongwon for groups vaccinated; once (A), twice (B), three times (C).

공격접종 후 생존한 개체에서 전반적으로 공격접종 당시보다 낮은 수준의 역가가 검출되었으며 결과는 Fig. 1과 같다. 공격접종 후 생존한 개체는 전반적으로 공격접종 당시보다 낮은 역가를 나타내었다.

SPF 계군의 ELISA 항체 역가 변화

SPF 계군에서 NDV 백신접종에 대한 항체를 ELISA 법으로 측정한 결과는 Table 4와 같다. 백신 미접종 대조군에서는 전 실험기간 동안 NDV에 대한 항체는 검출되지 않았다. 백신 접종군에서 7일령에 채혈한 20수 중 12수에서 표준음성혈청보다 높은 역가가 검출되었으나 모두 positive cut off value(ELISA titer 398 이상) 이하의 역가로 음성으로 나타났으며 14일령에는 20수 중 6수에서 ELISA양성의 결과를 나타내었다. 일령이 경과함에 따라 역가는 전반적으로 상승하여 28일 이후에는 3개 계군 모두 평균역가가 1000 이상이였다. 백신 1회 접종군은 28일령에 일부 개체에서 8000 이상의 높은 역가가 검출되면서 평균역가 1518을 나타내어 최고치에 도달한 후 역가가 서서히 감소되었다. 백신 2회 접종군은 28일령에 peak 역가에 도달한 후 유지되고 있으며 백신 3회 접종군은 역가가 계속 상승하였다.

공격접종후 생존한 개체는 Fig. 2에서와 같이 공격접종당시 보다 높은 역가를 나타내었다.

SPF계군의 공격접종에 대한 방어율

백신 횟수를 다르게 접종한 각각의 SPF계군에 교정원주를 공격접종하여 방어율을 측정한 결과 백신 무접종 대조군은 Table 5에서와 같이 공격접종후 모두 폐사하였다. 백신 접종군에서 혈청검사상 역가가 검출되지 않았던 7일령에도 공격감염에 대해 33.3%의 방어율을 나타내었다. 방어율은 14일령에 11.1%로 가장 낮았고 일령이 경과함에 따라 증가하여 28일령 이후에는 모두 80% 이상의 방어율을 나타내었다.

Table 4. Comparison of ELISA titers among SPF chicken groups at various time

Group	No. of Vaccination	Days at sampling					
		1	7	14	21	28	35
I-1	-	1 ± 0 ¹⁾ (0) ²⁾	2 ± 20 (0)	1 ± 0 (0)	1 ± 0 (0)	1 ± 0 (0)	1 ± 0 (0)
I-2	1	-	11 ± 64 (123.7)	107 ± 628 (145.6)	737 ± 1178 (97.4)	1,518 ± 4618 (145.1)	1,111 ± 729 (56.4)
I-3	2	-	-	-	865 ± 872 (76.1)	1,161 ± 822 (58.7)	1,181 ± 1,029 (67.0)
I-4	3	-	-	-	-	1,412 ± 1,395 (79.3)	1,600 ± 1,198 (62.6)

1) Geometric mean titer ± standard deviation
2) Parenthesis is coefficient of variation (%).

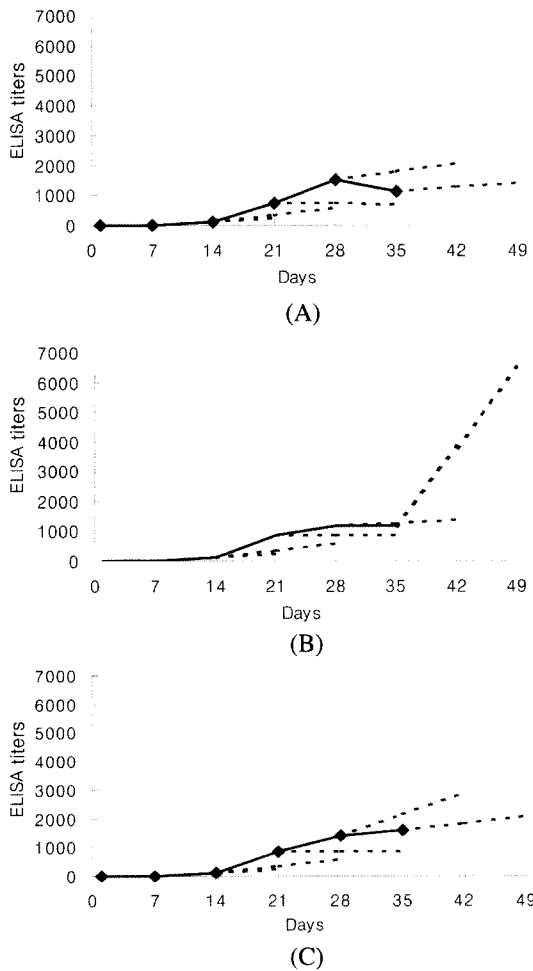


Fig. 2. Comparison of ELISA titers among SPF chicken groups between non-challenged (—◆—) and challenged(---). ELISA response was measured in all survived chickens after challenge with Kyojeongwon for groups vaccinated; once (A), twice (B), three times (C).

일반육계에서의 H 항체 역가 변화

일반육계 계군에서 NDV 백신접종에 대한 항체를 HI 법으로 측정된 결과는 Table 6과 같다. 4개 계군 모두 1일령의 모체이행 항체가 평균 7 이상으로 높게 검출되었고 계군과 계군간의 역가분포는 다소 차이가 있었으나 각계군내 개체별 역가는 CV 10% 수준으로 비교적 고른 분포를 나타내었다. 일령이 경과함에 따라 전반적으로 역가는 감소하고 있으나 백신 2회 접종군에서 14일령 이후 CV 40% 이내의 고른 분포를 나타내며 역가가 증가하였고 V4백신 1회 접종군의 28일령 혈청 20개 중 10개에서 21일령의 최고 역가인 5보다 높은 역가가 검출되었으며 CV도 33.7에서 66.6으로 증가하였다. 백신 3회 접종군은 일령이 경과함에 따라 역가가 감소하였지만 CV는 급격히 증가하여 출하시에는 94%의 수준을 나타내었다.

공격접종후 Fig. 3에서와 같이 전반적으로 역가는 상승하였는데 백신을 1회 접종한 2개 계군의 14일령 공격접종 개체에서는 역가가 감소하였다.

일반육계에서의 ELISA 항체 역가 변화

일반육계 계군에서 NDV 백신접종에 대한 항체를 ELISA법으로 측정된 결과는 Table 7과 같다. 4개 계군 모두 1일령의 모체항체가 높게 검출되었고 계군과 계군간의 역가분포는 다소 차이가 있었으며 각 계군내 개체별 역가는 고른 분포와 불균일한 분포가 다양하게 관찰되었다. 역가는 백신접종 횟수와 상관없이 일령이 경과함에 따라 급격히 감소하였고, 백신 2회 접종군의 28일령 혈청 20개중 1개에서 낮은 수준의 역가상승이 관찰되었다.

공격접종후 생존한 개체는 Fig. 4에서와 같이 VG/GA 주 1회 접종군의 14일령 공격접종 개체를 제외하고 모두 공격접종 당시보다 역가가 증가하였다.

Table 5. Comparison of survival rates among SPF chicken groups at various time

Group	Days at challenge				
	7	14	21	28	35
I-1	0/4 ¹⁾ (0) ²⁾	0/5 (0)	0/4 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
I-2	3/9 (33.3)	1/9 (11.1)	3/9 (33.3)	9/9 (100)	9/9 (100)
I-3	3/9 (33.3)	1/9 (11.1)	5/8 (62.5)	8/9 (88.9)	8/8 (100)
I-4	3/9 (33.3)	1/9 (11.1)	5/8 (62.5)	9/9 (100)	9/9 (100)

1) Number of chickens survived / number of chickens challenged
 2) Parenthesis is survival rate (%).

Table 6. Comparison of HI titers among broilers groups at various time

Group	Days at sampling			
	1	14	21	28
II-1	10.10 ± 0.85 ¹⁾ (8.42) ²⁾	6.25 ± 0.79 (12.64)	3.65 ± 1.23 (33.70)	4.70 ± 3.13 (66.60)
II-2	8.42 ± 0.77 (9.14)	6.10 ± 0.85 (13.93)	4.45 ± 1.15 (25.84)	2.30 ± 1.72 (74.78)
II-3	7.68 ± 0.95 (12.37)	3.45 ± 1.32 (38.26)	4.85 ± 1.90 (39.18)	5.53 ± 1.95 (35.26)
II-4	8.95 ± 1.32 (14.75)	4.84 ± 1.34 (27.69)	3.50 ± 2.01 (57.43)	2.45 ± 2.31 (94.29)

1) Mean of log₂ HI titer ± standard deviation.

2) Parenthesis is coefficient of variation (%).

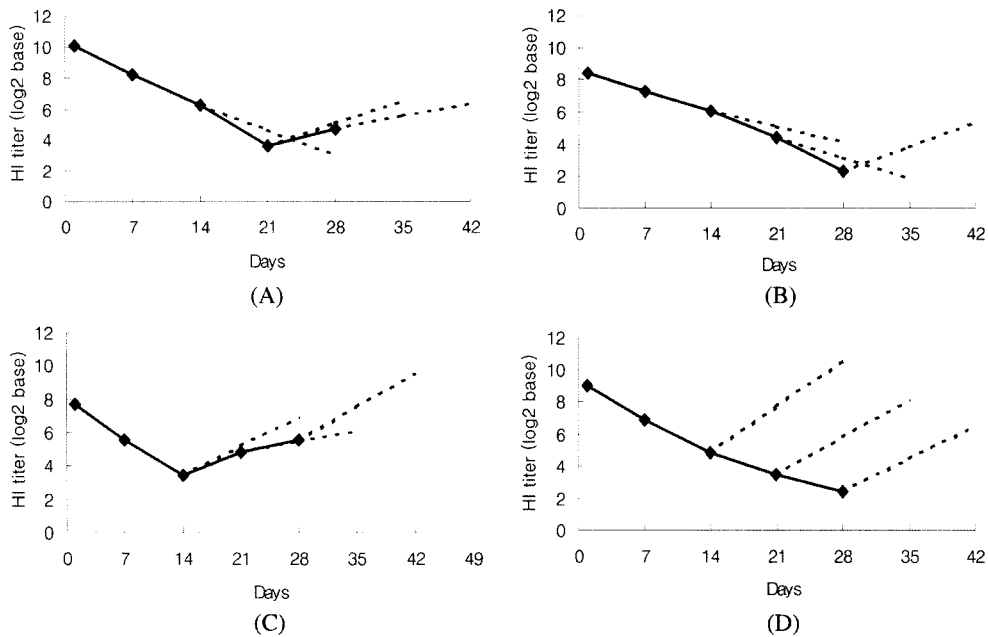


Fig. 3. Comparison of HI titers among broilers groups between non-challenged (—◆—) and challenged (---). HI response was measured in all survived chickens after challenge with Kyojeongwon for groups vaccinated; once with V4 strain (A), once with VG/GA strain (B), twice with VG/GA strain (C), three times with VG/GA strain (D).

Table 7. Comparison of ELISA titers among broilers groups at various time

Group	Days at sampling			
	1	14	21	28
II-1	15,981 ± 3,690 ¹⁾ (22.4) ²⁾	1,491 ± 2,013 (94.9)	113 ± 119 (69.0)	101 ± 199 (118.7)
II-2	10,268 ± 4,803 (41.7)	1,815 ± 2,014 (88.1)	157 ± 280 (110.8)	157 ± 280 (140.1)
II-3	9,691 ± 5,076 (46.6)	242 ± 449 (112.2)	54 ± 121 (110.5)	126 ± 360 (101.0)
II-4	11,308 ± 4,815 (38.1)	215 ± 528 (105.0)	17 ± 326 (260.7)	5 ± 212 (299.4)

1) Geometric mean titer ± standard deviation.

2) Parenthesis is coefficient of variation (%).

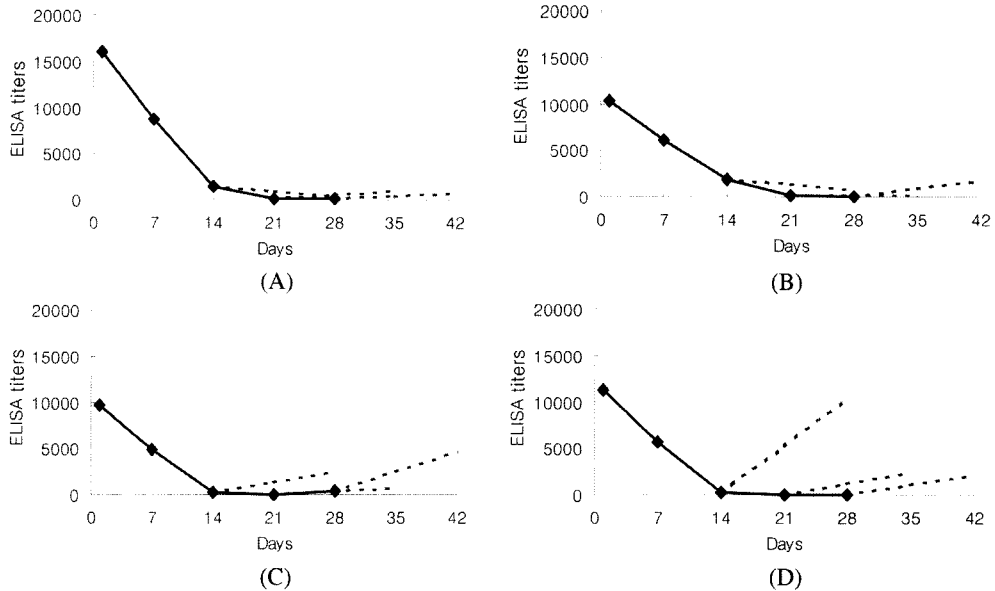


Fig. 4. Comparison of ELISA titers among broilers groups between non-challenged (—◆—) and challenged (---). ELISA response was measured in all survived chickens after challenge with Kyojeongwon for groups vaccinated; once with V4 strain (A), once with VG/GA strain (B), twice with VG/GA strain (C), three times with VG/GA strain (D).

일반육계에서의 공격시험에 대한 방어율

백신 횟수가 다른 4개 농장의 일반육계 계군에 교정 원주를 공격접종하여 방어율을 측정 한 결과 Table 8에서와 같이 백신 3회 접종군을 제외한 3개 계군은 매 시기별 공격접종에 대해 90% 이상의 방어율을 나타내었다. 백신 3회 접종군은 14일령에 25%의 방어율을 나타냈고 21일령 이후 80% 이상으로 증가하였다.

고 찰

본 시험은 국내 야외 계군의 NDV에 대한 혈중 항체 검출에 있어서의 ELISA의 유용성, 즉 생독백신 접종 후 ELISA 역가 추이 관찰 및 강독 NDV 감염에 방어할 수 있는 ELISA 역가 측정을 목적으로 실시되었다. 야외 상황과 유사한 조건하에서 실험하기 위해 백신의 종류, 접종시기, 횟수 등은 야외에서 널리 사용되는 방법에 준하여 실시하였으며 이 조건을 갖춘 육계 농장 4곳을 선정하고 주령별로 닭을 선정하여 실험에 사용하였다. SPF 계군의 실험도 병행하여 모체이행항체의 영향을 받지 않은 정확한 면역형성 정도를 측정하여 야외계군의 혈중항체 수준과 비교하였다.

뉴캐슬병의 대표적인 백신 주인 La Sota, B1 및 Ulster 주를 각각 점안 및 비강 또는 음수 및 비강으로 접종한 후 7일이 경과하면 HI와 ELISA검사로 혈중 항체 역가 변화가 나타나는 것으로 알려져 있다 [2, 7, 21]. 본 실

Table 8. Comparison on survival rate among broilers groups at various time

Group	Days at challenge		
	14	21	28
II-1	10/10 (100)	10/10 (100)	9/10 (90)
II-2	9/10 (90)	9/9 (100)	10/10 (100)
II-3	9/10 (90)	10/10 (100)	10/10 (100)
II-4	2/8 (25)	9/11 (81.8)	9/11 (81.8)

- 1) Number of chickens survived / number of chickens challenged.
- 2) Parenthesis is survival rate (%).

험에서 SPF계군에 VG/GA주 백신을 접종한 후 7일이 경과하였을 때 HI역가 변화를 관찰할 수 있었으나 ELISA 검사를 실시하였을 경우에는 접종 14일 후에 혈중항체 변화를 나타내어 이전의 연구결과와 일치하지 않았다.

Adair등 [2]은 Ulster 백신 접종 후 혈중 항체역가 변화를 측정하였는데 HI 검사 결과 백신 접종 11일 후부터 형성된 높은 역가가 53일령까지 큰 변화 없이 유지되었고, ELISA검사에서는 백신 접종 후 39일령까지 역가가 계속해서 증가하였다고 보고하였으며 이는 본 실

험의 결과와 일치하였다. Marquardt 등 [21]은 백신 접종 초기에 ELISA 검사에 비해 HI 검사에서 높은 역가를 형성하는 것은 감염 초기에 유도되는 IgM이 HI 검사에서 검출되기 때문인 것으로 추측하였다. 이전 연구결과 및 본 실험에서 측정된 바와 같이 HI 검사와 ELISA 검사의 낮은 상관관계(상관계수 : 0.55)는 사용된 바이러스의 항원성의 차이 때문인 것으로 추측된다. 즉, 실험에 사용한 ELISA kit 는 SPF 계군의 2차와 3차 백신 접종 시 사용한 바이러스와 같은 종류인 B1주를 제조되었으나 HI 검사는 La Sota주를 항원으로 사용하였으므로 각 검사에 사용된 바이러스의 항원성의 차이로 인해 역가의 차이를 나타내었을 가능성이 있다. 검출하는 항체의 종류가 다르기 때문인 것으로 추측된다. 즉, 바이러스의 각 단백질에 대한 항체의 생성 및 소멸시기에 차이가 있을 경우 즉 표면 단백질과 내부 단백질의 항체 형성시기가 다를 경우 바이러스 표면에 위치하고 있는 HN 단백질에 대한 항체만 검출하는 HI 검사에 비해 ELISA는 검출항체의 범위가 넓기 때문에 항체역가도 다르게 측정될 수 있으며 ELISA는 HI보다 항원자극에 민감하게 반응하는 것으로 추측된다 [25]. 위와 같은 이유로 백신의 추가적 접종에 따른 HI역가의 변화는 크지 않았으나 ELISA역가는 상승한 것으로 생각된다. 본 실험에서 백신 접종 후 경과시간 및 백신 접종 횟수에 따라 HI와 ELISA의 역가 추이가 다르게 측정된 것으로 볼 때 야외의 시료를 무작위 선택하여 검사할 경우 두 검사의 상관관계를 예측하기는 매우 어려울 것으로 판단된다 [21].

SPF 계군에 강독 NDV를 공격접종 한 후 생존한 개체의 혈중 역가 변화를 측정된 결과 HI는 공격접종 후 HI 역가는 감소한 반면 ELISA 역가는 증가하여 ELISA 검사는 HI 검사보다 강독 NDV에 대한 반응성이 우수한 것으로 나타났다. parainfluenza virus(PIV)가 분리되어 급성호흡기질환으로 확진된 환자의 감염초기 및 감염 10-27일 후에 채혈한 혈청 시료로 HI 와 ELISA를 이용하여 검사한 결과 HI 검사에서는 67%의 양성 검출율을 나타냈고, ELISA 검사에서는 90%의 양성 검출율을 나타내어 ELISA 검사는 HI 검사보다 급성호흡기질환의 진단에 적합한 검사법으로 알려져 있다 [11]. 이와 같이 ELISA 검사는 뉴캐슬병 진단에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상되나 본 SPF 계군 실험에서 강독 NDV 감염 후 생존한 닭의 수가 적었기 때문에 공격접종 후 HI와 ELISA의 역가 변화에 대해서는 반복실험이 요구된다.

SPF 계군의 면역수준을 측정하기 위해 공격접종을 실시한 결과 혈청검사서 역가수준이 음성이었던 7일령에도 33.3%의 방어율을 나타내는데 이는 IgA가 관여하는 국소면역에 의한 방어로 생각 된다 [9, 17]. Holmes [14]는 B1주를 비강 접종한 후 기관 분비액으로 바이러

스 중화시험을 한 결과 백신 접종 후 6일경에 가장 높은 중화항체역가를 형성하였다고 보고하였고, Daniele [9]은 국소적으로 분비된 IgA가 virion과 결합하여 점막 세포에 감염을 방지한다고 보고하였으며, Al-Garib 등 [7]은 La Sota주를 점안 및 비강 접종한 후 ELISA를 이용하여 기관 분비액의 IgA역가를 측정된 결과 접종 7일 후에 최고역가를 형성한 후 감소한다고 보고하였다.

SPF 계군에서 14일령에 가장 낮게 형성되었던 방어율이 일령이 경과함에 따라 증가하여 28일령 이후에는 3개 백신 접종군 모두 80% 이상의 방어율을 나타내었으므로 계군의 평균 ELISA 역가가 1000 이상일때 계군의 80% 이상이 강독 NDV의 감염에 방어할 수 있을 것으로 판단되었다. 공격감염에 대한 방어와 ELISA역가는 높은 상관관계를 나타내어 Adair 등 [2]과 Wilson 등 [35]의 결과와 일치하였다.

Allan 등 [8]은 NDV감염에 대한 방어와 HI 역가는 높은 상관관계가 있다고 보고하였으며 HI 역가 5 이상을 방어기준으로 제시하였다. 본 SPF 계군 실험에서 백신 1회 접종군의 HI 역가는 14일령에 평균역가 4.60으로 최고치를 형성한 반면 이 시기의 공격접종 방어율은 11.1%로 가장 낮았고, 14일령보다 더 낮은 역가인 3.88을 형성한 35일령의 방어율은 100%였으며, 백신 2회 접종군의 28일령과 35일령의 평균 HI역가는 감염방어 역가인 5 이상이었지만 방어율이 80% 수준으로 나타나 본 실험에서는 강독 NDV의 감염에 방어할 수 있는 HI 역가의 측정은 불가능하였다. HN보다 F 단백질에 대한 항체가 바이러스 중화작용이 더 크며 [22], HN 단백질에 대한 항체는 4개의 unit이 함께 작용하여야 완전한 중화를 나타내므로 [15], HI 역가와 공격 감염에 대한 방어율에 다소 차이가 있는 점은 이때문인 것으로 추측된다.

일반육계 계군의 NDV에 대한 항체가 측정을 위해 HI 검사와 ELISA검사를 실시한 결과 두 검사 모두 1일령의 모체이행항체가 높게 검출되었고 4개 계군 모두 14일령에는 역가가 급격히 감소하여 1일령 분무백신은 혈중 항체 역가를 높이지 않는 것으로 판단되었다. Giambrone 등 [12]과 Samberg 등 [31] 모체항체가 존재하는 어린 병아리에 ND 생독 백신을 분무 접종 한 후 HI 항체역가를 측정된 실험에서 접종 전보다는 낮은 수준이지만, 대조군 보다는 높은 역가가 검출됨을 확인하였다. 본 실험에서는 백신을 접종하지 않은 야외계군 실험은 병행하지 않았으므로 이 점에 대한 확인은 불가능 하였다. 모체이행항체가 소실되지 않은 병아리에 생독백신을 접종할 경우 모체 이행항체는 백신 바이러스의 증식을 저해하므로 백신에 의해 형성된 면역수준을 예측하기는 힘들며 [8], Russel 등 [29]은 어린 병아리에 B1주를 점안 접종하였을 때 인분비액내로 이동한 모체 IgG가 바

이러스 증식을 부분적으로 저해하였다고 보고하였다.

일반육계 계군실험에서 백신 2회 접종군의 역가변화를 HI검사로 측정된 결과 21일령 이후 변이계수(CV)가 40% 이내의 균일한 분포를 유지하면서 역가가 상승하였고 ELISA검사 결과 28일령에 낮은 수준의 역가의 상승이 관찰되었는데 이는 12일령에 접종한 VG/GA백신에 의해 형성된 역가로 판단된다. 이계군은 네 계군 중 모체항체가 가장 낮았던 계군으로 혈중 역가가 빨리 저하되어 모체이행항체에 의한 간섭현상을 최소화하여 충분한 백신효과를 유도할 수 있었던 것으로 추측된다. 반면 백신 3회 접종군에서는 일령경과에 따라 평균역가가 감소하였으며 CV가 급격히 증가하였다. 이 농장의 경우 육계 120,000수를 6개 동에 나누어 사육하고 있었는데 이는 백신 2회 접종농장의 25,000수 5개동 규모에 비해 1개 동에 수용된 계군수가 4배 정도 많은 수이기 때문에 넓은 평사에서 사육중인 대규모 계군에 백신의 분무접종이 고르게 되지 않아 계군 내 역가 분포범위가 넓어진 것으로 생각된다. V4백신 1회 접종군에서 28일령에 역가가 급격히 증가하였고, 역가 CV도 33.7%에서 66.6%로 증가하여 야외감염에 의한 역가상승으로 생각되었으나 계군 내 ND에 대한 임상증상은 관찰되지 않았다.

일반 육계 계군의 면역상태 측정을 위해 공격시험을 실시한 결과 4개 계군의 평균 HI 역가가 방어수준인 5 이하이며 ELISA역가 역시 본 SPF계군 실험에서 80% 방어 역가로 측정된 1000 수준 이하로 저하된 21일령 이후에도 4개 계군 모두 공격 접종에 80% 이상 생존하여, 생독백신 접종 후 공격 감염에 대한 방어에는 혈중 항체 이외의 다른 방어기전 즉, 국소성 점막 면역이 관여하는 것을 확인할 수 있었다 [14, 17]. 그러나 SPF계군 실험에서 백신 접종 7일후 국소면역에 의한 방어율이 33.3% 수준이었고, 국소면역에 관여하는 IgA의 기관 및 담즙내 농도가 7일령에 최고치를 형성하는 [7] 것을 고려해 볼 때 일반육계 실험에서 1일령에 백신 1회만 접종한 2개 계군의 혈중역가가 방어수준 이하로 감소하였던 21일령 이후의 방어율이 80% 이상으로 나타난 것은 잘못된 결과로 생각된다. 1일령과 15일령에 각각 비병원성 호흡기 친화성 ND 생독백신을 분무 접종한 계군의 평균 ND HI 역가 수준이 15~35일령 사이에 2~3 수준으로 유지된다는 이전 연구결과를 감안할 때 [1] 본 실험에서 백신 1회 접종한 2개 계군의 혈청역가와 방어율은 야외감염에 의한 면역 획득에 의한 것으로 생각된다. 그 외 장기간에 걸친 농장 실험으로 인한 공격 바이러스의 독력저하 등의 원인을 생각해 볼 수 있으나 이에 대한 확인은 불가능하였다.

일반육계 계군에서 공격접종 후 생존한 개체의 HI 역

가는 전반적으로 감소하였으나, ELISA 역가는 모두 증가하여 ELISA가 HI보다 강독 NDV의 감염에 대한 반응성이 우수한 것으로 나타났다. 강독 NDV 감염 후 생존한 개체의 ELISA 역가는 최소 1000 이상이었으며 실험에 사용한 VG/GA와 V4주인 장친화성 비병원성주 백신에 의한 ELISA 역가는 매우 낮은 수준이거나 혹은 검출되지 않았기 때문에 이는 야외감염에 대한 진단으로서 가치가 있을 것으로 생각되나 B1, LaSota 같은 호흡기 친화성 약독 백신주에 의해 ELISA 역가가 상승할 가능성이 있으므로 이에 대한 보강 실험이 필요하다고 판단된다.

이상의 결과로 볼 때 ELISA를 이용하여 강독 NDV의 감염에 방어할 수 있는 혈중항체 측정이 가능하였으며, 육계에서 장친화성 비병원성주 백신에 의한 ELISA 역가 변화는 낮은 수준이었으나 강독 NDV에 대한 반응성이 우수하여 야외감염 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되며 실험에 사용된 장친화성 비병원성주 백신 이외에 호흡기 친화성 약독주 백신을 접종한 계군의 ELISA 역가 변화에 대한 집중적인 연구가 필요하다고 판단된다.

결 론

NDV에 대한 혈중항체 측정에 있어서 ELISA의 유용성을 알아보고 강독 NDV의 감염에 방어할 수 있는 ELISA 역가를 측정하기 위해 일반 육계 계군과 SPF 계군에 생독백신을 접종한 후 강독 NDV 공격시험, HI검사와 ELISA를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 비병원성주 백신 접종후 14일후부터 ELISA에 의한 양성개체 판별이 가능하였다. SPF 계군 실험에서 ELISA를 이용하여 NDV 감염에 대한 방어역가 측정이 가능하였으며 강독 NDV의 감염에 80% 이상 방어할 수 있는 계군의 ELISA역가는 평균 역가 1000 이상인 것으로 나타났다. 일반육계 계군에서 장친화성 비병원성주 백신 접종후 ELISA로 검사하였던바 역가 변화는 매우 낮은 수준이거나 혹은 변화가 관찰되지 않았다. SPF계군에서 강독 NDV의 감염후 생존한 개체는 HI 역가는 감소한 반면 ELISA역가는 증가하여 ELISA가 HI 보다 강독 NDV에 대한 반응성이 우수한 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 송창선, 이윤정, 한명국, 성환우, 강경수, 이종복, 김재학 등. 최근 야외농장에서 실시하고 있는 뉴캐슬병 생독백신 접종효능에 대한 평가. 대한수의학회지. 2000, 40(3), 563-573.
2. Adair BM, McNulty, MS, Todd D, Connor TJ,

- Burns K.** Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA. *Avian Pathol.* 1989, **18**, 175-192.
3. **Alexander DJ, Collins MS.** The structural polypeptides of avian paramyxoviruses. *Arch. Virol.* 1981, **67**, 309-323.
 4. **Alexander DJ.** Newcastle disease in countries of the European Union. *Avian Pathol.* 1995, **24**, 3-10.
 5. **Alexander DJ.** Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In Calnek BW, with John Barnes H, Beard CW, McDougald LR, Saif YM. (eds.), *Disease of poultry.* 1997, 10th ed, Iowa state University Press. Ames. IA. pp. 541-569.
 6. **Alexander DJ.** Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*)-a review. *Avian Pathol.* 2000, **29**, 95-100.
 7. **Al-Garib SO, Gielkens ALJ, Gruys E, Hartog L, Koch G.** Immunoglobulin class distribution of systemic and mucosal antibody response to Newcastle disease in chickens. *Avian Dis.* 2003, **47**, 32-40.
 8. **Allan WH, Lancaste JE, Toth B.** Newcastle disease vaccines-their production and use. *Animal Production and Health Series No. 10.* 1978 FAO, Rome, Italy.
 9. **Daniele RP.** Immunoglobulin secretion in the airway. *Ann. Rev. Physiol.* 1990, **52**, 177-195.
 10. **De Leeuw O, Peeters B.** Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: Evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.* 1999, **80**, 131-136.
 11. **Fedova D, Novotny J, Kubinova I.** Serological diagnosis of parainfluenza virus infections: Verification of the sensitivity and specificity of the hemagglutination-inhibition (HI), complement-fixation (CF), immunofluorescence (IFA) test and enzyme immunoassay (ELISA). *Acta virol.* 1992, **36**, 304-312.
 12. **Giambrone JJ.** Laboratory evaluation of Newcastle disease vaccination programs for broiler chickens. *Avian Dis.* 1985, **29**, 479-487.
 13. **Holmes HC.** 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**, 11-19.
 14. **Holmes HC.** Virus neutralizing antibody in sera and secretion of the upper and lower respiratory tract of the chicken inoculated with live and inactivated Newcastle disease. *J. Comp. Pathol.* 1979, **89**, 21-29.
 15. **Iorio R, Bratt M.** Neutralization of Newcastle disease virus by monoclonal antibodies to the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein: requirement for antibodies to four sites for complete neutralization. *J. Virol.* 1984, **51**, 445-451.
 16. **Iorio RM, Borgman JB, Glickman RL, Bratt M.** Genetic variation within a neutralizing domain on the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 1986, **67**, 1393-1403.
 17. **Jayawardane GW, Spradbrow PB.** Mucosal immunity in chickens vaccinated with the V4 strain of Newcastle disease virus. *Vet Microbiol.* 1995, **46**, 69-77.
 18. **Kant A, Koch G, Van Roozelaar DJ, Balk F, Ter Huurne A.** Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 1997, **26**, 837-849.
 19. **Korani T, Odagiri Y, Nakamura J, Horlugh T.** Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with lentogenic NDV. *Avian Dis.* 1987, **31**, 491-497.
 20. **Marino OC, Hanson RP.** Cellular and humoral response of in ovo-bursectomized chickens to experimental challenge with velogenic Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 1987, **31**, 293-301.
 21. **Marquardt WW, Snyder DB, Savage PK, Kadavil SK, Uancey FS.** Antibody response to Newcastle disease virus given by two different routes as measured by ELISA and Hemagglutination-Inhibition test and associated tracheal immunity. *Avian Dis.* 1985, **29**, 71-79.
 22. **Meulemans G, Gonze M, Carlier MC, Petit P, Burny A, Le Long L.** Protective effect of HN and F glycoprotein-specific monoclonal antibodies on experimental Newcastle disease. *Avian Pathol.* 1986, **15**, 761-768.
 23. **Miers LA, Bankowski RA, Zee YC.** Optimizing the enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunity of chickens to Newcastle disease. *Avian Dis.* 1983, **27**, 1112-1125.
 24. **Parry SH, Aitken ID.** Local immunity in the respiratory tract of the chicken, II The secretory immune response to Newcastle disease virus and the role of IgA. *Vet. Microbiol.* 1977, **2**, 143-165.
 25. **Pipkin PA, Afzal MA, Heath AB, Linor PD.** Assay of humoral immunity to mumps virus. *J. Virol. Methods.* 1999, **79**, 219-225.
 26. **Reed LJ, Muench H.** A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938, **27**, 493-497.

27. **Reynolds DL, Maraqa AD.** Protective immunity against Newcastle disease virus: The role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. *Avian Dis.* 2000, **44**, 138-144.
28. **Reynolds DL, Maraqa AD.** Protective immunity against Newcastle disease virus: The role of cell-mediated immunity. *Avian Dis.* 2000, **44**, 145-154.
29. **Russell PH, Dwivedi PN, Davison TF.** The effect of cyclosporin A and cyclophosphamide on the populations of B and T cells and virus in the Harderian of chickens vaccinated with the Hitcher B1 strain of Newcastle disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997, **60**, 171-185.
30. **Russell PH.** 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. **Samberg Y, Hornstein K, Cuperstein E, Rivka G.** Spray vaccination of chickens with an experimental vaccine against Newcastle disease. *Avian Pathol.* 1977, **6**, 251-258.
32. **Steward M, Vipond IB, Millar NS, Emmerson PT.** RNA editing in Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 1993, **76**, 2519-2527.
33. **Stone-Hulslander J, Morrison TG.** Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells. *J. Virol.* 1997, **71**, 6287-6295.
34. **Timms L, Alexander DJ.** Cell-mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines. *Avian Pathol.* 1977, **6**, 51-59.
35. **Wilson RA, Charles PJ, Betsy F, Robert JE.** An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens. *Avian Dis.* 1984, **28**, 1079-1085.