

## 약병원성 조류인플루엔자 사독백신개발을 위한 후보주(ADL0401)의 면역 원성 및 안전성 평가

이진성 · 하대희 · 김정은 · 하봉도 · 모인필<sup>†</sup>

충북대학교 수의과대학

### Evaluation on Immunogenicity and Safety of Avian Influenza Isolate(ADL0401) as a Candidate for the Killed Vaccine against Low-Pathogenic Avian Influenza

J. S. Lee, D. H. Ha, J. E. Kim, B. D. Ha and I. P. Mo<sup>†</sup>

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, San 48 Gaeshin-Dong, Heungduk-Gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, South Korea

**ABSTRACT** Avian influenza (AI) virus (AIV) is distributed worldwide and it has been isolated from various species of wild and domestic birds. AI transfers with high speed and shows diverse pathogenicity syndroms. In Korea, several low pathogenic AIV, H9N2, have been isolated from the commercial farms with severe decrease of egg production and mortality resulted in severe economic loss since 1996. Therefore, it has been requested to develop AI vaccines to prevent clinical signs and economic losses from the field infection of AIV. To develop a killed vaccine that efficiently prevents low pathogenic AIV (H9N2), evaluation on the pathogenicity and selection of an inactivator for H9N2 is taking place and is being tested safety and immunogenicity of vaccine produced. Based on the pathogenicity test and viral reisolation test, the ADL0401 isolate is the characteristic low pathogenic AIVs and has fairly similar biologic functions compared with MS96 which is the official low pathogenic AIV (H9N2) and one of the predominant AIV isolated from poultry farms in Korea. In antigenicity tests, the ADL0401 and MS96 virus have no significant antigenic difference. In inactivation tests, the ADL0401 isolates can be easily inactivated with 0.1% Formalin at 37°C within 1 hour with a little decrease of HA titer. The vaccine developed in the present report has no harmful effect on bird and forms good immune capability. Therefore, the isolates, ADL0401 can be used for a killed vaccine which can reduce the clinical signs and viral shedding in the birds infected with H9N2 low pathogenic AIVs.

(Key words: low pathogenic avian influenza, pathogenicity, antigenicity, killed vaccine, immunogenicity, safety)

### 서 론

조류인플루엔자(Avian influenza : AI)는 Orthomyxoviridae 과(科, family), A형 Influenza virus 속(屬, genus)으로(Easterday et al., 1997) 국제수역사무국(Office International des Epizooties : OIE)에서 List A 질병으로 분류(Woolcock et al., 2001)되며, 국내에서는 고병원성 조류인플루엔자(Highly pathogenic avian influenza : HPAI)의 경우엔 제1종 법정전염병으로 규정하고 있다. 조류인플루엔자 바이러스(Avian influenza virus : AIV)는 negative sense RNA 바이러스로서 다른 RNA 바이러스와

는 달리 서로 다른 8개의 RNA 분절로 구성되어 있으며(Krug and Lamb, 2001), 이들은 hemagglutinin(HA)과 neuraminidase (NA)의 표면항원 유전자와 PB2 polymerase, PB1 polymerase, PA polymerase, nucleoprotein, nonstructural protein, M protein 등의 내부유전자로 나누어진다(Lamb, 1990). 병원성은 주로 HA 유전자와 관련이 있으며 HA 단백질 분절 부위에 최소한 B-X-B-R(B=아르기닌 또는 라이신 등 염기성 아미노산, X=비염기성 아미노산, R=아르기닌)의 염기 서열 구조로 이루어졌을 때 HPAI로 분류된다(Horimoto et al., 1994; Kawaoka and Webster, 1988; Vey et al., 1992). 모든 인플루엔자 바이러

본 연구는 농림부 농림기술관리센터( 첨단기술분야, 과제번호 : 203110-3 )의 지원으로 시행되었습니다.

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed : moip@chungbuk.ac.kr

스는 핵산단백질과 구조단백질을 한천내 침강반응(Agar gel precipitation : AGP)을 통하여 분석함으로써 여러 종류의 바이러스로 구분할 수 있다. 이와 같은 분석을 통하여 인플루엔자 바이러스는 A형, B형, C형 세 종류로 구별할 수 있다 (Kilbourne, 1975; Palese and Young, 1982). 그 중 B형과 C형은 사람에게 감염되고, A형 바이러스는 사람을 비롯하여 닭, 칠면조, 야생오리, 돼지, 말, 링크, 물개 등 다양한 종류의 척추동물에 감염된다(Cadman et al., 1994; Panigraphy et al., 1995).

A형 AIV에는 다양한 아형이 있는데, 바이러스 표면에 존재하는 HA의 특성에 따라 H1부터 H15까지 15종이 있으며, NA라는 특수효소의 특성에 따라 N1부터 N9까지 9종의 아형으로 구분된다(Easterday et al., 1997). 따라서 H형과 N형을 조합하면 A형 인플루엔자 바이러스는 이론적으로 총 135종의 아형이 존재하게 된다. AIV의 가장 큰 특징 중의 하나는 8개의 RNA 분절로 인하여 복제과정에서 쉽게 변이가 일어난다는 점이다. 서로 다른 두 아형의 AIV가 동일개체에 동시에 감염되면 두 AIV의 RNA 분절 간에 유전자 재편성이 가능하며, 이로 인하여 두 바이러스 간에 유전자의 교환이 일어나 대변이에 의해 전혀 새로운 바이러스의 출현을 초래할 수 있다(Liu et al., 2003).

AIV에 감염되면 임상증상이 없는 불현성 감염과 산란율 감소 및 약한 호흡기 증상에서부터 전신 감염까지 다양한 임상증상을 수반한다(Alexander and Gough, 1986; Suarez and Senne, 2000; Skeels et al., 1981). 전신감염은 HPAI 바이러스가 닭이나 가금류에 감염되면 여러 장기에서 증식하여 심한 임상증상을 동반한 전신감염과 함께 높은 폐사율을 야기한다. 그러나 오리나 대부분의 야생조류에는 질병을 일으키지 않으며 폐사도 나타나지 않는다(Parsons et al., 1986; Cooley et al., 1989; Shortridge et al., 1998). 불현성 감염과 산란율 감소 및 약한 호흡기 증상의 형태는 주로 약병원성 조류인플루엔자(Low-pathogenic avian influenza : LPAI) 바이러스 감염시 관찰할 수 있다. LPAI의 폐사율은 5% 미만으로 낮은 편이지만 2차로 주위 사육환경이나 세균감염 등 숙주의 상태에 따라 폐사율이 50% 이상 될 수도 있다.

HPAI 바이러스와 LPAI 바이러스간의 중요한 생물학적 차이점은 바이러스 외막의 HA를 HAI과 HA2 부분으로 분절하는데 있어서 효소의 필요성 여부이다(Barr, 1991; Stieneke-Grober et al., 1992; Walker et al., 1992). HA 분절은 AIV가 감염되기 위해서는 반드시 거쳐야 되는 단계이다. HPAI 바이러스는 생체내의 대부분 세포에서 발견되는 단백질 분해효소에 의하여 분절될 수 있는데 반하여 LPAI 바이러스는 호흡기나

소화기의 상피세포에서만 발견되는 트립신과 같은 단백질 분해효소로만 분절되기 때문에 매우 제한적일 수 밖에 없다.

국내에서는 1996년 3월 경기도 화성 등 3개 지역 5개 농장에서 처음 발생되었으며 모두 약병원성 바이러스(A/Chicken/Anyang/MS96;H9N2)로 확인되었다(Lee et al., 2000). 현재는 전국의 산란계 농장으로 확산되어 산란율저하와 다양한 폐사를 동반함으로서 양계산업에 막대한 손실을 초래하고 있다. 또한 2001년 중국산 수입육으로부터 HPAI(A/Duck/Anyang/AVL-1/01;H5N1) 바이러스가 분리된 바 있으며(Tumpey et al., 2003), 2003년 12월에는 HPAI(H5N1)가 충북 음성을 시작으로 해서 전국적으로 발생하여 큰 피해를 준 바 있다. 현재 국내에 유행하고 있는 LPAI 바이러스는 1996년과 동일한 혈청형의 AIV(H9N2)로 확인되고 있다(성환우, 2003).

국내 바이러스와 혈청형이 같은 바이러스(H9N2)가 5~6년 전부터 이란 등 중동국가에서 폭발적으로 발생되어 종계에서 육계에 이르기까지 막대한 경제적 손실을 주고 있으며 육계의 경우 약 65%의 폐사율을 기록하기도 하였다(Nili and Asasi, 2003; Bano et al., 2003). 국내에서의 H9N2형 AI에 대한 방제는 매우 시급한 설정이지만 생독백신을 접종하였을 경우 바이러스의 변이 가능성, 사독백신의 낮은 효능성 및 수평전파 차단이 되지 않는 등의 단점으로 인하여 국내 양계산업에서는 백신접종이 적극적으로 추진되지 못하고 있다. 그러나, 중동에서의 상업용 H9N2형 AI 백신의 성공적인 접종사례(Marandi et al., 1999)와 현재 국내에서의 급격한 발생 증가를 고려할 때 이제는 백신접종을 적극적으로 검토할 때이고, 세계적으로도 사독백신의 효능이 점차 인정되고 있으며 (David et al., 2001; Xie and Stone, 1990; Marandi et al., 1999) 같은 혈청형일 경우 방어력도 매우 높은 수준으로 가능하기 때문에 사독백신의 개발이 요구되고 있다. 국가방역 측면에서 고려하면 바이러스의 변이 가능성이 높은 생독백신보다는 사독백신을 우선적으로 개발하여야 하고 혈청형이 같아도 방어효과가 다를 수 있는 AIV의 특성상 가능하면 국내분리 바이러스를 백신주로 선택하여야 한다.

본 연구에서는 LPAI로 인한 경제적 손실을 효과적으로 방제할 수 있는 사독백신을 개발하기 위해 LPAI 국내 표준주인 MS96 virus (A/chicken/ Anyang/ MS96; H9N2)와 비교하여 백신후보주로서의 국내분리주인 ADL0401 virus(A/chicken/Cheongju/ADL0401;H9N2)의 생물학적 특성, 면역원성 및 안전성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

## 1. 바이러스 및 실험동물

LPAI의 특성을 가지고 있는 표준주로서 A/Chicken/Anyang/MS96 (H9N2) virus를 국립수의과학검역원(NVRQS, Anyang, Korea)으로부터 분양받았으며, 백신후보주로 야외분변시료로부터 분리한 A/Chicken/Cheongju/ADL0401 (H9N2) virus를 공시하였다.

실험동물로는 병원성 실험으로 4주령 specific pathogenic free(SPF) 닭 63수와, 안전성 및 면역원성 실험으로 6주령 인플루엔자 음성 닭 75수를 Isolator 계사 온도 20~25°C를 유지하며, 사료와 물을 충분히 공급하여 관찰하였다.

## 2. 혈청검사

### 1) 혈구응집시험법(Hemagglutination Test : HA Test)

U-자형 96 well microplate 전체에 PBS 50 µL를 분주하였다. A~G의 첫 번째 well에 항원시료를 50 µL씩 분주하고, H well에는 음성 대조군을 두어 각각 2진단계 희석하였다. 1% 닭 적혈구 부유액을 전 well에 50 µL 분주하여 30초간 잘 흔들어준 다음 실온에서 40분간 정치시킨 후 45° 정도 세워 흘러내리지 않는 최대희석배수를 End Point로 판독하였다.

### 2) 혈구응집억제시험법(Hemagglutination Inhibition Test : HI test)

U-자형 96 well microplate 전체에 PBS 25 µL를 분주하였다. A~F의 첫 번째 well에 혈청시료를 25 µL 넣어 분주하고, G well에는 음성 혈청을, H well에는 양성 혈청을 넣고 각각 2진 단계 희석하였다. 4HA Unit로 조정된 항원 동량을 각 well에 넣고 실온에서 30분간 감작시켰다. 1% 닭 적혈구 부유액을 25 µL 분주하여 실온에서 40분간 정치시킨 후 45° 정도 세워 흘러내리는 최대희석배수를 End Point로 판독하였다.

## 3. RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

바이러스 RNA는 Viral Gene-Spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit(iNtRON biotechnology, Korea)의 지침에 따라 추출하였으며 추출한 바이러스 RNA는 I-AIV(H9) Detection Kit (iNtRON biotechnology, Korea)로 RT-PCR을 진행하였다. 방법으로는 enzyme mix 8 µL에 RNA template 2 µL를 첨가하여 진단용액을 넣은 후 최종 반응액을 20 µL로 조정한 후 잘 섞어주고 Reverse transcription(45°C/30min), Pre-PCR(94°C/5min), PCR(denaturation 94°C/30sec, annealing 50°C/30sec, extension

72°C/40sec, 40cycles) 그리고 post-PCR(72°C/5min)을 핵산증폭기(ThermoHybaid PCR machine)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1.2% agarose gel(Invitrogen, USA) 상에서 전기영동한 뒤 5X loading dye로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 H9 유전자 크기는 1 kb plus DNA Ladder(Invitrogen, USA)를 같이 전기영동함으로써 확인하였다.

## 4. 바이러스 분리

농장 및 야외에서 채취한 분변을 멸균 면봉을 이용하여 최대한 여러 부분에서 취한 후 15mL conical tube에 옮겨 분변의 무게를 측정하였다. 여기에 항생제가 첨가된 Phosphate Buffered Saline(PBS), pH 7.2을 분변량의 2배 정도 넣고 섞어주었다. 항생제는 Streptomycin, Penicillin G, Kanamycin(SPK)을 첨가하였고, 각각 S(2mg/mL), P(2000IU/mL), K(0.25mg/mL)의 농도를 사용하였다.

조직시료의 경우에는 무게 측정 후 멸균된 막자유발에 넣고, 소량의 silica sand를 넣고 갈아준 다음 시료의 1.5배에 해당하는 항생제 첨가 PBS를 넣어주고 완전히 갈아서 시험판에 옮겨주었다. 항생제의 농도는 SPK를 각각 S(0.2mg/mL), P(200IU/mL), K(0.025mg/mL)로 사용하였다.

전 처리된 시료들을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취해 11일령의 SPF부화란의 요막강 내에 0.2mL를 접종하여 4일간 배양시켰다. 이후 냉장 과정을 거쳐 요막강액(Allantoic cavity fluid : ACF)을 채취하여 HA, HI test 및 RT-PCR을 실시하였다.

## 5. 바이러스 생물학적 특성조사

### 1) 바이러스의 확인

분리된 바이러스를 국립수의과학검역원에 의뢰하여 HI test 및 NI assay를 실시하여 혈청형을 동정하였으며, HA 단백질 분절부위의 염기서열을 분석하였다.

### 2) 병원성 조사

국내 분리 표준주인 MS96과 백신 후보주인 ADL0401을 충북대학교 수의과대학에 설치되어 있는 차폐장치인 양암 Isolator(Three shine, Keumsan, Korea)에서 4주령 SPF 닭에 MS96 바이러스는  $10^{8.7}$  EID<sub>50</sub>/mL, ADL0401 바이러스는  $10^{7.7}$  EID<sub>50</sub>/mL을 기관을 통하여 0.1mL씩 접종하여 10일간 임상증상, 폐사율 관찰 및 바이러스 재분리를 실시하였고, 각각 대조군을 두어 비교시험하였다. 임상증상, 폐사율 시험은 OIE 규정에 따라 그룹별 8마리씩 별도로 수행하였으며, 재분리

**Table 1.** Experimental design for pathogenicity test of ADL0401 AIV in SPF chicken

Viruses	Number of birds for viral reisolation					Number of birds for mortality test
	2DPI <sup>1</sup>	4DPI	6DPI	8DPI	10DPI	
ADL0401	3	3	3	3	3	8 <sup>2</sup>
MS96	3	3	3	3	3	8
Control	3	- <sup>3</sup>	3	-	3	8

<sup>1</sup> Days post inoculation (DPI).

<sup>2</sup> These birds were placed at separate isolator and were determined for mortality and clinical signs after challenged either ADL0401 or MS96.

<sup>3</sup> Not tested.

을 조사는 접종군별로 15마리씩 사육하며 2일 간격으로 3마리씩 공시하였다(Table 1). 채취장기로는 LPAI의 표적장기인 기관, 총배설강, 신장에서 분리를 시도하였고, 기관과 총배설강에서는 면봉채취를 병행하였다. 재분리 여부는 각 장기별로 항생제 처리된 유제 상충액을 인플루엔자 음성 일반 산란종란에 3개씩 접종하여 4일간 바이러스를 증식시킨 후 요막강액을 실험재료로 하여 HA 검사로 혈구응집여부를 확인한 후, 응집을 보인 시료에 대하여 각각의 virus 항혈청을 이용하여 HI 검사로서 바이러스 존재를 확인하였다. 또한 별도 채취된 장기의 유제 상충액으로 RT-PCR을 시행하여 바이러스 분리능과 비교하였다.

### 3) 항원성 조사

각 바이러스의 항혈청에 대한 이종항원 중화능을 확인하기 위하여 임상증상 판찰을 마친 SPF 닭에서 14DPI에 개체별 항혈청을 취한 후, 바이러스 접종군별 항혈청을 혼합하여 MS96접종군 HI titer 64, ADL0401접종군 HI titer 32를 준비하였다. 각각의 항혈청과 4HA<sup>1</sup> unit MS96, ADL0401 virus를 Cross-Hemagglutination inhibition Reaction 하여 동종항원과 이종항원에 대한 중화능을 비교하여 백신후보주로의 ADL0401의 항원성을 평가하고자 하였다. 두 바이러스간의 항원성의 차이를 검증하기 위한  $r$ 값은 두 종류의 항원과 항혈청을 혈청학적으로 서로 교차 반응하였을 때 항원성의 차이 범위를 단일 숫자로 나타내어주는 개념이다(Archetti and Horsfall, 1950).  $r$ 값이 1보다 적은 것은 동종항원보다 이종항원을 낮게 중화하는 경우이며 그 수치가 낮아질수록 이종항원에 대한 중화능이 낮은 경우가 된다. 1보다 큰 경우에는 그 반대 즉, 동종항원보다 이종항원을 높게 중화할 때 나타나게 된

다.  $r$ 값이 0.5일 경우 동종항원보다 이종항원을 4배 낮게 중화하는 경우이고, 동종항원보다 이종항원을 4배 높게 중화할 경우에는  $r$ 값이 2.0 정도가 된다.

## 6. 백신개발

### 1) 불활화제 선정

사독백신 제조에 사용될 효과적인 불활화제를 선정하기 위하여 0.01M BEI (Binary ethylenimine)와 0.1% formalin을 서로 다른 온도 조건(37°C, 4°C)에서 불활화 효과를 비교 실험하였다.

#### (1) BEI에 의한 불활화

2-bromoethylamine hydrobromide(Sigma, USA)를 미리 37°C로 가온한 0.2N NaOH 용액에 0.1M의 농도가 되도록 용해한 후 37°C 수조에서 1시간 동안 잘 흔들어 BEI를 만든다. 각 바이러스를 18mL씩 준비하여 온도조건별로 바이러스 9mL에 0.1M BEI 1mL를 가하여 최종 0.01M의 농도로 조정한 후 온도를 4°C와 37°C로 달리하여 잘 흔들어 반응시킨다. 6시간까지 1시간 범위로 반응시간을 두었으며, 이후 12시간과 24시간째에 각각 1mL 시료를 취하여 사용된 BEI의 10% 용량으로 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 용액을 가하여 반응을 정지시킨 후 공시하였다.

#### (2) Formalin에 의한 불활화

Formalin 원액(Junsei, Japan)을 멸균증류수에 1%로 희석한 후 바이러스 부유액에 대한 10%의 용량을 가하여 0.1% 농도로 BEI와 같은 온도, 시간별로 실험을 수행하였다.

#### (3) 바이러스의 불활화 확인시험

정해진 시간과 온도에서 불활화 한 바이러스 재료를 11령의 인플루엔자 음성 일반 산란종란 5개씩에 0.1mL를 접종하여 37°C에서 7일간 부란하면서 계태아의 치사상태를 검사하였다. 배양한 후 요막강액의 HA test에서 적혈구 응집 유무에 따라 불활화 여부를 확인하였다.

#### (4) 불활화제 처리 전후의 바이러스 혈구 응집 역가 변화 조사

공시된 불활화제를 MS96(64HA), ADL0401(32HA)의 바이러스에 불활화 효능시험과 마찬가지로 6시간까지 1시간 범위, 그리고 이후에 12시간과 24시간째에 4°C와 37°C의 서로 다른 온도조건에서 반응하여 HA 역가 변화를 불활화제 처리 전과 비교 관찰하였다.

## 2) 안전성 및 면역원성 조사

시험 생산한 백신에 대하여 생체 안전성 실험과 면역 형성 능을 평가하고자 여러 종류의 adjuvant를 사용한 백신과 접종량을 달리 하며 3차에 걸쳐 시험하였다. 시험백신에 사용된 바이러스는  $10^{8.3}$ EID<sub>50</sub>/mL의 바이러스를 함유한 ADL0401이며, 6주령 인플루엔자 음성 닭에 근육경로로 접종하여 2주간 임상증상 및 폐사율을 관찰하였으며, 3주째에 혈액을 채취하여 항체가를 조사하였다. 1차 실험으로 SEPPIC(Paris, France)에서 개발한 ISA 70, ISA 763, IMS 1312 adjuvant를 동일 조건에서 항체가를 비교하였고, 2차 실험에선 1차 실험에서 가장 좋은 효과를 나타낸 ISA70과 현재 국내외에서 상용화되고 있는 Drakeol 6VR(Penreco, USA)을 접종량을 달리 하여 비교하였으며, 최종적으로 ISA 70 adjuvant 백신으로 대조군과 함께 확정 실험을 실시하였다.

## 결 과

### 1. 바이러스 생물학적 특성조사

#### 1) 바이러스 확인

국립수의과학검역원에서 백신후보주인 ADL0401에 대한 혈청형 동정실험으로 HI test 및 NI assay 결과 혈청형은 H9N2로 확인되었고, HA 단백질 분절부위에 대한 염기 서열 분석 결과 HPAI 바이러스의 특성인 염기성 아미노산의 배열이 존재하지 않은 LPAI 바이러스의 구조를 갖고 있음이 판명되었다.

#### 2) 병원성

임상증상 관찰 실험에서는 두 바이러스 접종군 공히 폐사 는 없었으나, 접종 후 3~4일경에 심한 우울증상을 보였으며,

다음날 아침에 빠르게 회복이 되었다.

재분리율 조사에서는 부화란 접종 실험 결과, 후보주인 ADL0401은 접종 2일에서 4일후까지 기관에서 바이러스가 분리되었으며, 접종 6일 후부터는 분변으로 배출을 시작하여 접종 10일 후까지 지속되었다. MS96도 유사한 양상을 보였으나 총배설강의 8DPI에서는 분리가 되지 않아, 총배설강의 재분리율면에서는 ADL0401이 높은 것으로 나타났다(Table 2).

그러나 RT-PCR 실험 결과 전반적인 바이러스 검출양은 부화란 접종 실험과 유사하였으나, 총배설강에서 MS96은 접종 6일후에 3수, 8일후 1수, 10일후 2수가 양성으로 ADL0401의 접종 6일후 1수, 8일후 1수 양성에 비해 보다 높은 검출율을 나타냈다. 기관에서는 부화란 접종실험에서 ADL0401은 접종 2일후 3수, 4일후 3수, MS96은 접종 2일후 3수, 4일후 1수가 재분리된 것에 비해 RT-PCR에서는 두 바이러스 공히 접종 2일후 1수, 4일후 2수가 검출되어 재분리율이 상대적으로 낮게 나타났다(Table 3, Fig. 1, Fig. 2). 이는 부화란 접종실험의 경우에는 면봉 채취 시료의 분리율이 포함된 결과이므로 재분리율에 다소 차이를 보였다고 판단되었다.

두 실험의 결과를 종합적으로 살펴봤을 때 두 바이러스간의 분리양상은 상당히 유사하였으며, 백신후보주인 ADL0401은 약병원성 조류인플루엔자의 특성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.

#### 3) 항원성

표준야외주인 MS96과 백신후보주로서의 ADL0401의 이 종항원에 대한 중화능 실험을 한 결과 *r* value = 0.71로 동종 항원(*r* value = 1)에 비하여 다소 낮은 중화능을 나타내었지만, 두 바이러스간의 항원성에는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다(Table 4).

Table 2. Virus reisolation from various tissues after challenge of ADL0401

Viruses <sup>1</sup>	Virus reisolation rate after challenge														
	2DPI			4DPI			6DPI			8DPI			10DPI		
	T <sup>2</sup>	C	K	T	C	K	T	C	K	T	C	K	T	C	K
ADL0401	3/3 <sup>3</sup>	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	1/3	0/3
MS96	3/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
Control	0/3	0/3	0/3	-	-	-	0/3	0/3	0/3	-	-	-	0/3	0/3	0/3

<sup>1</sup> ADL0401 with dose of  $10^{7.7}$ EID<sub>50</sub>/mL and MS96 with dose of  $10^{8.7}$ EID<sub>50</sub>/mL were used for challenge.

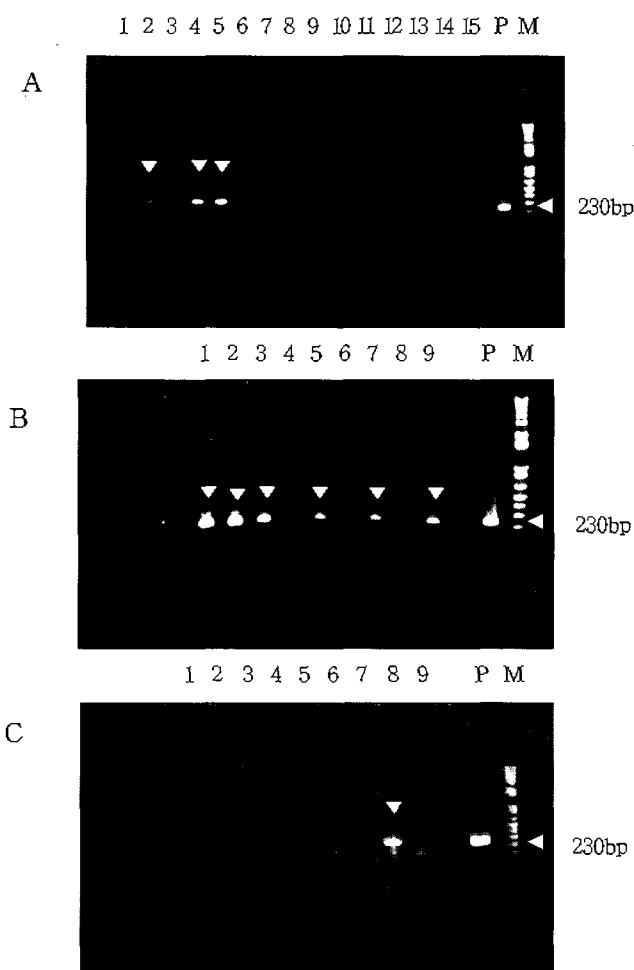
<sup>2</sup> T : Trachea, C : Cloaca, K : Kidney.

<sup>3</sup> Number of birds reisolated virus / number of birds tested.

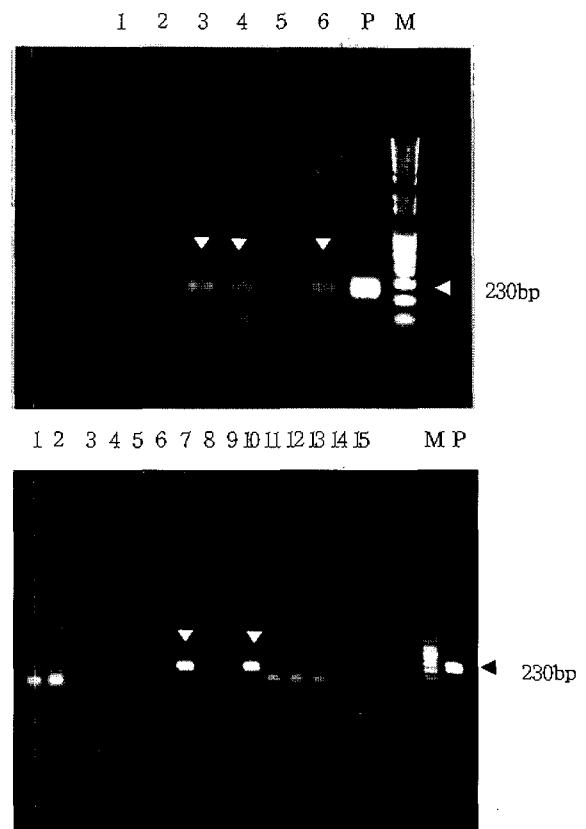
**Table 3.** Viral gene detection from various tissues by RT-PCR after challenge of ADL0401

Viruses	Viral gene detection rate after challenge														
	2DPI			4DPI			6DPI			8DPI			10DPI		
	T	C	K	T	C	K	T	C	K	T	C	K	T	C	K
ADL0401	1/3*	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
MS96	1/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	2/3	1/3
Control	0/3	0/3	0/3	-	-	-	0/3	0/3	0/3	-	-	-	0/3	0/3	0/3

\* Number of birds positive with RT-PCR / Number of birds tested.

**Fig. 1.** Detection of H9 gene of MS96 virus by RT-PCR.

(A) lanes 1~3, lanes 4~6, lane 7~9, lane 10~12 and lane 3~15 samples from trachea at 2DPI, 4DPI, 6DPI, 8DPI and 10DPI respectively. M means 1kb DNA ladder lane. P means positive sample ; (B) lane 1~3, lane 4~6 and lane 7~9 samples from cloaca at 6DPI, 8DPI and 10DPI respectively. ; (C) lane 1~3, lane 4~6 and lane 7~9 samples from kidney at 6DPI, 8DPI and 10DPI respectively.



**Fig. 2.** Detection of H9 gene of ADL0401 virus by RT-PCR.  
(A) lane 1~3 and lane 4~6 samples from trachea at 2DPI and 4DPI respectively. M means 1kb DNA ladder lane. P means positive sample ; (B) lane 1~3, lane 4~6, lane 7~9, lane 10~12 and lane 13~15 samples from cloaca at 6DPI, 8DPI, 10DPI and 10DPI respectively.

## 2. 백신 개발

### 1) 불활화제 선정

불활화 능력 실험은 0.1% formalin을 37°C 조건에서 처리하였을 때 가장 효과적이었으며, MS96은 2시간, ADL0401은 1

**Table 4.** Comparision of antigenic difference between ADL0401 and MS96 with correlation of neutralization for heterologous antigen

Antiserum	Antigen	
	MS96	ADL0401
MS96	64 <sup>1</sup> ( 1 )	64 ( 0.71) <sup>2</sup>
ADL0401	16 ( 0.71)	32 ( 1 )

<sup>1</sup> Hemagglutination inhibition titer.

$$^2 r \text{ value} = \sqrt{(r_1 \times r_2)} = \sqrt{0.5} = 0.71.$$

$r_1$  = heterologous titer with virus 2 / homologous titer with virus 1.

$r_2$  = heterologous titer with virus 1 / homologous titer with virus 2.

시간 만에 불활화가 이루어졌다. 온도 조건별로는 4°C에 비하여 37°C 조건으로 처리하였을 때 불활화 효력의 현저한 차이를 나타내었으며, 두 바이러스 모두 0.01M BEI보다 0.1% formalin에서 빠르게 불활화가 진행되었다(Table 5).

혈구 응집 역가는 MS96에선 두 불활화제가 같은 시간 양상으로 역가 저하를 보였으며 37°C 조건에 비해 4°C에서 빠

른 역가 저하를 나타내었으나, ADL0401 경우엔 4°C와 37°C에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 0.1% formalin 처리 시 0.01M BEI에 비하여 1시간 먼저 역가 저하를 나타냈다(Table 6).

결과적으로 백신 후보주인 ADL0401의 경우로만 보았을 때 0.01M BEI에서는 12시간까지도 불활화가 이루어지지 않았으나, 0.1% formalin에서는 1시간 만에 약간의 역가 저하를 나타내며 쉽게 불활화가 이루어짐을 알 수 있었다.

## 2) 안전성 및 면역원성

3차례에 걸쳐 adjuvant, 접종량 및 실험계수를 달리하여 실험한 결과 1차 실험에선 ISA 70 adjuvant를 사용한 백신에서  $4.20 \pm 0.84$ 로 가장 높은 항체 역가를 보였다. 이 백신을 접종량을 달리하여 그동안 국내외에서 보편적으로 사용되어 온 Drakeol 6VR adjuvant와 비교실험 했을 때, 0.5mL 접종시 Drakeol 6VR은  $7.00 \pm 0.67$ , ISA 70은  $7.50 \pm 0.76$ 의 항체가를 나타내 ISA 70 adjuvant 백신에서 보다 좋은 면역능을 형성하였고, ISA 70 adjuvant의 경우에서 접종량으로 볼 때는 0.5mL 접종시 항체가  $7.50 \pm 0.76$ 으로서, 0.2mL 접종시 항체가  $7.67 \pm 1.12$ 에 비해 표준편차 값이 적은 결과를 나타냈다. 확정

**Table 5.** Comparision of inactivation ability between BEI and Formalin at different incubation time and temperature

Viruses	Inactivator	Temp. (°C)	Incubation time (hours)							
			1	2	3	4	5	6	12	24
ADL 0401	0.01M BEI <sup>1</sup>	37	5/5 <sup>2</sup>	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
		4	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	0.1%	37	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Formalin	4	0/5	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5
MS96	Control	37	5/5	NT <sup>3</sup>	NT	NT	NT	NT	NT	5/5
		4	5/5	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5/5
	0.01M BEI	37	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		4	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	0.1%	37	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		4	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5
	Control	37	5/5	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5/5
		4	5/5	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5/5

<sup>1</sup> Binary ethylenimine.

<sup>2</sup> Number of HA positive / number of egg inoculated.

<sup>3</sup> Not tested.

**Table 6.** Comparision of HA titer before and after treatment with either BEI or Formalin as inactivator

Viruses	Inactivator	Temp. (°C)	처리전	Incubation time (hours)							
				1	2	3	4	5	6	12	24
ADL 0401	0.01M BEI	37 4	32* 32	32 16	16 16	16 8	8 8	8 8	8 8	8 8	8 16
	0.1% Formalin	37 4	32 32	16 16	16 16	16 8	8 8	8 8	8 8	8 8	8 16
	Control	37	32	32	32	16	16	16	16	16	32
		4	32	32	32	16	16	16	16	16	32
MS96	0.01M BEI <sup>1</sup>	37 4	64 64	64 32	64 32	32 16	32 16	32 16	32 16	32 16	32 32
	0.1% Formalin	37 4	64 64	64 32	64 32	32 16	16 16	16 16	16 16	16 16	32 32
	Control	37	64	64	64	64	32	32	32	32	64
		4	64	64	64	64	32	32	32	32	64

\* Hemagglutination titer.

실험으로 ISA 70 adjuvant 백신을 대조군을 두면서 0.5mL 용량으로 1회 근육 접종하여 안전성 및 면역원성을 확인해 본 결과, 백신 접종 전후로 폐사율 및 임상증상은 전혀 관찰되지 않았으며,  $7.40 \pm 1.06$ 으로 높은 수준의 항체 역가를 형성함을 재확인할 수 있었다(Table 7).

**Table 7.** Immunogenicity of ADL0401 conjugated with various adjuvant

Trial	Adjuvant	Volume(ml)	Number of bird	HI titer
1	ISA 70	0.5	5	$4.20 \pm 0.84^1$
	ISA 763	0.5	5	$2.40 \pm 1.67$
	IMS 1312	0.5	5	$3.80 \pm 1.30$
2	ISA 70	0.2	10	$7.67 \pm 1.12$
	ISA 70	0.5	10	$7.50 \pm 0.76$
	Drakeol 6VR	0.2	10	$6.20 \pm 0.63$
3	Drakeol 6VR	0.5	10	$7.00 \pm 0.67$
	ISA 70	0.5	15	$7.40 \pm 1.06$
	Control <sup>2</sup>		5	0 ± 0

<sup>1</sup> Mean of  $\log^2$  HI titer ± standard deviation.

<sup>2</sup> Vaccine untreated.

## 고 칠

본 연구에서는 LPAI로 인한 경제적 손실을 효과적으로 방지할 수 있는 사독백신을 개발하기 위해 LPAI 국내 표준주인 MS96 바이러스와 비교하여 백신 후보주로서의 국내 분리주인 ADL0401 바이러스의 생물학적 특성, 면역원성 및 안전성 평가 실험을 수행하였다.

분리된 백신 후보주인 ADL0401 바이러스의 병원성을 결정짓는 HA 당단백질 분절부위의 유전자 분석 결과 HPAI 바이러스에서 볼 수 있는 다염기성 아미노산 배열은 없었다. 국내 약병원성 인플루엔자 분리주인 Ck/Kor/006/96과 Ck/Kor/323/96의 HA 유전자 조사가 이루어진 바 있고(Guan et al., 1999), 표준주인 MS96의 HA 유전자와의 염기 서열과 비교한 결과 각각 96.6%, 98.5%의 유사성을 나타내었다(Lee. et al., 2000). ADL0401의 아미노산 염기 서열 또한 마찬가지로 국내 표준주인 MS96과 상당히 일치하였기에 LPAI 바이러스의 특성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

병원성 실험에서는 두 바이러스 접종군 모두 폐사는 없었으며 임상증상으로 접종 후 3~4일경에 두 바이러스 접종 군에서 모두 심한 우울 증세를 보인 다음 다음날 빠르게 회복하였고, 바이러스 재분리율면에서는 접종 후 4일까지 기관에서 바이러스가 머물러 있다가 접종 후 6일부터 분변으로 배

출을 시작하여 10일까지 지속되었다. Lee 등(2000)의 MS96 바이러스를 이용한 실험에서는 접종시 폐사는 없었으며, 접종 후 4~5일경에 비강 접종군에서 중등도의 우울 증세와 정맥 접종군에서의 심한 우울 증세를 나타내 본 실험에서와 같은 LPAI의 임상증상을 나타내었다. 바이러스 재분리 실험에서는 정맥 접종시 접종 후 3일에 기관에서 1/8수(13%)가, 총 배설강은 7/8수(88%)가 분리되었으며, 접종 후 7일에는 기관 예선 분리가 되지 않았고, 총배설강에서 7/8수(88%)가 분리되었다. 비강 접종 결과로는 기관에서는 전혀 분리가 이루어지지 않았으며, 총배설강에서는 접종 후 3일에는 분리되지 않았고, 접종 후 7일엔 3/8 (38%)수가 분리되었다. 정맥 접종 시 접종 3일 후에 총배설강에서의 분리율이 높았던 것은 혈관 접종에 따른 빠른 바이러스 분리가 이루어진 것으로 판단되었으며, 비강 접종에서 기관분리가 전혀 이루어지지 않은 접예선 본 실험과 차이를 보였다. 또한 Guo 등(2000)은 국내 분리주인 Ck/Kor/323/96과 Ck/Kor/006/96에서 병원성 실험을 하여 마찬가지로 폐사율은 나타내지 않았으며, 5일 동안 12주령의 닭에서의 바이러스 재분리 실험을 한 결과 Ck/Kor/323/96은 기관에서 8수 모두가 분리되었고(100%), 총배설강에서는 4/8수가 분리되었으며(50%), Ck/Kor/ 006/96의 경우엔 기관에서는 4/9수가(44%), 총배설강에서는 2/9수가(22%) 분리되는 등 접종 초기에서의 본 실험과 같은 분리양상을 나타내었다. 그러나 국내 분리주가 아닌 Ck/Bei/1/94(H9N2)에서는 80%까지의 폐사율을 나타내기도 하였으나, 이는 유전자 병원성 변이에 의해 HA 분절 부위에 다염기성 아미노산을 포함함으로써 고병원성을 획득한 것으로 확인되었다. 따라서 국내 분리주를 접종한 결과에서 폐사율이 없던 결과는 본 실험의 결과와 일치하였고, 재분리율에선 MS96의 경우에는 접종 후 3일에서도 총배설강에서 분리되는 등 본 실험과의 다른 결과를 나타내었지만, 접종 후 7일에 기관에서 바이러스 분리가 되지 않고 분변에서의 분리율이 높아지는 등 전반적인 분리 양상은 본 실험과 일치하였다. 다른 두 개의 국내 분리주의 경우에서도 5일간만의 관찰 결과이지만 기관 분리율이 총배설강의 분리율보다 높게 나타나는 본 실험과 같은 결과를 나타내었다. 따라서 ADL0401 분리주는 LPAI의 특징을 갖고 있으며, 국내 공인 LPAI 바이러스인 MS96과 상당히 유사한 생물학적 특성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.

야외주인 MS96과 백신 후보주로서의 ADL0401의 이종 항원에 대한 중화능 실험을 한 결과  $r$  value = 0.71로 동종항원 ( $r$  value = 1)에 비하여 다소 낮은 중화능을 나타내었지만, 두 바이러스간의 항원성엔 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 이

와 같이 인플루엔자 바이러스의 분리주간의 항원성에 차이가 있을 수 있다는 사실은 이미 오래 전에 증명이 된 바 있다 (Magill et al., 1936). Archetti 등(1950)은 인플루엔자 A 분리주인 FM1, SH, PR8, 965 사이의 항원성 차이를 실험한 결과 FM1과 SH간의  $r=1.4$ 로 항원성의 차이는 거의 없는 것으로 확인하였으나, SH와 965간의 경우에선  $r=1/8$ 로 현저한 항원성의 차이를 나타내었다. 이와같이 같은 인플루엔자 A 바이러스라 하더라도 다양한 항원성을 나타내듯이 본 실험에서의 두 바이러스 사이에서는 동종항원에 비해 다소 낮은  $r$ 값을 나타내었지만, 현저한 차이를 드러내지 않은 것으로서 ADL0401 분리주는 야외감염으로부터 임상증상 및 바이러스의 분변 배출을 감소시킬 수 있는 사독백신주로 사용되어질 수 있음을 알 수 있었다.

불활화제 선정 실험에서는 ADL0401은 0.1% Formalin, 37°C에서 바이러스 활성에 큰 영향을 주지 않으면서 1시간 이내에 쉽게 불활화가 이루어져 0.01M BEI와 비교하여 보다 좋은 효과를 나타내었다. Hurst는(1957) BEI 불활화제가 Formalin에 비해 항원성 면에서 우수하다고 밝힌 바 있으나, 본 연구에선 Formalin에서 좋은 효능을 보였고, 현재 BEI 제조 시약의 수입이 규제되어 있는 것으로 퇴약이 되어 향후 접종 실험이나 활용도면에서 힘들 것으로 사료되었으며, Formalin 처리로도 충분한 면역능을 얻을 수 있음을 본 실험을 통해 확인할 수 있었다.

백신 후보주를 이용하여 개발된 백신의 안전성 및 면역원성을 실험한 결과, 백신 접종계군에 대해선 폐사 및 임상증상을 발견할 수 없었으며, 면역증강제로 ISA 70 adjuvant (Seppic, France)를 사용하였을 때에 가장 우수한 면역능을 형성하였다. David 등(2001)은 혈청형이 H5인 여러 개의 LPAI를 이용한 백신으로 사람에서 유래한 HPAI A/Hong Kong/156/97 (H5N1)과 HPAI A/Hong Kong/483/97(H5N1)를 공격 접종하였을 때, 바이러스의 증식과 배출을 완전히 막진 못하였지만, 어느 정도 임상증상 및 바이러스 증식을 감소시켜 사독 백신의 효능을 확인한 바 있다. Marandi 등(1999)은 ISA70 adjuvant의 백신실험을 하여 접종 후 3주에 4.9~5.1 log<sub>2</sub>의 HI 역가를 나타내었으며, 공격 접종 시에 비강에서는 바이러스 재분리가 이루어지지 않았고 분변에서 15마리 중 1개의 바이러스만 분리되는 등 백신을 통하여 임상증상 및 바이러스 배출을 감소시킬 수 있음이 인정되었다. ISA 70은 현재 국내외에서 상용화되어 있는 Drakeol 6VR에 비해 가격이 비싼 단점은 있으나 실험결과에서와 같이 보다 우수한 면역능을 보여주었고, 또한 국외에서의 성공적인 사례로 살펴봤을 때 국내 활용 면에서도 적극 고려해 보아야 할 때라고 생

각된다.

본 연구의 바이러스 생물학적 특성 및 백신의 안전성, 면역 원성 실험 결과를 종합하여 볼 때 ADL0401 분리주는 LPAI에 감염된 계군에 대해 임상증상 및 바이러스 배출을 감소시킬 수 있는 사독백신주로 사용되어질 수 있음을 확인하였다.

향후 생산된 사독백신의 실험실적 및 야외 효능, 안전성 실험이 수행되어야 할 것이며, 또한 야외 감염계와 백신접종 계의 감별을 위한 진단법도 개발되어 빠른 시일 내에 현장 양계농가로의 보급이 이루어져 현재의 막대한 경제적 손실로부터 농가보호에 기여할 수 있기를 기대하는 바이다.

## 적 요

본 연구는 약병원성 조류인플루엔자 사독백신 개발을 위하여 백신 후보주(ADL0401)로서의 생물학적 특성 및 개발 백신에 대한 면역원성 및 안전성 평가를 실시하였다.

백신 후보주인 ADL0401의 병원성을 조사한 결과 폐사는 없었으며, 임상증상 및 바이러스 재분리율 양상이 국내 표준 야외주인 MS96과 상당히 유사한 생물학적 특성을 나타내어 약병원성 조류인플루엔자의 특징을 갖고 있음을 알 수 있었다.

표준야외주인 MS96과 백신후보주인 ADL0401간의 이종 항원의 중화능 실험을 한 결과  $r_{\text{값}} = 0.71$ 로 동종항원( $r_{\text{값}} = 1$ )에 비하여 다소 낮은 중화능을 나타내었지만, 두 바이러스 간의 항원성엔 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

불활화 능력실험으로 0.1% Formalin을 37°C 조건에서 처리하였을 때 가장 효과적인 결과를 가져왔으며, MS96은 2시간, ADL0401은 1시간만에 다소의 역가 저하는 있었으나 빠르게 불활화가 이루어짐을 확인하였다.

개발 백신의 면역원성 및 안전성 실험 결과 ISA 70 adjuvant 백신 접종시 백신 접종 전후로 폐사율 및 임상증상은 관찰되지 않았으며, 높은 수준의 항체 역가를 형성함으로써 가장 면역원성이 우수한 것으로 확인되었다.

(색인어 : 약병원성조류인플루엔자, 병원성, 항원성, 사독 백신, 면역원성, 안전성)

## 인용문헌

Alexander DJ, Gough RE 1986 Isolations of avian influenza virus from birds in Great Britain. Vet Rec 118:537-538.

- Archetti I, Horsfall FL 1950 Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization *in ovo* with heterologous immune serum. J Exp Med 92:441-462.
- Bano S, Naeem K, Malik SA 2003 Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. Avian Dis 47:817-822.
- Barr PJ 1991 Mammalian Subtilisins : The longsought dibasic processing endoproteases. Cell 66(1):1-3.
- Cadman HF, Kelly PJ, Zhou R, Davelaar F, Mason PR 1994 A broad-spectrum avian influenza subtype antigen for indirect enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. Avian Dis 38:621-625.
- Cooley AJ, Campen GV, Philpott MS, Easterday BC, Hinshaw VS 1989. Pathological lesions in the lungs of ducks infected with influenza A viruses. Vet Pathol 26:1-5.
- David ES, Joan RB, Michael LP, Charles WB 2001 Efficacy of vaccine in chickens against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza. Avian Dis 45:355-365.
- Easterday BC, Hinshaw VS, Halvorson DA 1997 Influenza. In : Diseases of Poultry, 10th ed. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, eds. Iowa State University Press Ames IA, pp. 583-605.
- Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Webster RG 1999 Molecular characterization of H9N2 influenza viruses : were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? Proc Natl Acad Sci USA 96:9363-9367.
- Guo YJ, Krauss S, Senne DA 2000 Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. Virology 267:279-288.
- Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, Kawaoka Y 1994 Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. J Virol 68(9):6074-6078.
- Hurst A 1957 Approaches to the chemotherapy of virus diseases. J Pharm Pharmacol 9:273-292.
- Kawaoka Y, Webster RG 1988 Sequence requirement for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 85: 324-328.
- Kilbourne ED 1975 The influenza viruses and infection. An introduction. In : Kilbourne ED ed. The influenza viruses and

- influenza. Academic Press New York, pp 1-4.
- Krug RM, Lamb RA 2001 Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Field virology, 4th ed. Knipeand DM, Howlet PM, eds. Lippincott Williams and Wildins. Chapter 46, pp 1487-1532.
- Lamb RA 1990 Orthomyxoviruses. In : Virology, Field BN, ed. Raven Press New York, pp 1091-1152.
- Lee CW, S CS, L YJ, M IP 2000 Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96. Avian Dis 44:527-535.
- Liu M, Guan Y, Peiris M, He S, Webby RJ, Perez D, Webster RG 2003 The quest of influenza a viruses for new hosts. Avian Dis 47(3):849-856.
- Magill TP, Fransis T 1936 Jr Proc Soc Exp Biol and Med. 35:463.
- Marandi MV, Bozorgmehrifard MH, Hashemzadeh M 1999 Efficacy of inactivated H9N2 avian influenza vaccine against non-highly pathogenic A/Chicken/Iran/ ZMT-101/98 infection.
- Nili H, Asasi K 2003 Avian influenza(H9N2) outbreak in Iran. Avian Dis 47:828-831.
- Palese P, Young JF 1982 Variation of influenza A, B, and C viruses. Science 215 :1468-1474.
- Panigrahy B, Senne DA, Pearson JE 1995 Presence of avian influenza virus (AIV) subtypes H5N2 and H7N1 in emus (*Dromaius novaehollandiae*) and rheas (*Rhea americana*) : Virus isolation and serologic findings. Avian Dis 39:64-67.
- Parsons GD, Alexander J, Manwell RJ 1986 Experimental assessment of the pathogenicity of eight influenza A viruses of N5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail. Avian Pathol 15:647-662.
- Skeels JK, Beasley JN, Blore P, Klopp S 1981 Severe egg-production drops in turkey breeders in Southcentral Missouri. Avian Dis 25:764-767.
- Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti KG, Norwood M, Senne D, Sims L, Takada A, Webster RG 1998 Charac- terization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology 252:331-342.
- Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Robert C, Klenk HD, Garten W 1992 Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. EMBO J 11(7):2407-2414.
- Suarez DL, Senne DA 2000 Sequence analysis of related low-pathogenic and highly pathogenic H5N2 avian influenza isolates from United States live bird markets and poultry farms from 1983 to 1989. Avian Dis 44:356-364.
- Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LEL, Senne DA, Lee J, Lee YJ, Mo IP, Sung HW, Swaine DE 2003 Evaluation of a high-pathogenicity H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. Avian Dis 47:951-955.
- Vey M, Orlich M, Adler S, Klenk GD, Rott R, Garten W 1992 Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition Motif R-X-K/R-R. Virology 188:408-413.
- Walker JA, Sakaguchi T, Matsuda Y, Yoshida T, Kawaoka Y 1992 Location and character of the cellular enzyme that cleavage the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. Virology 190(1):278-287.
- Woolcock MD, McFarland MD, Lai S, Chin RP 2001 Enhanced recovery of avian influenza virus isolates by a combination of chicken embryo inoculation methods. Avian Dis 45:1030-1035.
- World Health Organization Report 1973 Influenza neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. Bull WHO 48:199-203.
- Xie Z, Stone HD 1990 Immune response to oil-emulsion vaccines with single or mixed antigens of newcastle disease, avian influenza and infectious bronchitis. Avian Dis 31:154-162.
- 성환우 2003 공중보건 위생측면에서의 조류 인플루엔자 바이러스 및 최근 국내 유행주의 특성. 2003년 가금질병연구회 학술세미나, pp. 5-16.