

Characterization of Lentogenic Newcastle Disease Virus Isolated in Jeju, Korea during 2007~2008 Surveillance

Eun-Kyoung Lee¹, Woo-Jin Jeon¹, Jin-Won Kim¹, Mi-Ja Park¹, Sung-Hwan Moon²,
Sang-Hun Lee², Jun-Hun Kwon¹ and Kang-Seuk Choi^{1*}

¹Avian Diseases Division, National Veterinary Research and Quarantine service, Anyang, Korea

²Jeju Veterinary Research Institute, Jeju, Korea

To expand the epidemiological understanding of Newcastle disease in Jeju Province, Korea, active surveillance was extensively performed through a virological examination for poultry farms and wild birds in Jeju Province during 2007~2008. Samples (swabs or fresh feces) were collected from a total of 6,485 birds including 6,405 domestic birds (chickens, ducks, pheasants, geese, quails, turkeys, and ostriches) and 80 wild birds. A total of 24 hemagglutinating agents were isolated from domestic birds on fourteen farms including five Korean native chicken, one layer chicken, two broiler chicken, four duck and two pheasant farms. The hemagglutinating agents were all identified as lentogenic NDV based on the reverse transcriptase polymerase chain reaction, sequence analysis of amino acids on the F cleavage site and mean death time in chicken embryos. The F gene-based phylogenetic analysis revealed that the NDV isolates were classified into genotypes 1 or 2 of class II. These lentogenic viruses were closely related to NDV vaccine strains used in Jeju Province. Active surveillance conducted for Newcastle disease indicates no scientific evidence of virulent NDV infection in chickens in Jeju Province, Korea since 2005.

Key Words: Newcastle disease, Surveillance, Lentogenic NDV, Jeju Province

서 론

뉴캐슬병 바이러스 (Newcastle disease virus, NDV)는 *Paramyxoviridae*과 *Avulavirus*속에 속하는 *Avian Paramyxovirus type 1* (APMV-1)에 속하는 바이러스이다 (1). NDV 입자의 크기는 직경 약 100~500 nm이며, 입자의 모양은 다양한 형태 (pleomorphic)를 가지고 있다 (1). NDV는 약 15 kb 크기의 non-segmented negative sense RNA 형태의 게놈을 가지고 있다. NDV 게놈은 nucleoprotein (NP),

phosphoprotein (P), matrix protein (M), fusion protein (F), hemagglutinin-neuraminidase protein (HN), 그리고 RNA-dependent RNA polymerase (L) 등 주요 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 함유하고 있다 (2). NDV의 HN과 F는 바이러스 외피 (envelope)에 돌출되어 있는 당단백질이다. 이 중 HN은 세포부착과 바이러스 방출 등에 관여하며, F는 바이러스 감염시 세포융합 (cell fusion)에 관여한다 (3~5).

NDV는 F 단백질의 과가변 부위 (hypervariable region) 유전자 염기서열에 바탕으로 유전계통 분류학적으로 크게 class I과 class II로 분류하고 있다. Class I은 주로 야생조류 (특히 물새류)와 재래시장에서 분리되고 약독형의 특징을 지니고 있다 (6, 7). 최근까지 알려진 바에 의하면 유전계통 분류상 NDV class II는 genotype I에서 IX까지 분류되어 지고 있다 (6, 8, 9). 이 중 genotype I과 II는 주로 야생조류에서 분리되며, 닭에서 병원성을 거의 나타내지 않기 때문에 이들 중 일부 NDV는 백신 바이러스로도

Received: September 9, 2009/ Revised: November 23, 2009

Accepted: November 30, 2009

*Corresponding author: Kang-Seuk Choi, DVM, PhD., Avian Diseases Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, 335 Joongang-ro, Anyang, Gyeonggi 430-757, Korea.
Phone: +82-31-467-1821, Fax: +82-31-467-1814
e-mail: choiks@nvqs.go.kr

**This work was financially supported by the Jeju Provincial Government for the establishment of regional freedom of Newcastle disease in Jeju Province, Korea.

응용되고 있다. Genotype III에서 IX는 닭 등 가금류에서 주로 분리되며 대부분의 경우 닭에 대한 병원성을 가지고 있다 (8, 10~12).

뉴캐슬병 (Newcastle disease)는 중간독 이상의 NDV 감염에 의해 발병하는 조류의 급성전염병으로 우리나라에서는 제1종 법정 가축전염병으로 지정되어 있다. NDV의 독력 (virulence)은 뇌내병원성지수 (intracerebral pathogenicity index, ICPI)나 계태아 평균치사시간 (mean death time, MDT) 등 닭에 대한 병원성 정도에 의하여 약독형 (lentogenic), 중간독형 (mesogenic), 강독형 (velogenic)으로 결정되어 진다 (1, 13). 분자유전학적 분석방법으로는 F 단백질의 분절부위 (cleavage site)의 병원성 모티프 (motif) 존재 여부에 의하여 바이러스의 독력 여부를 판단할 수 있다 (13, 14~17).

뉴캐슬병은 조류종 중 닭, 꿩, 메추리 등에 가장 감수성이 높아 이들 가금류 종에 강병원성 NDV에 감염되면 수 주 이내에 거의 100%에 이르는 폐사율 (mortality)을 나타낸다. 국내에서의 뉴캐슬병은 1927년 최초 보고된 이래, 3년에서 5년 주기로 대유행 양상을 보이면서 지속적으로 양계산업에 피해를 입혀 왔다 (18~20). 특히 뉴캐슬병 피해 최소화를 위하여 국내에서는 1997년 부화장을 대상으로, 2001년부터 부화장 및 양계 농장을 대상으로 뉴캐슬병 백신접종 의무화 정책을 실시하고 있다. 정부의 강력한 뉴캐슬병 방역정책에 따라 2000년대 초 마지막 뉴캐슬병 대유행을 겪은 이후에도 뉴캐슬병은 지속적으로 발생하고 있지만, 발생건수는 점차 줄어드는 경향을 보이고 있다.

한편 제주도의 경우 2005년 재래시장 토종닭에서 최종 발생 이후 2009년 현재까지 뉴캐슬병 추가발생 보고가 없는 상황이다. 세계동물보건기구 (Office International des Epizooties, OIE)는 과거 1년간 뉴캐슬병 발생이 없고, 과학적인 질병 예찰을 통하여 뉴캐슬병 부재증명을 하는 경우 뉴캐슬병 청정지역으로 인정하고 있다 (21). 그러므로 제주도의 경우 체계적인 질병 예찰을 통하여 뉴캐슬병 부재증명이 이루어질 경우 뉴캐슬병 청정지역으로 인정받는 요건을 갖추게 된다. 이를 위하여 수의과학검역원과 제주도는 도내 사육 가금류 농장 전체를 대상으로 2007년부터 2년간 뉴캐슬병 부재증명을 위한 예찰 활동을 집중적으로 실시하여 왔다. 본 연구를 통하여 최근 2년간 실시한 제주도내 사육하고 있는 닭 등 가금 농장 전체를 대상으로 바이러스 검사를 실시하였으며, 이를 통

하여 실제로 제주도내 사육 농가의 가금류들 사이에서 뉴캐슬병이 유행하고 있는지 여부를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

검사시료 채취

제주도내 사육하고 있는 가금류 및 야생조류를 대상으로 한 검사시료 채취는 2007년 11월부터 2008년 1월까지 3개월간, 2차 바이러스 검사는 2008년 8월부터 2008년 11월까지 3개월간 총 2회에 걸쳐 제주도내 사육 농가 전체를 대상으로 실시하였다. 검사대상 농가는 시료 채취전 뉴캐슬병으로 의심되는 증상을 나타내는 지 여부를 관찰하고 기록하였다. 바이러스 검사를 위한 시료는 가금 농가 계사당 개체 20수씩 임의로 선정하여 상기도 (upper respiratory tract) 및 총배설장 (cloaca) 부위를 면봉으로 swab하여 검체를 채취하였다. 면봉 swab에 의하여 시료 채취가 여의치 않은 일부 방사 축종의 경우 농장내 신선한 분변을 채취하였다. 채취한 시료는 실험에 사용하기 전까지 냉장상태로 보관하였으며, 농장의 계사 단위로 상기도 및 총배설장 시료를 각각 합쳐서 바이러스 검사를 실시하였다.

바이러스 분리 검사

바이러스 분리 검사는 바이러스 표준검사법인 종란접종법을 사용하여 실시하였다 (1, 13). 바이러스 분리를 위하여 특정병원체부재 (specific pathogen free, SPF) 닭에서 유래한 종란을 Charles River SPAFAS (North Franklin, CT, USA)에서 구입하여 사용하였다. 각 검사시료는 9일내지 11일령의 종란의 요막강 (allantoic cavity)내로 접종한 후 종란 배양기 (Heraeus Instruments, Hanau, Germany)에서 5일간 배양하였다. 배양 24시간 이내 닭 태아가 폐사한 경우에는 종란이 세균감염된 것으로 간주하고 폐기하였다. 그 후 접종 종란의 요막강액을 무균적으로 채취하였다. 모든 검사시료에 대하여 상기와 동일한 방법으로 종란에서 반복 계대를 실시하였다. 그 후 접종 종란에서 채취한 요막강액은 유리 평판 (glass plate)에서 닭 적혈구에 대한 응집능이 있는 지 여부를 조사하였다. 적혈구응집능이 있는 것으로 확인된 요막강액은 바이러스 동정에 사용하였다. 종란에서 2차 계대 후에도 적혈구응집능이 없는 요막강액은 바이러스 음성으로 간주하였다.

바이러스의 동정

상기의 바이러스 분리시험에서 닭 적혈구응집능이 있는 요막강액 시료들을 대상으로 분리 바이러스가 NDV 인지 여부를 조사하였다. NDV 검사는 역전사효소 중합효소연쇄반응법 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)을 사용하여 실시하였다. 바이러스 RNA 추출은 Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON Biotech., Seongnam, Korea)을 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 의거하여 실시하였다. 추출한 RNA는 *i*-NDV Master (Common type) Mix (iNtRON Biotech.) 또는 *i*-NDV Master (Pathotype) Mix (iNtRON Biotech.)를 사용한 뉴캐슬 병 신속검출 키트 (*i*-NDV Detection Kit, iNtRON Biotech.)로 RT-PCR을 제조사에서 권장하는 방법에 의거하여 실시하였다. RT-PCR 증폭산물을 전기영동 (1.5% agarose gel, 100 V, 20분)하여 NDV 핵산이 증폭되었는지 여부를 관찰하였다. 전기영동 결과는 Common type의 경우 379 bp, pathotype의 경우 204 bp가 증폭될 경우 양성으로 판정하였다. 또한 379 bp 크기의 핵산 증폭산물만 증폭될 경우 약독형 NDV 양성으로, 379 bp 및 204 bp 크기의 두 종류 핵산 증폭산물이 모두 증폭될 경우 강독형 NDV 양성으로 판정하였다. NDV로 동정된 분리주들은 생물학적 및 유전적 특성 실험에 사용할 때까지 -70℃에 냉동 보관하였다.

바이러스 내열성 조사

NDV 분리주의 내열성 (thermostability)는 다음과 같이 실시하였다. 즉, 바이러스 검체시료를 56℃에서 30 분간 열처리한 다음 V-bottom microtiter plate (Greiner, Stonehouse, UK)에서 닭 적혈구를 이용한 혈구응집반응 (hemagglutination, HA) 역가를 측정하였다. 이때 열처리를 하지 않은 동일 시료를 대조로 사용하였다. 바이러스의 HA 역가는 혈구응집이 일어나는 최고 희석배수의 역수로 표시하였다.

계태아 평균치사시간 측정

분리 바이러스의 독력은 Alexander 등이 제시한 방법과 기준에 의거하여 MDT법으로 측정하였다 (22, 23). 분리 바이러스의 MDT 측정을 위하여 9일령 내지 11일령의 SPF 닭 종란을 사용하였다. NDV RT-PCR에서 양성으로 판정된 요막강액을 10배 계단 희석하여 각 희석당

0.2 ml씩을 5개의 SPF 종란 요막강내로 접종한 후 37℃ 종란 배양기에서 5일간 배양하였다. 배양 24시간 이내 닭 태아가 폐사한 경우에는 종란이 세균감염된 것으로 간주하고 폐기하였다. 그 후 배양기간 5일 이내에 닭 태아가 폐사한 종란은 요막강액을 무균적으로 채취하여 닭 적혈구응집능 여부를 확인하였다. 적혈구응집능을 보인 경우 NDV에 의한 닭 태아 폐사로 간주하였으며, 그렇지 않은 경우는 NDV 감염 음성으로 간주하였다. 닭 태아가 100% 폐사한 최고 희석배수에서 측정된 종란내 닭 태아 평균 치사시간을 MDT로 하였다. 바이러스의 독력은 MDT가 60시간 이하일 경우 강독, 60시간 이상 90시간인 경우 중간독, 90시간 이상일 경우 약독으로 판정하였다.

NDV F 유전자 분석

NDV 분리주의 F 유전자의 가변성 부위를 RT-PCR로 증폭한 후 염기서열을 분석하고 계통 분석을 실시하였다. 바이러스 RNA 추출은 Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON Biotech.)을 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 의거하여 실시하였다. cDNA 합성 및 특이유전자 증폭은 Accupower™ RT-PCR premix kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)을 사용하여 제조사에서 권장하는 방법과 Lee 등 (20)이 사용한 PCR 반응 조건에 따라 PCR 증폭기 (PTC-220, MJ research, Waltham, MA, USA)를 사용하여 one-step RT-PCR을 실시하였다. RT-PCR을 위하여 사용된 primer set는 M1055 (forward; 5'-GCTGATCATGAGGTTACCTC-3')와 F508 (reverse; 5'-AGTCGGAGGATGTTGGCAGC-3')로 M 유전자의 1055번째 핵산부위에서 F 유전자의 508번째 핵산부위까지 총 695개 핵산이 증폭되도록 설계되었다 (20). RT-PCR 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하였다. 그 다음 Gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 아가로스 겔에 있는 695 bp의 특이 증폭 밴드를 추출 정제하였다. 증폭한 유전자는 자동염기서열 분석장치 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

유전계통 분석

상기에서 분석한 분리 바이러스의 F 유전자 염기서열을 이용하여 계통 분석 (phylogenetic analysis)을 실시하였다. 계통 분석은 상기 695 bp의 F 유전자 핵산 염기서열 중 F 유전자의 N 말단 부위의 389 bp의 핵산 염기서열

Table 1. Lists of farms and their domestic birds sampled in Jeju Province, Korea during 2007~2008 NDV surveillance

Period sampled	Sample type	Total	Species tested ^a						
			Ly	Br	BB	KN	Dk	Pt	Others
1st (07.11 ~ 08.1)	Swab	2,506 (63)	1,520 ^b (36)	286 (7)	80 (1)	400 (14)	120 (3)	80 (1)	20 (1)
	Faeces	165 (10)	–	–	–	45 (2)	40 (2)	45 (3)	35 (3)
2nd (08.8 ~ 08.11.)	Swab	3,054 (68)	1,798 (31)	559 (14)	80 (1)	597 (21)	20 (1)	–	–
	Faeces	700 (19)	–	–	–	100 (3)	270 (7)	240 (5)	90 (4)
Total		6,405	3,318	845	160	1,142	450	365	145

^a Ly, layer; Br, broiler; BB, broiler breeder; KN, Korean native; Dk, duck; Pt, pheasant; Others, quail, goose, and turkey.

^b The number of bird individuals (farms) tested

Table 2. History of poultry farms where hemagglutinating agents were isolated in Jeju Province, Korea during 2007~2008 NDV surveillance

Virus ^a	Period ^b	Flock history			
		Farm (location)	Bird type	Age (days old)	Vaccination
JJ/1A1/07	1st	A (Seogwipo)	Korean native	180	Yes
JJ/1A2/07	1st	A	Korean native	210	Yes
JJ/2A2/08 ^c	2nd	A	Korean native	280	No
JJ/B1/07	1st	B (Seogwipo)	Pheasant	–	Yes
JJ/C1/07	1st	C (Gujwa)	Duck	28	No
JJ/C2/07	1st	C	Duck	35	No
JJ/C3/07	1st	C	Duck	21	No
JJ/D1/07	1st	D (Jocheon)	Duck	14	No
JJ/D2/07	1st	D	Duck	56	Yes
JJ/E/07	1st	E (Pyoseon)	Korean native	730	Yes
JJ/F/08	2nd	F (Hallim)	Layer	190	Yes
JJ/G2/08	2nd	G (Aewol)	Duck	35	Yes
JJ/H3/08	2nd	H (Aewol)	Korean native	168	Yes
JJ/I1/08	2nd	I (Hangyeong)	Duck	3	Yes
JJ/I2/08	2nd	I	Duck	21	Yes
JJ/J2/08	2nd	J (Aewol)	Korean native	105	Yes
JJ/K1/08	2nd	K (Namwon)	Broiler	34	Yes
JJ/L1/08	2nd	L (Pyoseon)	Broiler	25	Yes
JJ/M/08	2nd	M (Seonsan)	Korean native	100	Yes
JJ/N1/08	2nd	N (Seogipo)	Pheasant	–	Yes
JJ/N2/08	2nd	N	Pheasant	–	Yes
JJ/N4/08	2nd	N	Pheasant	–	Yes
JJ/N6/08	2nd	N	Pheasant	–	Yes
JJ/N7/08	2nd	N	Pheasant	–	Yes

^a Hemagglutinating agents were all confirmed as Newcastle disease virus

^b 1st: 1st surveillance (2007. 11~2008. 1), 2nd: 2nd surveillance (2008. 8~2008. 11)

^c NDV was isolated repeatedly in 2007 and 2008 on Farm A

만을 취하여 실시하였다. 계통 분석을 위한 핵산 염기 서열 교정 (editing), 아미노산 서열 예측 및 alignments는 Lasergene 7.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 사용하여 실시하였다. 본 연구에서 분리된 바이러스의 유전자 염기서열 분석결과는 기존에 발표된 NDV 유전자 염기서열과 비교 분석하였다. 이를 위하여 GeneBank에 등록이 되어 있는 NDV 28주와 NDV 국내분리주 16주 등 총 NDV 34주의 F 유전자 염기서열을 사용하였다. Phylogenetic tree는 Clustal X (<http://bisp.u-strasbg.fr/en/documentation/ClustalX>) 프로그램 내에서 neighboring-joining method로 1,000 bootstrapping하여 분석하고 Tree-View (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) 프로그램을 통해 분석 트리를 도식화하였다.

결 과

제주도 가금농장에 대한 바이러스 검사 결과

제주도내 사육하고 있는 가금류 농가를 대상으로 한 바이러스 검사는 2007년부터 2008년까지 2회에 걸쳐 실시하였다. 바이러스 검사를 위한 시료 채취 현황은 Table 1과 같다. 검사 대상 가금류 축종은 닭 (산란계, 육계, 육용 종계, 토종닭), 오리, 꿩, 거위, 메추라기, 칠면조였다. 또한 검사시료 채취 당시 농장내 사육중인 가금류에서 뉴캐슬병으로 의심될 만한 어떤 증상도 관찰되지 않았다. 야생조류의 경우 야생조류 서식지에 서식하는 야생오리류를 중심으로 시료를 채취하였다.

1차 바이러스 검사 (2007년 11월부터 2008년 1월) 대상은 73개 가금 농가 2,671수로, 산란계 36개 농가 1,520수, 육계 7개 농가 286수, 육용 종계 1개 농가 80수, 토종닭 16개 농가 445수, 오리 5개 농가 160수, 꿩 4개 농가 125수, 메추리 1개 농가 20수, 기러기 1개 농가 25수, 칠면조 1개 농가 5수, 타조 1개 농가 5수였다. 이 중 토종닭 1개 농가 3주, 꿩 1개 농가 1주, 오리 2개 농가 5주 등 5개 농가에서 총 9주의 혈구응집능 바이러스가 분리되었다 (Table 2). 이 기간 동안 야생조류는 야생오리 서식지인 하도리에서 분변 40점, 오조리에서 분변 20점, 용수리에서 분변 20점 등 야생 오리류의 분변 80점을 채취하여 바이러스 검사를 실시하였다. 검사결과 야생조류에서는 혈구응집능 바이러스는 분리되지 않았다.

2차 바이러스 검사 (2008년 8월부터 2008년 11월) 대상은 87개 가금 농가 3,754수로, 산란계 31개 농가 1,798

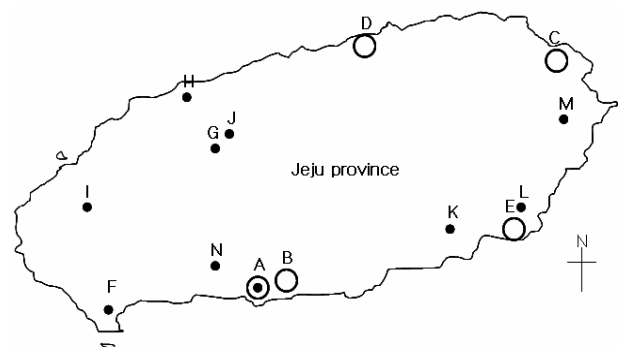


Figure 1. Geographical distribution of poultry farms where NDV was isolated during 2007~2008. ○, NDV positive farms during first NDV surveillance (2007. 11~2008. 1); ●, NDV positive farms during second NDV surveillance (2008. 1~2008. 11)

수, 육계 14개 농가 559수, 육용 종계 1개 농가 80수, 토종닭 24개 농가 697수, 오리 8개 농가 290수, 꿩 5개 농가 240수, 메추리 1개 농가 40수, 거위 2개 농가 40수, 기러기 1개 농가 10수였다. 이 중 산란계 1개 농가 1주, 육계 2개 농가 2주, 토종닭 4개 농가 4주, 꿩 1개 농가 5주, 오리 2개 농가 3주 등 10개 농가에서 총 15주의 혈구응집능 바이러스가 분리되었다 (Table 2). 이 중 토종닭 1개 농가 (농가A)는 1차 및 2차 일제검사에서 모두 혈구응집능 바이러스가 분리되었다.

혈구응집능 바이러스가 분리된 농장 중 토종닭 1개 농가와 오리 2개 농가를 제외하고는 모두 뉴캐슬병 백신 접종을 실시한 농가였다. 바이러스가 분리된 가금의 연령은 3일령에서부터 730일령까지 다양하였다. 바이러스가 분리된 농가들은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 지리적으로 제주도내 고른 분포를 나타내었다.

NDV의 동정 및 생물학적 특성 조사

제주도에서 사육중인 가금류에서 분리된 혈구응집능 바이러스들이 NDV인지 여부를 동정하기 위하여 NDV를 특이적으로 검출하는 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 본 연구에서 분리한 총 24주의 혈구응집능 바이러스 모두에서 NDV를 공통적으로 검출하는 *i*-NDV Master (Common type) Mix를 사용한 RT-PCR에 의해 379 bp의 핵산이 특이적으로 증폭되었으나, 강독형 NDV만을 특이적으로 검출하는 *i*-NDV Master (Pathotype) Mix를 사용한 RT-PCR에서는 혈구응집능 분리주 모두에서 204 bp의 핵산 증폭산물 검출되지 않았다 (Table 3). 또한 SPF 닭 종란에서의 분리 바이러스의 독력을 조사한 결과, 본 연구에서 분리

Table 3. Genetic and biological characteristics of NDVs isolated in Jeju Province, Korea during 2007~2008 NDV surveillance

NDV isolate (Farm)	NDV RT-PCR ^a		Genotyping ^b		F0 motif sequence	Heat treatment		Mean death time
	Common	Pathotype	Class	Genotype		Before	After	
JJ/1A1/07 (A)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	512	64 ^c	>120
JJ/1A2/07 (A)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	512	64	>120
JJ/2A2/08 (A)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	512	128	>120
JJ/B1/07 (B)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	256	<4	>120
JJ/C1/07 (C)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	256	128	>120
JJ/C2/07 (C)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	512	<4	>120
JJ/C3/07 (C)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	256	128	>120
JJ/D1/07 (D)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	256	32	>120
JJ/D2/07 (D)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	64	<4	>120
JJ/E/07 (E)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	128	128	>120
JJ/F/08 (F)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	64	<4	>120
JJ/G2/08 (G)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	512	256	>120
JJ/H3/08 (H)	Positive	Negative	I	II	GRQGRLIG	128	<4	>120
JJ/I1/08 (I)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	1024	1024	>120
JJ/I2/08 (I)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	256	256	>120
JJ/J2/08 (J)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	512	256	>120
JJ/K1/08 (K)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	1024	32	>120
JJ/L1/08 (L)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	512	256	>120
JJ/M/08 (M)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	128	128	>120
JJ/N1/08 (N)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	512	512	>120
JJ/N2/08 (N)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	256	256	>120
JJ/N4/08 (N)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	4096	1024	>120
JJ/N6/08 (N)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	512	512	>120
JJ/N7/08 (N)	Positive	Negative	I	I	GKQGRLIG	2048	1024	>120

^a Common type, NDV-specific RT-PCR; pathotype, virulent NDV-specific RT-PCR.^b Genotyping was performed using phylogenetic analysis based on sequences of the F gene.^c The titer represents HA titer after treatment of NDV at 56°C, 30 min.

된 바이러스 24주 모두 120시간 이상의 MDT를 보였다 (Table 3). 따라서 본 연구에서 분리한 혈구응집능 분리주는 RT-PCR 검사 및 MDT 결과를 바탕으로 모두 약독형 NDV로 판정하였다.

총 14개 농가에서 분리된 NDV 24주에 대하여 바이러스의 생물학적 성상을 조사하기 위하여 내열성 검사를 실시하였다. 그 결과 9개 농가 (A, E, G, I, J, K, L, M, N)에서 내열성을 가진 바이러스 (총 92주)가, 3개 농가 (B, F, H)에서 내열성을 가지지 않은 바이러스 (총 3주)가, 그리고 2개 오리 농가 (A, C, D)에서 내열성을 가진 바이러스

(총 3주)와 내열성을 가지지 않은 바이러스 (총 2주)가 동시에 분리되었다 (Table 3).

NDV의 F 단백질 분절부위 분석

F 단백질의 분절부위의 병원성 motif를 분석하기 위하여 NDV F 단백질의 112번에서 119번 위치에 해당하는 아미노산 서열을 조사하였다. 본 연구에서 분리한 NDV는 모두 F 단백질의 분절부위는 Table 3에서 보는 바와 같이 약독형 NDV의 특징인 단염기성 (monobasic) 아미노산 염기서열의 motif를 가지고 있었다 (12, 16, 24). NDV

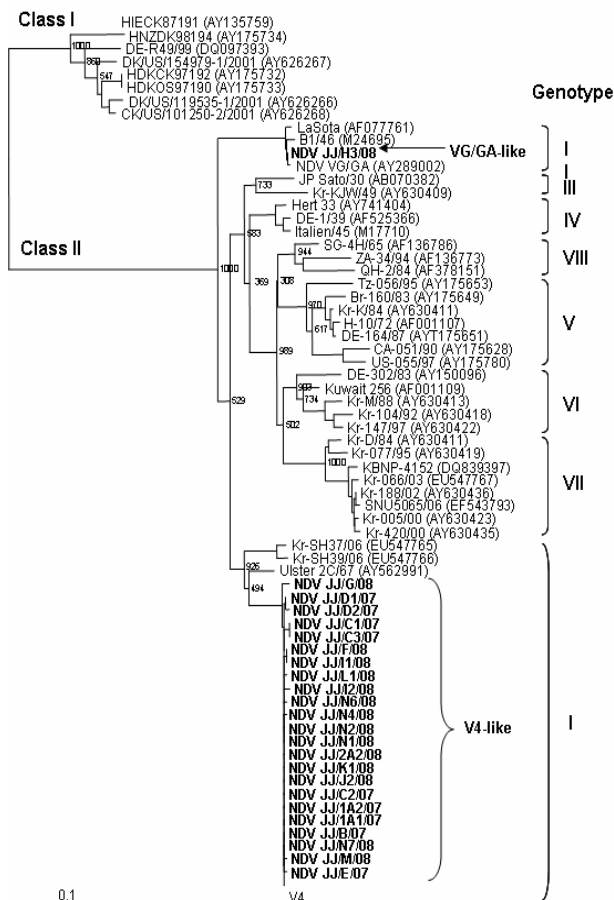


Figure 2. Phylogenetic analysis of NDV isolates based on the first 389 nucleotides of the coding region of the F gene. Sequences of reference strains were taken from the GenBank database. The accession numbers of reference strains were included in parenthesis. NDV isolates in bold represent NDV isolated in Jeju Province, Korea during 2007~2008 surveillance.

분리주 JJ/H3/08을 제외한 23주는 F 단백질 분절부위에 현재 국내에서 백신주로 사용하고 있는 V4-like NDV (DSB-HP주)와 동일한 ¹¹²GKQGRLLIG¹¹⁹의 motif를 가지고 있었다. 2차 검사시 H 농장의 토종닭에서 분리된 NDV 1주는 F 단백질 분절부위에 현재 국내에서 백신주로 사용하고 있는 VG/GA주, B1주, LaSota주 등과 동일한 ¹¹²GRQGRLLIG¹¹⁹의 motif를 가지고 있었다.

NDV 분리주의 유전계통 분석

본 연구에서 분리한 NDV 분리주들의 F 단백질의 N 말단부위 389개의 핵산 염기서열을 취하여 유전계통 분류학적 분석을 실시하였다 (Fig. 2). 그 결과 본 연구를 통하여 제주도에서 분리한 NDV 24주들은 유전계통 분류

학적으로 모두 class II에 속하는 바이러스였다. 그 중 23개 분리주는 genotype I에 속하였다. Genotype I에 속하는 NDV 분리주 23주는 백신주인 V4주와 유전적 관련성이 가장 높은 것으로 분석되었다 (V4-like NDV). 제주도 토종닭 농가에서 분리한 NDV 분리주 JJ/H3/08은 genotype II로 분류되었다. NDV 분리주 JJ/H3/08은 백신주로 사용 중인 VG/GA주와 가장 높은 관련성을 보였다 (VG/GA-like NDV).

NDV 분리주를 대상으로 F 단백질 유전자의 N 말단 부위의 389 bp의 핵산 염기서열만을 취하여 기존 백신주와 염기서열 상동성을 분석하였다. V4-like NDV 분리주들은 V4 백신주와 99.2~100%의 높은 상동성을 나타내었으나, 다른 백신주인 VG/GA 백신주와는 87.1~87.6%의 상동성을 보였다. 또한, VG/GA-like NDV 분리주 JJ/H3/08은 VG/GA 백신주와 99.7%의 높은 상동성을 나타낸 반면, V4 백신주와는 87.9%의 상동성을 보였다. F 단백질 유전자의 과가변 부위 (아미노산 4번째에서 32번째 부위까지)의 아미노산을 비교 분석하였다 (Table 4). 그 결과, V4-like NDV 분리주 중 23주 중 19주가 V4 백신주와 동일한 아미노산 서열을 가지고 있었다. C 농장유래 NDV 분리주 2주 (JJ/C1/07, JJ/C3/07)와 D 농장유래 NDV 분리주 2주 (JJ/D1/07, JJ/D2/07)는 14번째 아미노산에서 M (methionine)에서 V (valine)으로, 4번째 아미노산에서 R (arginine)에서 G (glycine)으로 각각 1개의 아미노산이 교체되어 있는 것이 발견되었다. 한편 VG/GA-like NDV 분리주 JJ/H3/08은 VG/GA 백신주와 100% 동일한 아미노산 서열을 가지고 있었다.

고 찰

본 연구를 통하여 제주도에 사육중인 가금류들을 대상으로 뉴캐슬병 일제조사를 실시하여 2005년 최종발생이 후 제주도에 실제로 뉴캐슬병 발생이 없는 지 조사하고자 하였다. 이를 위하여 최근 2년간 두 번에 걸쳐 제주도에 전체 가금류 사육 농가 대상 6,405수 가금조류 및 야생조류 80수 등 총 6,485수의 조류를 대상으로 조사하였다. 조사 당시 제주도의 경우 모든 가금류에 대하여 뉴캐슬병 예방접종 정책을 실시하고 있었기 때문에 임상관찰과 함께 호흡기 상기도와 총배설장 swab 시료를 채취하여 바이러스 검사를 실시하는 데 주안점을 두었다.

본 연구를 통하여 제주도에서의 뉴캐슬병 일제조사

Table 4. Amino acid changes in hyper-variable region of fusion protein of NDV isolates

NDV isolate (Farm)	Amino acid at position														
	4	5	8	9	11	13	14	17	20	22	26	29	30	32	33
JJ/1A1/07 (A)	R	S	R	I	V	L	M	V	M	A	V	T	S	A	L
JJ/1A2/07 (A)
JJ/2A2/08 (A)
JJ/B1/07 (B)
JJ/C1/07 (C)	V
JJ/C2/07 (C)
JJ/C3/07 (C)	V
JJ/D1/07 (D)	G
JJ/D2/07 (D)	G
JJ/E/07 (E)
JJ/F/08 (F)
JJ/G2/08 (G)
JJ/H3/08 (H)	R	P	K	V	A	M	M	I	A	A	I	A	N	S	I
JJ/I1/08 (I)
JJ/I2/08 (I)
JJ/J2/08 (J)
JJ/K1/08 (K)
JJ/L1/08 (L)
JJ/M/08 (M)
JJ/N1/08 (N)
JJ/N2/08 (N)
JJ/N4/08 (N)
JJ/N6/08 (N)
JJ/N7/08 (N)
V4 (vaccine)
VG/GA (vaccine)	R	P	K	V	A	M	M	I	A	A	I	A	N	S	I

기간 동안 14개 가금 농가에서 총 24주의 NDV를 분리하였다. 이들 분리 바이러스는 모두 class II에 속하는 genotype I 또는 II에 속하는 약독형 NDV였다. 현재 OIE는 중간독 이상의 독력을 가진 NDV에 감염된 경우에 한하여 뉴캐슬병을 정의하고 있다 (13). 그러므로 본 연구의 NDV 분리 농장은 독력이 없는 NDV가 분리되었기 때문에 뉴캐슬병 발생으로 간주되지 않는다.

NDV F 유전자의 N 말단 과가변 부위는 NDV genotype 분류 또는 유전계통 분석을 위한 주된 유전자 부위로 사용되고 있다 (8~11, 20~22, 25). 그러므로 본 연구에

서도 이 유전자 부위를 대상으로 유전자 분석을 실시하였다. 본 연구에서 분리된 바이러스들은 크게 V4 백신주와 가장 유전적으로 높은 관련성 (99.2~100%의 상동성)을 가진 V4-like NDV 분리주와 VG/GA 백신주와 가장 높은 상동성 (99.7%)을 가진 VG/GA-like NDV로 분류되었다. 조사 당시 제주도내 사육 농장의 가금류에서는 V4 백신주나 VG/GA 백신주들이 생독 (live) 백신으로서 광범위하게 사용하고 있었다. 이러한 사실을 감안해 볼 때 이들 분리 바이러스들은 NDV 생독백신 바이러스일 가능성이 높다고 판단된다.

바이러스가 분리된 농가의 가금 축종을 분석해 보면 제주도내 대부분을 차지하는 육계 (2개 농가)나 산란계 (1개 농가)보다는 토종닭 (5개 농가), 오리 (4개 농가), 꿩 (2개 농가)에서 상대적 바이러스 분리 빈도가 높았다. 이들 농가들에서의 구체적인 생독백신 접종시기 등 백신 접종 내력을 확보하지 못해 아쉬운 점이 있지만, 이들 농가들에서 일제검사 직전에 생독백신 접종이 이루어졌을 가능성이 높다고 판단된다.

또 다른 측면에서 보자면, 본 연구를 통하여 제주도에 서 분리된 NDV의 79% (19/24주)가 내열성 NDV라는 사실에 주목할 필요가 있다. 이들 내열성 바이러스는 내열 성이 없는 바이러스에 비해 상대적으로 환경에서보다 오랜 기간 동안 농장내 생존할 수 있기 때문에 내열성 바이러스가 비내열성 바이러스에 비해 상대적으로 많이 분리되었을 수 있다고 판단된다. 내열성 백신 바이러스의 장기간 농장내 잔존 가능성을 뒷받침 해 줄 만한 사례가 A 농장이다. A 농장의 경우 2007년 말에 백신접종한 토종닭에서 내열성의 V4-like NDV가 분리되었다. 그 후 2008년 하반기 동일 농장에서 백신접종하지 않은 새로운 토종닭 계군에서도 내열성의 V4-like 바이러스가 분리되었다.

흥미롭게도 오리사육 농가 C와 D의 경우 같은 농가 내에서 내열성이 있는 V4-like NDV와 내열성이 없는 V4-like NDV가 동시에 분리되었다. NDV 생독백신을 접종한 적이 없는 국내사육 가금오리에서의 V4-like 바이러스들이 분리 보고된 사례가 있으며, 일본 등 여러 나라에서도 NDV가 야생조류에서 약독형 NDV가 분리 보고된 바가 있다 (26~33). 그러므로 이들 농장내 성상이 다른 두 종류의 바이러스의 분리는 백신 바이러스뿐만 아니라 가금 농장내 오리들 사이에서 자연적으로 존재하고 있는 heterogenous한 V4-like NDV의 존재 가능성도 배제할 수 없다.

현재 제주도의 경우 뉴캐슬병 백신접종 의무화 정책을 추진하고 있기 때문에 제주도의 대부분 가금 개체들은 뉴캐슬병 백신항체를 보유하고 있는 실정이다. 2006년 당시 육계 1,800수를 대상으로 한 뉴캐슬병 ELISA 검사결과 91.4%, 산란계 3,000수를 대상으로 HI 검사결과 100%의 양성율을 나타내었다 (34). 2007년과 2008년의 경우에도 제주도 가금 개체에서의 백신바이러스에 대한 항체 보유율 상황은 장 등의 보고와 유사할 것으로 판단된다. 여기에서 중요한 부분은 백신접종에 의해 형성된

항체와 강독형 NDV에 의한 야외감염 항체를 감별할 수 있는 검사방법이 현재까지 개발되어 있지 않다는 점이다. 그러므로 뉴캐슬병 혈청 검사에 의한 야외감염 여부를 판단하기 위해서는 동일 농장 계군에서 최소 2주 간격으로 항체 검사를 실시하여 항체증감 여부를 조사해야 하는 번거로움이 있다. 또한 뉴캐슬병 백신 보강접종 여부 및 그 시기 등 여러 요인을 감안하여야 하므로 야외감염 여부를 판단하는 것은 매우 어려운 실정이다. 그러므로 본 연구에서 국내 가금류에 대한 뉴캐슬병 혈청검사 및 분석을 실시하지 않았다.

본 연구를 통하여 제주도내 가금 사육 전 농가를 대상으로 바이러스 검사를 실시한 결과 강독형 NDV가 분리 또는 검출된 농장은 없었다. 이 결과는 실제 제주도 사육 가금류들 사이에서 강독형 NDV가 존재하지 않을 가능성이 높다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 야생조류의 신선한 분변을 대상으로 NDV 검사를 실시했지만 바이러스는 분리되지 않았다. 본 연구를 통하여 매우 제한된 수의 야생조류를 대상으로 바이러스 검사를 실시하였기 때문에 야생조류에서의 바이러스가 분리되지 않았다고 해서 실제로 야생조류가 NDV를 가지고 있지 않다고 판단하기 힘들다. 그러므로 향후 야생조류에 대한 예찰을 확대 강화하여 이들 야생조류가 NDV를 보유하고 있는 지 그리고 만약 존재한다면 가금 농장에서 분리되는 바이러스와 어떤 관련성이 있는 지 밝혀 볼 필요가 있다.

참 고 문 헌

- 1) Alexander DJ. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. *Disease of Poultry*. 11th ed. Iowa: Iowa State University Press; 2003. p.63-100.
- 2) Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2001. p.1305-1340.
- 3) Dutch RE, Hagglund RN, Nagel MA, Paterson RG, Lamb RA. Paramyxovirus fusion (F) protein: a conformational change on cleavage activation. *Virology* 2001;281:138-50.
- 4) Lamb RA. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 1993;197:1-11.
- 5) Morrison TG. Structure and function of a paramyxovirus

- fusion protein. *Biochim Biophys Acta* 2003;1614:73-84.
- 6) Kim LM, King DJ, Curry PE, Suarez DL, Swayne DE, Stallknecht DE, Slemons RD, Pedersen JC, Senne DA, Winker K, Afonso CL. Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J Virol* 2007;81:12641-53.
 - 7) Seal BS, Wise MG, Pedersen JC, Senne DA, Alvarez R, Scott MS, King DJ, Yu Q, Kapczynski DR. Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Vet Microbiol* 2005;106:7-16.
 - 8) Liu XF, Wan HQ, Ni XX, Wu YT, Liu WB. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Arch Virol* 2003;148:1387-403.
 - 9) Liu H, Wang Z, Wu Y, Zheng D, Sun C, Bi D, Zuo Y, Xu T. Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005. *J Virol Methods* 2007;140:206-11.
 - 10) Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol* 2003;32:239-56.
 - 11) Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordany A, Kaleta EF, Werner O, Meulemans G, Jorgensen PH, Mante AP, Gielkens AL, Capua I, Damoser J. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol* 1998;143:49-64.
 - 12) Toyoda T, Sakaguchi T, Imai K, Inocencio NM, Gotoh B, Hamaguchi M, Nagai Y. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* 1987;158:242-7.
 - 13) World Organisation for Animal Health. Chapter 2.3.14 Newcastle disease. In: Office International des Epizooties. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6th ed. Paris: Office International des Epizooties;2008. p576-589.
 - 14) de Leeuw OS, Koch G, Hartog L, Ravenshorst N, Peeters BP. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J Gen Virol* 2005;86:1759-69.
 - 15) Garten W, Berk W, Nagai Y, Rott R, Klenk HD. Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity. *J Gen Virol* 1980;50:135-47.
 - 16) Nagai Y. Protease-dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends Microbiol* 1993;1:81-7.
 - 17) Peeters BP, de Leeuw OS, Koch G, Gielkens AL. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* 1999;73:5001-9.
 - 18) Kim JH, Song CS. Consideration of cause of recent severe outbreak of Newcastle disease in Korea and a brief review of virological differences, serological diagnosis and administration of a vaccine. *Kor J Poult Sci* 1992;19:65-76.
 - 19) Kwon HJ, Cho SH, Ahn YJ, Seo SH, Choi KS, Kim SJ. Molecular epidemiology of Newcastle disease in Republic of Korea. *Vet Microbiol* 2003;95:39-48.
 - 20) Lee YJ, Sung HW, Choi JG, Kim JH, Song CS. Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. *Avian Pathol* 2004;33:482-91.
 - 21) World Organisation for Animal Health. 2008. Chapter 10.13 Newcastle disease. In: Office International des Epizooties. Terrestrial animal helath code. 6th ed. Paris: Office International des Epizooties: 2008. http://www.oie.int/eng/normes/MCode/en_chapitre_1.10.13.htm.
 - 22) Alexander, D.J., 1988b. Newcastle disease diagnosis. In: Alexander, D.J. (Ed.), Newcastle Disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, 147-60.
 - 23) Alexander DJ. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J Comp Pathol* 1995;112:105-26.
 - 24) Collins MS, Bashiruddin JB, Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch Virol* 1993;128:363-70.
 - 25) Ke GM, Liu HJ, Lin MY, Chen JH, Tsai SS, Chang PC. Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan. *J Virol Methods* 2001;97:1-11.
 - 26) Alexander DJ, Spackman D, Allan WH, Borland L. Isolation of Newcastle disease virus from a wild mallard duck (*Anas*

- platyrhynchos*). Vet Rec 1979;105:328-9.
- 27) Gould AR, Kattenbelt JA, Selleck P, Hansson E, Della-Porta A, Westbury HA. Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. Virus Res 2001;77: 51-60.
- 28) Hanson BA, Swayne DE, Senne DA, Lobpries DS, Hurst J, Stallknecht DE. Avian influenza viruses and paramyxoviruses in wintering and resident ducks in Texas. J Wildl Dis 2005; 41:624-8.
- 29) Kawamura M, Nagata-Matsubara K, Nerome K, Yamane N, Kida H, Kodama H, Izawa H, Mikami T. Antigenic variation of Newcastle disease viruses isolated from wild ducks in Japan. Microbiol Immunol 1987;31:831-5.
- 30) Peroulis I, O'Riley K. Detection of avian paramyxoviruses and influenza viruses amongst wild bird populations in Victoria. Aust Vet J 2004;82:79-82.
- 31) Stanislawek WL, Wilks CR, Meers J, Horner GW, Alexander DJ, Manvell RJ, Kattenbelt JA, Gould AR. Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. Arch Virol 2002;147: 1287-302.
- 32) Takakuwa H, Ito T, Takada A, Okazaki K, Kisa H. Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. Jpn J Vet Res 1998;45: 207-15.
- 33) Vickers ML, Hanson RP. Characterization of isolates of Newcastle disease virus from migratory birds and turkeys. Avian Dis 1982;26:127-33.
- 34) Jang HJ, Jung BY, Kim ST, Kwon KB, Rho SM, Park CK. Nationwide seroprevalance of Newcastle disease for recent 5 years in Korea. Kor J Vet Publ Hlth 2007;31:249-255.
-