

In situ RT-PCR 및 *In situ* hybridization 기법에 의한 닭 뉴캐슬병의 진단법 개발

박남용*, 최효임, 조호성, 강성귀, 조경오, Corrie Brown¹

전남대학교 수의과대학, ¹미국 조지아 수의과대학

(게재승인 : 2002년 8월 21일)

Development of Diagnostic Techniques for Newcastle Disease in Chickens by *In Situ* RT-PCR and *In Situ* Hybridization

Nam-Yong Park*, Hyo-Im Choi, Ho-Seong Cho, Sung-Kwi Kang, Kyoung-Oh Cho and Corrie Brown¹

Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

¹Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine,
University of Georgia, Athens, Georgia 30602-7388, USA

(Accepted : August 21, 2002)

Abstracts : Newcastle disease (ND) is a highly contagious infection of poultry. Two pathology-based techniques, *in situ* RT-PCR and *in situ* hybridization (ISH) were applied to formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from chickens naturally infected with velogenic ND virus (VNDV). Two pairs of primers and a probe for ISH and *in situ* RT-PCR, respectively, were selected from highly conserved region of matrix gene of NDV. The ISH experiment was carried out using MicroProbe™ capillary action system within 2 hours. *In situ* RT-PCR was performed using MicroProbe™ capillary action system and GeneAmp *In Situ* PCR system. With ISH and *in situ* RT-PCR, viral nucleic acid was detected in the central nervous system of chickens from infected with neurotropic velogenic Newcastle disease virus (NVNDV), whereas viral nucleic acid was detected in various organs or tissues of chickens from infected with viscerotropic velogenic Newcastle disease virus (VVNDV). In the NVND group, positive signals were characteristically defined in the cytoplasm of neuron, vascular endothelial cells, and perivascular mononuclear macrophages in the central nervous system. One of NVND group, chicken from one farm exhibited positive signals in the bronchial epithelium. The VVND group chickens showed positive reaction in the macrophages, vascular endothelium, and bronchiolar epithelium. Markedly, viral nucleic acid was detected in the macrophages of morphologically normal tissues which were peripheral or located in distant areas from lesions. The central nervous system of chickens infected with VVND virus had positive signals in the vascular endothelial cell, perivascular mononuclear macrophages and some neuron. The number and intensity of the positive cells by *in situ* RT-PCR were more and stronger, respectively, in comparison with those by ISH. Particularly, positive reaction was detected in macrophages infiltrating in cardiac muscle by *in situ* RT-PCR, but not obtained by ISH. Therefore, these results demonstrated that ISH is a rapid diagnostic method for detection of NDV and *in situ* RT-PCR can be used as an efficient method for detection of low viral load infection or subclinical viral infection of NDV.

Key words : Newcastle disease virus, *in situ* hybridization, *in situ* RT-PCR

이 논문은 2001년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음

* Corresponding author: Dr. Nam-Yong Park, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea (E-mail : nypark@chonnam.ac.kr)

서 론

뉴캐슬병(Newcastle disease; ND)은 1926년 인도네시아의 Java에서 최초 발생 보고된 이후 국내를 비롯하여 전 세계적으로 심각한 경제적 피해를 야기하는 질병으로 야생조류를 포함한 전 조류가 감수성을 갖고 있으며 폐사율과 전염성이 매우 강해 국내에서는 제1종 법정전염병으로, 해외에서는 Office International Epizootics list A로 분류되고 있다^{1,2}.

뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus; NDV)는 Paramyxoviridae, *Rubulavirus*의 Paramyxovirus type 1에 속하는 바이러스로 병원성에 따라 강독주(velogenic strain), 중독주(mesogenic strain), 약독주(lentogenic strain)로 구분되며 NDV 강독주는 임상증상에 따라 신경친화형 NDV (neurotropic form)와 내장친화형 NDV (viscerotropic form)로 분류된다^{1,3}. genome으로 negative sense single strand RNA를 갖는 NDV는 NP (nucleoprotein), P (phosphoprotein), M (matrix protein), F (fusion protein), HN (hemagglutinin-neuraminidase protein), L (RNA-directed RNA polymerase)의 6가지 단백질을 생산하는 유전자들을 코딩하고 있는데, 이 중 F 유전자와 HN 유전자는 NDV의 병원성과 직접 관련된 것으로 알려져 있다⁴. 특히 F 유전자는 강독주와 약독주의 아미노산 구성이 서로 달라서 이 유전자의 아미노산 분석을 통하여 바이러스의 병원성을 감별할 수 있다^{4,6}. 이에 반해 M 유전자는 핵산 염기서열이 병원성에 따라 차이가 거의 없는 보존성이 높은 부위로 알려져 있다⁷.

국내에서 사용되는 ND 진단방법에는 혈구응집반응(HA) 및 혈구응집억제반응(HI)⁸, 바이러스 중화시험, ELISA⁹ 등의 혈청학적 검사와 바이러스의 분리 및 계대아 접종시험 등이 있다. 그러나, 혈청학적 검사는 다른 혈청형 특히 PMV-3에 교차반응 하거나 백신에 의한 위양성 반응을 나타낼 수 있으며, 심급성 경과시에는 위음성으로 진단될 수 있다¹⁰. 또한 이러한 혈청학적 검사는 백신주로 사용되는 NDV 약독주와 야외 감염주를 감별 진단하기에는 한계가 있다. 바이러스의 분리 및 계대아 접종시험은 ND를 정확하게 진단할 수 있으나 바이러스 분리시 4~7일의 배양시간과 많은 노력이 요구되는 단점이 있다^{1,10}.

현재 민감도가 높은 방법으로 인정받고 있는 RT-PCR 기법은 세포 및 조직의 형태를 유지할 수 없다는 단점을 가지고 있다¹¹. 이에 반해 *in situ* hybridization (ISH) 기법은 직접 조직이나 세포의 도말 표본을 대상으로 probe와 상보적인 조직내 표적 염기서열간에 유전자 교잡이 일어나는 원리를 이용한 진단기법으로 세포 및 조

직의 형태를 유지할 수 있는 장점이 있다¹². 이러한 ISH와 RT-PCR의 장점을 접목시켜 응용 개발된 *in situ* RT-PCR 기법은 민감도가 높은 진단기법으로 인정받고 있다¹³.

이에 본 실험의 목적은 ISH와 *in situ* RT-PCR 기법을 이용하여 ND가 감염된 조직에서 NDV 핵산의 소재를 파악하는 것이다. 또한 ND의 신속·정확한 진단을 위한 분자생물학적 기법을 확립하고, 두 기법간의 민감도를 상호 비교·분석하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

국내 양계 농장에서 병력, 임상 증상 및 병리조직학적 검사를 통해 NDV 강독주에 자연 감염된 다섯 농장을 대상으로 하였다. 각 농장에서 ND의 임상증상을 보인 개체 중에서 무작위로 10 마리씩 추출하여 본 실험에 사용하였으며 양성 대조군으로는 La Sota 바이러스주가 실험 접종된 14일령 계태아의 요막을 이용하였고 음성 대조군으로는 ND의 백신 접종을 하지 않았고, 혈청학적 검사상 ND를 비롯한 다른 질병에 대한 감염이 일어나지 않은 두 농장에서 무작위로 5 마리씩 선별하여 실험에 이용하였다. 본 실험에 선별된 농장에 대한 일반적인 정보는 Table 1과 같다.

뉴캐슬병의 병원형은 Alexander *et al*¹에 의한 역학조사 및 임상증상에 준하여 분류하였다. 신경친화형 ND는 계사내의 거의 대부분 닭들이 급성의 호흡기 증상(호흡 곤란)을 보인 후, 사경, 진전, 편측성 부전마비 등의 신경증상을 보이는 것으로 폐사율은 50~90%인 경우이며, 내장친화형 ND는 계사내의 거의 대부분 닭들이 급성의 호흡기 증상, 안면부종 및 설사 등의 임상증상과 90% 이상의 폐사율을 보인 경우이다. 선별된 농장의 닭들에 대한 임상증상 및 병리조직학적 소견을 Table 2에 정리하였다.

부검시 채취한 시료는 10% 중성 포르말린 고정 후 파라핀 포매하고 3 μ m로 연속 절편하여 ISH를 위한 ProbeONTM Plus 슬라이드(Fisher Biotech^R, New York, USA)와 *in situ* RT-PCR을 위한 *in situ* PCR glass 슬라이드(Perkin Elmer, Co., New York, USA)에 부착시켰다.

RT-PCR

바이러스 RNA의 추출

자연 발생증체의 파라핀 블럭에서 바이러스 RNA를 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 먼저, 10 μ m 조직 절편 5장이 들어있는 튜브내에 proteinase K (10mg/ml) 10 μ l

Table 1. Conditions of samples

Patho-type	Farms	Scale of farms (head)	Ages (days)	Vaccination ages (days)				
				ND (Newcastle disease)	IB (infectious bronchitis)	IBD (infectious bursal disease)	ILT (infectious laryngotracheitis)	AE (avian encephalomyelitis), FP (fowl pox)
NVNDV	A	20,000	47	4, 14	4, 14	21, 29	-	-
	B	10,000	31	10	1, 7	-	12	-
	C	10,000	30	2	7, 20	-	12	-
VVNDV	D	4,000	30	1	7	2	13	-
	E	10,000	50	4	15	7	5	49
Negative control	F	10,000	10	-	7	2	-	-
	G	10,000	30	-	7, 15	2	12	1

* NVNDV : neurotropic velogenic Newcastle disease virus.
 VVNDV : viscerotropic velogenic Newcastle disease virus.
 - : no vaccination.

Table 2. Clinical signs and histopathology of chicken infected with velogenic Newcastle disease virus

Patho-type	Farms	Clinical sign				Histopathology				
		Increased respiration	Diarrhea	Nervous sign	Proventri-culus Hemorrh-age	Vasculitis in Parenchy-mal tissue	Lymphoid necrosis	Pneu-monia	Necrotiz-ing enteritis	perivas-cular cuffing, gliosis
NVNDV	A	+	+	+++	-	+	-	+	-	+++
	B	++	+	+++	-	-	-	+	-	+++
	C	-	-	++	-	+	-	-	-	++
VVNDV	D	++	++	+	+++	+	++	++	+++	+
	E	++	++	-	++	-	+++	++	+	+
Negative control	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* - : no detection, + : slight, ++ : moderate, +++ : extensive.

가 포함된 digestion buffer [10mM Tris (pH 7.4), 100mM NaCl, 25mM disodium EDTA, 0.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS)] 500 μ l에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 소화시켰다. 핵산을 추출하기 위해 500 μ l의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) (acid phenol, pH 4.4) 혼합액을 넣고 8,000 g에서 5분 원심분리(Hettich, Tuttlingen, Germany) 후 상층액을 취한 다음 동량의 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 혼합액을 넣고 8,000 g에서 5분 동안 원심분리 하여 상층액을 분리·수거하였다. 상층액과 동량의 isopropanol과 이것의 1/4 부피의 8M ammonium acetate를 첨가하였다. 침전된 핵산의 양

을 증가시키기 위한 carrier로 각 튜브당 glycogen (10mg/ml) 2 μ l을 첨가하여 잘 섞은 후 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 냉동 보관하였다. 이후 16,000 g에서 10분 동안 원심분리 후 상층액을 버리고, 염을 제거하기 위해 70% ethanol 200 μ l로 침전물을 3회 세척하였다. 이후 상층액을 버리고, 침전물을 실온에서 건조시킨 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 멸균증류수 20 μ l로 침전물을 용해시켰다. 이렇게 추출된 RNA는 -70 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

양성 대조군으로는 NDV의 백신주인 La Sota 바이러 스주가 접종된 14일령 계태아의 양막액(중앙가축전염병

연구소, 한국)을 사용하였으며 QIAamp HCV kit (QIAGEN Co., Hilden, Germany)를 이용하여 제조사 사용설명서에 따라 바이러스 RNA를 추출하였다. 음성대조군으로는 NDV가 감염되지 않은 닭의 파라인 포매 조직에서 상술한 대로 바이러스의 RNA를 추출하였다.

Primer

Oligonucleotide primer는 GenBank에 보고된 NDV의 M 유전자(GenBank accession# U25833) 중 보존성이 높은 부위에서 선택하였다^{7,14,15}. Sense primer의 염기서열은 5'-TCG AGI CTG TAC AAT CTT GC-3' (ND-F)이며, antisense primer의 염기서열은 5'-GTC CGA GCA CAT CAC TGA GC-3' (ND-R)이다. Primer는 바이오니아(대전, 한국)에 의뢰하여 제작하였으며 이 primer에 의하여 증폭되는 산물 크기는 232 bp이다.

RT-PCR

추출된 바이러스를 RT-PCR로 증폭하기 위해 GeneAmp PCR System 2400 Thermal Cycler (Perkin Elmer Co., New York, USA)를 이용하였으며 RT-PCR 방법은 one step single tube method로 실시하였다. RT-PCR을 실시하기 전에 역전사 효소가 잘 반응할 수 있도록 바이러스 RNA 5 μ l에 DMSO 1 μ l을 잘 섞어 70 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응시킨 후 5분간 얼음속에 보관하였다. RT-PCR 반응액은 10X buffer [Mg²⁺ free, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X100] 5 μ l, 25mM MgCl₂ 5 μ l, 2.5mM dNTP Mixture 4 μ l, 40 unit RNase inhibitor (RNasin, Promega Co., Madison, USA) 0.5 μ l, 50 pmole ND-F 1 μ l, 50 pmole ND-R 1 μ l, 10 unit AMV reverse transcriptase (Promega Co., Madison, USA) 0.5 μ l, 5 unit Taq polymerase (Promega Co., Madison, USA) 0.5 μ l, RNase free distilled water 26.5 μ l를 각각 혼합하여 총 50 μ l의 RT-PCR 반응액을 만든 후 42 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 역전사 반응을 실시하고 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 역전사 효소를 불활화시킨 다음 PCR 과정은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 50 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 한 cycle로 35회 반복하여 수행하였다. RT-PCR 증폭 산물은 ethidium bromide (EtBr)로 염색된 2% agarose gel에서 전기영동 후 UV transilluminator 상에서 관찰하였다.

Sequencing

RT-PCR을 통하여 얻은 232 bp 증폭산물의 염기서열을 확인하기 위해 sequencing을 수행하였다. 증폭산물을 GENE CLEAN II kit (BIO 101 Inc., Carlsbad, USA)를 이용하여 정제한 후 기초과학연구원 연구소 광주분원(광주,

한국)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

In situ Hybridization (ISH)

ISH에 사용할 probe의 제작을 위해 RT-PCR 증폭산물을 SUPRECTM-02 (TaKaRa, Kyoto, Japan)로 여과시켜 primer와 dNTP 및 잔존 oligonucleotides를 제거하였다. 이후 Biotin-Chem-Link kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 이용하여 biotin을 표지하였다. 표지된 DNA는 파장 260nm에서 흡광도를 측정 (Pharmacia Biotech Co., Cambridge, England)하여 정량한 후 Brigati probe diluent (Research Genetics, Huntsville, USA)와 Hybridization cocktail (Amresco^R, Ohio, USA)로 최종 농도 1 μ g/ml이 되도록 희석하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 ISH에 사용하였다.

ISH는 박 등¹⁶의 방법을 응용하였는데 MicroProbeTM capillary action system (Fisher Biotech^R, New York, USA)을 이용하여 2시간 이내에 모든 과정을 마쳤다. Histochoice (Dewaxing agent, Amresco^R, Ohio, USA)를 사용하여 110 $^{\circ}$ C에서 2분씩 5회 탈파라인 과정을 거치고, 함유과정 후 pepsin (Research Genetics, Huntsville, USA)을 110 $^{\circ}$ C에서 4분 반응시킴으로써 조직소화처리 과정을 수행하였다. 이 후 cDNA probe를 넣고 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킴으로써 두 가닥의 DNA probe를 한 가닥으로 변형시켰다. probe가 조직내의 표적 바이러스 핵산과 잘 결합하도록 40 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 반응시킨 다음 발색과정에서 비특이적인 반응을 일으킬 수 있는 내인성 peroxidase를 제거하기 위해 methanol과 3% H₂O₂가 함유된 Autoblocker (Research Genetics, Huntsville, USA)를 이용하여 50 $^{\circ}$ C에서 4분 동안 반응시켰다. 이후 streptavidin-HRP (ZyMaxTM Grade, Zymed Lab., Inc, San Francisco, USA)를 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시키고 streptavidin-HRP와 발색제의 결합을 증대시키기 위해 Probe Lock (Chromogen Enhancer, Research Genetics, Huntsville, USA)을 사용하였다. 발색 반응은 aminoethylcarbazole (AEC) substrate kit (Zymed Lab., Inc, San Francisco, USA)와 diaminobenzidine (DAB) substrate kit (Vector Lab., Inc, Burlingame, USA)를 이용하였고, 대조염색은 Autohe-matoxylin (Research Genetics, Huntsville, USA)으로 실시하였다. 이후 증류수로 세척하고 Universal mount (Research Genetics, Huntsville, USA)로 봉입한 후 광학현미경상에서 양성반응을 관찰하였다.

In situ RT-PCR

In situ RT-PCR 기법의 수행 과정은 Park et al.¹⁷의 방법을 변형하여 사용하였다. 준비된 슬라이드를 110 $^{\circ}$ C에

서 Histochoice로 2분씩 5회 탈파라핀 과정 및 합수과정을 거친 후 proteinase K (20 μ g/ml)로 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 조직을 소화처리 하였다. 1 \times Immuno/DNA Buffer (Research Genetics)에 5분간 완충시켜 잔류 proteinase K를 희석시킨 후 탈수과정을 거쳐 조직내에서 RT-PCR 반응을 수행하였다. 이 과정은 GeneAmp In Situ PCR System 1000 Thermal Cycler (Perkin Elmer, Co., USA)를 이용하였다. 반응 시간과 온도는 RT-PCR 과정의 조건과 동일하게 실시하였으며, 반응액의 조성은 1mM Biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim Co., Germany) 0.6 μ l를 첨가시키는 것을 제외하고는 RT-PCR 반응액과 동일하였다. 조직내에서의 RT-PCR 과정 후 조직내 내인성 peroxidase를 제거하기 위한 Autoblocker (Research Genetics, USA)와 streptavidin-HRP (ZyMaxTM Grade, Zymed Lab., Inc, USA)를 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시켰다. 발색 반응은 AEC substrate kit (Zymed Lab., Inc, USA)와 DAB substrate kit (Vector Lab., Inc, USA)를 이용하였고, 대조염색은 Autohematoxylin (Research Genetics, USA)으로 실시하였다. 이후 증류수로 세척하고 Universal mount (Research Genetics, USA)로 봉입한 다음 광학현미경상에서 양성반응을 관찰하였다.

결과의 평가

ISH 및 IS-PCR의 결과에 대한 평가는 광학현미경 400 배 배율에서 임의로 10개의 시야를 선정하여 한 시야당 양성세포의 수를 측정한 바, 양성세포수가 100개 이상 일 경우(+++), 10-100개 일 경우(++), 1-10개일 경우(+)로 분류하였다.

결 과

RT-PCR에 의한 바이러스 핵산의 증폭

RT-PCR 결과는 Fig. 1과 같다. 백신주인 La Sota 바이러스주에서 추출한 양성대조군(lane 1)과 자연 발생증례(lanes 2-6)에서 232 bp의 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었다. 또한 음성대조군(lanes 7-8)에서는 증폭산물이 확인되지 않았다.

Sequencing

RT-PCR을 통해 얻은 232 bp 길이의 DNA 증폭산물이 제작한 primer쌍에 의해 증폭된 특이 산물인지를 확인하기 위하여 염기서열을 분석한 결과, 기존에 보고되었던 NDV M 유전자의 핵산 염기서열 부위와 100% 상동성을 보였다(결과제시 없음).

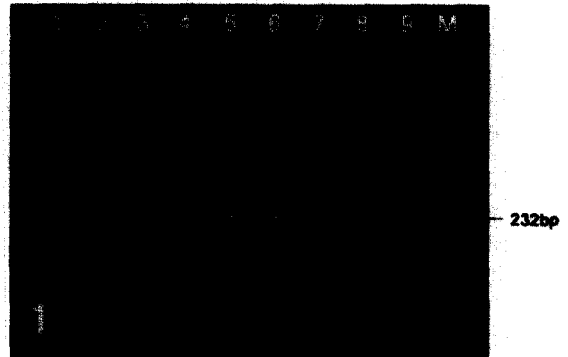


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product (232 bp) of Newcastle disease virus matrix gene. Lane 1 : La Sota strain (positive control), lanes 2-4 : chicken naturally infected by neurotropic velogenic Newcastle disease virus, lanes 5-6 : chicken naturally infected by viscerotropic velogenic Newcastle disease virus, lanes 7-8 : chicken mock infected, lane 9 : mock (No RNA template), M : 100 bp marker.

ISH에 의한 바이러스 핵산의 검출

Biotin 표지 DNA probe을 이용하여 MicroProbeTM capillary action system 하에서 ISH의 전 과정을 2시간 이내에 신속하게 수행하였다. 자연 발생된 신경친화형 ND로 분류된 닭에서 양성반응은 Table 3에 정리된 바와 같이 주로 중추신경조직에서 관찰되었다. ISH에 양성반응을 보인 세포들은 주로 신경세포(Fig. 2a), 혈관내피세포 및 혈관주위 단핵 대식세포의 세포질이었다. 또한 한 농장(Table 3, A 농장)에서는 기관지 상피세포의 세포질에서 아주 약하게 양성반응이 관찰되었다. 반면에 비장, 간, 신장, 선위, 심장, 소장, 대장에서는 양성반응이 관찰되지 않았다.

내장친화형 ND로 분류된 닭에서 양성반응은 폐와 비장을 비롯하여 선위, 장 림프조직 및 뇌에서 관찰되었다(Table 3). 폐에서 양성반응을 보이는 세포들은 형태학적으로 폐포사이 단핵 대식세포(Fig. 2b)와 혈관내피세포였으며, 이들의 세포질에서만 양성반응이 관찰되었다. 비장에서 양성반응은 섬유소의 삼출과 응고 피사소가 관찰되는 중심정맥 부위를 중심으로 그 주위를 구성하고 있는 세포들의 세포질(Fig. 2c)에서 양성반응이 관찰되었다. 대체적으로 양성반응을 보이는 세포들은 크고 형태학적으로 단핵 대식세포와 유사하였다. 선위와 장에서 양성반응은 점막하의 림프조직에서 관찰되었으며 이들 양성세포는 형태학적으로 단핵 대식세포였다. 뇌에서도 약한 양성반응이 신경세포, 혈관내피세포 및 혈

Table 3. Distribution and severity of positive signals detected by ISH and *in situ* RT-PCR in serial section of paraffin-embedded tissue from chickens infected with velogenic Newcastle disease virus

Pathotype	Farms	ISH						<i>in situ</i> RT-PCR					
		Lung	Spleen	Proven-triculus	Intestine	Heart	Brain	Lung	Spleen	Proven-triculus	Intestine	Heart	Brain
NVNDV	A	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+++
	B	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+++
	C	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++
VVNDV	D	++	++	+	+	-	+	+++	+++	+	+	++	++
	E	+	+	+	+	-	+	++	++	++	++	-	+
Negative control	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* +++ : > 100 positive cells per 10 regions of high-power field (×400).
 ++ : 10~100 positive cells 10 regions of high-power field (×400).
 + : 1~10 positive cells per 10 regions of high-power field (×400).
 - : no positive cells.

관주위 단핵 대식세포의 세포질에서 확인되었다.

양성대조군에서는 요막의 상피세포층을 따라 상피세포의 세포질에서 점상 및 작은 덩어리 모양으로 양성반응이 관찰되었다(Fig. 2d). Probe를 처리하지 않은 조직과 음성대조군에서는 ISH의 양성반응이 어느 세포에서도 확인되지 않았다.

***In situ* RT-PCR 기법에 의한 바이러스 핵산의 검출**

Table 3에서와 같이 *in situ* RT-PCR 기법에 의해 신경친화형 ND로 분류된 닭에서 양성반응이 관찰된 장기 또한 주로 중추신경조직이었다. 특히, 뇌에서 양성반응은 신경세포(Fig. 3a)에서 강하게 관찰되었으며, 그 외 혈관내피세포 및 혈관주위 단핵 대식세포(Fig. 3a, 삽입 그림)의 세포질에서도 뚜렷하게 확인할 수 있었다. A 농장은 기관지 상피세포에서 ISH의 결과 보다 더 많은 세포의 세포질에서 양성반응이 관찰되었다.

자연 발생된 내장친화형 ND로 분류된 닭은 폐, 비장, 선위, 장 림프조직(맹장 편도), 심장 및 뇌에서 양성반응이 관찰되었다. 폐에서의 양성반응은 폐포사이 간질내에 산재된 개개의 단핵 대식세포 세포질(Fig. 3b)에서 관찰되었으며, 폐 혈관내피세포의 세포질(Fig. 3b, arrow)에서도 양성반응이 관찰되었다. 비장에서도 중심정맥 부위에서 ISH의 결과보다 많은 단핵 대식세포들의 세포질(Fig. 3c)에서 강한 양성반응이 관찰되었다. 또한 심장에서 양성반응은 조직학적으로 괴사 병변이 관찰되는 부위에 침윤한 큰 단핵세포의 세포질에서 관찰되었다.

그 외 선위와 장에서는 점막하 림프조직을 구성하는 단핵세포들의 세포질에서 양성반응을 확인할 수 있으며, 뇌에서도 신경세포, 혈관내피세포 및 혈관주위 단핵 대식세포에서 양성반응이 확인되었다.

양성대조군과 음성대조군은 ISH와 동일한 대조군을 이용하였다. 양성대조군(Fig. 3d)에서는 *in situ* RT-PCR 기법에 의한 양성반응이 ISH에 의한 양성반응(Fig. 2d)보다 더욱 뚜렷하게 관찰되었다. 음성대조군에서는 전 조직에서 양성반응을 확인할 수 없었다.

ISH와 *in situ* RT-PCR 기법 비교

중추신경계에서 두 병원형에 따른 양성반응을 비교해 보았을 때, 양성반응은 신경친화형 ND로 분류된 닭의 조직이 내장친화형 ND로 분류된 닭의 조직보다 2배 이상 많은 수의 세포에서 강하게 관찰되었다.

연속 절편한 조직으로 각각 두 분자생물학적 기법을 실시하여 나타난 양성반응을 비교해 본 결과, 신경친화형 ND로 분류된 닭들의 뇌에서 *in situ* RT-PCR 기법에 의해 양성반응을 보이는 세포의 수는 400배 배율에서 한 시야당 평균 75개로 ISH 기법에 의한 양성 세포수 115개 보다 1.5배 이상 많았고 보다 강한 양성반응을 나타내었다. 또한 내장친화형 ND로 분류된 닭에서 두 기법에 의한 양성반응을 비교해 보았을 때, Table 3에서와 같이 양성 대조군을 비롯한 선위, 장 림프조직 및 뇌에서 ISH 보다 *in situ* RT-PCR 기법에 의한 경우에 보다 많은 양성반응이 관찰되었다. 더욱이 폐와 비장에서도

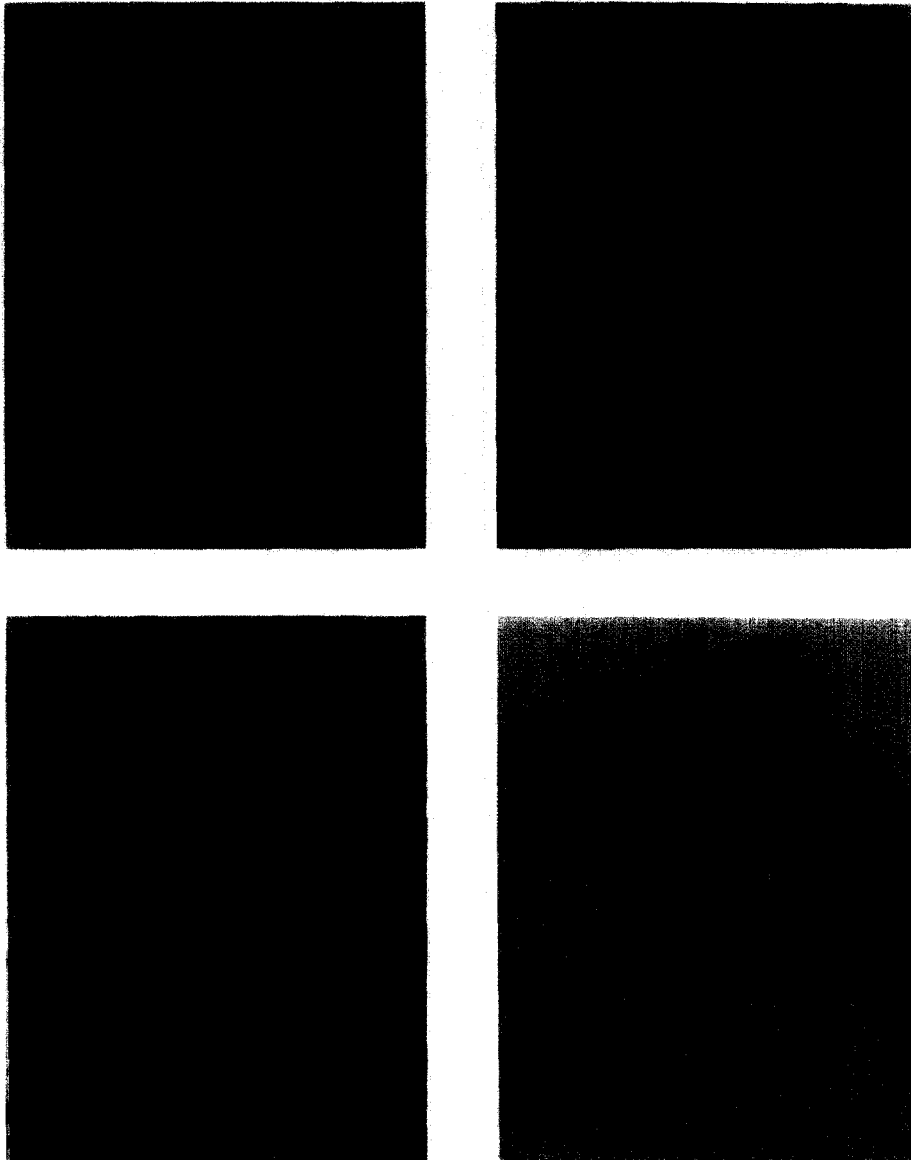


Fig. 2. Detection of positive signals for Newcastle disease virus by ISH. a. positive signals (arrow) are detected in the brain of a chicken infected by neurotropic velogenic Newcastle disease virus. DAB, Hematoxylin counterstain, $\times 400$; b. many positive cells, indicating specific Newcastle disease virus nucleic acid (arrow) presence in the lung of a chicken infected by viscerotropic velogenic Newcastle disease virus. DAB, Hematoxylin counterstain, $\times 1000$; c. scattered positive signals in the spleen of a chicken infected by viscerotropic velogenic Newcastle disease virus. AEC, Hematoxylin counterstain, $\times 1000$; d. positive control, positive signals are detected in epithelial cells (arrows) of the allantoic membrane of the egg experimentally inoculated with La Sota strain. AEC, Hematoxylin counterstain, $\times 1000$.

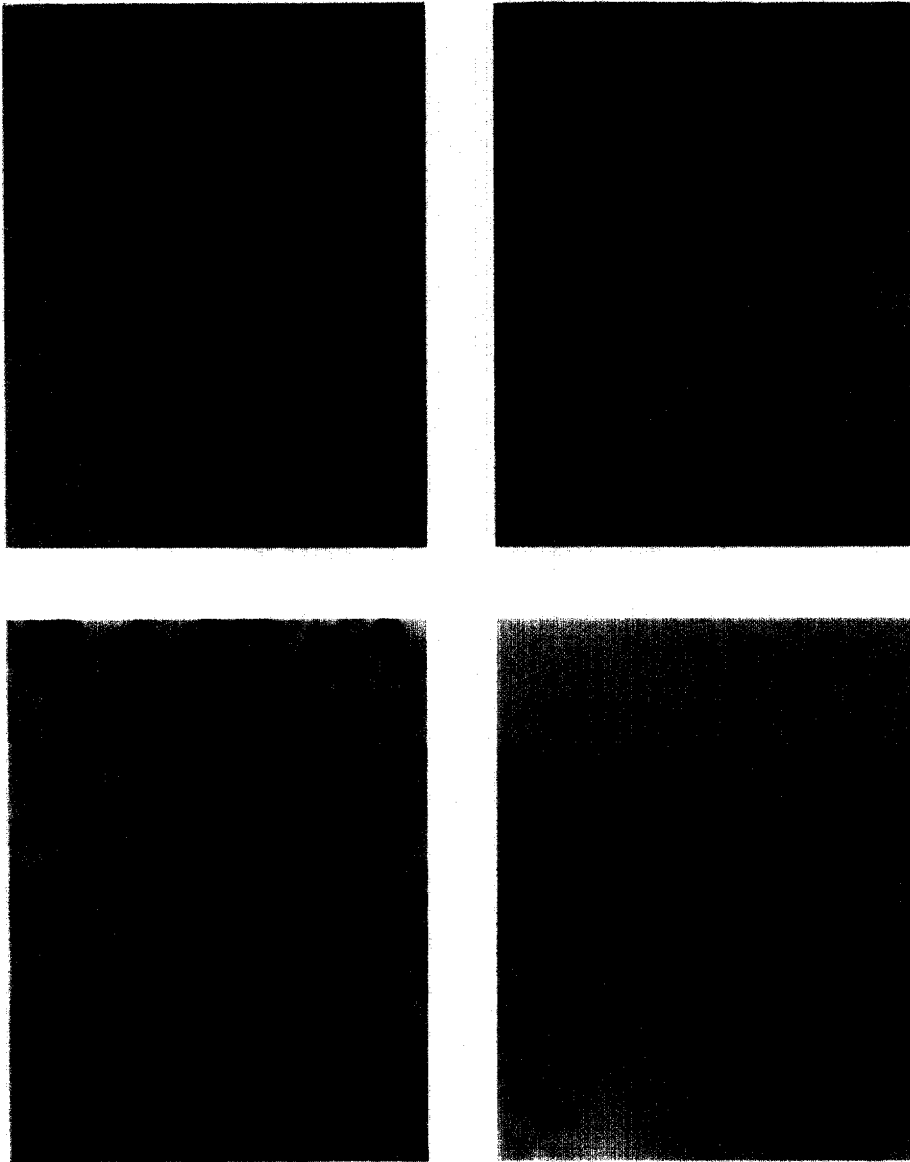


Fig. 3. Detection of positive signals for Newcastle disease virus by *In situ* RT-PCR. a. Stronger positive cells (arrowheads) against matrix gene of Newcastle disease virus are observed in brain in comparison with those by ISH(insert). DAB, Hematoxylin counterstain, $\times 400$. b. Positive signals (arrowheads) are observed in the lung. Positive signals (arrow) in the vascular endothelial cell. DAB, Hematoxylin counterstain, $\times 1000$. c. Positive signals are scattered in the spleen of a chicken infected by viscerotropic velogenic Newcastle disease virus. Abundant viral nucleic acid is detected in the mononuclear macrophages. AEC, Hematoxylin counterstain, $\times 1000$. d. Positive signals (arrowheads) are observed in the cytoplasm of the epithelial cell. AEC, Hematoxylin counterstain, $\times 1000$.

ISH보다 *in situ* RT-PCR 기법을 수행하였을 때 조직내 약 2~3배 많은 수의 세포에서 강한 양성반응이 관찰되었다(Table 3). 특히 ISH에 의해 양성반응을 확인할 수 없었던 심장에서는 *in situ* RT-PCR 기법에 의해 양성반응이 확인되었다. 따라서 NDV의 검출을 위한 *in situ* RT-PCR 기법은 ISH 방법보다 민감도가 뛰어난 진단방법임을 확인하였다.

고 찰

바이러스성 질병을 진단하고 병리기전을 규명하기 위해서는 민감도가 높은 진단기법이 요구된다. 이는 바이러스의 초기 감염이나 잠복감염 등의 경우처럼 바이러스의 핵산이 소량으로 존재하는 경우 통상의 진단 방법으로는 검출하기 어렵기 때문이다. 민감도가 높은 RT-PCR인 경우 이론적으로는 한 copy의 바이러스 핵산도 검출할 수 있지만, 핵산의 추출과정에서 바이러스가 희석되거나 소실될 수 있을 뿐 아니라 조직내에서 핵산의 위치가 파악되지 않는다는 단점이 있다¹². 이에 반해 Hasse *et al*¹⁸ 에 처음 소개된 *in situ* RT-PCR 기법은 조직내에서 직접 바이러스를 검출 할 뿐 아니라 PCR 기법의 장점인 시료내 1-2 copy 정도의 극소량 바이러스 핵산도 검출 할 수 있는 장점이 있어 다양한 연구에 응용되고 있다^{17,19,20}. 또한 기존의 RT-PCR이 필요로 하던 핵산의 추출이나 전기영동 과정을 생략할 수 있어 액상 RT-PCR법에 비해 신속하고 민감도도 우수한 방법이다. 이러한 장점을 이용하여 조직내에서 직접 NDV 핵산을 검출할 수 있는 가장 민감한 진단방법인 *in situ* RT-PCR 기법을 ND의 진단에 적용하게 되었다.

ISH와 *in situ* RT-PCR 기법의 민감도를 알아보기 위하여 전 실질장기의 파라핀 포매 조직을 연속 절편하여 각각 두 기법을 수행한 후 광학현미경의 고배율에서 양성반응을 보인 세포 수를 측정하였다. 그 결과, *in situ* RT-PCR 기법이 ISH와 비교하여 신경친화형 ND로 분류된 닭의 뇌조직 뿐만 아니라 내장친화형 ND로 분류된 닭의 비장, 폐, 선위, 장 림프조직 등 내부 실질장기에서도 양성반응이 1.5배에서 2배 이상의 많은 수의 세포들에서 측정되었다. 더욱이 심장에서의 양성반응을 통하여 ISH 기법에 의해서 검출되지 않았던 바이러스 핵산이 *in situ* RT-PCR 기법에 의해서 검출되었음을 알 수 있다. 결론적으로 *in situ* RT-PCR 기법은 ISH보다 민감도가 높은 진단기법이며, 이 기법은 바이러스 핵산이 조직내 적게 분포하는 경우에도 유용한 진단기법으로 생각된다. 반면에 ISH 기법은 ND를 신속하고 정확하게 진단하는 기법이기는 하나 바이러스 감염수가 적은 경우

에는 바이러스 핵산의 검출이 제한적이라는 단점이 있으며, 이를 보완·대체하기 위한 진단방법으로 *in situ* RT-PCR 기법은 유용할 것으로 사료된다¹³.

신경친화형 NDV 핵산의 분포를 두 분자생물학적 기법에 의해 검사한 결과, 양성반응은 주로 중추신경조직에 국한되었으며, 한 증례에서만 기관지 상피세포에서 양성반응이 관찰되었다. 일반적으로 전신 감염을 일으키는 바이러스의 경우에는 바이러스가 외부와 접촉하고 있는 곳에 먼저 초기 감염을 일으킨 후, 바이러스에 친화성 있는 장기로 전파된다. 따라서 본 증례의 경우처럼 신경친화형 NDV가 초기 감염문호인 호흡기계에 감염을 일으키고, 이 후 중추신경계로 전파되었을 것이라고 생각할 수 있는데 이러한 소견은 신경친화형 NDV를 인공접종한 실험결과에 의해서도 설명되고 있다. 즉, 신경친화형 NDV를 기관내 접종한 경우에는 폐와 기관지 상피세포에서 NDV 항원이 검출된 반면, 결막낭에 접종한 경우에는 중추신경계에서는 바이러스가 검출됨에도 불구하고 폐와 기관에서는 바이러스가 검출되지 않았다고 보고하였다²¹.

초기 감염부위에서 전신장기로의 바이러스 확산은 여러 가지 경로를 통해 가능한데 먼저 혈중으로 바이러스가 직접 들어가 전신으로 확산되는 경우나 대식세포에 의해 탐식 혹은 증식되어 전신 장기로 확산되는 경우가 대표적이다²². NDV가 뇌로 전파되는 경로는 아직까지 불명확하다. 본 연구에서 바이러스 핵산이 혈관내피세포 및 혈관주위 단핵 대식세포에서 관찰된 것은 바이러스가 혈중으로 들어간 후 이 바이러스가 직접 혈관내피세포로 전파되어 감염되는 것과 대식세포에 의해 전파되는 두 가지 경로 모두를 추정할 수 있다. 본 실험의 결과만을 두고 보면, 혈관주위 대식세포가 혈관 내피세포에서 증식한 바이러스를 탐식한 후 뇌의 실질로 전파시켰는지 혹은 직접 초기 감염부위로부터 전파시켰는지는 확실하지 않다.

신경친화형 NDV 핵산이 검출된 세포들을 분석해 볼 때, 이 바이러스는 신경세포, 혈관내피세포, 그리고 단핵 대식세포에서 바이러스 전사와 복제가 일어나는 것으로 추정된다. *In situ* RT-PCR 기법에 의한 신경친화형 NDV 핵산의 양성반응이 뇌의 다른 어느 세포보다 신경세포에서 강하게 관찰되었는데, 이는 바이러스가 신경세포에서 증식하고 있다는 것을 의미한다. 하지만 신경세포에서 바이러스 증식이 많지 않은 경우에는 ND를 진단하기 어렵다. 신경친화형 ND를 인공접종한 후 임상 증상을 확인하고 ISH에 의해 바이러스 핵산을 검출한 기존의 실험의 결과에 의하면, 신경세포에서 바이러스 핵산이 약하게 검출되었다고 보고하였다²³. 이것은 신경

세포에서 바이러스의 증식이 많지 않음에도 불구하고 신경증상을 일으켰다는 것이고, 또한 조직내 NDV가 적었기 때문에 ISH에 의해서는 강한 양성반응을 얻지 못한 것이라고 추측된다. 하지만, 본 실험에서 사용한 *in situ* RT-PCR 기법은 바이러스 핵산이 적게 존재하더라도 NDV를 검출할 수 있기 때문에 신경세포에서 ISH에 의한 것보다 강한 양성반응을 얻은 것으로 생각된다.

내장친화형 ND로 분류된 닭에서 바이러스 핵산의 분포를 검사한 결과, 비장, 폐, 선위, 장 림프조직 및 뇌에서 양성의 반응을 확인할 수 있었다. 이러한 장기나 조직에서 주로 단핵 대식세포가 강한 양성반응을 보였으며, 그 외 이들 장기나 조직의 혈관내피세포나 상피세포에서도 양성반응이 확인되었다. 이 병원형의 닭들에서 주목해야 할 반응으로는 폐 혈관내피세포의 양성반응이다. 내장친화형 NDV는 혈중에 직접 침입한 후 각 장기로 전파되며, 이렇게 전파된 바이러스는 혈관내피세포에서 증식하여 출혈성의 병변을 야기하며 또한 증식된 바이러스는 내부의 실질로 확산되어 간다고 보고되어 있다²³. 또한 바이러스는 대식세포에 의해서 탐식 및 증식하여 전신 장기로 확산되었을 수도 있다²². 상술한 바와 같이 본 실험에 이용된 닭들에서도 혈관내피세포에서 같은 양상의 소견이 관찰되었다. 이러한 결과는 NDV는 초기에 호흡기 상피세포에 침입·증식한 후 혈액내로 바이러스가 직접 들어가거나 대식세포에 의해서 탐식·증식된 후 전신 장기에 확산되며, 해당 장기의 혈관내피세포에서 증식하여 점차적으로 심한 병변을 일으킨다고 추측할 수 있다.

지금까지 내장친화형 NDV 핵산이 검출된 장기로는 비장, 장 림프조직(대장의 맹장 편도, 소장 및 맹장)에서 가장 뚜렷하며, 심근, 폐, 기낭, 안검, 뇌 및 F낭 등이 보고되어 있다^{21,23,24}. Seal et al²⁵에 의하면 림프기관인 F낭에서 양성반응을 보였다고 하였으나 본 실험과 더불어 Brown et al²¹에서는 F낭에 모두 음성 반응을 보였다. 또한 *in situ* RT-PCR 결과, ISH에 의해 바이러스 핵산이 검출되지 않는 심근의 단핵 대식세포에서도 양성반응을 확인할 수 있었다. 하지만 심근세포에서는 두 기법을 이용하여 어떠한 양성반응도 관찰되지 않아, 기존의 결과와 상이하였다. 이처럼 조직내 바이러스의 분포가 다른 이유는 ND는 바이러스주에 따라 조직 친화성과 항원표식에 변이가 크기 때문이라고 생각된다²⁶. 또한 같은 바이러스주라 하더라도 숙주의 면역능력, 감염시기 및 경과에 따라 양성반응의 정도가 달라질 수 있기 때문으로 추측된다. 또한 국내에서 발생하고 있는 ND도 신경친화형 NDV에 비해 내장친화형 NDV가 전 실질장기에 친화성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 본 실험은 RT-PCR을 실시하여 NDV에 상보적인 DNA를 증폭시킨 후 biotin을 표지하여 probe를 제작하였으며, NDV 강독주에 자연 감염된 닭의 조직을 연속 절편한 파라핀 포매 조직에서 ISH를 실시하여 2시간 이내에 뇌, 비장과 폐를 비롯한 각종 장기에서 바이러스 핵산이 검출되었다. 또한 연속 절편한 조직을 대상으로 *in situ* RT-PCR 기법을 수행한 결과, *in situ* RT-PCR 기법이 ISH에 비해 민감도가 뛰어났다. 여러 가지 ND의 진단기법 중에 ISH는 비교적 간편하고 신속·정확한 기법이며, *in situ* RT-PCR 기법은 ISH보다 민감도가 높은 진단기법이다.

결 론

국내 양계 농장에서 자연 발생된 NDV 강독주 감염 닭들의 파라핀 포매 조직을 대상으로 ISH와 *in situ* RT-PCR 기법을 적용함으로써 다음과 같은 결론을 얻었다. 20개의 검체를 동시에 검사하며 실험 전 과정을 2시간 이내에 마칠 수 있는 MicroProbe™ capillary action system의 ISH 기법을 확립함으로써 간편하고 신속·정확한 ND의 진단이 가능하게 되었고 *in situ* RT-PCR 기법의 수행을 통해 ISH에 의해 바이러스 핵산이 검출되지 않는 심근의 단핵 대식세포에서도 양성반응을 확인함으로써 NDV 핵산을 검출하는데 매우 *in situ* RT-PCR 기법이 매우 민감도가 높은 방법으로 이용될 수 있음을 확인하였다.

또한 신경친화형의 시료에서 확인된 NDV 핵산 분포는 주로 중추신경계에 집중되었는데 신경세포, 혈관내피세포 및 혈관주위 단핵 대식세포의 세포질에서 양성반응을 확인할 수 있었다. 이를 통해 지금까지 불명확했던 신경친화형 강독주에 의한 중추신경계의 병변 발생이 혈중의 바이러스가 직접 중추신경계의 혈관내피세포에 감염됨으로써 병변이 발생할 수 있으며 중추신경계의 병변을 형성하기 위해서 먼저 바이러스가 감염문호인 호흡기 상피세포에 감염·증식한다는 것을 알 수 있었다.

내장친화형 시료에서 NDV 핵산 분포는 비장, 폐, 선위, 장 림프조직 및 뇌에 분포하고 있으며 이 조직에서의 양성반응은 주로 단핵 대식세포에서 강하게 관찰되었다. 또한 이들 장기나 조직의 혈관내피세포나 상피세포에서도 양성반응을 확인할 수 있어서 내장친화형 NDV의 감염도 병리기전은 신경친화형 ND와 유사함을 확인하였다.

본 연구를 통해 ISH와 *in situ* RT-PCR 기법은 NDV를 검출하고 병리기전을 연구하는데 매우 유용함을 확인하

였는바 ISH 기법은 단시간에 정확한 진단을 수행하는 목적에, *in situ* RT-PCR은 감염초기 같은 미량의 바이러스를 검출하는 목적으로 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

참고문헌

- Alexander DJ, Calnek BW, Barnes HJ, McDougall LR, Saif YM, Beard CW. Newcastle disease and other paramyxovirus infection. In : *Disease of Poultry*, Iowa State University Press, 541-569, 1997.
- Office International des Epizootics. Manual for the animal disease reporting to the OIE. World Organization for the Animal Health, Paris, France, 1996.
- Rima BK, Alexander DJ, Biller MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA. Paramyxoviridae. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy*, Springer-Verlep, Wien, Vienna. 268-274, 1995.
- Seal BS, King DJ, Sellers HS. The avian response of Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol*, 24:257-268, 2000.
- Gotoh B, Ohnishi Y, Inocencio NM, Esaki E, Nakayama K, Barr PJ, Thomas G, Nagai Y. Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein superiority of furin/PAGE to PC2 or PCI/PC3. *J Virol*, 66:6391-6397, 1992.
- Le L, Brasseur R, Werners C, Meulemans G, Burny A. Fusion protein gene of Newcastle disease virus : sequence and hydrophobicity. Comparative analysis between virulent and avirulent strain. *Virus Genes*, 1:333-350, 1988.
- Seal BS, King DJ, Bennett JD. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for the pathotype prediction and molecular epidemiologic analysis. *J Clin Microbiol*, 33:2624-2630, 1995.
- Alexander DJ, Alle WH. Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathol*, 4:269-278, 1974.
- Wilson RA, Perrotta C, Frey B, Eckroade RJ. An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens. *Avian Dis*, 29:1079-1085, 1984.
- Alexander DJ, Lister SA, Wilson GW. Avian paramyxovirus type 1 infection of racing pigeons. *Vet Rec*, 118:424-427, 1986.
- Park CS, Manahan LJ, Brigati DJ. Automated molecular pathology: one hour *in situ* DNA hybridization. *J Histotech*, 14:219-229, 1991.
- Nuovo GJ, Richart RM. Buffered formalin is the superior fixative for the detection of HPV DNA by *in situ* hybridization analysis. *Am J Pathol*, 134:837-842, 1989.
- Hung JL, Ming HL. Comparison of two molecular techniques for the detection of avian reoviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues. *J Virol Methods*, 80:197-201, 1999.
- Stram Y, Shchori D, Chinitch Y, David D, Molad T, Samina I. Molecular characterization of an unassigned Israeli Newcastle disease virus isolate. *Avian Dis*, 42:746-751, 1998.
- King DJ, Seal BS. Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus (NDV) field isolates with comparisons to reference NDV strains. *Avian Dis*, 42:507-516, 1998.
- 박남용, 조호성, 조경오 등. In situ Hybridization에 의한 토끼 출혈증의 신속·간편한 진단. *한국수의병리학회지*, 5:57-61, 2001.
- Park NY, Im HH, Cho KO. Development of PCR *in situ* hybridization and *in situ* hybridization for diagnosis of swine aujeszky's disease, in *Proceedings. 16th International Pig Veterinary Society Congress*, 614, 2000.
- Haase AT, Retzel EF, Staskus KA. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 87:4971-4975, 1990.
- Nuovo GJ, MacConnell P, Forde A, Delvenne P. Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 139:847-854, 1991.
- Komminoth P, Long AA, Ray R, Wolfe HJ. *In situ* polymerase chain reaction detection of viral DNA, single-copy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytopins. *Diagn Mol Pathol*, 1:85-97, 1992.
- Brown CC, King DJ, Seal BS. Detection of a macrophage-specific antigen and the production of

- interferon gamma in chickens infected with Newcastle disease virus. *Avian Dis*, 43:696-703, 1999.
22. Lam KM. Growth of Newcastle disease virus in chicken macrophage. *J Comp Pathol*. 115:253-263, 1996.
 23. Brown CC, King DJ, Seal BS. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet Pathol*, 36:125-132, 1999.
 24. Brown CC, King DJ, Seal BS. Comparison of pathology-based techniques for detection of viscerotropic velogenic Newcastle disease virus in chickens. *J Comp Pathol*, 120:383-389, 1999.
 25. Seal BS, King DJ, Meinersmann RJ. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Res*, 66:1-11, 2000.
 26. Ojok L, Brown CC. An immunohistochemical study of the pathogenesis of virulent viscerotropic Newcastle disease in chickens. *J Comp Pathol*, 115:221-227, 1996.