

몽골에서 최초로 분리된 뉴캐슬병 바이러스의 분자생물학적 특성

최강석^{1,†} · 이은경¹ · 전우진¹ · D. Batchuulon² · R. Sodnomdarjaa² · 박미자¹ · 유예나¹ · 권준헌¹

¹국립수의과학검역원 조류질병과 OIE 뉴캐슬병 표준실험실, ²State Central Veterinary Laboratory (Mongolia)

Molecular Biological Characterization of the First Newcastle Disease Virus Isolated in Mongolia

Kang-Seuk Choi^{1,†}, Eun-Kyoung Lee¹, Woo-Jin Jeon¹, D. Batchuulon², R. Sodnomdarjaa²,
Mi-Ja Park¹, Ye-Nah Yoo¹ and Jun-Hun Kwon¹

¹OIE Reference Laboratory for Newcastle Disease, Avian Disease Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-757, Korea

²State Central Veterinary Laboratory, Zaisan P.P.Box53/23, Ulaanbaatar 21053, Mongolia

ABSTRACT The outbreak of Newcastle disease occurred for the first time at a commercial chicken farm near Ulaanbaatar, Mongolia in August 2010. Newcastle disease virus (NDV) obtained from infected chickens in Mongolia was characterized by biological and molecular biological approaches. Mongolian NDV isolate killed all of chicken embryos within 60 h in the mean death time assay, indicating virulent for chicken. A genomic region of 695 nts between nts 1055 of the M gene and 508 of the F gene was amplified by RT-PCR and sequenced. The deduced amino acid sequence of the F protein cleavage site was ¹¹²RRQKRF¹¹⁷, which is a typical sequence of velogenic strains of NDV and is agreement with the result of the MDT assay. The sequence of the partial F gene (nts 47 to 435) was used for genotyping by phylogenetic analysis. The phylogenetic analysis showed that the Mongolian isolate was of genotype VII within class II of NDV. Further phylogenetic analysis on the genotype VII strains revealed that the isolates placed in a genetic sublineage of VII_d and most closely related with velogenic strains of NDV circulating in Far-east Asian region especially China, suggesting the introduction of velogenic NDV into Mongolia from neighboring countries.

(Key words : Newcastle disease virus, Mongolia, chicken, phylogenetic analysis)

서 론

뉴캐슬병(Newcastle disease; ND)은 뉴캐슬병바이러스(Newcastle disease virus; NDV)가 원인체로 닭에서 심한 호흡기 증상, 소화기 증상 및 신경 증상을 보인 후 100%에 가까운 높은 치사율을 나타낼 수 있는 조류의 급성 전염병이다(Alexander, 2003). 세계동물보건기구(OIE)는 중간독 이상의 병원성 NDV의 감염에 의해서 유발되는 질병에 한하여 ND 발생으로 간주하고 있다(OIE, 2008).

NDV의 독력(virulence)은 뇌내병원성지수(intracerebral pathogenicity index; ICPI)나 종란 평균치사시간(mean death time; MDT) 등 생물학적 병원성 측정법이나 F 단백질의 분절부위(cleavage site) motif의 아미노산 서열 분석에 의한 분자유전학적 분석을 통하여 평가하고 있다(Aldous et al., 2003;

OIE, 2008). 특히 생물학적 병원성 측정 방법을 통하여 강독(velogenic), 중간독(mesogenic), 약독(lentogenic) 등으로 바이러스 독력 수준을 세부적으로 구분한다(Alexander, 2003).

NDV 유전형(genotype)은 바이러스 F 단백질 유전자의 염기 서열에 기초한 유전학적 계통 분석에 의하여 분류하고 있으며(Aldous et al., 2003), 크게 Class I 과 Class II로 구분하고 있다(Kim et al., 2007). 이 중 닭에 병원성을 보이는 바이러스 strain은 현재까지 모두 Class II에 속한다. Class II 바이러스는 최소한 9개의 genotype(genotype I-IX)이 존재한다(Liu et al., 2003; Ke et al., 2010). 이중 genotype I 과 II는 닭에서 병원성이 없는 경우가 대부분인 반면 genotype III에서 IX에 속하는 바이러스 strain들 대부분은 닭에 대한 병원성이 높다.

현재 ND는 아시아와 아프리카의 대부분 국가에서 상재적으로 발생하여 가금 산업에 큰 경제적 손실을 입히고 있

[†] To whom correspondence should be addressed : kchoi0608@korea.kr

는 실정이다. 최근 동아시아에서 유행하는 주된 NDV genotype은 class II에 속하는 genotype VII 바이러스들이다(Kou et al., 1999; Yang et al., 1999; Mase et al., 2002; Liang et al., 2002; Liu et al., 2003; Lee et al., 2004; Tsai et al., 2004; Zou et al., 2005; Ke et al., 2010).

몽골은 사육 가축의 대부분이 소, 양, 말, 낙타 등으로서 목축업이 발달한 대표적인 국가이지만, 양계 산업이 거의 발달하지 않은 국가이다. 최근 들어서 양계 사육 규모가 점점 증가하고 있기는 하지만 현재까지 몽골 전체 사육 규모가 27여 만 수 정도 밖에 되지 않을 정도로 여전히 가금 산업이 영세한 편이다. 대부분의 아시아 국가와 달리 몽골은 2010년 7월 이전까지는 ND가 발생한 적이 없는 대표적인 청정 국가로 남아있었다. 그러나 2010년 8월 13일 울란바토르(Ulaanbaatar)시 인근 지역에서 4,800여 수의 산란계(약 53 주령)를 사육하는 한 가금 농장에서 수 일 전부터 급격한 산란을 저하와 함께 대부분 개체들이 침울 증상을 보이며, 그 중 일부는 폐사함으로써 몽골에서 사상 처음으로 전형적인 ND가 발생하였다. 당시 이 농장은 이미 2010년 4월 중순에 몽골에서 자체 생산한 ND 생백신(La Sota주)로 예방 접종을 실시한 산란계 농장이었다. 그 당시 ND의 지역 간 확산을 방지하기 위하여 발생 농장 내 모든 산란계의 살처분(stamping-out), 농장 내 계란(1600개) 폐기 및 이동 제한(Movement restriction) 등 국가 방역 조치가 취해졌다. 이와 더불어 발생 농장에서 채취한 검사 시료를 국립수의과학검역원 세계동물보건기구(OIE) 뉴캐슬병 표준실험실에 긴급히 송부하여 뉴캐슬병 진성 여부 확인 및 발생 원인을 파악하기 위하여 분리바이러스의 특성 분석을 요청하였다.

본 연구를 통하여 몽골에서 세계동물보건기구(OIE) 뉴캐슬병 표준실험실에 제공한 검사 시료로부터 NDV 분리 및 동정을 실시하고, 분리 바이러스의 독력 및 유전학적 특성을 분석한 결과를 간략히 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 검사 시료

본 실험에 사용한 모든 검사시료는 몽골 국립중앙수의검사소(State Central Veterinary Laboratory; SCVL, Ulaanbaatar, Mongolia)로부터 제공받았다. 바이러스 검사용 시료는 폐사 계 1수에서 채취한 뇌(brain) 및 폐(lung) 조직 등을 특정병원체 부재(specific pathogen free; SPF) 종란에 각각 접종하여 배양한 후 요막강액(allantoic cavity fluid)을 채득하였다. 이들 요막강액 검사 시료는 몽골 SCVL로부터 제공받자마자

SPF 종란(SPAFAS[®], Charles River Laboratories, USA)에서 다시 접종하여 추가 계대 배양을 실시하였다. 증폭된 바이러스는 1 mL씩 소분(aliquot)하여 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에 보관하였다. NDV 특이 항체 검사용 혈청 시료 5점은 발생 당시 농장 내 살아있는 산란계에서 채취한 혈청 50점 중 32배 이상의 HI 항체 역가를 보인 혈청 11점 중 일부이었다. 이들 혈청은 실험에 사용하기 전 56°C , 30분간 열처리를 실시하여 비동화하였다.

2. 분리 바이러스의 동정

닭혈구에 대한 응집능을 보인 요막강액에 대하여 바이러스 동정 시험을 실시하였다. 분리 바이러스의 동정(identification)은 NDV 닭 양성혈청(국립수의과학검역원 OIE 뉴캐슬병 표준실험실)을 사용한 혈구 응집 억제 시험(hemagglutination inhibition test; HI test)을 실시하였다. 분리 바이러스(종란 요막강액)에 대한 조류인플루엔자바이러스(avian influenza virus; AIV) 검사는 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)법(Lee et al., 2001)과 간이 검사 키트(Bionote LLC, Hwaseong, Korea)를 사용하여 실시하였다.

3. 혈구응집억제반응(Hemagglutination Inhibition Test: HI Test)

검사 혈청 내 존재하는 NDV 특이항체 검출이나 분리 바이러스의 동정을 위하여 U자형 96 well micro-plate를 사용하여 beta-method로 HI test를 실시하였다. HI 검사를 위하여 국립수의과학검역원 OIE 뉴캐슬병 표준실험실에서 보유하고 있는 NDV La Sota주 HI 항원 및 항 NDV 닭 면역혈청(면역원 La Sota주)을 사용하였다. 즉, U자형 96 well micro-plate의 전체 well에 0.1M phosphate buffered saline(PBS), pH 7.2를 $25\mu\text{L}$ 씩 첨가하고, 첫 번째 well에 혈청을 $25\mu\text{L}$ 를 첨가하여 2진 단계 희석을 실시하였다. 그 후 4 hemagglutination unit(HAU)의 NDV 용액을 전체 well에 $25\mu\text{L}$ 씩 첨가한 다음 실온에서 30분간 반응시켰다. 1% 닭 적혈구 부유액을 전체 well에 $25\mu\text{L}$ 씩 첨가한 다음 실온에서 40분간 반응시킨 다음 판독하였다. 항체 역가는 혈구응집이 완전히 억제된 최고 희석 배수의 역수로 결정하였다.

4. RT-PCR에 의한 바이러스 병원성 분석

병원성 NDV(강독형 및 중간독형)를 신속하게 판별하기 위하여 개발된 RT-PCR 검사 키트(*i*-NDV Detection Kit, iNtRON Biotech., Seongnam, Korea)를 사용하여 pathotype 분석을 실시하였다. 이 검사 키트는 F 단백질 분절 부위의 특징적인

핵산 염기 서열을 토대로 제작된 두 종류의 PCR primer sets를 사용한다. 바이러스 RNA 추출은 Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit(iNtRON Biotech.)을 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 의하여 실시하였다. 추출한 RNA는 제조사에서 제공하는 NDV 공통 유전자 검출용 *i*-NDV Master Mix 및 병원성 NDV 특이검출용 *i*-NDV Master Mix를 동시에 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 의거하여 NDV 신속 검출 키트(*i*-NDV Detection Kit)로 RT-PCR을 실시하였다. 그 후 전기영동(1.5% agarose gel, 100 V, 20분)을 실시하여 Common type RT-PCR의 경우 379 bp, pathotype-specific RT-PCR의 경우 204 bp의 NDV 핵산이 증폭되었는지 여부를 관찰하였다. 전기영동 결과, common type RT-PCR에만 핵산 증폭산물이 있는 경우 약독형 NDV 양성으로, common type RT-PCR과 pathotype RT-PCR 모두 핵산 증폭산물이 증폭될 경우 병원성 NDV 양성으로 판정하였다.

5. 종란 평균 치사 시간 측정(Mean Death Time; MDT)법

분리 바이러스의 병원성은 Alexander(1988)가 제시한 방법과 기준에 의거하여 MDT법으로 측정하였다. 즉, 10진 단계 희석한 NDV 액을 각 희석당 0.2 mL씩을 5개의 SPF 종란(9일령 내지 11일령)의 요막강내로 접종한 다음 37°C 종란 배양기에서 5일간 배양하였다. 배양 24시간 이내에 종란이 폐사한 경우에는 세균 오염으로 간주하였다. 그 후 배양 5일 이내에 종란 폐사가 일어난 경우, 종란 요막강액을 무균적으로 채취하여 혈구응집 여부를 조사하여 혈구응집능을 보인 경우 NDV에 의한 폐사로 간주하였다. MDT는 100% 종란 폐사가 일어난 최고 희석 배수에서 측정된 종란 평균 치사시간으로 결정하였다. 바이러스의 독력은 MDT가 60시간 이하일 경우 강독(velogenic), 60시간 이상 90시간인 경우 중간독(mesogenic), 90시간 이상일 경우 약독(lentogenic)으로 판정하였다.

6. 유전자 염기 서열 및 계통 분석

NDV 분리주의 염기 서열과 바이러스 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 et al.(2004)이 사용한 PCR 반응 조건에 따라 PCR 증폭기(PTC-220, MJ research, Waltham, MA, USA)를 사용하

여 one-step RT-PCR을 실시하였다. RT-PCR을 위하여 사용된 primer set는 M1055(forward; 5'GCTGATCATGAGGT TACCTC-3')와 F508(reverse; 5'AGTCGGAGGATGTTGGC AGC-3')로 M 유전자의 1055번째 핵산 부위에서 F 유전자의 508번째 핵산 부위까지 총 695개 핵산이 증폭되도록 설계되었다. 증폭된 RT-PCR 산물은 전기영동을 실시하여 증폭산물을 확인한 다음 마크로젠사(Macrogen Inc., Seoul, Korea)에 염기 서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 바이러스 유전자 염기 서열 중 F 유전자의 N 말단 부위 염기 서열(389 bp) 만 취하여 계통 분석(phylogenetic analysis)을 실시하였다. 계통 분석을 위한 핵산 염기 서열 교정(editing), 아미노산 서열에 측 및 alignments는 Lasergene 7.0(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 사용하여 실시하였다. 본 연구에서 분리된 바이러스의 유전자 염기 서열 분석 결과는 기존에 발표된 NDV 유전자 염기 서열과 비교 분석하였다. 이를 위하여 GeneBank에 등록이 되어 있는 NDV 00주의 F 유전자 염기 서열을 사용하였다. Phylogenetic tree는 Clustal X(<http://bisp.u-strasbg.fr/en/documentation/ClustalX>) 프로그램 내에서 neighbor-joining method로 1,000 bootstrapping하여 분석하고, Tree-View(<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) 프로그램을 통해 도식화하였다.

결 과

1. 바이러스 분리 및 동정

몽골 산란계 발생 농장에서 유래한 바이러스 검사 시료에 대하여 종란 접종법으로 바이러스 분리를 시도하였다. 발생 농장에서 폐사한 산란계 1수에서 유래한 뇌 조직 및 폐 조직 검사시료를 접종한 종란은 접종 2일 이내 모두 폐사하였다. 이들 종란의 요막강액을 채취하여 조사한 결과, 닭 적혈구와의 강한 응집 반응이 관찰되었다. 바이러스 동정을 위하여 HI 검사를 실시하였다(Table 1). 그 결과, 항 NDV 닭 양성혈청에 대하여 강한 혈구 응집 억제 반응을 나타내었다. HI 검사를 실시한 결과, 항 NDV 닭 혈청에 대하여 분리 바이러스는 NDV La Sota 항원과 동일한 수준의 HI 역가(32배)를 나타내었다. 그러나 조류인플루엔자바이러스 특이 RT-PCR 법과 간이 진단 키트 검사법으로 분리 바이러스를 조사한 결과, 조류인플루엔자 바이러스에 대해서는 음성 반응을 나타내었다(Data not shown). 따라서 상기 실험의 결과를 바탕으로 분리한 바이러스는 NDV로 동정하고, Mongolia/Ck/1/10(MN1/10)으로 명명하였다.

동일 농장 내 NDV에 대하여 항체 양성 반응을 나타낸 산

Table 1. Virological results of tissue samples from dead chicken suspected of Newcastle disease in Mongolia

Tissue	RT-PCR for NDV ¹		Virus isolation	MDT ²	F ₀ cleavage site
	Common type	Patho-type			
Brain	Pos	Pos	Pos	54.7 h	RRQKRF
Lung	Pos	Pos	Pos	NT	RRQKRF

¹Common and pathotype represent RT-PCR results using NDV-common primer set and virulent NDV-specific primer set, respectively.

²MDT, mean death time in chicken embryos. Criteria for virulence; velogenic (highly virulent), <60 h; mesogenic (intermediate virulent), 60 to 90 h; lentogenic (no or low virulent), 90 to 120 h.

란계 혈청 5점에 대하여 NDV 백신주인 La Sota 항원과 발생 농장에서 분리된 MN1/10주를 NDV 항원으로 사용하여 HI 검사를 각각 실시하였다. 그 결과, 발생 농장 유래 산란계 혈청들은 MN1/10 항원을 사용하였을 때와 NDV La Sota 항원을 사용했을 때 모두 최소 512배 이상의 HI 항체 역가를 나타내었으며, 이들 혈청에 대한 두 NDV 항원간 HI역가는 유의성있는 차이를 나타내지 않았다(Table 2).

2. NDV 몽골 분리주의 독력

몽골 산란계 발생 농장에서 분리된 NDV MN1/10 주의 독력을 평가하기 위하여 세 가지 방법을 사용하였다. 먼저 신속한 pathotyping을 위하여 NDV MN1/10 주에 대하여 RT-PCR 검사 키트를 사용하여 병원성 NDV 여부 검사를 실시하였다. Common type RT-PCR로 검사하였을 때 MN1/10 주로부터 379 bp 크기의 핵산이 증폭되었으며, 동일 시료에 대하여 pathotype-specific RT-PCR을 적용한 결과, 204 bp 크기의 NDV 핵산이 증폭되었다.

두 번째로 바이러스 독력을 평가하는 분자생물학적 측정 방법인 F 단백질 분절 부위의 아미노산 서열 분석법을 실시하였다. 이를 위하여 F 단백질 유전자 N 말단 부위를 포함하는 695개 핵산을 RT-PCR법으로 증폭하여 F 단백질의 분절 부위의 motif 부위인 112번에서 119번 위치에 해당하는 아

미노산 서열을 조사하였다. 본 연구에서 분리한 NDV MN1/10 주의 F 단백질 분절 부위 아미노산 서열은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 ¹¹²RRQKRF¹¹⁹의 motif를 가지고 있었다. 이러한 염기 서열 즉 다염기성(multibasic) 아미노산들과 117번째 위치의 phenylalanine으로 구성된 염기 서열 패턴은 병원성 NDV가 가지고 있는 F 단백질 분절 부위 motif의 특징이다(Toyoda et al., 1987; Collins et al., 1993; Nagai, 1993; Alexander, 2003).

마지막으로 바이러스 독력을 평가하는 생물학적 측정 방법인 MDT를 실시하였다. 이를 위하여 MN1/10 주(종란 요막강액)을 10진 단계 희석하여 종란에 접종하였다. 그 결과,

```

M G S K P S T R I P V P L M L I T R I M L
1  ATGGGCTCC AAACCTTCT ACCAGGATC CCAGTACCT CTAATGCTG ATCACCCGG ATTATGCTG
I L S C I R L T S S L D G R P L A A A G I
64  ATATTGAGC TGTATCCGT CTGACAAGC TCTCTTGAC GGCAGGCC CTTGCAGCT GCAGGAATT
V V T G D K A V N V Y T S S Q T G S I I V
127  GTAGTAACA GGAGTAAAG GCAGTCAAT GTATACACC TCGTCTCAG ACAGGGTCA ATCATAGTC
K L L P N M P R D K E A C A K A P L E A Y
190  AAGTTGTC CCGAATATG CCCAGAGAT AAGGAGGCA TGTGCAAAA GOCCATTG GAGGCATAT
N R T L T T L L T P L G D S I R K I Q G S
253  AACAGAACA CTGACTACT CTGCTCACT CCTCTTGGC GACTCCATC CCGAGATC CAAGGGTCT
V S T S G G R R Q K R F I G A V I G S V A
316  GTGTCCACG TCCGGAGGA AGGAGACAA AAACGCTTT ATAGGTGCT GTTATTGGC AGTGTAGCT
L G V
379  CTTGGGGTT GC

```

Fig. 1. Nucleotides and predicted amino acid sequences of the first 389 nucleotides of the coding region of the F gene of NDV MN1/10 strain. The F protein cleavage site sequence from position 110~119 is boxed and F protein N-terminal variable region is underlined.

Table 2. Serological test results for Newcastle disease virus of Mongolian samples from affected chickens

Antigen	HI titer (log ₂) for NDV						
	Field sera ¹				Control sera ²		
	#6	#7	#8	#9	#10	Pos	Neg
MN1/10	10	10	12	9	9	5	<1
La Sota	11	11	13	10	9	5	<1

¹Field sera were taken from five chickens raised at the outbreak farm in Mongolia.

²Pos: anti-NDV (La Sota strain) chicken serum, Neg: specific pathogen free chicken serum.

100% 종란 폐사를 일으키는 최대 바이러스 희석 농도는 10^{-8} 배였다. 이 바이러스 희석액(10^{-8})을 접종한 종란에서의 평균 치사 시간은 54.7시간이었다. 상기의 결과를 종합하여 MN1/10 주는 닭에서 치명적인 강독형 NDV인 것으로 판정하였다.

3. NDV 몽골 분리주의 유전학적 계통 분석

본 연구에서 분리한 NDV MN1/10 주의 F 단백질의 N 말단 부위 389개의 핵산 염기 서열을 취하여 유전학적 계통 분석을 실시하였다(Fig. 2). 그 결과 본 연구를 통하여 NDV

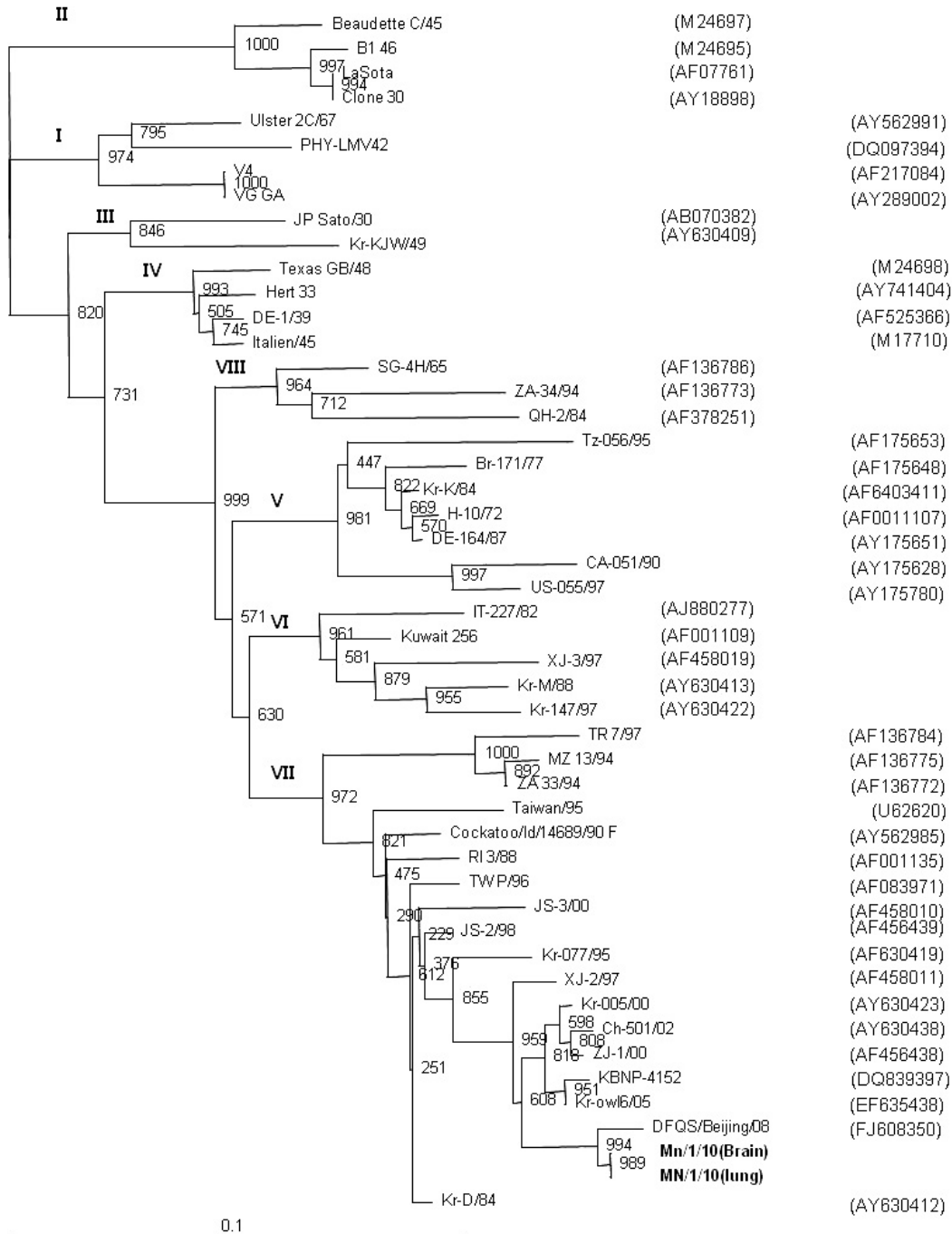


Fig. 2. Phylogenetic tree of the nucleotide sequence of NDV MN1/10 isolate based on the first 389 nucleotides of the coding region of the F gene. Sequences of reference strains of NDV were obtained from the GenBank database. Genbank accession numbers for all NDV strains are indicated on the right. NDV MN1/10 isolated in this study is in bold.

MN1/10 주는 class II에 속하는 genotype VII 바이러스였다. 특히 이 바이러스는 NDV DFQS/Beijing/08(97.8%), Kr-005/00(97.2%) 등 genotype VII 중 sublineage d(genotype VII d) 바이러스로 분류(Rui et al., 2010)되고 있는 동아시아 지역 유행 바이러스들과 가장 높은 상동성을 나타내었다. 따라서 genotype VIId에 속하며, 동아시아 지역에서 유행하는 NDV 24주와 함께 추가적으로 유전학적 계통 분석을 실시하였다 (Fig. 3).

그 결과, 동아시아 지역에서 유행하는 바이러스들은 크게 CN1, CN2, KR, TW 등으로 세부적인 cluster로 분류할 수 있었으며, MN1/10 주는 중국 2(China2: CN2) cluster에 속하는 바이러스들과 같은 그룹으로 분류되었다.

고 찰

본 연구를 통하여 우리는 몽골의 한 산란계 농장에서 폐사계로부터 강독형 NDV를 분리 및 동정하고, 발생 농장 내 산란계 일부에서 높은 역가의 NDV 특이 항체를 검출하여 몽골에서의 ND 발생 사례를 최종적으로 확립할 수 있었다. 특히 이번 발생 사례는 몽골에서 최초로 발생한 ND 사례라는 점에서 그 의미가 크다고 하겠다.

서론에서 언급한 바와 같이 세계보건기구는 ND 발생을 중간독 이상의 NDV 감염이 확인된 경우에 ND 발병으로 규정하고 있기 때문에 우선적으로 몽골 산란계 농장에서 분리된 NDV가 중간독 이상의 바이러스 독력을 가지고 있는 지 평가하였다. 몽골에서 분리된 NDV는 발생 농장 내 폐사계의 뇌와 폐 등 실질 장기 조직에서 분리되었다. 일반적으로 약독형 NDV의 경우, 소화기와 상부 호흡기에 국소적인 감염을 일으키는 반면, 강독형 NDV는 전신 감염(systemic infection)을 일으켜 닭에서의 병원성을 나타낸다(Brown et al., 1999; Mo et al., 2001; Kommers et al., 2003; Lee, 2005). 그러므로 실질 장기에서 NDV가 분리되었다는 것은 폐사계에서 NDV 전신 감염(systemic infection)이 일어났다는 것을 의미하므로 폐사계는 강독형 NDV 감염에 의해 폐사했을 것으로 판단된다. 실제로 폐사계에서 분리된 NDV MN1/10 주는 F 단백질의 분절 부위에 전형적인 강독형 NDV의 아미노산 motif(¹¹²RRQKRF¹¹⁹)를 가지고 있고, MDT가 54.7시간으로 닭에 치명적인 강독형 NDV로 밝혀져 이 같은 추정이 뒷받침되었다.

발생 당시 농장 내 생존한 산란계를 대상으로 NDV 특이 항체 존재 여부를 검사했을 때 검사 개체의 78%(39수/50수)가 16배 이하의 낮은 HI 항체 역가를 보유하고 있었다. 이들 개체들은 발생 4개월 전에 ND 생백신(La Sota주)을 단 1회 접종한 상태였기 때문에 백신 항체가 상당수 소실된 상태에서 아직 감염이 되지 않았거나 항체가 형성되기 전 감염 초기 상태이었을 것으로 판단된다. 또한 발생 당시 대부분의 산란계에서 임상 증상이 나타난 것은 생백신 접종에도 불구하고 낮은 수준의 ND 백신 면역 항체 수준을 보유하고 있었기 때문에 발병한 것으로 판단된다. 다만 일부 개체에서는 Table 2에서 보는 바와 같이 최소 512배 이상의 매우 높은 HI 항체가를 보유하고 있었다. 그러므로 몽골 발생 농장에서의 백신 형태(생백신)와 접종 시기 등을 감안해 볼 때 이들 개체에서 검출된 NDV 항체는 백신 접종에 의한 것이라기 보다는 강독형 NDV에 감염되어 나타난 감염 항체로 이미 회복기 단계에 들어선 것으로 보인다.

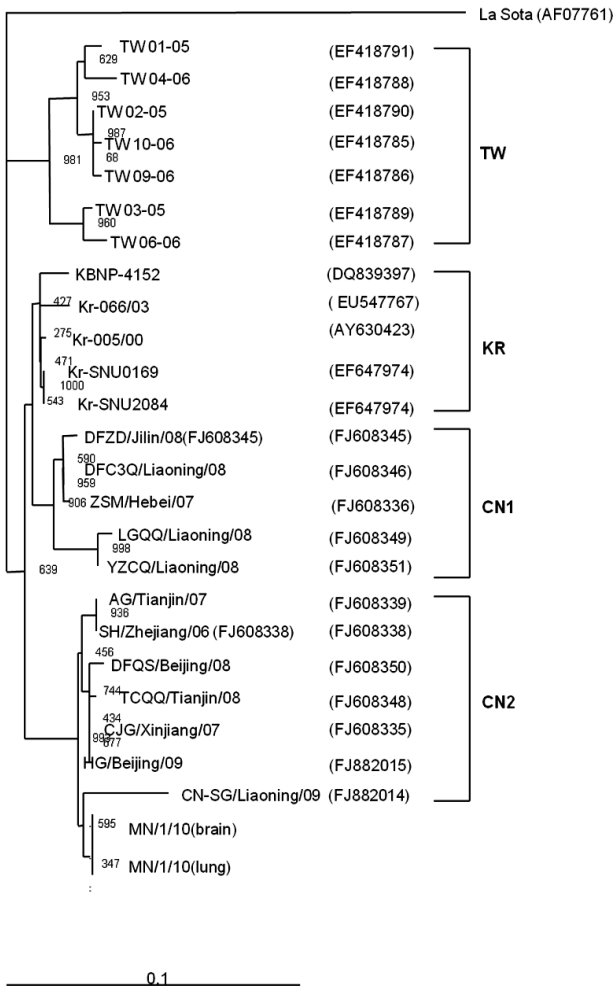


Fig. 3. Phylogenetic analysis of genotype VII d Newcastle disease viruses based on the hypervariable region (position 1 to 389) of the Fusion gene. Genbank accession numbers for all NDV strains were included in parenthesis.

본 연구에서 분리한 NDV 몽골 분리주는 유전학적 계통 분석 결과 genotype VIId에 속하는 바이러스로 밝혀졌다. Genotype VIId 바이러스는 90년대 이후 아시아 특히 동아시아 지역에서 유행하는 주된 NDV 유전형으로 알려져 있다(Yu et al., 2001; Mase et al., 2002; Lee et al., 2004; Zou et al., 2005; Mase et al., 2009). Genotype VIId 바이러스들을 대상으로 추가적으로 계통 분석을 실시한 결과를 살펴보면 이들 바이러스들도 대만(TW), 한국(KR), 중국1(CN1), 중국 2 (CN2) 등으로 세분화되어 있어 지역적 유행 경향을 보여주고 있다(Fig. 3). 일본의 경우 Mase 등(2009)에 의하면 한국에서 분리된 바이러스들과 가장 유전적 관련성이 높은 것으로 보고된 점을 감안하면 일본에서 분리되는 바이러스들은 한국과 같은 지역형(topotype)을 나타낸다고 보여진다(Mase et al., 2009). 본 연구의 몽골 분리주 MN1/10은 중국2 그룹에 속하는 NDV와 같은 유전적 그룹으로 분류되었다. 이들 유전적 그룹에 속하는 NDV는 몽골에서 인접한 중국 동부 지역에서 유행하고 있다는 점을 감안할 때 이들 지역으로부터 유행 바이러스가 몽골로 유입되었을 가능성이 있어 보인다. 그러나 발생 농장에 대한 보다 구체적인 역학 상황 정보를 확보하는 데 한계가 있었다. 그러한 연유로 이 바이러스가 어떤 경로와 방법으로 몽골로 유입되었는지 파악할 수 없었다.

적 요

몽골 산란계 농장에서 발생한 뉴캐슬병 사례로부터 뉴캐슬병 바이러스를 분리하고 그 특성을 조사하였다. 그 결과, 발생 농장 산란계 폐사계의 뇌 및 폐 조직으로부터 뉴캐슬병 바이러스 MN1/10 주가 분리되었다. 이 바이러스는 F 단백질 분절 부위가 특징적인 병원성 motif(RRQKRF)를 가지고 있었으며 종란 평균 치사 지수(MDT)가 54.7시간으로 강독형 NDV이었다. 또한 발생 농장 내 생존하고 있는 산란계에서 고역가의 NDV 특이항체가 검출되었다. 유전학적 계통 분석을 실시한 결과, 몽골 분리주는 Class II에 속하는 genotype VIId 바이러스로 확인되었다. 유전학적 계통 분석 결과, 몽골 분리주는 몽골과 인접한 중국에서 유행하는 바이러스 그룹(CN2)에 속하는 것으로 분류되었다. 우리의 연구 결과는 몽골에서의 뉴캐슬병 최초 발생은 동북아시아 지역에서 유행하는 강독형 NDV의 유입에 의해서 이루어졌음을 말해준다.

(색인어: 뉴캐슬병바이러스, 몽골, 닭, 계통 분석)

사 사

이 논문은 국립수의과학검역원 수의과학기술개발 연구사업의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

인용문헌

- Aldous EW, Myun JK, Banks J, Alexander DJ 2003 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* 32:239-256.
- Alexander DJ 1988 Newcastle disease diagnosis. pp 147-160. In: *Newcastle Disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Alexander DJ 2003 Newcastle disease. pp 64-87 In: *Diseases of Poultry*, 11th edition. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Brown C, King DJ, Beal BS 1999 Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet Pathol* 36:125-132.
- Collins MS, Bashiruddin JB, Alexander DJ 1993 Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch Virol* 128:363-370.
- Ke GM, Yu SW, Ho CH, Chu PY, Ke LY, Lin KH, Tsai YC, Liu HJ, Lin MY 2010 Characterization of newly emerging Newcastle disease viruses isolated during 2002-2008 in Taiwan. *Virus Res* 147:247-257.
- Kim LM, King DJ, Suarez DL, Wong CW, Afonso CL 2007 Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 45: 1310-1314.
- Kommers GD, King DJ, Seal BS, Brown CC 2003 Pathogenesis of chicken-passaged Newcastle disease viruses isolated from chickens and wild and exotic birds. *Avian Dis* 47:319-329.
- Kou YT, Chueh LL, Wang CH 1999. Restriction fragment length polymorphism analysis of the F gene of Newcastle disease viruses isolated from chickens and an owl in Taiwan. *J Vet Medical Sci* 61:1191-1195.
- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK 2001

- Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 97:13-22.
- Lee YJ 2005 Molecular epidemiological and immunological analysis of viscerotropic velogenic Newcastle disease viruses isolated during epizootics from 1949 to 2002. Ph D Dissertation, Konkuk University, Seoul, South Korea. pp 22-50.
- Lee YJ, Sung HW, Choi JG, Kim JH, Song CS 2004 Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. *Avian Pathol* 33:482-491.
- Liang R, Cao DJ, Li JQ, Chen J, Guo X, Zhuang FF, Duan MX 2002. Newcastle disease outbreaks in western China were caused by the genotypes VIIa and VIII. *Vet Microbiol* 87:193-203.
- Liu XF, Wan HQ, Ni XX, Wu YT, Liu WB 2003 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* 148:1387-1403.
- Mase M, Imai K, Sanada Y, Sanada N, Yuasa N, Imada T, Tsukamoto K, Yamaguchi S 2002 Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. *J Clin Microbiol* 40:3826-3830.
- Mase M, Inoue T, Imasa T 2009 Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2001 to 2007 in Japan. *J Vet Med Sci* 71:1101-1104.
- Mo IP, Kwon YK, Han MG, Seong HW 2001 Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with virulent viscerotropic Newcastle disease viruses isolated in Korea. *Korean J Poult Sci* 28:99-106.
- Nagai Y 1993 Protease-dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends Microbiol* 1:81-87.
- OIE 2008 Newcastle disease. pp 576-589 In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th ed. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France.
- Rui Z, Juan P, Jingliang S, Jixun Z, Xiaoting W, Shouping Z, Xiaojiao L, Guozhong Z 2010 Phylogenetic characterization of Newcastle disease virus isolated in the mainland of China during 2001-2009. *Vet Microbiol* 141:246-257.
- Toyoda T, Sakaguchi T, Imai K, Inocencio NM, Gotoh B, Hanaguchi M, Nagai Y 1987 Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* 158:242-247.
- Tsai HJ, Chang KH, Tseng CH, Frost KM, Manvell RJ, Alexander DJ 2004 Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. *Vet Microbiol* 104:19-30.
- Yang CY, Shieh HK, Lin YL, Chang PC 1999 Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in western Europe. *Avian Dis* 43:125-130.
- Yu L, Wang Z, Jiang Y, Chang L, Kwang J 2001 Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the people's republic of China and Taiwan. *J Clin Microbiol* 39:3512-3519.
- Zou J, Shan S, Yao N, Gong Z 2005 Complete genome sequence and biological characterizations of a novel goose Paramyxovirus-SF02 isolated in China. *Virus Genes* 30:13-21.
- (접수: 2011. 2. 14, 수정: 2011. 5. 6, 채택: 2011. 5. 9)