

## 닭 도축장에서의 뉴캐슬병 바이러스 오염 실태 조사

최강석<sup>1</sup> · 이은경<sup>1</sup> · 전우진<sup>1</sup> · 권준현<sup>1</sup> · 이진화<sup>2</sup> · 성환우<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>국립수의과학검역원 조류질병과, <sup>2</sup>강원대학교 수의과대학

### Surveillance of Newcastle Disease Virus in Chicken Slaughterhouses

Kang-Seuk Choi<sup>1</sup>, Eun-Kyoung Lee<sup>1</sup>, Woo-Jin Jeon<sup>1</sup>, Jun-Hun Kwon<sup>1</sup>, Jin-Hwa Lee<sup>2</sup> and Haan-Woo Sung<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Avian Disease Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-757, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**ABSTRACT** We conducted a 10-month (March to October 2009) surveillance of Newcastle disease virus (NDV) in 13 slaughterhouses in Korea. NDV was isolated in 13.0%, 13.3%, 16.0%, and 10.8% of chicken farms, transport vehicles, hang rooms, and chilling water, respectively. Of NDV isolates from slaughterhouses, 37% were isolated in July. All NDV isolates were determined to be lentogenic viruses by RT-PCR-based pathotyping, and all NDV isolates had the <sup>112</sup>GKQGR/L<sup>117</sup> motif at the cleavage site of the F protein. Phylogenetic analysis based on the hypervariable region of the F protein gene classified all 25 NDV isolates examined into genotype I within class II. Of these, 24 were clustered together with the NDV V4 strain, while the remaining isolate was placed in the cluster belonging to the NDV Ulster 2C strain. Our results indicate that lentogenic NDV was a high-frequency contaminant in the serial process of ranging live birds to slaughtering at slaughterhouses.

(Key words : Newcastle disease virus, lentogenic, slaughterhouse, phylogenetic analysis)

## 서 론

뉴캐슬병(Newcastle disease; ND)은 *Paramyxoviridae* family의 *Avulavirus* genus에 속하는 avian paramyxovirus type 1(APMV-1) 즉 ND virus(NDV) 감염에 의해 발병되는 전염병이다. 닭에서의 병원성은 NDV의 병원성과 NDV에 대한 닭의 면역 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 세계동물보건기구(OIE)는 중간독 이상의 병원성 NDV의 감염에 의해서 유발되는 질병에 한하여 ND 발생으로 간주하고 있다(OIE, 2008). 병원성이 높은 NDV가 면역되지 않은 닭에 감염할 경우에는 심한 호흡기 증상, 소화기 증상 및 신경증상을 보인 후 일주일 이내에 100%에 가까운 높은 치사율을 나타낼 정도로 병원성이 높고 전염 속도가 빠른 것으로 알려져 있다(Alexander and Senne, 2008). 그러므로 ND는 고병원성 조류인플루엔자(highly pathogenic avian influenza; HPAI)와 함께 국내에서 뿐만 아니라 세계동물보건기구(OIE)에서도 질병 발생 유무를 엄격히 관리하는 가금 전염병중 하나이다.

NDV의 유전형(genotype)은 바이러스 F단백질 유전자의

염기서열에 기초한 유전학적 계통 분석에 의하여 분류하고 있으며(Aldous et al., 2003), 크게 Class I 과 Class II로 구분하고 있다(Kim et al., 2007; Lee et al., 2009a ; Liu et al., 2009; Wu et al., 2010). 이 중 닭에 병원성을 보이는 NDV는 현재까지 모두 Class II에 속한다. Class II 바이러스는 최소한 9개의 genotype(genotype I ~IX)이 존재한다(Kim et al., 2007; Wu et al., 2010). 이 중 genotype I 과 II는 닭에서 병원성이 없는 경우가 대부분인 반면 genotype III에서 IX에 속하는 NDV 대부분은 닭에 대한 병원성이 높다.

현재 ND는 아시아와 아프리카의 대부분 국가에서 상재적으로 발생하고 있다. 국내의 경우 2000년 이전까지는 3년 내지 5년을 주기로 전국적인 ND 대유행 양상을 보여왔다(Choi, 2010). NDV는 단일 혈청형만 존재하고 있는 것으로 간주되고 있기 때문에 백신주와 관계없이 ND에 대한 백신 예방 효과는 다른 질병에 비해 비교적 우수한 것으로 알려져 있다. 그러나 2001년부터 부화장 및 농장에서의 ND 백신 접종 의무화 제도 시행 이후 ND 발생 건수는 지속적으로 줄어들고 있다(Choi, 2010). 그러한 광범위한 백신 접종에도 불구하고

\* To whom correspondence should be addressed : sunghw@kangwon.ac.kr

현재까지 가금 농장에서의 ND는 완전히 근절되지 않고 산발적으로 발생하고 있는 실정이다. ND의 전염과 농장간 확산은 감염 조류의 이동, 야생 조류, 사료, 사람 및 차량 등 다양한 오염원에 의해 이루어질 수 있다(Alexander and Senne, 2008; Choi, 2010). 그럼에도 불구하고 농장이나 도축장 등 닭의 특정 생산 단계에서의 국내 ND의 오염 실태에 대한 체계적인 연구는 국내외적으로 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 도축장 출하 닭, 도축장 출입 차량, 도축장 냉각수 등 생산 단계에서 NDV 오염 실태를 조사하고, 이를 통해 ND 국내 주요 전파 경로를 파악하여 정부의 효율적인 뉴캐슬병 근절 대책 방역 사업에 활용코자 본 사업을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 검사 시료

도축장내 존재하는 NDV 분리를 위하여 도축장 내 분변 및 냉각수를 채취하였다. 분변 시료는 닭 수송용 차량과 현수실에서 시료 당 20 g 전후를 각각 채취하였다. 채취된 시료는 30 mL의 멸균 PBS로 진탕한 후 3,000 rpm에서 원심 분리하여 상층액을 채취한 후 0.45  $\mu$ m 필터로 여과하여 바이러스 분리용 시료로 사용하였다. 냉각수 시료는 도축장 냉각조 중 1차 냉각수와 최종 냉각수를 각각 40 mL씩 채취하고, 채취된 시료는 3,000 rpm에서 원심 분리하여 상층액을 채취한 후 0.45  $\mu$ m 필터로 여과하여 바이러스 분리용 시료로 사용하였다.

도축장 출하 닭의 경우 바이러스 분리를 위하여 농장당 10수씩 임의로 선정하여 면봉을 사용하여 총 배설장에서 시료를 채취하였다. 채취 시료는 농장 단위로 합하여 항생제 첨가된 유채용 PBS 10 mL를 가하여 분변이 잘 풀어도도록 진탕하였다. 각각의 시료는 3,000 rpm에서 원심 분리하여 상층액을 채취한 후 0.45  $\mu$ m 필터로 여과하여 바이러스 분리용 시료로 사용하였다. 농장별 ND 혈청 검사를 위하여 바이러스 검사 시료를 채취한 동일 개체에 대하여 개체별로 혈액을 채취하였다. 이들 혈청은 실험에 사용하기 전 56°C, 30 분간 열처리를 실시하여 비동화시켰다.

### 2. 바이러스 분리 및 동정

검사 시료에 대한 바이러스 분리는 특정 병원체 부재(specific pathogen-free, SPF) 닭 종란을 사용한 종란 접종법으로 실시하였다. 즉, 바이러스 분리용 검사 시료(종란당 0.2 mL)를 10일령의 SPF 닭 종란의 요막강 내로 접종한 다음 37°C

배양기에서 5일간 배양하였다. 배양 기간 동안 1일 2회 검란하면서 종란 폐사 여부를 관찰하였다. 이때 접종 후 1일 이내에 종란이 폐사한 경우 세균 오염으로 간주하고 폐기하였다. 배양 기간 중 폐사한 종란과 배양 기간이 완료된 종란은 4°C 냉장 온도에서 4시간 이상 보관한 후 요막강액을 채취하여 바이러스 유무를 검사하였다. 바이러스 유무는 채취한 요막강액으로부터 닭 적혈구 응집 반응(hemagglutination, HA)을 실시하여 응집 반응을 보이는 시료를 NDV 특이 항혈청을 이용한 혈구 응집 억제 반응(hemagglutination inhibition, HI)법으로 확인하였다.

### 3. 혈구 응집 억제 반응(HI) 검사

분리 바이러스의 동정(identification) 및 NDV 혈청 검사를 위하여 HI 검사를 실시하였다. HI 검사는 U자형 96 well micro-plate에서 실시하였으며, 4 HAU(hemagglutination unit)의 NDV 항원을 사용한 베타(beta)법으로 실시하였다. HI 검사를 위하여 국립수의과학검역원 OIE 뉴캐슬병 표준실험실(경기도 안양시)에서 보유하고 있는 NDV La Sota주 HI 항원 및 NDV 닭 면역혈청(면역원 La Sota주)을 표준 항원 및 항체로 사용하였다. 즉, U자형 96 well micro-plate의 전체 well에 0.1 M phosphate buffered saline(PBS), pH 7.2 를 25  $\mu$ L씩 첨가하고, 첫 번째 well에 혈청을 25  $\mu$ L를 첨가하여 2진 단계 희석을 실시하였다. 그 후 4 HAU의 NDV 용액을 전체 well에 25  $\mu$ L씩 첨가한 다음 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 다음 1% (v/v) 닭 혈구 부유액을 전체 well에 25  $\mu$ L씩 첨가한 다음 실온에서 40분간 반응시킨 다음 판독하였다. NDV에 대한 HI 항체 역가는 혈구 응집이 완전히 억제된 최고 희석 배수의 역수로 결정하였다.

### 4. NDV 분리주의 병원성 동정

병원성 NDV(강독형 및 중간독형)과 비병원성 NDV를 신속하게 판별하기 위하여 RT-PCR 검사 키트(*i*-NDV Detection Kit, iNtRON Biotech., Korea)를 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 따라서 병원성 분류(pathotyping)를 실시하였다. 병원성 NDV 검출 특이 primer는 병원성 NDV와 비병원성 NDV간 F 유전자 분절 부위(cleavage site) 유전자의 차이점을 이용하여 제조된 것이다. 즉, 병원성 NDV 분리주를 검출하기 위한 pathotype primer로서 NDPt-R(5'-TGC CAC TGM TAG TTG YGA TA-3')과 NDPt-F(5'-GGA AGG AGA CRR AAA CGC T-3')를 사용하여 204 bp의 핵산이 증폭되도록 설계되어 있으며, 모든 NDV를 증폭할 수 있는 common type primer로서 NDcomF156(5'-ATA CAC CTC RTC YCA GAC

AG-3')와 NDPt-R(5'-TGC CAC TGM TAG TTG YGA TA-3')를 사용하여 379 bp의 핵산이 증폭되도록 설계되어 있다. 바이러스 RNA 추출은 Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit(iNtRON Biotech., Korea) RT-PCR 반응은 common type primer set와 pathotype primer set 모두 동일한 반응 조건에서 실시하였다. 즉, RT 반응으로 45°C 30분, pre-denaturation 과정으로 94°C, 5분 처리 후 denaturation(94°C 20초), annealing(50°C 30초), elongation(72°C 30초) 과정을 40회 반복한 뒤 72°C 5분간 post-elongation 과정으로 하였다. PCR 반응 후 반응 산물은 전기영동을 실시하여 특이적인 증폭 산물이 있는지 판독하였다. 전기영동 결과 common type RT-PCR에만 핵산 증폭산물(379 bp)이 있는 경우 저병원성 NDV로, common type RT-PCR뿐만 아니라 pathotype RT-PCR에서도 핵산(204 bp)이 증폭되었을 경우 병원성 NDV로 판정하였다.

#### 5. NDV 분리주의 유전학적 계통 분석

NDV 분리주의 F 단백질 염기서열 분석과 이들 염기서열을 바탕으로 유전학적 계통 분석을 실시하였다. 바이러스 RNA 추출은 Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit(iNtRON Biotech., Korea)을 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 의거하여 실시하였다. RT-PCR은 Lee et al.(2004)이 사용한 primer set 및 PCR 반응 조건에 의거하여 실시하였다. RT-PCR을 위하여 사용된 primer set는 M1055(forward; 5'GC TGATCATGAGGTTACCTC-3')와 F508(reverse; 5'AGTCGGA GGATGTTGGCAGC-3')로 M 유전자의 1,055번째 핵산 부위에서 F 유전자의 508번째 핵산 부위까지 총 695개 핵산이 증폭되도록 설계되었다. PCR 증폭 산물은 전기영동을 실시하여 증폭 산물을 확인한 다음 마크로젠사(Macrogen Inc., Seoul, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 핵산 염기서열 교정

(editing), 아미노산 서열 예측 및 alignments는 MEGA version 4.0을 이용한 Clustal W Method로 분석하였다. 유전학적 계통 분석은 분석된 바이러스 유전자 염기서열 중 F 유전자의 첫 389개 핵산 염기서열(1~389)만 취하여 사용하여 MEGA version 4.0 프로그램을 이용한 neighbor-joining method로 작성하였다.

## 결 과

### 1. 도축장 NDV 오염도 조사

전국 36개 닭 도축장 중 강원, 경기, 충남, 경북, 전북, 전남 지역에 소재한 13개 도축장을 선정하여 3월부터 10월까지 매월 주기적으로 NDV 오염도 조사를 실시하였다(Table 1). 바이러스 분리를 위하여 이들 도축장에 출입하는 닭 수송 차량(vehicle), 도축장 현수실(hang room) 및 도축장 냉각수(1차 냉각수+최종 냉각수, chilling water) 등으로부터 총 460점의 검사 시료를 채취하였다. 바이러스 분리 검사 결과, 이들 460개 검사 시료 중 59점에서 NDV가 검출되었다. 월별 NDV 분리 경향을 살펴보면 7월에 NDV가 가장 많이 분리(22주, 전체 분리주의 37.2%)되었으며, 5월에 채취한 시료에서는 NDV가 검출되지 않았다.

닭 수송 차량의 경우, 매달 특정 시기에 도축장을 방문하여 출입하는 수송 차량을 대상으로 실시하였으며, 최소 18대(5월)에서 최대 45대(7월) 등 총 203대 차량으로부터 검사 시료를 채취하였다. 검사한 차량 중 13.3%(27/203)에서 NDV가 분리되었다. NDV 검출율은 7월(22.2%)과 10월(21.2%)에 상대적으로 높았으며, 5월(0%)과 9월(7.7%)에 상대적으로 낮게 나타났다.

도축장 내 현수실의 경우 매달 특정 시기에 도축장을 방문하여 최소 6개(4월)에서 최대 16개(8월) 등 총 81개소로부

**Table 1.** Isolation of Newcastle disease virus from samples collected at 13 chicken slaughterhouses in Korea

	Monthly virus isolation (percent isolation)								Total
	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	
Vehicle	2/20 (10.0)	2/19 (10.5)	0/18 (0)	3/28 (10.7)	10/45 (22.2)	4/28 (14.3)	2/26 (7.7)	4/19 (21.1)	27/203 (13.3)
Hang room	0/8 (0)	0/6 (0)	0/7 (0)	1/11 (9.0)	4/16 (25.0)	3/16 (18.8)	1/8 (12.5)	4/9 (44.4)	13/81 (16.0)
Chilling water	1/13 (7.7)	3/12 (25.0)	0/14 (0)	5/16 (31.3)	8/43 (18.6)	1/34 (2.9)	0/34 (0)	1/10 (10.0)	19/176 (10.8)
Total	3/41 (7.3)	5/37 (13.5)	0/39 (0)	9/55 (16.4)	22/104 (21.2)	8/78 (10.3)	3/68 (4.4)	9/38 (23.7)	59/460 (12.8)

터 검사 시료를 채취하였다. 검사한 현수실 중 16.0%(13/81)에서 NDV가 분리되었다. NDV 검출율은 수송 차량과 마찬가지로 7월(25.0%)과 10월(44.4%)에서 상대적으로 높았으며, 3월에서 5월에는 바이러스가 검출되지 않았다.

도축장 내 냉각수의 경우 매달 특정 시기에 도축장을 방문하여 최소 10점(10월)에서 최대 43점(8월) 등 총 176점의 검사 시료를 채취하였다. 검사한 냉각수 시료 중 10.8%(19/175)에서 NDV가 분리되었다. NDV 검출율은 6월(31.3%), 4월(25.0%), 7월(18.6%)에 상대적으로 높았으며, 5월에서 9월에는 바이러스가 검출되지 않았다.

## 2. 도축장 출하 닭에서의 NDV 오염율 조사

2009년 7월에서 10월 사이에 도축장으로 출하된 77개 농장의 육계 777수를 대상으로 닭 분변과 혈액을 채취하여 NDV 분리 및 혈청 검사를 실시하였다. 이들 육계 농장을 대상으로 백신 접종 내역을 파악한 결과, 77개 육계 농장 모두 1일령 때 NDV Ulster 2C주로 제조한 생독 백신을 공통적으로 분무 접종하였으며, 10일령 전후에는 농장별로 관급으로 배정된 다양한 ND 생백신을 1회 추가 접종한 것으로 파악되었다.

이들 77개 농장의 육계 777수를 대상으로 HI법으로 항체 검사를 실시하여 농장별 개체별 ND 항체 수준을 분석하였다. 그 결과, 평균 항체 수준이 농장별 0에서 4.1±2.1까지, 개체별 0에서 7 이상까지 보이는 등 다양한 수준의 HI 항체가 나타내었다. 육계 출하 농장 단위로 분석하기 위하여 평균 HI 항체가(log<sub>2</sub> 기준)를 <1, 1~<3, ≥3로 구분하였을 때 조사 대상 전체 농가 중 각각 32.5%, 42.8% 및 24.7%가 각각의 범위에 있는 것으로 나타났다. 개체별로 분석하였을 때 <1, 1~<3, ≥3의 항체가(log<sub>2</sub> 기준)를 보유한 개체는 조사 대상 전체 개체 중 49.4%, 20.1% 및 30.5%이었다(Table 2).

또한 이들 77개 육계 농장의 출하 닭 분변 시료로부터 바이러스 분리를 시도한 결과, 검사 대상 농장의 13.0%(10/77)에서 NDV가 분리되었다. NDV가 분리된 농장은 계군의 ND

면역 수준과 관계없는 양상을 보였으며, 특히 1개 농장의 경우에는 검사한 개체 모두에서 HI 항체가 검출되지 않는 농장에서 NDV가 분리되었다.

## 3. NDV 분리주의 병원성 분류

도축장 및 도축장 출하 닭에서 분리한 NDV 분리주에 대한 병원성은 pathotyping RT-PCR을 실시하여 평가하였다. 도축장에서 분리된 59주 및 도축장 출하 닭에서 분리된 10주 등 총 69주의 NDV 분리주를 대상으로 pathotyping RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, 모든 NDV를 검출할 수 있는 primer set(NDcomF156 및 NDPt-R)를 사용한 RT-PCR에서 본 연구에서 분리된 NDV 69주로부터 모두 379 bp 크기의 핵산이 증폭되었다. 그러나 또한 동일 바이러스 시료를 병원성 NDV만을 특이적으로 검출하는 primer set(NDcomF156 및 NDPt-R)를 사용한 RT-PCR에 적용한 결과, 204 bp 크기의 NDV 핵산이 증폭되지 않았다. 그러므로 본 연구를 통하여 분리한 NDV는 저병원성 바이러스인 것으로 판단되었다.

## 4. 도축장 및 도축장 출하 닭에서 분리된 NDV의 유전학적 특성

본 연구에서 도축장 및 도축장 출하 닭에서 분리된 NDV 분리주의 염기서열과 바이러스 계통 분석을 실시하였다. 이를 위하여 M 유전자의 1055번째 핵산 부위에서 F 유전자의 508번째 핵산 부위까지 총 695개 핵산이 증폭되도록 설계된 primer set(M1055 및 F508)를 사용하여 RT-PCR법으로 NDV 핵산 유전자를 증폭하였다. RT-PCR 결과, 분리주 69주 모두에서 695 bp에 해당하는 DNA 산물이 증폭되었다. 증폭된 DNA 산물의 유전자 염기서열 정보 중 F 유전자의 N 말단 부위 염기서열(389 bp)만 취하여 Genbank에 등록되어 있는 ND 바이러스들의 유전자 염기서열과 비교 분석을 실시하였다.

우선 NDV 분리주에 대하여 바이러스 병원성에 관여하는 것으로 알려진 F 단백질 분절의 motif 부위(112번에서 117번)에 해당하는 아미노산 서열을 조사하였다(Table 3). 본 연구에서 분리된 NDV 분리주 69주 모두 <sup>112</sup>GKQGR/L<sup>117</sup> motif를 가지고 있었다. 이러한 염기서열 즉 분절 부위 motif내 단염기성(monobasic) 아미노산을 가지고 있고, 117번째 위치에 leucine을 가지고 있는 아미노산 염기서열 패턴은 저병원성 NDV가 가지고 있는 F 단백질 분절 부위 motif의 특징이다(Collins et al., 1993; Nagai, 1993; Toyoda et al., 1987).

본 연구에서 분리한 NDV 분리주 중 25주(출하 닭 유래 9주, 차량 14주, 도축장 현수실 유래 2주)를 선택하여 F 단백질의 N 말단 부위 389개의 핵산 염기서열의 아미노산 서열을 사

**Table 2.** Distribution of ND HI antibody titer of chickens to be slaughtered

HI antibody titer (log <sub>2</sub> )	Flock (%) <sup>a</sup>	Individual (%)
<1	25 (32.5)	384 (49.4)
1 to <3	33 (42.8)	156 (20.1)
≥3	19 (24.7)	237 (30.5)
Total	77 (100)	777 (100)

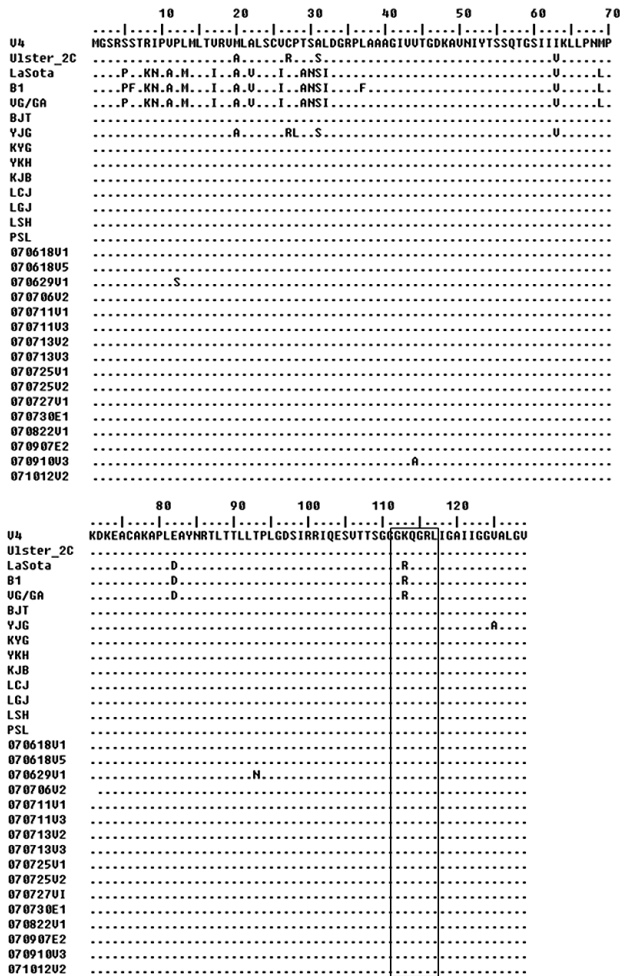
<sup>a</sup>Mean HI antibody titer of the flock was analyzed.

**Table 3.** Genetic characteristics of NDV isolates

NDV	Origin	Country	F cleavage site	Genotype	Cluster
BJT	Chicken	Gimcheon	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
YJG	Chicken	Hamyang	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	Ulster-like
KYG	Chicken	Seongju	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
YKH	Chicken	Changnyeong	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
KJB	Chicken	Sangju	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
LCJ	Chicken	Gimcheon	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
LGJ	Chicken	Haman	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
LSH	Chicken	Yeongdong	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
PSL	Chicken	Changnyeong	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070618V1	Vehicle	Goseong(Ganwon)	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070618V5	Vehicle	Chilgok	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070629V1	Vehicle	Yanggu	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070706V2	Vehicle	Wonju	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070711V1	Vehicle	Inje	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070711V3	Vehicle	Inje	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070713V2	Vehicle	Yanggu	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070713V2	Vehicle	Yanggu	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070725V3	Vehicle	Wonju	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070725V1	Vehicle	Wonju	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070727V2	Vehicle	Hwachon	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070730E1	Hang room	—	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070822V1	Vehicle	Gapyeong	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070907E2	Vehicle	—	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
070910V3	Vehicle	Anseong	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like
071012V2	Vehicle	Yangpyeong	<sup>112</sup> GKQGRL <sup>117</sup>	I	V4-like

용하여 저병원성 NDV 백신 strain들의 아미노산 서열 정보와 비교 분석하였다(Fig. 1). 그 결과, 분석한 NDV 분리주 중 24주는 NDV V4주와 가장 유사한 아미노산 서열을 가지고 있었다. 이 중 22주는 NDV V4주와 아미노산 서열이 100% 일치하였다. 070629V1주는 12번째(P→S)와 93번째(T→N)에서, 07091V3주는 44번째(V→A)에서만 NDV V4 strain과 아미노산 차이를 보였다. NDV 분리주 YJG는 NDV Ulster 2C주와 가장 유사한 아미노산 서열을 가지고 있었으며, 28번째(P→L)와 125번째(V→A)에서만 NDV Ulster 2C주와 아미노산 차이를 나타내었다.

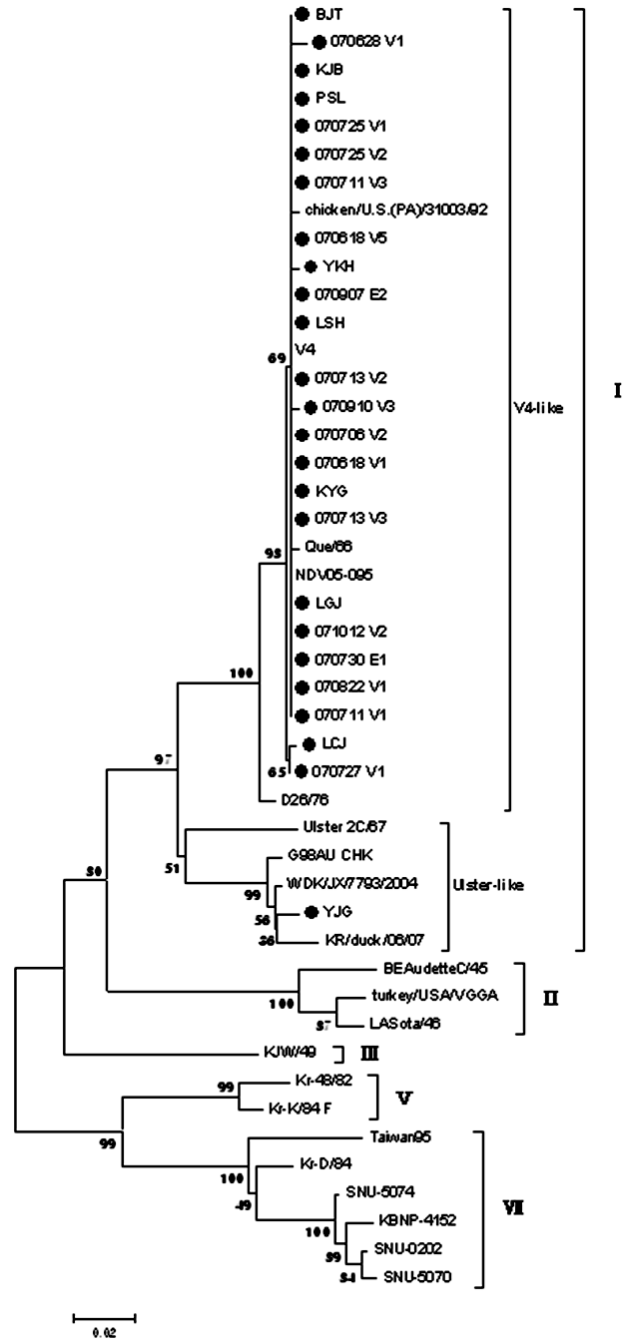
이들 NDV 분리주의 F 단백질의 N 말단 부위 389개 핵산 염기서열을 사용하여 유전학적 계통분석을 실시하였다(Fig. 2). 그 결과 분석된 NDV 분리주 25주 모두 Class II에 속하는 genotype I 바이러스로 분류되었다. 분석한 NDV 분리주 25주 중 24주는 NDV V4주와 같은 유전적 cluster(V4-like)를 형성하였다. 출하 닭에서 분리된 NDV 분리주 YJG는 Ulster 2C주와 같은 유전적 cluster(Ulster-like)를 형성하였다. 특히 국내 가금오리에서 분리된 NDV KR/duck/06/07주도 NDV 분리주 YJG는 같은 유전적 cluster(Ulster-like)로 분류되었으며, Ulster 2C주보다 유전적 관련성이 높은 것으로 나타났다.



**Fig. 1.** Nucleotides and predicted amino acid sequences of the first 389 nucleotides of the coding region of the F gene of NDV in the study. The F protein cleavage site sequence from position 110~119 is boxed.

### 고찰

본 연구를 통하여 우리는 국내 도축장 및 도축장 출하 닭을 대상으로 NDV 오염 실태를 조사하였다. 도축장은 많은 양계 농장(특히 육계)에서 출하된 닭들이 집합하는 장소이다. 또한 닭 출하에 동원된 수송 차량들은 도축장 방문 당시 다른 양계 농장에서 출하된 닭이나 닭 오염물(분변 등)과의 기계적 접촉 가능성이 있으며, 그 후 출하 목적으로 다시 다른 양계 농장을 방문한다. 이러한 상황 때문에 닭 전염병의 확산에 있어서 도축장이 중요한 병원체 매개 역할을 할 수 있는 위험성을 항상 가지고 있다. 그러므로 본 연구에서 실시한 도축장에서의 NDV 오염 실태 조사는 질병 역학적 측면에서 그 의미가 크다고 하겠다.



**Fig. 2.** Phylogenetic tree of the nucleotide sequence of NDV based on the first 389 nucleotides of the coding region of the F gene. NDV isolates in this study are marked with black circle (●).

본 연구에서는 2009년 당시 전국 닭 도축장의 36%(13/36 개소)를 대상으로 조사하였기 때문에 도축장에서의 오염 실태를 파악하기엔 충분한 자료라고 판단된다. 도축장에서 병원체의 주요 오염원으로 작용할 수 있는 출하 닭, 닭 수송용

차량, 도축장 현수실 및 도축장 냉각수(1차 및 최종 냉각수)를 조사 대상으로 선정하여 NDV 오염 실태를 조사하였다. 그 결과, 출하 닭(농장), 닭 수송용 차량, 도축장 현수실, 도축장 냉각수에서 각각 조사 대상건수의 13.0%, 13.3%, 16.0%, 10.8%에서 NDV가 분리되었다. 시기별로 보면 차량, 현수실, 냉각수 모두에서 7월에 가장 많이 바이러스가 분리되었다. 이는 하절기 삼계탕 수요 등으로 7월경에 도축물량이 가장 많은 시기이고, 이때 출입하는 수송 차량수도 증가하기 때문에 NDV에 노출될 가능성이 높아지는 여건과 관련된 것으로 보인다. 이러한 결과로 볼 때 NDV는 출하된 닭에서부터 도축 과정까지 NDV 오염이 상당수 유지되고 있음을 나타낸다. 다행스럽게도 도축장 및 출하 닭에서 분리된 NDV는 모두 저병원성 바이러스이었다. 현재 세계동물보건기구(OIE)는 중간독 이상의 NDV에 의하여 감염이 이루어질 경우에만 NDV 발병으로 규정하고 있다(OIE, 2008). 따라서 본 연구에서 분리되거나 오염된 NDV 사례는 OIE 규정상 NDV 발병으로 간주되지 않기 때문에 저병원성 NDV 분리 자체가 방역 조치 등을 취할 수준이 되지 않는다.

이들 육계 농장들은 모두 1일령(Ulster 2C strain)과 10일령 전 후에 NDV 생백신을 공통적으로 접종한 농장이었기 때문에 출하 과정에서 NDV 생백신 바이러스가 분리될 수 가능성이 있었다. 그러므로 출하 닭과 도축장에서 분리된 NDV 분리주와 백신주 간의 유전자 비교 분석을 실시했다. 그 결과, 본 연구에서 분석된 NDV 분리주는 분리 대상(출하 닭, 차량, 냉각수, 현수실)과 관계없이 모두 Class II에 속하는 genotype I에 속하는 바이러스였다. 이들 중 출하 닭에서 분리된 1주(KNU-YJG)는 NDV Ulster 2C주와 같은 유전적 cluster를 형성하였다. 그러므로 농장에서 생백신으로 사용한 NDV Ulster 2C주가 출하 과정에서 분리되었을 가능성이 있어 보인다. 그러나 F 단백질의 첫 129개 아미노산 서열을 비교해 보았을 때 KNU-YJG는 Ulster 2C주와 두 곳의 아미노산에서 차이를 보인 반면 NDV 백신을 하지 않는 국내 사육오리에서 분리된 NDV KR/duck/06/07주와는 아미노산 서열이 100% 일치하였다. 그러므로 NDV 분리주 KNU-YJG는 NDV 생백신이 아닌 다른 요인, 예를 들면 야생 조류, 가금 오리류 등으로부터 감염 가능성도 배제할 수 없다. 이와 관련하여, 본 연구에서 분리된 NDV 분리주중 24주가 NDV V4주와 같은 유전적 cluster(V4-like)로 분류되고 있다는 점에 유의할 필요가 있다. 현재 국내에서는 NDV V4주는 생백신으로서 사용하고 있지 않으나, 같은 유전적 cluster로 분류되는 NDV DSP-HP strain이 농장 일부에서 사용하고 있다. 그러나 본 연구에서 바이러스가 분리된 농장 중 NDV DSP-HP strain을 생백신으로 사

용한 농장은 한 군데도 없었다. Lee et al.(2009a, 2009b)에 의하여 보고된 연구에 의하면 NDV 생백신을 접종하지 않는 국내 가금오리에서 분리된 NDV중 대부분이 V4-like 바이러스들이거나 백신주로 사용되지 않는 Aomori-like 바이러스들이었다. 상기의 여러 가지 상황을 감안해 볼 때 본 연구에서 분리된 NDV V4-like 바이러스들은 NDV 생백신보다는 야생 조류나 가금오리 등 자연계에 존재하는 바이러스에서 유래되었을 가능성이 높아 보인다.

본 연구에서 조사한 77개 육계 농장의 경우, 농장 단위에서는 14.3%(11/77), 개체 단위에서는 49.4%(384/777)가 HI 검사 기준으로 NDV 항체 음성이었다. 이 결과는 전에 보고된 육계 농장에서의 NDV 항체 양성률 결과와 유사한 결과를 나타내었다(Jang et al., 2007; Heo et al., 2006). 본 연구에서 사용한 HI 항체 검사는 방어 항체 면역 수준을 측정하는 지표이다(Allan et al., 1978). 즉, NDV에 대한 HI 항체 수준이 계군 평균 4(log<sub>2</sub>) 이상 수준을 유지해야 NDV 야외 감염으로부터 완전히 폐사 피해를 예방할 수 있다는 점(Allan et al., 1978)을 감안할 필요가 있다. 조사한 육계 농장의 75%(57/77)는 2회에 걸쳐 생백신 접종을 실시했음에도 불구하고 평균 3(log<sub>2</sub>) 이하로 있어 NDV 야외 감염에 취약한 면역 수준을 보유하고 있었다.

결론적으로 국내 닭 도축장에서의 NDV 감염 실태 조사 결과를 종합해 보면 출하 닭, 도축장 수송 차량, 도축장 현수실, 도축장 냉각수 등에서 최소 10% 이상의 높은 저병원성 NDV 분리율을 나타내었다. 저병원성 NDV가 분리되는 자체는 방역상 문제가 되지 않지만 생산(출하 닭)에서 도축 과정(차량, 현수실 및 냉각수)까지 동일한 바이러스가 빈번하게 발생하고 있다는 점을 감안할 때, 생백신 의무 접종으로 어느 정도 면역이 형성된 닭에서 고병원성 NDV에 노출되더라도 병증을 보이지 않게 되는 점을 감안 할 때 고병원성 NDV가 출하 닭을 통하여 도축장에 유입될 경우 도축장 출입 차량 등을 통하여 질병 전파 및 확산 위험성이 있을 것으로 판단된다. 그러므로 질병 방역 위생 관리 차원에서 농장 단위 수준에서의 차단 방역과 도축장 수송 차량 등에 대한 철저한 소독 등 방역 위생 관리 노력이 필요해 보인다.

## 적 요

국내 도축장 및 도축장 출하 닭을 대상으로 NDV 오염 실태를 조사하였다. 조사 결과, 닭 출하 농장, 닭 수송용 차량, 도축장 현수실, 도축장 냉각수에서 각각 조사 대상건수의 13.0%, 13.3%, 16.0%, 10.8%에서 NDV가 분리되었다. 시기별로 보면

차량, 현수실, 냉각수 모두에서 7월에 가장 많이 바이러스가 분리되었다. Pathotyping RT-PCR을 실시한 결과, 이들 분리된 NDV 분리주는 모두 저병원성 NDV 양성 반응을 나타내었으며, F 단백질 분절 부위에 모두 <sup>112</sup>GKQGR/L<sup>117</sup> motif를 가지고 있었다. 본 연구에서 분리된 NDV 분리주의 F 단백질 유전자를 분석하여 보았을 때, 조사한 NDV 분리주 25주 중 24주가 NDV V4주와 같은 유전적 cluster를 형성하였으며, 나머지 1주는 NDV Ulster 2C주와 같은 유전적 cluster를 형성하였다. 이와 같은 연구 결과로 보아 국내에서는 출하 닭, 수송 차량, 현수실, 냉각수 등 생산에서 도축 단계까지 일련의 과정에서 높은 빈도로 저병원성 NDV 오염이 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

(색인어: 뉴캐슬병 바이러스, 저병원성, 도축장, 출하 차량, 계통 분석)

## 사 사

이 논문은 국립수의과학검역원 수의과학기술개발 연구사업의 지원에 의하여 이루어 졌습니다.

## 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, Senne DA 2008 Newcastle disease. Pages 75-100 In: *Diseases of Poultry*, 12<sup>th</sup> edition. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Allan WH, Lancaster JE, Toth B 1978 Newcastle disease vaccines: their production and use. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Choi KS 2010 Characteristics of recent epidemic strains of Newcastle disease virus in Korea. *Korean J Poult Sci* 37: 89-99.
- 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.
- Heo JH, Lee KC, Cho MH, Kim KH, Hah DS, Kim JS 2006 A survey of Newcastle disease virus antibody titers on slaughtered chickens. *Korean J Vet Res* 29:267-276.
- Jang HJ, Jung BY, Kim ST, Kwon KB, Rho SM, Park CK 2007 Nationwide seroprevalence of Newcastle disease for recent 5 years in Korea. *Kor J Vet Publ Hlth* 31:249-255.
- 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.
- Lee EK, Jeon WJ, Kim JW, Park MJ, Moon SH, Lee SH, Kwon JH, Choi KS 2009a Characterization of lentogenic Newcastle disease virus isolated in Jeju, Korea during 2006-2007 surveillance. *J Bacteriol Virol* 39:383-393.
- Lee EK, Jeon WJ, Kwon JH, Yang CB, Choi KS 2009b Molecular epidemiological investigation of Newcastle disease virus from domestic ducks in Korea. *Vet Microbiol* 134:241-248.
- 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.
- Liu X, Wang X, Wu S, Hu S, Peng Y, Xue F, Liu X 2009 Surveillance for avirulent Newcastle disease viruses in domestic ducks (*Anas platyrhynchos* and *Cairina moschata*) at live bird markets in Eastern China and characterization of the viruses isolated. *Avian Pathol* 38:377-391.
- 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.
- Toyoda T, Sakaguchi T, Imai K, Inocencio NM, Gotoh B, Hana-guchi 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.
- Wu S, Wang W, Yao C, Wang X, Hu S, Cao J, Wu Y, Liu W, Liu X 2010 Genetic diversity of Newcastle disease viruses isolated from domestic poultry species in Eastern China during 2005~2008. *Arch Virol* 156:253-261.

(접수: 2011. 3. 2, 수정: 2011. 6. 4, 채택: 2011. 6. 7)