

# 유전자 교잡법(In situ hybridization)에 의한 닭 뉴캐슬병의 진단법 개발

박남용\* · 최효임\* · 윤인중\*\*

(\*전남대학교 수의과대학 · \*\*중앙가축전염병 연구소)

## Development of Diagnostic Technique for Avian Newcastle Disease by in situ Hybridization

Nam-Yong Park\* · Hyo-Im Choi\* · In-Joong Yoon\*\*

\*Dept. of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine,  
Chonnam National University

\*\*Choong Ang Animal Disease Lab.

### 적 요

닭의 뉴캐슬병은 병원성과 숙주의 범위가 다양하여 감별진단이 쉽지 않은 질병이다. 뉴캐슬병의 진단에는 혈청학적 진단이나 바이러스 분리가 적용되고 있으나 혈청학적 진단상 교차반응이 흔하고 바이러스 분리는 많은 시간이 요구되는 단점이 있다. 따라서 분자생물학적 기법인 유전자 교잡법(in situ hybridization; ISH)을 개발하여 닭의 뉴캐슬병을 정확하고 신속하게 진단하고자 했다.

본 연구에서 개발된 유전자 교잡법(ISH)에 의한 뉴캐슬병의 진단은 자연 감염된 닭의 각 장기에 대한 파라핀 포매 조직에서 뉴캐슬병 바이러스의 RNA를 추출하여 RT-PCR에 의해 뉴캐슬병의 감염을 확인하였다. 이를 대상으로 분자생물학적 수준에서 조직내 유전자 교잡법을 개발하고자 파라핀 포매 조직을 준비하였다. 뉴캐슬병을 특이적으로 진단할 수 있는 바이러스 Genome 중 F gene(fusion gene)에서 특이 primer를 제작하여 백신주인 Hitchner B1 strain을 주형으로 Reverse Transcription(RT) 반응을 통하여 cDNA를 제작한 후 PCR을 통해 cDNA를 증폭시켜 전기영동을 통해 305bp 크기의 PCR산물을 확인하였다.

유전자 교잡법에 사용된 Probe는 RT-PCR 산물에 비방사선 물질인 바이오틴(Biotin)을 표지하였다. 이 Probe를 이용하여 RT-PCR을 통해 뉴캐슬병 감염 양성으로 진단되었던 파라핀 포매 조직에서 Microcapillary Action System을 이용하여 비장, 뇌, 폐, 림프조직, 기타 실질장기를 대상으로 ISH를 수행하여 특이적인 양성 반응을 확인하였으며 소요되는 시간은 1~2시간이었다. 따라서 ISH 기법을 닭 뉴캐슬병의 진단에 신속 정확한 진단기법으로 개발하였다.

### 1. 서론

닭의 뉴캐슬병(Newcastle disease)은 Paramyxovirus과, Rubulavirus(Rima 등, 1995)에 속하는 RNA바이러스

스인데 9개의 혈청형 중 Paramyxovirus type 1(PMV-1)은 단 하나의 혈청형을 가지나(Alexander와 Allan, 1974., Beard와 Hanson, 1984) 다양한 병원성을 나타내며 크게 강독주(velogenic strain), 중독주(mesogenic strain), 약독주(lentogenic strain)로 구분된다(Alexander,

1997). 뉴캐슬병은 1926년 인도네시아의 Java에서 최초 보고된 이후 전 세계적으로 심각한 발생이 보고되고 있으며(Kraneveld FC, 1926), 현재 우리 나라에서도 전국적으로 발생되고 있다(박 등, 2000). 실제 폐사율과 전염성이 대단히 높기 때문에 많은 경제적 피해를 주고 있는 닭의 가장 중요한 제1종 법정전염병으로 OIE list A(OIE, 1996)로 분류되어 있다.

뉴캐슬 바이러스는 (-)ssRNA 바이러스이며 약 15 kbps로 구성되어 있다(Millar NS, 1988). 이 바이러스는 6개의 단백질, 즉 NP(nucleoprotein), P(phosphoprotein), M(matrix protein), F(fusion), HN(hemagglutinin-neuraminidase protein), L(RNA-directed RNA polymerase)를 코딩하고 있으며, 이 중에서도 Nagai(1976) 등에 의하면 F gene이 뉴캐슬병 바이러스의 병원성을 결정하는 중요한 부위라고 하였다(Glickman 등, 1988). 뉴캐슬병 바이러스의 F(fusion) 단백질은 숙주세포내의 단백분해효소에 의해 잘려짐으로써 병원성을 나타내는데 강독주와 중독주는 이 F 단백질 활성을 숙주내에서 발휘하여 전신 장기로 감염을 일으키는 데 반해 약독주는 F 단백질이 잘리지 않기 때문에 점막부위에서만 감염이 인정된다(Gotoh 등, 1992). Brown(1999)에 의하면 바이러스 항원을 검출하는 면역화학적 염색에서 뉴캐슬병 바이러스의 약독주인 B1과 La Sota Strain에서 감염 양상이 점막부위에만 국한되어 나타났다고 하였다. 이러한 이유로 조직내 유전자 교잡법(ISH)을 실시할 경우 백신에 의한 감염시에는 양성 반응이 점막 부위에만 국한되어 나타나기 때문에 백신에 의한 감염도 감별이 가능할 수 있다.

국내 뉴캐슬병의 진단에는 혈구응집반응(HA) 및 혈구응집억제반응(HI)(Villegas, 1990), 바이러스 중화시험(Fabricant, 1949), ELISA(Allan HW, 1978, Miers 등 1983) 등에 의한 혈청학적인 진단법과 바이러스의 분리(Chomzcynskin와 Sacchi, 1987; Seal, 1995) 및 계태아 접종시험(Alexander 등, 1974) 등이 응용되고 있다. 그러나 혈청학적 진단방법들은 다른 바이러스 특히 Paramyxovirus type 3과 같은 혈청형에 교차반응(Alexander 등, 1984)을 하거나 백신에 의한 위양성 반응과 심급성 경과시에는 위음성으로 진단될 수 있

다(Oglesbee M 등, 1986). 또한 바이러스의 분리 및 계태아 접종시험은 뉴캐슬병을 확인할 수 있으나 많은 시간(바이러스 분리시 4~7일의 배양시간이 필요함)과 노력이 요구되는 단점이 있다. 이에 반해 분자생물학적 진단기법인 조직내 유전자 교잡법은 다양한 시료를 이용할 수 있고 초심자도 쉽게 응용할 수 있는 장점이 있으며 이미 제작된 Probe를 이용하여 1~2시간내에 조직내에서 바이러스의 검출이 가능하기 때문에 신속하고 아주 민감도가 높은 방법이다(조 등, 1999).

본 연구에 응용하였던 유전자 교잡법(ISH)은 조직의 형태를 그대로 유지하면서 세포내 핵산을 직접 검출해내는 기법으로 특정 DNA나 RNA의 염기서열을 세포질이나 핵내에서 probe를 이용하여 검출해낼 수 있는 장점이 있다. PCR 또는 RT-PCR이나 기존의 filter hybridization 기법은 세포의 형태를 유지할 수 없는 반면에 ISH기법은 세포나 조직의 형태를 유지할 수 있다는 점에서 병리학자들에게 각광을 받고 있으며 질병의 기전을 연구하는데 많은 도움이 된다(Park CS 등, 1991). 특히, 근래에 들어 probe에 비방사선 물질을 표지하면서 경비와 위험 부담이 줄었기 때문에 특히 바이러스 질병의 진단 기법으로서 응용은 점점 확대되어 가고 있다(Liu HJ, 1997).

## II. 재료 및 방법

### 1. 바이러스의 핵산 추출

임상증상 및 병리조직학적 검사를 통하여 전형적인 뉴캐슬병을 보인 가검물의 파라인 포매 조직내에서 뉴캐슬병 바이러스의 핵산을 추출하였다. 또한 국내 백신주로 널리 사용되고 있는 Hitchner B1에서도 QIAamp HCV kit(QIAGEN)를 사용하여 바이러스의 핵산을 분리하였다.

### 2. RT-PCR

#### 가. Primer

oligonucleotide primer는 DNASIS(2.5ver., Hitachi

Software Engineering Co., Ltd.)를 이용하여 뉴캐슬병에 특이적인 공통 primer로 ND-F(sense primer)과 ND-R(antisense primer)을 뉴캐슬 바이러스 백신주(Hitchner B1)의 Fusion gene(F gene) 부위에서 선택하였다(Table 1).

#### 나. 시료 준비

뉴캐슬병에 감염 의심된 조직에서 추출된 RNA 바이러스로 RT-PCR을 수행하였다. 음성대조군으로는 뉴캐슬병 바이러스 백신접종이 없는 정상 닭의 조직을 이용하였으며 양성대조군으로는 뉴캐슬병 바이러스의 백신주인 Hitchner B1 바이러스 핵산을 이용하였다.

#### 다. RT-PCR 수행 과정

역전사 반응은 RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2(TaKaRa Shuzo Co., Ltd.)로 수행하였다. 추출된 바이러스 RNA 4 $\mu$ l에 MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ l (5mM), 10X RNA PCR Buffer 4 $\mu$ l, RNase Free distilled water 0.5 $\mu$ l, dNTP Mixture 3 $\mu$ l (1mM), RNase Inhibitor 0.5 $\mu$ l (1unit/ $\mu$ l), ND-R(antisense primer) 3 $\mu$ l (20 pmole/ $\mu$ l), AMV Reverse Transcriptase 1 $\mu$ l (0.25 units/ $\mu$ l)를 넣어 총 20 $\mu$ l의 RT 반응액을 만든 후 42°C에서 90분 실시한 후 99°C에서 5분간 수행하여 반응을 정지시킨 후 5°C에서 5분간 보관하였다. 합성된 cDNA를 PCR로 증폭하기 위해 Thermal Cycler(Perkin Elmer 2400)를 이용하여 100 $\mu$ l를 총량으로 수행하였다. 반응액은 cDNA 합성 반응액 20 $\mu$ l에 MgCl<sub>2</sub> 6 $\mu$ l (2.5mM), 10X LA PCR Buffer II(Mg<sup>2+</sup> free) 8 $\mu$ l, Sterilized distilled water 62.5  $\mu$ l, ND-F(sense primer)를 3 $\mu$ l (20 pmole/ $\mu$ l), TaKaRa LA TaqTM 0.5 $\mu$ l (2.5 Units/100 $\mu$ l)를 넣은 후 총량이 100 $\mu$ l가 되게하여 최초 94°C에서 2분 반응 후 94°C에서 30sec, 55°C에서 30sec, 72°C에서 30sec을 1 cycle로 40회 반복한 후 72°C에서 7분간 반응시킨 후 4°C에서 반응산물을 저장하였다.

#### 라. 전기영동

증폭여부를 확인하기 위해 PCR 반응물을 Tris-Acetic acid EDTA(TAE) Buffer내에서 1.5% Agarose

gel을 10mg/ml의 Ethidium Bromide(EtBr) 3 $\mu$ l로 염색한 후 70 Volt로 30분간 전기영동을 수행한 후 U.V 상에서 증폭여부를 확인하였다.

### 3. 유전자 교잡법(ISH)

#### 가. 조직의 준비

부검시 채취한 조직은 10%중성 포르말린 고정 후, 파라핀 포매하여 5 $\mu$ m의 조직 절편을 제작하였다. 조직 절편은 실험 도중에 탈락되지 않도록 poly-L-lysine 처리된 Probe-On plus slide(Fisher Biotech<sup>®</sup>)에 고정하여 실온에서 보관하였다. 이 조직은 RT-PCR에 양성으로 확인된 파라핀 포매 조직이다. 음성대조군으로는 뉴캐슬병 바이러스 백신을 접종하지 않은 정상 닭의 파라핀 포매 조직과 닭의 전염성 기관지염(IB)로 진단된 닭의 조직을 이용하였다.

#### 나. Probe 제작

RT-PCR에 의해 증폭된 cDNA 산물을 최종 반응액에서 SUPRECTM-02(TaKaRa Shuzo Co., Ltd.)으로 Primer와 dNTP를 비롯한 잔존 Oligonucleotides를 제거한 후 증폭된 cDNA의 농도를 측정하기 위해 Spectrophotometer(Pharmacia biotech)를 이용하여 260nm에서 흡광도(Optical Density: OD)를 측정하였다. Probe의 바이오틴 표지는 Biotin-Chem-Link Kit(Boehringer Mannheim)를 이용하여 cDNA 1 $\mu$ g에 바이오틴 1 $\mu$ l를 첨가한 후 85°C에서 30분간 반응시켜 Biotin을 표지하였다. 표지된 Probe는 Brigati diluent(Research Genetics)에 희석하여 최종농도를 400ng/ml가 되도록 하여 -20°C에 보관하면서 ISH 반응에 사용하였다.

#### 다. ISH 수행 과정

ISH 수행 과정은 Microcapillary Action System(Fisher Biotech)을 이용하였다. 두 장의 Probe-ON Plus Slide를 맞대어 생긴 틈사이로 적은 양의 시약이 흡수되어 반응하도록 하였다. 그 다음 흡수성이 좋은 pad위에 슬라이드를 놓아 반응하고 남은 시약이 쉽게 제거되도록 하여 1~2시간 내에 모든 과정을 수행

하였다.

ISH 수행과정은 Table 2와 같이 수행하였다. 최초 110°C에서 Histochoice™(Amresco<sup>®</sup>)를 흡수하여 2분 동안 반응을 5회 반복하였다. Pepsin(Reserch Genetics 750102)으로 조직소화처리 과정을 수행하였다. 소화 처리된 조직에 Biotin이 표지된 Probe를 넣고 95°C에

서 10분, 40°C에서 20분을 수행하여 바이러스에 Probe가 결합하도록 하였다. Probe가 결합된 조직상에 내인성 Peroxidase를 제거하기 위해 Methanol과 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 함유된 Auto Blocker(Reserch Genetics 750110)를 이용하였다. 이후 Biotin에 특이적으로 결합하는 Streptoavidin-HRP(Horse Radish Peroxidase)를

**Table 1. Sequences of two primer of F gene in Newcastle disease virus**

Pimer	Sequences
ND-F(sense primer)	5' -ATA CAC CTC ATC CCA GAC AG-3'
ND-R(antisense primer)	5' -GTC GGA GGA TGT TGG CAG-3'

**Table 2. Procedures of In situ Hybridization**

STEP	REAGENT	CYCLE	TIME	TEMP
Deparaffinization	Dewaxing agent	5	2 min	110 ° C
Dehydration	Auto Alcohol	2	1wash	RT
Protein Digestion	Pepsin	2	4min	110 ° C
Washing	1 × Immuno/DNA buffer	1	2min	RT
Probe Denaturation	Probe	1	10min	95 ° C
Hybridization	Probe	1	20min	40 ° C
Washing	Auto Wash	1	1min	RT
	1 × Immuno/DNA buffer	1	1min	RT
Endoperoxidase Inhibition	Auto Blocker	1	2min	50 ° C
Washing	Auto Wash	1	1min	RT
	1 × Immuno/DNA buffer	1	1min	RT
Detection	Streptoavidin-HRP	1	15min	37 ° C
	Probe Lock	1	1wish	RT
Chromogen	AEC	1	4min	37 ° C
Washing	Auto Wash	2	1wash	RT
	1 × Immuno/DNA buffer	1	1min	RT
Counterstain	Auto Hematoxylin	1	30sec	RT
Buffering Washing	Distilled Water	4	1wash	RT
Universal Mount				

\* RT: Room Temperature

37°C에서 15분 동안 반응시켰다. 발색반응은 AEC (aminoethyl carbazole substrate)로 4분 동안 수행 후 대조염색은 Auto Hematoxylin(Reserch Genetics 750107)으로 실시하였다. 마지막으로 증류수로 세척하여 Universal Mount(Biomedica M-02)로 처리한 후 일반 광학현미경상에서 양성반응 여부를 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. RT-PCR 결과

RT-PCR 수행결과 증폭하고자 하였던 305bp 크기의 증폭부위를 파라핀 포매 조직에서 추출한 바이러스에서와 양성대조군으로 백신주인 Hitchner B1에서도 뚜렷하게 확인할 수 있었다(Fig 1). 또한 대조군으로 사용한 정상 닭에서는 바이러스가 증폭되지 않았다. 증폭된 산물의 농도를 측정하기 위해 흡광도를 측정한 결과 파장 260nm에서 4.80D값을 얻을 수 있었다.

#### 2. ISH 수행 결과

RT-PCR에서 양성인 뉴캐슬병에 감염된 파라핀 포매조직에서 ISH과정을 수행하였다. 뉴캐슬병의 임상증상이 없고 뉴캐슬병 백신이 접종되지 않은 닭의 정상 조직과 전형적인 전염성 기관지염(IB)으로 진단된 조직을 음성대조군으로 설정하여 ISH의 반응 양상을 관찰하였다.

전형적인 양성반응은 뇌와 비장을 비롯하여 기낭, 폐 및 F낭에서 관찰되었다. 이러한 장기의 상피세포와 혈관주위에서 침윤된 단핵구양 세포의 세포질내에서 적색의 양성반응을 확인하였다. 또한 뇌와 비장에서는 조직내에 분포하는 혈관내피세포 및 림프구에서 양성반응을 관찰할 수 있었다. 반면에 Probe를 처리하지 않은 뉴캐슬병 바이러스 감염조직과 음성대조군에서는 ISH의 양성반응을 확인할 수 없었다.

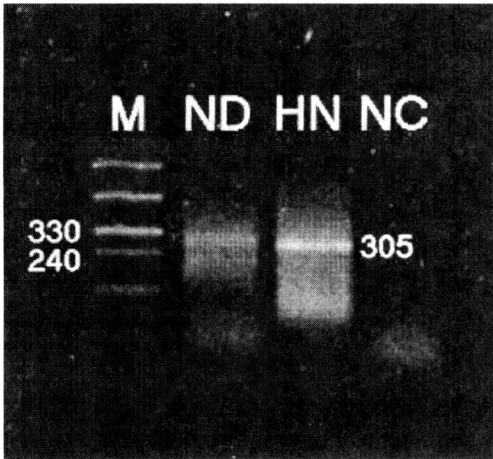
지금까지 알려진 조직내 뉴캐슬병 바이러스의 조직내 핵산 검출 장기로는 비장, 장 림프조직(대장의 맹장 편도, 소장외 메켈 결주머니)에 가장 뚜렷하며,

심근, 폐, 기낭, 안검, 뇌, F낭 등이며(Brown 등, 1999) 바이러스주의 종류와 감염시기와 경과 등에 따라 병변의 발생 분포가 다양하게 관찰된다(Alexander 등 1991). 예를 들어 Seal 등(2000)에 의하면 F낭에서도 양성 반응을 관찰한 반면에 Brown 등(1999)에 의하면 전부 음성 반응을 보였다고 하였다. 이러한 조직내 바이러스 분포의 차이는 Brown 등(1999)이 면역조직염색법과 ISH 기법의 민감도를 비교 실험한 결과와 같이 ISH 기법이 면역조직화학적 염색법에 비해 민감도가 높기 때문에 바이러스 분포가 적은 조직에서도 양성반응을 쉽게 관찰된 것으로 생각된다.

ISH 기법은 Gall(1969) 등에 의해서 처음 소개될 당시에는 검사방법이 복잡하고 시간이 많이 소요되었으나 최근 Unger(1988) 등과 Park(1991) 등에 의해서 Microcapillary Action System에 의한 자동화 과정이 도입되면서 1~2시간내에 ISH가 가능해졌다.

ISH를 실시하는데 있어서 가장 중요한 것은 표적 핵산을 특이적으로 검출할 수 있는 probe의 작성이다. 염기서열의 길이와 성상에 따라 20~50 base pair oligonucleotide probe(Brown 등, 1999; Seal 등, 2000), RNA probe, 그리고 유전자 재조합 cDNA probe로 나눈다. 길이가 너무 짧은 oligonucleotide probe는 조직을 잘 투과하는 높은 민감도를 갖지만 비특이적인 결합을 일으킬 수 있는 반면 너무 긴 것은 특이성이 높으나 민감도가 떨어지므로 가장 적절한 길이는 150~300 base pair로 알려져 있다. 또한 RNA를 사용한 riboprobe(Brown 등, 1999)의 경우에는 일반적인 환경에서 RNA 분해효소에 쉽게 파괴되므로 각별한 주위가 필요하기 때문에 진단 목적으로의 이용에는 한계가 있다(Herrington CS 등, 1992). 이러한 이유로 본 연구에서는 안전하고 특이적인 cDNA probe를 작성하여 ISH에 이용하였다. 더욱이 ISH는 조직을 이용하기 때문에 조직병리검사와 병행할 수 있는 장점이 있다(김 등, 1997).

유전자 교잡법(ISH)의 원리는 슬라이드위에 고정된 조직절편상에서 조직의 세포를 용해시켜 조직의 DNA 또는 RNA를 모두 노출시킨 후 병원체의 DNA 또는 RNA의 특이 부위 서열과 상보적인 결합부위를 가진 DNA 조각(probe)에 방사성 동위원소나 Biotin



M : KBII Marker  
 ND : 뉴캐슬병에 감염된 파라핀 포매 조직  
 HN : Hitchner B1 백신주(양성대조군)  
 NC : 건강한 닭 파라핀 포매 조직(음성대조군)

Fig 1. 뉴캐슬병(ND) 바이러스 핵산을 이용한 RT-PCR 결과 305 bp의 밴드를 확인하였다.

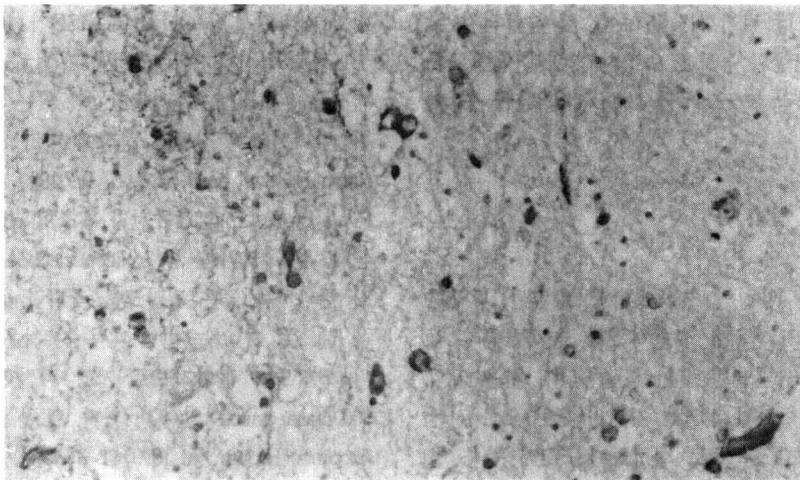


Fig 2. 뇌조직을 ISH 실시한 결과 신경세포(뉴론)의 세포질에서 적색의 강한 양성반응이 관찰됨. X200. ISH.

과 같은 비방사성 물질로 미리 표지를 하고, 이것을 세균이나 바이러스의 DNA 또는 RNA와 서로 유전자 교잡시킨 다음 표지된 DNA나 RNA 조각을 발색 등의 검출 방법으로 광학현미경을 통해 찾아냄으로써 조직상에서 바로 질병진단을 가능하게 하는 것이 그 기본 원리이다. Donahoe JP(1989)에 의하면 유전자 교잡법은 진단뿐만 아니라 진단 생물학, 세포생물학, 유전학 및 병리학 연구에 아주 유용한 기법이라 하였다.

본 연구의 수행을 통하여 뉴캐슬병에 감염된 환축의 여러 조직에 유전자 교잡법을 적용하여 뇌, 비장, 기낭을 비롯한 전신 실질장기에서 특이적인 양성반응을 단시간내에 신속하고 정확하게 확인할 수 있었다. 양성반응 개체의 조직내 ISH 수행과 RT-PCR 수행 결과 모두 양성반응을 보여 진단이 가능함을 알 수 있었다. 조직내 ISH를 적절하게 응용 및 유용한다면 매우 정확한 뉴캐슬병의 진단을 수행할 수 있을 것이라 확신한다.

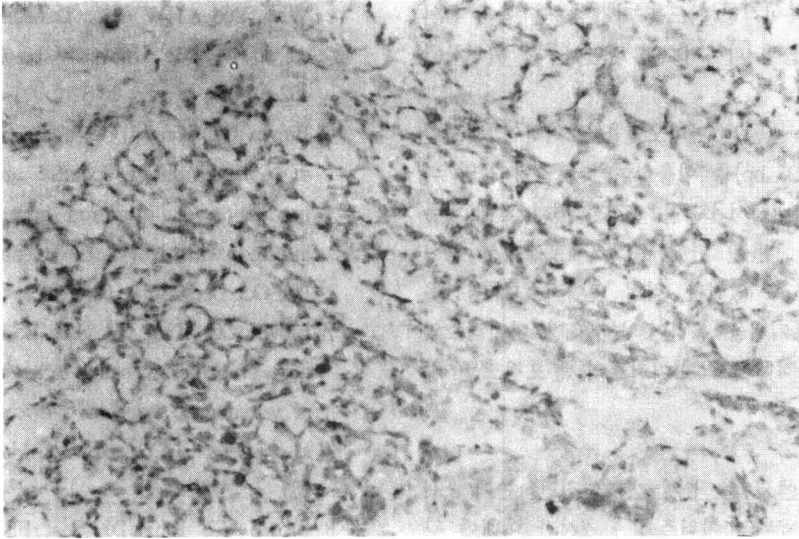


Fig 3. 폐조직을 ISH 실시한 결과 폐포대식 세포의 세포질에서 적색의 양성반응이 관찰됨. X100. ISH.

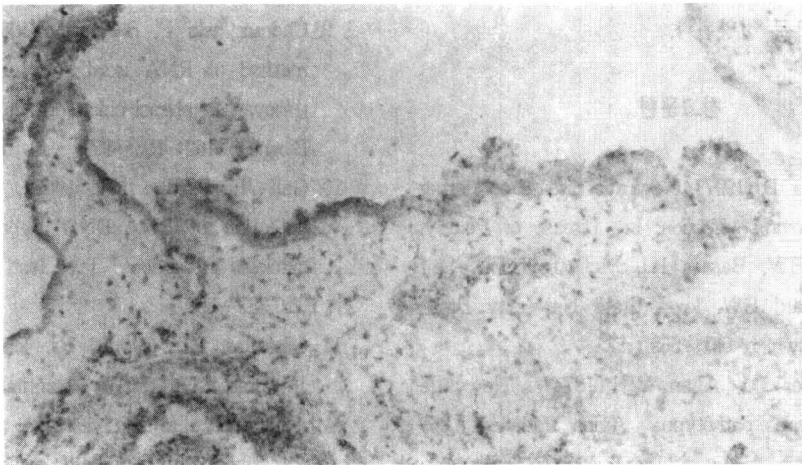


Fig 4. 뉴캐슬병 백신주가 접종된 계태아의 요막 조직에서 ISH를 실시한 결과 적색의 양성반응을 관찰할 수 있었다. X100. ISH.

#### IV. 결론

유전자 교잡법(ISH)을 이용하여 닭 뉴캐슬병을 신속하고 특이성 있게 진단할 수 있는 기법을 확립하였다. 임상증상과 병리조직학적 검사를 통해 뉴캐슬병으로 진단된 과라핀 포매 조직에서 바이러스 핵산을 추출하여 RT-PCR을 실시하였으며, 바이오틴으로

표지하여 Probe를 제작하였다. 이를 이용하여 자연 발생례로 의심되었던 닭의 과라핀 포매 조직을 대상으로 Microcapillary action system하에서 ISH를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 자연 발생 닭 뉴캐슬병 과라핀 포매 조직에서 추출한 뉴캐슬 바이러스에 대한 RT-PCR을 수행한

결과 305bp의 특이적인 밴드를 전기영동을 통해 확인함으로써 뉴캐슬병 바이러스에 감염여부를 확인하였다.

2. 비방사성 물질인 바이오틴을 표지하여 합성한 cDNA Probe(305 bp)를 이용하여 뉴캐슬병 감염 파라핀 포매 조직내에서 ISH를 실시한 결과 뇌를 비롯한 비장 등에 침윤된 단핵세포의 세포질에서 양성 반응을 확인할 수 있었다. 직접 바이러스의 핵산을 검출하는 ISH 기법을 통하여 뉴캐슬병 바이러스의 감염여부와 조직내에서 바이러스의 분포정도를 알 수 있었다.

이상의 결과에서 닭 뉴캐슬병을 진단하는데 ISH 기법은 조직내에서 바이러스를 1~2시간 이내에 간편하고 신속하게 검출할 수 있었으며, 바이러스의 분리·동정·혈청학적 검사법 등의 단점을 보완할 수 있어, 앞으로 닭 뉴캐슬병을 진단하는 데 크게 응용이 확대될 것으로 전망된다.

### 참고문헌

- Alexander DJ(1997). Newcastle disease and other paramyxovirus infection, In: Disease of Poultry, Calnek BW, Barnes HJ, McDougall LR, Saif YM, Beard CW, Iowa State University Press, Ames, Iowa, p. 541~569.
- Alexander DJ, Allan WH.(1974). "Newcastle disease virus pathotypes," Avian Pathol. 4: 269~278.
- Alexander DJ, Parsons(1984). "Avian paramyxovirus type 1 infection of racing pigeons. 2. Pathogenicity experiment in pigeons and chickens," Vet. Rec. 16: 245~249.
- Allan HW, Lancaster JE, Toth B.(1978). Newcastle disease vaccines-their production and use, FAO Animal Production and Health Series No. 10, FAO, Rome.
- Beard CW, Hanson RP.(1984). Newcastle disease, In M. S. Hofstad, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, Yoder HW et al. Diseases of Poultry, 8th ed. Iowa State University press, Ames, IA, p. 452~470.
- Brown CC, King DJ, Seal BS.(1999). "Detection of a macrophage-specific antigen and the production of interferon gamma in chickens infected with Newcastle disease virus," Avian Dis. Oct-Dec:43(4): 696~703.
- Brown CC, King DJ, Seal BS.(1999). "Comparison of pathology-based techniques for detection of viscerotropic velogenic Newcastle disease virus in chickens," J Comp Pathol, May:120(4): 383~389.
- Brown CC, King DJ, Seal BS.(1999). "Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence," Vet Pathol, Mar:36(2): 125~132.
- Chomczynski P, Sacchi M.(1987). "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction," Anal. Biochem. 162: 156~159.
- Gall JF, Pardue ML.(1969). "Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytologic preparations," Proc Natl Acad Sci USA, 63: 387~393.
- Glickman RL, Syddall RJ, Iorio RM, Sheehan JP, Bratt MA.(1988). "Quantitative basic residue requirements in the cleavage activation site of the fusion glycoprotein as a determinant for virulence for Newcastle disease," virus, J. Virol. 62: 354~356.
- Gotoh B, Ohnishi Y, Inocentio NM, Esaki E, Nakayama K, Barr PJ, Tomas G, Nagai Y.(1992). "Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3," J. Virol, 66: 50~54.
- Fabricant J.(1949). "Studies on the diagnosis of



- Newcastle disease and infectious bronchitis of fowls, I. The hemagglutination-inhibition test for the diagnosis of Newcastle disease," *Cornell Vet.* 39: 202~220.
14. Herrington CS, McGee JO.(1992), "Diagnostic Molecular Pathology A Practical Approach Vol I. Principles and basic methodology of DNA/RNA detection by in situ hybridization," Oxford University Press, p. 66~102.
  15. Liu HJ, Giambone JJ.(1997), "Characterization of a non-radioactive cloned cDNA probe for detecting avian reovirus," *Avian Dis.* 41: 374~378.
  16. Miers LA, Bankoski RA, Zee YC.(1983), "Optimizing the enzymelinked immunosorbant assay for evaluating immunity in chickens to Newcastle disease," *Avian Pathol.* 27: 1112~1125.
  17. Millar NS, Chambers P, Emmerson PT.(1988), "Nucleotide sequence of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle disease virus, stain Ulser: molecular basis for variations in pathogenicity between strains," *J. Gen. Virol.* 69: 613~620.
  18. Nagai Y, Klenk HD, Rott R.(1976), "Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus," *Virology.* 72: 494~508.
  19. Office International des Epizootics(1996), *Manual for the animal disease reporting to the OIE*, World Organization for the Animal Health, Paris, France.
  20. Oglesbee M, Jackwood D, Perrine K, et al.(1986), "In virus nucleic acid with a virus-specific cDNA probe by dot hybridization and in situ hybridization," *J Virol Meth.* 14: 195~211.
  21. Park CS, Manahan LJ, Brigati DJ(1991), "Automatid Molecular Pathology: one hour In Situ DNA Hybridization," *J of Hsitotech.* 14:4: 219~229.
  22. Rima B, Alexander DJ, Biller MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA, et al.(1995), *Paramyxoviridae*, *Virus Taxonomy*, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag, Vienna, p. 268~274.
  23. Seal BS, King DJ, Meinersmann RJ.(2000), "Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae," *Virus Res.* Jan 1:66(1): 1~11.
  24. Seal BS, King DJ, Bennett JD(1995), "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," *Journal of Clinica Microbiology.* 33: 2624~2630.
  25. Unger ER, Brigati DJ, Chenggis ML, et al.(1988), "Automation of In situ hybridization: Application of capillary action robotic workstation," *J Hstiotechnol.* 11: 253~258.
  26. Villgas P.(1990), *Laboratory manual, Avian virus diseases*, Collage of Veterinary Medicine.