

## Isolation and Characterization of Avian Metapneumovirus from Broiler Breeder Chickens in Korea

Kang-Seuk Choi\*, Woo-Jin Jeon, Mi-Ja Park, Eun-Kyoung Lee and Jun-Hun Kwon

*Avian Diseases Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, Korea*

Avian metapneumovirus (AMPV) is an emerging pathogen causing respiratory and reproductive illness in poultry worldwide. To demonstrate the presence of AMPV in domestic chickens in Korea, we attempted to isolate AMPV from affected chickens. A cytopathic agent was isolated using chicken tracheal ring culture from dead chickens from a broiler breeder farm with reduced egg production in Korea. This agent, termed SC1509 strain, subsequently passed in Vero cells with distinct cytopathic effects. The SC1509 strain was confirmed as avian metapneumovirus (AMPV) using both RT-PCR test and monoclonal antibody-based immunofluorescence assay. Sequence analysis based on the G glycoprotein revealed that the SC1509 strain had 22.5 to 96.0% nucleotide sequence identity and 11.1 to 92.7% predicted amino acid sequence identity with previously published AMPV strains, particularly with the highest sequence homology (95.8 to 96% for nucleotides and 92.2 to 92.7% for amino acids) to European strains belonging to genotype B. The SC1509 strain was phylogenetically clustered with genotype B viruses, confirming that the SC1509 strain belongs to genotype B. This is the first report of genotype B avian metapneumovirus from chickens in Korea.

**Key Words:** Avian metapneumovirus, Genotype B, G protein, Korea

### 서 론

조류메타뉴모바이러스 (avian metapneumovirus, AMPV) 감염증은 닭과 칠면조에서 호흡기 증상, 두부종창증 (swollen head syndrome), 산란저하 및 탈색란, 연각란 등 비정상란 발생 등을 유발하는 호흡기성 바이러스성 전염 병이다 (1). 이 전염병은 과거에 칠면조 비기관염 (turkey rhinotracheitis), 조류비기관염 (avian rhinotracheitis), 두부종창증, 조류뉴모바이러스 감염증 (avian pneumovirus infection) 등으로 불리어 졌다 (1). 최근에 동물보건기구 (OIE)는 이 질병을 AMPV 감염증 또는 칠면조 비기관염

으로 공식 명명하고 있다 (2).

이 질병의 병원체인 AMPV는 2001년 사람에서 최초로 분리 보고된 사람 메타뉴모바이러스 (human metapneumovirus) (3)와 함께 파라믹소비리데 과 (Family Paramyxoviridae)의 새로운 genus인 Genus *Metapneumovirus*에 속하는 바이러스로 분류되었다 (4). AMPV는 3'-N(nucleocapsid)-P(phosphoprotein)-M(matrix)-F(fusion)-M2(second matrix)-SH(small hydrophobic)-G(attachment glycoprotein)-L(large polymerase)-5'의 순서대로 8개의 유전자 배열로 구성된 single-stranded, negative sense RNA genome을 가지고 있다 (5). AMPV는 G 단백질의 염기서열 분석결과를 바탕으로 A에서 D까지 4개의 genotype이 있다 (6, 7). Genotype A와 B는 아시아 (8~11), 유럽 (6, 12, 13), 아프리카 (11, 14)의 칠면조와 닭에서 주로 보고되고 있으며, genotype C는 미국과 캐나다지역의 칠면조와 야생조류에서 주로 분리 보고 (15~17)되고 있으며, 그리고 genotype D는 프랑스의 오리에서 (18) 분리 보고된 바 있다.

국내에서의 AMPV 감염증은 Kim 등에 의하여 1992년 경기도 의정부지역 한 육용 종계군에서 심한 두부종창증

Received: September 9, 2009/ Revised: November 19, 2009

Accepted: November 24, 2009

\*Corresponding author: Kang-Seuk Choi, DVM, MS, PhD., Avian Diseases Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, 335 Joonangro, Manan-gu, Anyang, Gyeonggi 430-824, Korea.  
Phone: +82-31-467-1821, Fax: +82-31-467-1814  
e-mail: choiks@nvrqs.go.kr

\*\*This work was supported by a grant of the National Veterinary Research and Quarantine Service (B-AD15-2008-07-01), Korea.

을 보이는 사례에서 APMV 중화항체를 검출 보고한 것이 최초의 발병 보고 사례이다 (19). 이 결과는 비록 혈청학적 조사결과이지만, 이미 국내 사육닭에서는 혈청학적으로만 1990년대 초 이전에 국내에 유행하고 있었음을 말해 주고 있다. 최근에는 일부 연구자에 의하여 APMV 감염증이 국내사육 육용종계, 육계, 산란계에서 만연되어 있음을 혈청학적 검사결과를 근거로 하여 보고한 바 있다 (20~23). 그럼에도 불구하고, 아직까지 국내사육 닭에서 APMV의 분리 보고 사례가 없는 실정이다. 본 연구에서는 APMV 감염증이 발생한 국내 한 육용 종계군의 닭 폐사체로부터 바이러스를 처음으로 분리 동정하고, 분리된 바이러스의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 검체 시료 채취

바이러스 분리를 위한 시료 채취 대상 농장은 국립수의과학검역원으로부터 APMV 감염증과 대장균증의 복합 감염 사례로 최종 진단된 한 육용종계 농장이었다. 대상 농장은 경기도내 39,000수 사육규모의 29주령의 Ross 품종의 육용종계 사육농장으로, 검사 시료 채취 당시 산란 피크가 70%에서 정체되었으며, 탈색란이 5% 정도로 증가하고 있는 상태였다. 발생 당시 폐사 닭이 매일 40수 내지 50수씩 관찰되었다. 바이러스 분리를 위하여 APMV 감염증이 발생한 육용종계 농장으로부터 폐사 닭 6수를 제공받았다. 이들 폐사 닭들은 부검 당시 안면부종과 함께 구강에는 구강 분비물이 섞인 사료 내용물로 충만하였으며, 폐사체 부검 당시 대장균성 복막염 병변 소견을 나타내었다. 세균검사결과 폐사 닭의 간과 비장조직에서 대장균이 분리되었다.

바이러스 분리를 위하여 방문 당시 농장에서 폐사 닭의 부비동 (nasal turbinate) 조직 검사 시료를 채취하거나 멸균 면봉을 사용하여 폐사 닭의 비인두액 (nasopharyngeal fluid)을 채취하였다. 채취한 부비동 조직 시료는 최종 농도 10% (v/v) 되게 항생제 (Gibco™ antibiotic-antimycotic solution, GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)를 함유한 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2)를 첨가하여 균질화 (homogenization)한 다음 Vortexer (Thermolyne Corp, Dubuque, IA, USA)를 사용하여 약 2분간 철저히 혼합하였다. 비인두액 시료의 경우 상기와 같은 PBS 용액 1.0 ml에 첨가한 다음 vortexer를 사용하

여 약 2분간 철저히 혼합하였다. 각 검사 시료액은 원심분리기 (Beckman Coulter™, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 3,000 rpm, 10분 동안 원심분리를 실시하였다. 채취한 원심 상층액을 0.45 µm Pall Acrodisc syringe filter (Pall Co., Ann Arbor, MI, USA)에 여과시켜 바이러스 분리를 위한 접종 시료로 사용하였다.

### APMV 검출용 RT-PCR

검사 시료내 APMV 존재 여부를 위한 검사는 역전사 중합효소연쇄반응법 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 실시하였다. RT-PCR을 위하여 Bayon-Auboyer 등 (1999)이 사용한 APMV 모든 아형을 검출할 수 있는 forward primer (Nd: 5'-AGCAGGATG-GAGAGCCTCTTTG-3')와 reverse primer (Nx: 5'-CATGGC-CCAACATTATGTT-3')를 사용하였다 (24). Nd/Nx primer set는 APMV N 단백질 유전자 일부를 암호화하는 115개의 핵산이 증폭되도록 설계되어 있다.

RNeasy RNA extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 검사 시료로부터 직접 APMV 전체 게놈 유전자 RNA를 추출하였다. APMV N 단백질 유전자의 cDNA 합성은 역방향 프라이머 Nc (5'-TTCCTTGAATTGTTTGAGAAGA-3')와 AccPower® RT premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 첫 번째 가닥 cDNA를 합성하였다. 그 다음, 합성한 cDNA 절편, Nd 프라이머 및 Nx 프라이머를 사용하여 AccPower® RT/PCR premix kit를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 PCR 증폭기 (PTC-220, MJ-research, Waltham, MA, USA)에서 94℃에서 15분간 열처리한 후 94℃ 20초간 변성, 51℃에서 45초간 어닐링, 72℃에서 45초간 확장을 총 30회 실시하여 PCR 증폭을 실시하였고, 마지막으로 72℃ 5분간 반응시켜 DNA 합성을 최종 완료하였다. PCR 증폭산물을 아가로스겔에서 전기영동을 실시하여 115 bp 크기의 핵산이 증폭되는 경우 APMV 양성으로 간주하고 추가 분석에 사용하였다.

### 계태아 기관배양

계태아 기관조직배양 (tracheal organ culture)법은 Gough 등 (1998)의 방법에 준하여 실시하였다 (25). 즉 19일령 specific pathogen free (SPF) 닭 종란의 계태아 기관을 forcep으로 무균적으로 꺼내어 페트리디쉬에 놓고 기관 외부를 둘러싸고 있는 결체조직 성분을 제거하였다. 그

후 0.6 mm에서 0.8 mm 두께의 기관링 (tracheal ring)이 형성되게 기관을 세절하였다. 항생제를 함유한 Eagle's minimum essential medium(EMEM) (GibcoBRL) 1.0 ml가 담긴 5 ml 배양 튜브 (BD Falcon™, Erembodegem, Belgium)에 기관링을 넣고 37℃가 유지되는 회전배양기에서 약 100 rpm 속도로 회전배양시켰다. 다음날 배양된 기관링을 현미경 (BX51; Olympus Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하여 기관섬모 (cilia) 운동이 활발한 것만 대상으로 바이러스 분리용으로 사용하였다.

#### 바이러스 분리

PCR 양성 반응을 나타낸 조직 또는 비인두액 시료를 계대하 기관배양조직에 접종하여 바이러스 분리를 시도하였다. 즉, 전날 미리 기관링을 첨가하여 배양한 튜브를 꺼내어 배양액을 제거한 다음 검사 시료를 튜브당 200 µl씩 첨가하여 37℃에서 1시간 흡착 (adsorption)시켰다. 그 후 접종액을 제거하고 항생제를 함유한 EMEM 1 ml를 첨가하여 37℃가 유지되는 shaking rotator (BR-23UM; Taitec Co., Shaitama, Japan)에서 약 100 rpm 속도로 회전배양시켰다. 그 후 튜브내 배양한 기관의 섬모 활력 정도를 현미경으로 매일 관찰하였다. 세포배양액만을 접종하여 배양한 튜브를 기관섬모 운동을 관찰하기 위한 기관조직배양 대조 튜브로 사용하였다. 접종 후 5일째까지 기관섬모 운동에 이상이 없는 경우 기관조직배양 배양액을 채취하여 동일한 방법으로 추가 계대배양을 실시하였다. 기관조직배양에서 섬모운동정지 (ciliastasis)가 관찰된 경우 배양액을 채취하여 유리 평판 (glass plate)에서 1% (v/v) 닭 적혈구 용액과 혼합하여 적혈구 응집능을 조사하였다. 적혈구 응집능을 보일 경우 Newcastle disease virus나 avian influenza virus와 같은 혈구응집능 바이러스로 간주하였다. 적혈구 응집능이 관찰되지 않을 경우 *Mycoplasma spp*에 대한 PCR 검사 (26)와 infectious bronchitis virus에 대한 RT-PCR 검사 (27)를 실시하여 타 병원체 오염 여부를 조사하였다.

#### 분리 바이러스의 동정

분리한 바이러스는 면역형광항체법 (immunofluorescent assay, IFA)으로 AMPV 동정을 실시하였다. 미리 Vero 세포를 단층 배양한 IFA용 슬라이드 글라스가 들어있는 배양 용기에 분리 바이러스액을 0.2 ml씩 접종하였다. 그 후 37℃에서 1시간 동안 흡착시킨 다음 접종액을 제거하

고 항생제 용액을 포함하는 EMEM을 배양 용기당 5 ml씩 첨가하고 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 접종 3일 후 배양 슬라이드 글라스를 꺼내어 IFA 검사에 사용하였다. 즉, 감염세포가 있는 슬라이드를 배양 용기에서 살짝 꺼내어 세포고정액 (acetone : ethanol = 1 : 4)으로 -20℃에서 10분간 고정시켰다. 그 후 AMPV 특이 단클론항체 12.2.1 (National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang, Korea)를 1:100 희석하여 슬라이드에 방울방울 떨어뜨려 세포가 완전히 잠기게 하였다. 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 AMPV 특이 단클론항체 12.2.1를 제거하고 PBS 용액으로 3회 세척하였다. 그 후 형광색소 (FITC)가 결합된 항-마우스 2차 항체 용액 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)을 1:100배 희석하여 슬라이드 글라스에 점적하였다. 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 2차 항체 용액을 제거하고 PBS 용액으로 3회 세척하였다. 그 후 슬라이드 글라스를 형광현미경용 마운팅 용액 (Blomeda Co., Foster City, CA, USA)으로 점적한 후 다시 그 위에 커버글라스로 덮고 형광현미경 (IMT-2; Olympus Co.)으로 형광 발색 여부를 관찰하였다.

#### Vero 세포에서의 증식성 조사

AMPV 국내분리주의 Vero 세포 (ATCC CCL81; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서의 증식성을 조사하였다. 항생제와 5% fetal bovine serum (GibcoBRL)이 첨가된 EMEM 배양액으로 약 10<sup>6</sup> 세포/ml가 되게 Vero 세포를 부유시킨 다음 세포 부유액 5 ml를 25 cm<sup>2</sup> 세포배양용 플라스크에 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 배양함으로서 단층을 형성시켰다. 플라스크에 Vero 세포가 단층을 완전히 형성되도록 배양한 후 분리 바이러스를 플라스크당 0.2 ml씩 접종하여 37℃에서 1시간 동안 흡착시켰다. 그 후 접종액을 제거하고 항생제와 2% fetal bovine serum이 첨가된 EMEM 배양액을 배양 용기당 5 ml씩 첨가하고 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃ 배양기에서 5일간 배양하였다. 그 후 세포배양액을 수확하여 동일한 방법으로 10회 연속 계대하면서 세포변성효과 (cytopathic effects, CPE) 형성 여부를 관찰하였다. 이후 동일한 방법으로 AMPV를 접종한 후 48시간에 배양상층액을 취하여 바이러스 역가를 측정하였다.

### 바이러스 역가 측정

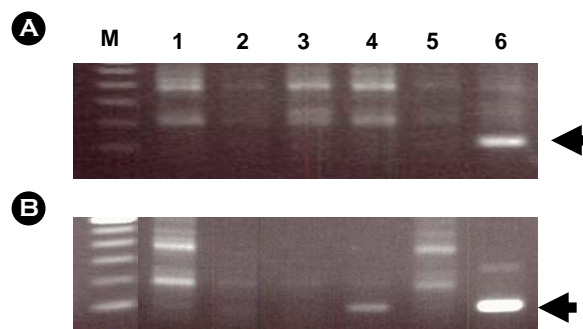
기관조직배양법에 의한 바이러스 역가 측정의 경우 상기에서 기술한 기관링을 배양한 튜브를 사용하였다. 바이러스 배양액을 10진 단계 희석한 다음, 희석액을 튜브당 100  $\mu$ l 희석당 5개 튜브씩 접종한 다음 일주일간 회전배양하면서 기관검토 활력 여부를 관찰하였다. Vero 세포를 이용한 바이러스 역가 측정의 경우 조직배양용 96-well microtiter plate를 사용하여 기관조직배양법과 동일한 방법으로 실시하고 접종 후 7일간 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 배양하면서 CPE 출현 여부를 관찰하였다. 바이러스의 감염 역가는 기관조직배양법의 경우 기관검토 활동이 중지된 튜브가 50%되는 희석배수의 역수 (50% cilia infective dose, CID<sub>50</sub>)로, Vero 세포의 경우 CPE가 관찰되는 well이 50% 되는 희석배수의 역수 (50% tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>)로 표시하였으며, CID<sub>50</sub>와 TCID<sub>50</sub>은 Reed & Muench의 방법에 따라 산출하였다 (28).

### AMPV 유전형 및 계통 분석

AMPV 국내분리주의 유전형 분석은 AMPV G 단백질 유전자의 염기서열 분석을 통하여 실시하였다. 이를 위하여 forward primer (Gf1; 5'-ATGGGGTCAGAGCTCTACATC-3') 및 reverse primer (Gr1; 5'-TTATTGACTAGTACAGCA-CCAC-3')를 사용한 RT-PCR법으로 AMPV G 단백질 유전자 1245개의 핵산을 증폭하였다.

AMPV RNA는 RNeasy RNA extraction kit (Qiagen)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 바이러스 배양액으로부터 추출하였다. AMPV G 단백질 유전자의 cDNA 합성은 추출한 RNA, Gf1 primer 및 Gr1 primer를 AccuPower™ RT/PCR premix kit (Bioneer)에서 제공한 튜브에 Gr1 primer를 첨가하여 제조사의 매뉴얼에 따라 RT-PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은 95℃에서 15분간 열처리한 후 95℃에서 60초간 변성, 58℃에서 60초간 어닐링 및 72℃에서 90초간 확장하는 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72℃ 5분간 DNA 합성을 실시하는 것으로 하였다. RT-PCR이 끝난 후 1,245 bp 크기의 핵산 증폭산물은 아가로스겔에서 전기영동을 실시하여 확인하였다. AMPV G 단백질 유전자의 핵산 염기서열은 자동염기서열분석기 (ABI 377, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA)를 사용하여 RT-PCR 증폭산물로부터 직접 분석하였다.

유전자 분석은 RT-PCR에 의해 증폭시킨 1,245 bp의 G



**Figure 1.** Detection of AMPV RNA in dead chickens using RT-PCR. Total RNA was isolated from nasopharyngeal swabs (A) or nasal turbinate tissues (B). Lane M, molecular marker; lanes 1~6, dead chickens tested. The arrow represents the expected size of PCR products amplified by PCR.

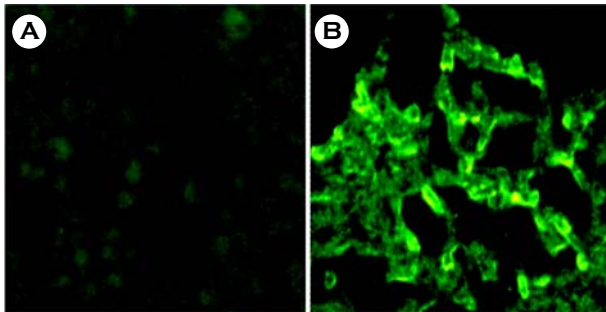
유전자 핵산 염기서열을 취하여 분석하였다. 계통발생학적 유전자 분석 (phylogenetic analysis)을 위한 핵산 염기서열 교정 (editing), 아미노산 서열예측 및 alignments는 Lasergene 7.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)를 사용하여 실시하였다. 분리 바이러스의 유전자 염기서열 정보는 GenBank에 이미 공개된 AMPV 유전자 염기서열 정보와 비교 분석하였다. 계통분류학적 분석은 Clustal X 프로그램 내에서 neighboring-joining method로 1,000 bootstrapping하여 분석하고 TreeView 프로그램을 통해 도식화 하였다.

## 결 과

### AMPV 감염 발생농장으로부터 바이러스 분리 및 동정

본 연구에서 AMPV 감염증이 발생한 것으로 진단된 육용종계 농장의 폐사 닭을 대상으로 바이러스 분리를 시도하였다. AMPV 발생농장의 폐사 닭 6수로부터 채취한 부비동 (NT-1에서 NT-6)과 비인두액 시료 (OP-1에서 OP-6)를 대상으로 Nd/Nx primer set를 사용한 AMPV RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 검사 시료 비인두액 시료의 경우 6번 (OP-6) 시료에서, 부비동 검사 시료의 경우 4번 (NT-4)과 6번 (NT-6) 검사 시료에서 115 bp 크기의 핵산이 증폭되었다 (Fig. 1).

이들 PCR 양성 시료를 기관배양조직에 접종하여 바이러스 분리를 시도하였다. 그 결과 NT-4 시료를 접종한 기관배양조직에서 접종 3일째부터 기관검토의 활력이 현저히 저하되기 시작하였으며, 접종 5일째 기관검토의 운동이 완전히 정지되었다. NT-6 및 OP-6 시료의 경우 접종

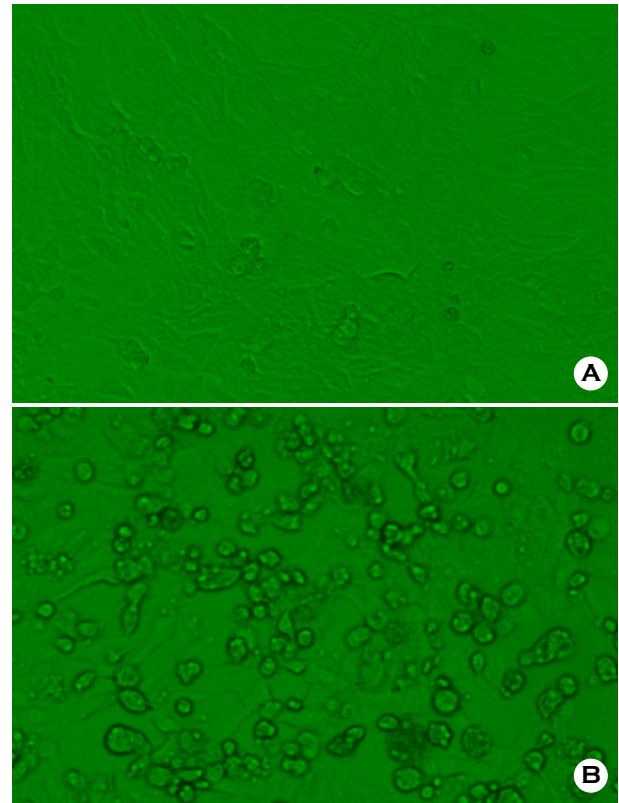


**Figure 2.** Immunofluorescent staining of AMPV (SC1509 strain)-infected Vero cells using AMPV-specific monoclonal antibody 12.2.1. **A:** Mock-infected Vero cells, **B:** AMPV-infected Vero cells.

후 4일째부터 기관섬모의 활력이 저하되기 시작하였다. 배양액만 접종한 대조 시료는 배양기간 내내 기관섬모의 활력이 저하되지 않았다. 모든 검사 시료의 기관조직배양 배양액을 동일한 방법으로 새로 배양한 기관조직에서 추가 계대배양을 실시하였다. 그 결과 이들 3개의 PCR 양성 시료는 배양 후 3일 이후 급격히 기관섬모의 활력이 저하되었으며, 배양 5일 후 기관섬모 활력이 완전히 정지되었다.

PCR 양성 시료를 기관조직배양에서 2대 계대한 다음 수확한 배양액을 대상으로 Nd/Nx 프라이머 세트를 사용한 RT-PCR법으로 AMPV가 존재하는지 여부를 조사하였다. 그 결과, 검사 시료 NT-4, NT-6 및 OP-6를 접종한 기관조직배양 배양액 모두에서 115 bp 크기에 해당하는 핵산이 증폭되었다. 이들 기관조직배양 배양액을 채취하여 1% (v/v) 닭 적혈구와 혼합하였을 때 이들 배양액 모두 적혈구를 응집시키지 않았다. 그러므로 분리 바이러스는 적혈구 응집능이 있는 Newcastle disease virus와 avian influenza virus는 아닌 것으로 판단하였다. 동일 시료를 대상으로 타 병원체 오염 여부를 조사하였을 때 시료접종 배양액 모두에서 *Mycoplasma spp*나 infectious bronchitis virus는 검출되지 않았다.

AMPV에 대한 RT-PCR 양성 반응이 진성임을 최종 확인하기 위하여 NT-6 시료에서 분리된 바이러스를 Vero 세포에 접종한 다음, AMPV 특이 단클론항체 12.2.1을 사용하여 형광면역염색을 실시하였다. 그 결과, 분리 바이러스 감염세포의 경우 세포질에서 단클론항체 12.2.1와의 항원-항체 결합 반응으로 강한 형광염색반응을 나타내었다 (Fig. 2). 그러나 대조 Vero 세포는 세포내 어떠한 형광염색도 관찰되지 않았다. 상기 결과를 바탕으로 NT-6



**Figure 3.** Cytopathic effects of AMPV SC1509 strain in Vero cells. **A:** Mock-infected Vero cells, **B:** AMPV-infected Vero cells.

시료로부터 분리된 바이러스를 AMPV임을 동정하였으며, 분리 바이러스를 SC1509주로 명명하였다.

#### AMPV 감염에 의한 세포변성효과와 바이러스 증식성

AMPV SC1509주를 기관조직배양에서 2대 계대배양한 다음 기관조직배양에서 바이러스 증식성을 조사하였다. 그 결과 본 연구에서 분리한 AMPV SC1509주는 기관조직배양에서 최소한 ml 당  $10^{8.5}$  CID<sub>50</sub>의 매우 높은 역가를 나타내었다.

본 연구에서 분리한 AMPV SC1509주는 이후 Vero 세포에 계대배양하였다. 기관조직배양에서 증식시킨 AMPV SC1509주를 Vero 세포에 처음 계대 접종하였을 때 접종 5일 후 rounding cells이 관찰되기 시작하였다. 대조 Vero 세포에서는 어떠한 CPE도 관찰되지 않았다. 이후 Vero 세포에 연속 계대할수록 감염세포에서의 CPE 출현시기가 점점 단축되었다. Vero 세포에 10대 계대하였을 때 접종 2일째부터 cell rounding이 나타나기 시작하였으며, 접종 3일째부터는 작은 크기의 합포체 (syncytia) 형성이 관

**Table 1.** Comparison of nucleic acid and deduced amino acid sequences of the G protein of AMPV SC1509 strain with other strains of AMPV

	Deduced amino acid												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. SC1509	100	32.6	32.6	32.3	<b>92.5</b>	<b>92.2</b>	<b>92.7</b>	11.1	15.2	25.6	25.6	6.4	4.7
2. CVL14/1 (A)	51.4	100	98.4	98.2	32.6	32.6	32.6	7.8	10.3	25.3	25.3	5.8	7.5
3. 1556 (A)	51.1	99	100	99.7	32.6	32.6	32.6	8.0	10.5	25.3	25.3	5.8	7.5
4. LAH/A (A)	51.1	98.8	99.8	100	32.3	32.3	32.3	8.0	10.5	25.3	25.3	5.8	7.5
5. 2119 (B)	<b>96.0</b>	52.1	51.7	51.6	100	98.7	99.2	10.4	14.8	27	27	5.9	4.2
6. 872S (B)	<b>95.8</b>	52.2	51.8	51.7	99.4	100	99.5	10.4	14.8	27.2	27.2	5.7	4.2
7. 6574 (B)	<b>95.9</b>	52.3	51.9	51.9	99.5	99.6	100	10.4	14.8	27	27	5.7	4.2
8. Colorado (C)	22.5	24.5	24.7	24.6	22.1	22.2	22.2	100	52.9	12.6	12.6	18.1	9.8
9. Mn-2a (C)	35.1	38.1	38.0	37.8	35.3	35.3	35.3	61	100	15.2	15.2	10	5.8
10. Fr/85/1 (D)	45.3	52.6	52.3	52.2	45.5	45.6	45.6	25.9	37.6	100	99.7	8.1	7.7
11. Fr/85/2 (D)	45.3	52.5	52.4	52.2	45.5	45.6	45.6	25.9	37.6	99.8	100	8.1	7.7
12. HMPV	20.1	19.5	19.6	19.7	20.1	20.2	20.1	34.7	22.4	20.7	20.7	100	10.5
13. BRSV	22.3	20.3	20.4	20.3	21.7	21.8	21.6	32.8	21.2	21.2	21.3	30.6	100
Nucleic acid													

찰되기 시작하였다 (Fig. 3). Vero 세포에서 10대 계대한 후 바이러스 증식량을 측정된 결과, AMPV SC1509주는 ml당 최소  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>의 바이러스 감염 역가를 나타내었다.

AMPV 국내분리주의 G 단백질 유전자 분석과 계통 분석

본 연구에서 분리한 AMPV의 분자유전학적 특성을 분석하기 위하여 AMPV 표면 당단백질인 G 단백질의 전체 유전자를 RT-PCR법으로 증폭하여 염기서열을 분석하였다. AMPV G 단백질 유전자를 증폭하여 염기서열을 분석한 결과, 본 연구에서 분리한 AMPV SC1509주의 G 단백질은 총 414개의 아미노산으로 구성되어 있음을 알 수 있었다 (Table 1). 본 연구에서 AMPV SC1509주의 핵산 및 아미노산 서열을 기존 AMPV 주들과 비교 분석하였다 (Table 1). 이를 위하여 기존에 보고된 외국 AMPV 주들의 G 단백질 유전자 정보를 GenBank로부터 취하여 사용하였다. 그 결과 핵산 염기서열 수준에서는 genotype A 바이러스들과 51.1~51.4%, genotype B형 바이러스들과 95.8~96.0%, genotype C 바이러스들과 22.5~35.1%, D형 바이러스들과 45.3%의 상동성을 보였다. 아미노산 염기서열 수준에서는 genotype A 바이러스들과 32.3~32.6%,

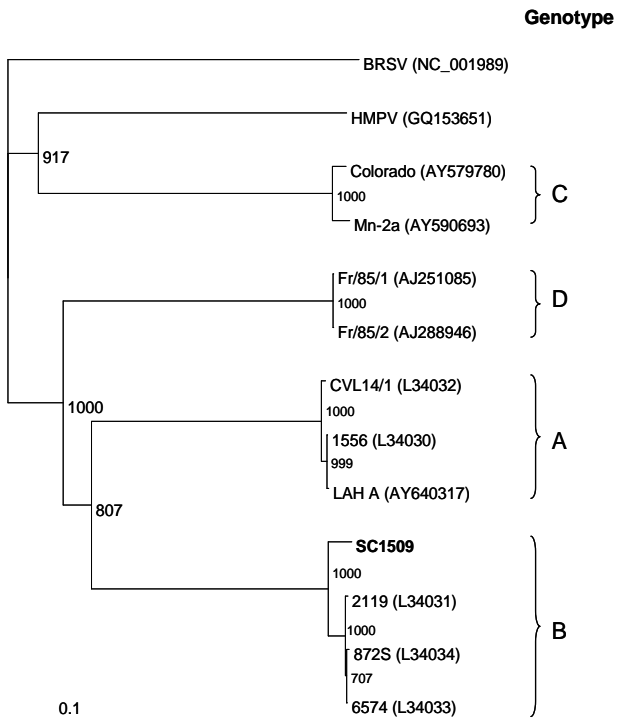
genotype B 바이러스들과 92.2~92.7%, genotype C 바이러스들과 11.1~15.2%, genotype D 바이러스들과 25.6%의 상동성을 보였다.

AMPV SC1509주의 G 단백질 유전자 염기서열 정보를 취하여 계통 분석을 실시하였다. 그 결과 본 연구에서 분리된 AMPV SC1509주는 872S, 657-4, 2119주들과 함께 genotype B로 분류되었다 (Fig. 4).

## 고 찰

본 연구를 통하여 국내사육 육용종계 발생농장으로부터 AMPV를 분리하는 데 성공하였다. 본 연구에서 분리한 AMPV는 국내사육 닭에서의 최초 분리 사례로서 그 의미가 크다 하겠다. 그 동안 국내에서 AMPV 감염증은 최소한 1990년대 이전부터 국내에 존재하는 것으로 혈청학적 모니터링 조사를 통해 보고되었지만 (19), 아직까지 발병 사례로부터 AMPV가 분리 보고된 바 없었다. 닭에 감염 후 며칠 이내에 virus clearance가 일어나고, 감염 닭의 호흡기 상기도에서의 바이러스 증식량이 낮으며, 바이러스 분리과정 또한 매우 까다롭기 때문이다 (4). 이러한 이유로 국내뿐만 아니라 외국의 여러 나라에서도 혈





**Figure 4.** Phylogenetic analysis of AMPV SC1509 strain. Nucleotide sequences were analyzed based on the complete G coding region. AMPV field isolate from this study is shown in bold. Designation in parenthesis represents accession number of reference strains obtained from the GenBank database. The provisional designations including genotypes are indicated on the right.

청학적으로 AMPV가 존재하고 있음이 보고되어 있으나 실제 바이러스를 분리하는 데 성공한 예는 매우 드문 실정이다.

본 연구에서 AMPV 감염증이 발생한 것으로 진단된 한 육용종계의 폐사 닭을 대상으로 바이러스 분리를 시도하였다. 당시 폐사 닭의 부검 소견은 모두 대장균성 복막염을 나타내었으며 실질장기에서 대장균이 분리되었다. AMPV가 닭에 단독 감염시 폐사를 거의 유발하지 않는다는 점을 감안해 볼 때, 폐사의 직접적인 원인은 대장균 감염에 의한 것으로 판단된다. 여기에서 주목할 점은 이들 폐사 닭의 경우 모두 비정상적으로 점액성 분비물과 혼합된 사료 섭취물이 다량 존재하고 있었다는 점이다. 이것은 폐사 당시 닭 호흡기의 상기도에서 분비물이 상당수 분비되고 있었던 상태였음을 말해준다. 이러한 상부 호흡기 분비물은 AMPV 감염 초기의 닭에서 나타나는 주요 증상들 중 하나이다 (29~31). 여러 연구자의 보고에 의하면, AMPV 실험감염 닭에서 감염 초기

에만 이들의 상기도 (upper respiratory tract)에서 AMPV가 검출되거나 분리되었다 (30, 32, 33). 본 연구에서 사용한 폐사 닭 6수 중 2수의 상기도에서 AMPV가 검출되었다. 그러므로 상기의 상황을 종합해서 고려해 볼 때, 이들 폐사 닭 중 최소한 일부 개체들은 AMPV 감염 초기 단계에 있었던 것으로 판단된다. 그리고 RT-PCR에 의해 AMPV가 검출된 모든 시료로부터 AMPV를 분리하는 데 성공하였다. 그러므로 향후 AMPV 발생 사례로부터 바이러스를 효과적으로 분리하기 위하여 구강내 점액성 분비물과 혼합된 사료 내용물이 발견되는 폐사 닭을 사용하는 것을 고려해 볼 만하다. 특히 개체번호 6번 폐사 닭의 경우 비인두액 시료보다는 부비동 조직 시료의 경우 동일 개체에서 RT-PCR에 의한 AMPV 핵산 증폭량이 많았다. 개체번호 4번 폐사 닭의 경우 부비동 조직에서는 AMPV 핵산이 검출되었지만, 비인두액 시료에서는 AMPV 핵산이 증폭되지 않았다. 이 결과는 감염 닭의 비인두액 시료보다는 부비동 조직 시료가 AMPV 분리하는 데 보다 적합하다는 것을 말해준다.

현재까지 AMPV 분리에는 닭 또는 칠면조 기관조직 배양법 (34~37), 종란 난황내 접종법 (14, 34, 38), Vero 세포 (39, 40), QT-35 (41, 42) 또는 닭 태아섬유아세포 배양법 (37, 42) 등이 사용되고 있다. 북미지역에서 유행하는 genotype C AMPV의 경우 바이러스 분리에는 주로 Vero, QT-35, CEF 등 세포 배양법을 사용하고 있으나 (40, 42), 다른 유전형의 AMPV의 경우 기관조직배양법, 종란 난황내 접종법을 바이러스 분리에 가장 일반적으로 사용하고 있다 (4). 본 연구에서 AMPV 분리방법으로서 감염 닭으로부터 바이러스 분리 가능성을 높이기 위하여 닭유래 기관조직배양법을 사용하였으며, 검사 시료를 접종한 후 배양기간 동안 내내 회전배양을 실시하였다. 그 결과로 본 연구에서는 AMPV가 검출된 폐사 닭의 비후두액 또는 부비동 조직 시료를 사용하여 성공적으로 바이러스를 분리할 수 있었다.

본 연구에서 분리한 AMPV SC1509주는 기관조직배양에서 2대 계대한 후 바이러스 역가를 측정하였을 때 최소한 ml 당  $10^{8.5}$  CID<sub>50</sub>의 높은 증식성을 나타내었다. 기관조직배양에서 분리한 바이러스를 Vero 세포에서 1차 계대할 때부터 세포변성효과를 나타내었다. Vero 세포에서의 세포변성효과는 바이러스를 세포에 계대할 수록 점점 더 빨리 나타나는 경향을 보였다. 특히 계대 초기에는 rounding cells이 주로 관찰되었으나, 계대 횟수가 증

가할수록 감염세포간 합포체 형성이 점점 더 명확하게 관찰되었다. 이러한 CPE 양상은 다른 여러 연구자들의 보고와 일치하였다 (9, 14, 34).

이러한 결과는 야외 바이러스가 기관조직배양에서 이미 높은 역가로 증식하였기 때문에 Vero 세포에서 바이러스가 보다 쉽게 적응한 결과로 판단된다. Vero 세포에서 10대 계대한 후 ml당 최소  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>의 바이러스 증식량을 나타내었다는 것은 야외바이러스가 Vero 세포에 충분히 적응하였음을 나타낸다.

본 연구에서 분리한 AMPV SC1509주는 G 단백질의 핵산 및 아미노산 분석결과 genotype B에 속하는 AMPV로 분류되었다. 현재 국내사육 닭에서는 AMPV 감염증을 예방하기 위한 생독 (live) 백신이 사용되고 있지 않은 상황이다. 그러므로, 본 연구에서 분리한 AMPV SC1509주는 생독백신 유래 바이러스가 아니라는 것을 의미한다. 이것은 AMPV 국내분리주의 G 단백질 염기서열 분석결과에 의해서도 뒷받침된다. 분리 바이러스는 기존에 보고되어 있는 genotype B에 속하는 AMPV 주들과 가장 높은 상동성을 나타내었지만, 이들 바이러스들과는 7.5~7.8%의 아미노산 염기서열상 차이를 나타내었다. 이것은 국내 유행하는 AMPV가 다른 나라에서 보고된 AMPV 주들과는 유전적으로 차이가 있음을 말해주는 것이다. 즉, 본 연구에서 분리한 AMPV SC1509주는 국내에 처음 유입된 이후 상당 기간 국내사육 닭에서 적응하여 독자적으로 진화해 온 바이러스임이 말해준다. AMPV G 단백질은 감염세포에의 부착과 중화항체 유도에 매우 중요한 단백질로 알려져 있다. 그러나 중화항체 에피토프 (epitope) 등 항원성과 관련된 항원 부위가 아직까지 구명되어 있지 않은 실정이기 때문에 본 연구의 AMPV SC1509주와 다른 genotype B의 AMPV 주들간 유전적 차이가 항원성에 어느 정도 영향을 미치고 있는지를 여부를 본 연구에서 분석할 수 없었다. 이를 구명하기 위하여 향후 AMPV G 단백질의 중화항체 에피토프 등을 추가적으로 분석할 예정이다.

본 연구에서 바이러스가 분리된 육용종계 농장에서 산란율 저하와 계란 품질저하 (탈색란 증가)의 피해가 있었다. 이러한 피해가 AMPV에 의하여 직접적으로 유발된 피해인지 여부를 본 연구에서 구명하지 못했다. 향후 산란하는 닭에서의 분리 바이러스에 대한 닭에서의 재현성(병원성) 시험을 실시할 예정이다.

본 연구를 통하여 분리된 바이러스는 향후 국내유행

AMPV 감염증에 대한 역학적 상황을 이해하고, 분리 바이러스를 이용한 진단기술 개발 및 질병 피해를 예방하기 위한 효과적인 백신 개발을 위한 기초가 된다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 판단된다. 다만, 본 연구를 통하여 단 1주의 바이러스만을 분리한 상황이기 때문에 분리 바이러스만으로 국내 유행하는 AMPV 야외바이러스 전체를 대표하기에는 무리가 있다. 특히 한국과 인접한 일본 (10)과 중국 (11)의 경우 닭에서 genotype A 바이러스가 존재하고 있음이 이미 보고된 바 있기 때문에 genotype A에 속하는 AMPV의 국내 존재 가능성도 배제할 수 없는 상황이다. 그러므로, 향후 보다 많은 야외 감염 사례로부터 AMPV를 분리하여 그 특성을 조사해 볼 필요가 있다.

## 참 고 문 헌

- 1) Jones RC. Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered. Avian Pathol 1996;25:639-48.
- 2) Office International des Epizooties. Chapter 2.3.15. Turkey rhinotracheitis (avian metapneumovirus). In: Office International des Epizooties. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6th ed. Paris: Office International des Epizooties; 2008. p.590-8.
- 3) Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med 2001;7:719-24.
- 4) Cook JK, Cavanagh D. Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). Avian Pathol 2002;31:117-32.
- 5) Njenga MK, Lwamba HM, Seal BS. Metapneumoviruses in birds and humans. Virus Res 2003;91:163-9.
- 6) Băyon-Auboyer MH, Arnauld C, Toquin D, Eterradossi N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. J Gen Virol 2000;81:2723-33.
- 7) Lwamba HC, Alvarez R, Wise MG, Yu Q, Halvorson D, Njenga MK, Seal BS. Comparison of the full-length genome sequence of avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses. Virus Res 2005;107:83-92.
- 8) Banet-Noach C, Simanov L, Perk S. Characterization of Israeli avian metapneumovirus strains in turkeys and chickens. Avian Pathol 2005;34:220-6.



- 9) Lu YS, Shien YS, Tsai HJ, Tseng CS, Lee SH, Lin DF. Swollen head syndrome in Taiwan-isolation of an avian pneumovirus and serological survey. *Avian Pathol* 1994;23:169-74.
- 10) Mase M, Yamaguchi S, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Nakamura K. Presence of avian pneumovirus subtypes A and B in Japan. *Avian Dis* 2003;47:481-4.
- 11) Owoade AA, Ducatez MF, Hübschen JM, Sausy A, Chen H, Guan Y, Muller CP. Avian metapneumovirus subtype A in China and subtypes A and B in Nigeria. *Avian Dis* 2008;52:502-6.
- 12) Jones RC, Naylor CJ, Bradbury JM, Savage CE, Worthington K, Williams RA. Isolation of a turkey rhinotracheitis-like virus from broiler breeder chickens in England. *Vet Rec* 1991;129:509-10.
- 13) Pattison M, Chettle N, Randall CJ, Wyeth PJ. Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Vet Rec* 1989;125:229-31.
- 14) Buys SB, Du Preez JH, Els HJ. The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 1989;56:87-98.
- 15) Bennett RS, Nezworski J, Velayudhan BT, Nagaraja KV, Zeman DH, Dyer N, Graham T, Lauer DC, Njenga MK, Halvorson DA. Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. *Avian Dis* 2004;48:902-8.
- 16) Seal BS. Avian pneumoviruses and emergence of a new type in the United States of America. *Anim Health Res Rev* 2000;1:67-72.
- 17) Turpin EA, Stallknecht DE, Slemons RD, Zsak L, Swayne DE. Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. *Avian Pathol* 2008;37:343-51.
- 18) Toquin D, Băyon-Auboyer MH, Etteradossi N, Jestin V. Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Vet Rec* 1999;145:680.
- 19) Kim JH, Song CS, Sung HW, Mo IP, Kwon JH, Kim KS, Kim SH. Outbreak of swollen head syndrome in a broiler breeder farm and serological survey of avian pneumovirus. In: *Proceedings of the Korean Society of Veterinary Science*, 36<sup>th</sup> meeting, Kwangju, Korea: Korean Society of Veterinary Science; 1992. p.25.
- 20) Kim JE, Hwang JY, Bae DR, Sung MS, Kim ST, Kim SY. Examination of seroprevalence and detection of avian pneumovirus from layer hens in Gyeongbuk province. *Korean J Vet Serv* 2007;30:43-9.
- 21) Kim ST, Kim SK, Cho MH, Kim YH. Serological survey of avian pneumovirus infection in laying hens of Gyeongbuk province. *Korean J Vet Serv* 2003;26:51-6.
- 22) Lee JW, Shon KR, Park KS, Kim YT, Kim CC, Han KS, Lee HM, Song HJ. Serological survey of avian pneumovirus and reovirus in breeders of Jeonbuk province. *Korean J Vet Serv* 2006; 29:9-18.
- 23) Park JB, Cha SY, Park YM, Zhao DD, Song HJ, Jang HK. Recently epidemiological survey of the viral diseases of broiler chickens in Jeonbuk province from 2005 to 2007. *Korean J Vet Serv* 2008;31:43-55.
- 24) Băyon-Auboyer MH, Jestin V, Toquin D, Cherbonnel M, Etteradossi N. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch Virol* 1999;144:1091-109.
- 25) Gough RE, Alexander DJ, Wyeth PJ. Avian rhinotracheitis (pneumovirus). In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, editors. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. 4<sup>th</sup> ed. Kennett Square: American Association of Avian Pathologists; 1998. p.164-7.
- 26) Jeon WJ, Kim BH, Jung BY, An DJ, Yi CH, Jang H, Chung GS. Application of a PCR method for the detection of Mycoplasma in veterinary live viral vaccines. *Kor J Microbiol* 2005;41:269-74.
- 27) Mase M, Tsukamoto K, Imai K, Yamaguchi S. Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan. *Arch Virol* 2004;149:2069-78.
- 28) Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.
- 29) Alkhalaf AN, Ward LA, Dearth RN, Saif YM. Pathogenicity, transmissibility, and tissue distribution of avian pneumovirus in turkey poults. *Avian Dis* 2002;46:650-9.
- 30) Aung YH, Liman M, Neumann U, Rautenschlein S. Reproducibility of swollen sinuses in broilers by experimental infection with avian metapneumovirus subtypes A and B of turkey origin and their comparative pathogenesis. *Avian Pathol* 2008;37:65-74.
- 31) Cook JK, Chesher J, Orthel F, Woods MA, Orbell SJ, Baxendale W, Huggins MB. Avian pneumovirus infection of laying hens: experimental studies. *Avian Pathol* 2000;29:545-56.

- 32) Hess M, Huggins MB, Mudzamiri R, Heincz U. Avian metapneumovirus excretion in vaccinated and non-vaccinated specified pathogen free laying chickens. *Avian Pathol* 2004; 33:35-40.
- 33) Shin HJ, McComb B, Back A, Shaw DP, Halvorson DA, Nagaraja KV. Susceptibility of broiler chicks to infection by avian pneumovirus of turkey origin. *Avian Dis* 2000;44:797-802.
- 34) Giraud P, Bennejean G, Guittet M, Toquin D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet Rec* 1986;119:606-7.
- 35) McDougall JS, Cook JK. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. *Vet Rec* 1986;118:206-7.
- 36) Wilding GP, Baxter-Jones C, Grant M. Ciliostatic agent found in rhinotracheitis. *Vet Rec* 1986;118:735.
- 37) Wyeth PJ, Gough RE, Chettle N, Eddy R. Preliminary observations on a virus associated with turkey rhinotracheitis. *Vet Rec* 1986;119:139.
- 38) Panigrahy B, Senne DA, Pedersen JC, Gidlewski T, Edson RK. Experimental and serologic observations on avian pneumovirus (APV/turkey/Colorado/97) infection in turkeys. *Avian Dis* 2000;44:17-22.
- 39) Shin HJ, Cameron KT, Jacobs JA, Turpin EA, Halvorson DA, Goyal SM, Nagaraja KV, Kumar MC, Lauer DC, Seal BS, Njenga MK. Molecular epidemiology of subgroup C avian pneumoviruses isolated in the United States and comparison with subgroup a and B viruses. *J Clin Microbiol* 2002;40: 1687-93.
- 40) Lee E, Song MS, Shin JY, Lee YM, Kim CJ, Lee YS, Kim H, Choi YK. Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C isolated from pheasants in a live bird market. *Virus Res* 2007;128:18-25.
- 41) Chiang SJ, Dar A, Goyal SM, Nagaraja KV, Halvorson D, Kapur V. Isolation of avian pneumovirus in QT-35 cells. *Vet Rec* 1998;143:596.
- 42) Goyal SM, Chiang SJ, Dar AM, Nagaraja KV, Shaw DP, Halvorson DA, Kapur V. Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. *Vet Diagn Invest* 2000;12:166-8.
-