

Development of Competitive ELISA for Detection of Avian Metapneumovirus Antibodies in Chicken

Kang-Seuk Choi*, Jin-Won Kim, Eun-Kyoung Lee, Woo-Jin Jeon, Mi-Ja Park,
Yeh-Na Lyoo and Jun-Hun Kwon

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

Avian metapneumovirus (aMPV) causes an acute and highly contagious upper respiratory tract infection in turkeys and chickens. In this study, a competitive ELISA (C-ELISA) was developed for the detection of antibodies to aMPV in chicken sera and/or their egg yolks. This assay is based on the competitive binding of monoclonal antibody with serum antibodies to recombinant aMPV N protein expressed by a recombinant baculovirus. The C-ELISA showed specificity and sensitivity of 100% and 98.0%, respectively, when compared to the virus neutralization test. In specific pathogen-free chickens experimentally infected with aMPV SC1509 strain, the C-ELISA started to detect antibodies to aMPV as early as 5 days post infection from birds infected with aMPV, while a commercial ELISA kit detected first 10 days post infection. The C-ELISA was similar or superior to a commercial ELISA kit when serum and egg yolk samples collected from chickens on six outbreak farms were tested for diagnosis. The C-ELISA developed in the present work provides a short turnaround time and can be a useful diagnostic and screening tool for aMPV infection in the field.

Key Words: Avian metapneumovirus, ELISA, N protein, Antibody detection

서 론

Avian metapneumovirus (aMPV)는 *Paramyxoviridae* family, *Pneumovirinae* subfamily, *Metapneumovirus* genus에 속하는 바이러스이다 (1). aMPV의 게놈 (genome)은 non-segmented, negative sense single-stranded RNA 형태를 띠고 있으며, 3'-nucleocapsid protein (N)-phosphoprotein (P)-matrix (M)-fusion (F)-second matrix (M2)-small hydrophobic protein (SH)-attachment glycoprotein (G)-large polymerase (L)-5'의 순서대로 8개 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하고 있다 (2).

aMPV는 현재 single serotype만 존재하는 것으로 간주

되고 있으나 (3, 4), 단클론 항체 (monoclonal antibody)에 의한 바이러스 중화능 (5, 6)이나 G 단백질 유전자 염기서열 분석 (7)에 따라 4개의 subtype (A, B, C, D)으로 분류하고 있다. 이중 subtype A와 B는 유럽, 아시아, 중동 지역에서 주로 유행하고 있으며 (4, 8, 9), subtype C는 미국 지역에서 주로 분리되고 있다 (10). Subtype D는 프랑스 지역의 오리에서 분리 보고된 바 있다 (11~13).

aMPV는 칠면조 (14), 닭 (15), 오리 (12, 16), 꿩 (17), 타조 (18), 비둘기 (19), 기러기 (20), 종달새와 참새 (21) 등 다양한 조류 species에서도 감염될 수 있어 숙주 범위는 광범위하다. 이들 조류 species 중 임상 증상 및 폐사를 유발하는 감수성 조류 species는 칠면조와 닭이다 (4, 9). aMPV는 칠면조에서는 급성 비기관염 (acute rhinotracheitis)을 유발하며, 산란하는 경우 산란저하 및 기형란 (탈색란) 등의 피해를 줄 수 있다 (9). 닭의 경우 칠면조에서의 임상 증상과 유사한 형태로 나타나지만, 병원성은 칠면조에서 보다 약하게 나타난다 (9). 특히 육계와 종계에서의 두부종창증 (swollen head syndrome)을 유발하는데 관여하는 주된 병인체로 알려져 있다 (4, 9,

Received: March 30, 2010/ Revised: July 9, 2010

Accepted: July 15, 2010

*Corresponding author: Kang-Seuk Choi, DVM, PhD. 175 Anyangro, Manan-gu, Anyang, Gyeonggi 430-757, Korea.

Phone: +82-31-467-1821, Fax: +82-31-467-1814

e-mail: kchoi0608@korea.kr

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

13, 22). 또한 닭에서는 subtype A나 subtype B에 속하는 aMPV 감염에 의하여 발병한 사례들은 보고되고 있지만 (8, 13, 15), subtype C나 subtype D에 속하는 aMPV 감염에 의한 닭에서의 발병한 사례는 보고된 바 없다.

국내의 경우 1992년 경기도 소재 한 종계농장에서 두 부종창증과 산란저하 피해 사례를 보이는 사례가 처음 보고되었다 (23). 최근에는 일부 연구자에 의하여 aMPV 감염증이 국내 사육 육용 종계, 육계 및 산란계에서 만연되어 있음을 혈청학적 검사 결과를 근거로 하여 보고된 바 있다 (24~27). 최근 국내 연구 결과에 의하면, 국내 사육 닭에서 subtype A (28)와 subtype B (29)에 속하는 aMPV가 닭에서 분리 보고된 바 있다.

aMPV 감염증의 경우 바이러스 분리나 항원 검출 방법이 매우 까다롭고 어렵기 때문에 양계농장에서의 질병 진단이나 모니터링 검사를 위하여 바이러스 분리나 항원 검사 방법보다는 항체검사 방법을 일반적으로 많이 사용하고 있다 (4, 9, 22). 항체검사 방법에는 여러 가지 검사법들이 있지만, 대량 신속검사가 가능한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 법이 널리 사용되고 있다 (22). 현재 시판중인 ELISA 검사 키트는 세포배양법으로 증식한 바이러스를 추출하여 항원을 사용하고 있다. 최근 사람 메타뉴모바이러스 (human metapneumovirus) 감염이나 칠면조에서의 subtype C aMPV에 대한 항체를 검출할 목적으로 바이러스 항원 대신 재조합 M 단백질 (30)이나 재조합 N 단백질 (31~33)을 사용한 indirect ELISA의 개발이 보고된 바 있다.

본 연구에서는 aMPV N 단백질을 baculovirus 발현체계를 이용하여 발현하여 항원으로 사용하고, aMPV N 단백질 특이 단클론 항체를 생산하여 검출 항체로서 사용하여, 닭에서 질병을 유발할 수 있는 subtype A 및 B aMPV 항체를 모두 검출할 수 있는 competitive ELISA (C-ELISA)를 개발하여 그 유효성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 바이러스

본 연구를 위하여 aMPV SC1509 strain을 사용하였다. 이 바이러스는 산란저하와 두부종창증 피해가 발생한 국내 한 종계장의 닭에서 분리되었다 (29). 이 바이러스는 Choi 등 (29)이 보고한 방법대로 Vero 세포 (ATCC CCL81; American Type Culture Collection, Manassas, VA,

USA)에서 증식 배양하였다. 배양 바이러스의 감염 역가는 96-well microplate에서 Vero 세포를 사용하여 측정하였으며, Reed & Muench (34)의 방법에 따라 세포변성효과 (cytopathic effect, CPE)가 관찰되는 well이 50% 되는 바이러스 희석배수의 역수 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)로 표시하였다.

RT-PCR에 의한 aMPV N 전체 유전자 증폭 및 클로닝

국립수의과학검역원에 의뢰되어 subtype A aMPV 감염이 확인된 닭의 부비동 (nasal turbinate) 조직 시료를 aMPV N 단백질 유전자 증폭용 시료로 사용하였다. 조직 시료는 최종 농도 10% (v/v)되게 항생제 (GibcoTM antibiotic-antimycotic solution, GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)를 함유한 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2)를 첨가하여 균질화 (homogenization)하여 바이러스 핵산 추출에 사용하였다. RNeasy RNA extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조사에서 제공하는 실험 매뉴얼에 의거하여 검체 시료로부터 직접 aMPV genomic RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 시료로부터 aMPV N 유전자에 대한 cDNA 합성 및 증폭을 위하여 AccuPower[®] RT/PCR premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 제조사에서 권장하는 방법에 따라 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 실시하였다. RT-PCR을 위한 primers는 forward primer NF1 (5'-GGATCCATGCTCTCTTGAAAGTATTAGG-3') 및 reverse primer NR1 (5'-GGTACCGAAAGACATTGTTACTTGTCC-3')를 사용하였다. Primer 염기서열은 subtype A aMPV인 8544 strain의 공개된 유전정보 (GenBank accession No. DQ666911)를 바탕으로 N 유전자의 전체 open reading frame (ORF)을 포함한 1,220 nt 크기의 핵산이 증폭되도록 제작하였으며, primer NF1 및 NR1의 5'-말단에 *Bam*HI와 *Kpn*I 제한효소 작용부위를 각각 삽입하였다. PCR 증폭기 (PTC-220, MJ-research, Waltham, MA, USA)에서 95℃, 10분간 열처리한 후 94℃ 1분간 denaturation, 55℃ 1분간 annealing 및 72℃ 1분간 extension을 30회 반복 실시한 다음 마지막으로 72℃ 5분간 반응시켜 PCR을 완료하였다. 증폭 산물은 1% (w/v) agarose gel에서 전기영동한 다음, gel purification kit (Qiagen)을 이용하여 순수 정제한 다음 자동염기서열 분석장치 (ABI 377, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

상기에서 RT-PCR에 의해 증폭된 N 유전자 DNA 산물은 제한효소처리 없이, 바로 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하여 cloning하여 pGEM/AMPVN을 작성하였다.

Recombinant baculovirus 작성

상기의 pGEM/AMPVN 벡터를 제한효소 *Bam*H1 및 *Kpn*1으로 처리하여 벡터내 삽입되어 있는 aMPV N 유전자 DNA 단편을 추출하였다. 그 다음, baculovirus polyhedron promoter (P_{PH})를 가진 pBacPAK8 transfer vector (BD Clontech, Palo Alto, CA, USA)의 multicloning site내 aMPV N 유전자를 삽입하여 pBacPAK/AMPVN를 제작하였다. 이후 pBacPAK/AMPVN는 baculovirus 발현체계 (BD Clontech)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 DH10Bac 대장균에 형질도입하여 rBac/AMPVN DNA를 작성하였다. rBac/AMPVN를 linearized baculovirus DNA와 함께 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) 곤충세포에 co-transfection 시킴으로서 aMPV N 단백질을 발현하는 recombinant baculovirus를 작성하였다. Recombinant baculovirus는 1.5% low melting agarose gel을 사용한 plaque assay를 실시하여 cloning하였다. Plaque clone은 Sf9 곤충세포에 각각 증식시킨 다음 감염세포들을 취하여 aMPV 면역혈청을 이용한 immunoblotting으로 N 단백질의 발현여부를 최종 확인하였다. aMPV N 단백질을 발현하는 recombinant baculovirus는 rBac/AMPVN라고 명명하였다.

SDS-PAGE 및 immunoblotting

Recombinant baculovirus (rBac/AMPVN)에 의한 재조합 N 단백질의 발현여부 확인을 위하여 immunoblotting을 실시하였다. 즉, 감염세포에서 추출한 단백질은 NuPAGE® Novex bis-tris gel (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA)과 Xcell SureLock™ Mini-cell (Invitrogen Inc.)을 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 전기영동을 실시하여 단백 분획들을 gel 상에서 Commassie blue로 염색하거나 Xcell II™ Blot Module (Invitrogen inc.)을 사용하여 제조사의 매뉴얼대로 nitrocellulose (NC) membrane으로 전이시켰다. 그 후 NC membrane 상에 aMPV 면역혈청을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 다음 항원-항체 anti-species IgG (H+L) conjugated with alkaline phosphatase와 BCIP/NBT 기질용액 (Kirkegaard-Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, USA) 반응을 실온에서 1시간 동안 실

시하여 단백 분획의 발색여부를 관찰하였다.

aMPV N 단백질 항원의 제조

곤충세포에서의 재조합 N 단백질 항원 제조는 다음과 같이 실시하였다. 즉, 미리 Sf9 곤충세포를 단층 배양시킨 175-cm² 세포배양용 플라스크에 0.1 MOI (multiplicity of infection) 농도의 rBac/AMPVN을 접종하여 27°C에서 90분간 Sf9 세포에 감염시킨 후 27°C에서 5일간 배양하였다. 그 다음, 상기의 감염세포들을 수확하여 500 × g에서 20분간 원심분리하여, 상층액은 제거한 후 감염세포 pellet만을 수확하였다. 그 다음, 감염세포 pellet에 세포배양액의 1/20 양이 되게 lysis buffer (0.01 M PBS, 0.05% tween 20, 1 × protease inhibitors) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 첨가하였다. 그 후 세포 부유액을 얼음물에서 놓고 초음파처리기로 세포를 파쇄하여 재조합 N 단백질이 추출되도록 하였다. 마지막으로, 500 × g에서 20분간 원심분리하여 재조합 N 단백질이 함유되어 있는 상층액을 수확하여 재조합 N 단백질 항원을 제조하였다. 제조 항원은 10진 단계 희석한 다음 단클론 항체 12.2.1 (35)을 사용한 indirect ELISA법으로 반응성을 측정하여 재조합 N 단백질의 농도를 측정하였다. 제조한 N 단백질 항원은 glycerol과 동량 혼합하여 aliquot한 다음 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

aMPV N단백질 특이 단클론 항체의 생산

본 연구에서 C-ELISA의 검출 항체로서 사용하기 위한 aMPV 특이 단클론 항체를 생산하였다. 단클론 항체의 제작은 Choi 등 (36)의 방법에 의거하여 aMPV 특이 단클론 항체를 분비하는 융합세포주 (hybridoma)를 작성하였다. 즉, 상기의 N 단백질 항원 원액을 incomplete Freund adjuvant와 동량으로 균질하게 혼합한 다음, Balb/c mouse의 footpad에 혼합액 0.05 ml씩 접종하였다. 면역 후 10일에서 15일 사이에 popliteal lymph node의 lymphocyte를 무균적으로 채취한 다음, polyethylene glycol (PEG) 1500 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)을 사용하여 SP2/0-Ag14 mouse myeloma cells과 화학적으로 융합시켰다. 융합세포는 hypoxanthine aminopterin thymidine (HAT) 배양액을 사용하여 선택적으로 증식시켜 cloning하였다. 작성된 융합세포주에서 분비되는 단클론 항체는 재조합 N 단백질 항원을 사용한 간접 ELISA로 일차 선발한 다음,

ELISA 반응을 보인 경우 Choi 등 (29)이 사용한 면역형광항체법 (immunofluorescent assay, IFA)에 의하여 최종 확인하였다. 단클론 항체의 isotype은 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 분석하였다. 국립수의과학검역원 조류질병과에서 보관 중이던 단클론 항체 12.2.1 복수액 (ascites)도 본 연구에 추가로 사용되었다. 이 단클론 항체는 aMPV VCO3 strain (subtype B)의 N 단백질에 대한 단클론 항체로, IgG2a light chain과 kappa heavy chain을 가지고 있는 단클론 항체다 (35).

닭 혈청 및 계란유래 난황추출시료

질병 병성감정, 농장 질병 모니터링 검사 및 aMPV 감염 실험 등의 목적으로 국립수의과학검역원 조류질병과에서 보관중인 닭 혈청 및 계란유래 난황추출시료를 본 연구에 사용하였다. 이들 시료들에 대하여 바이러스 중화시험을 실시하여 항체 양성 여부를 최종 판정하였다.

1) 3주령의 specific pathogen free (SPF) 닭에서의 aMPV 국내분리주 SC1509 strain (29) 감염 실험 혈청 36점.

2) aMPV 항체 음성 농장으로 확인된 3개 양계농장 (종계2, 산란계1)유래 닭 음성혈청 200점.

3) aMPV 항체 양성 농장으로 확인된 3개 양계농장 (종계2, 산란계1)유래 닭 양성혈청 102점.

4) 병성감정으로 의뢰되어 aMPV 감염증 발생으로 진단된 6개 양계농장 유래 닭 혈청 80점 및 이들 농장에서 수거한 계란유래 난황추출시료 105점.

N 단백질에 대한 면역혈청

C-ELISA의 양성 대조혈청 (positive control)으로 사용하기 위하여 N 단백질에 대한 면역혈청을 제조하였다. 즉 3주령의 SPF 닭 (Lohmann, Cuxhaven, Germany)에 상기에서 제조한 재조합 aMPV N 항원을 Freund adjuvant와 동량 혼합한 다음 수당 1 ml씩 2주 간격으로 2회 근육내 접종한 다음 최종 면역 후 3주 후에 채혈하여 제조하였다. 이때 일차 면역은 complete Freund adjuvant를, 2차 보강 접종은 incomplete Freund adjuvant를 사용하였다. 또한 3주령 SPF 닭을 채혈하여 제조한 혈청을 aMPV 음성 대조혈청으로 사용하였다.

Indirect ELISA

C-ELISA에 사용할 재조합 N 단백질 항원의 항원 농

도 및 최적 조건을 측정하기 위하여 indirect ELISA를 실시하였다. 상기에서 제조한 재조합 N 단백질 항원은 0.01 M PBS, pH 7.2로 1:50배 희석한 다음 2진 단계 희석을 실시하여 각 희석액을 Nunc Maxisorp ELISA plate (Nunc, Roskilde, Denmark)의 well에 50 μ l씩 분주한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때 음성 대조 항원으로서 정상 곤충세포 추출액을 사용하였다. 그 다음, ELISA plate에 부착하지 않은 산물들은 PBST buffer (0.002 M PBS, 0.05% Tween 20)로 3회 세척하여 제거하였다. 그 후, blocking buffer [0.01 M PBS, 0.05% (v/v) Tween 20, 3% (w/v) skimmed milk]으로 1:8000배 희석한 단클론 항체 12.2.1. 복수액을 well당 50 μ l 분주하고, 37°C에서 1시간 동안 반응하게 하였다. 상기 반응이 끝난 후, PBST로 3회 세척하고 blocking buffer로 2,000배 희석한 anti-mouse immunoglobulins peroxidase conjugate (Kirkegaard-Perry Laboratories Inc.) 용액을 각 well에 50 μ l씩 첨가한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응하게 하였다. 상기 반응이 끝난 후, ELISA plate를 PBST buffer로 3회 세척하고 OPD (o-phenylenediamine) 용액 (Sigma Chemical Co.)을 각 well에 50 μ l씩 첨가하고 실온에서 10분간 발색시켰다. 그 후 1.25 M H₂SO₄ 용액을 well당 100 μ l씩 첨가하여 발색 반응을 중지시키고, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 가장 높은 ELISA 흡광도를 보인 재조합 N 단백질 항원의 희석 농도를 ELISA 항원 최적 조건으로 결정하였다.

그 후 본 연구에서 사용한 단클론 항체들의 최적 희석 조건을 결정하기 위하여 동일한 방법으로 indirect ELISA를 실시하였다. 이 때 재조합 N 단백질 항원은 상기의 최적 조건을 사용하였으며, 검사한 단클론 항체는 blocking buffer로 2진 단계 희석한 다음 각 희석액을 ELISA에 적용하였다. 각 단클론 항체당 최고 흡광도의 75% 수준에 해당하는 ELISA 흡광도를 보이는 항체 희석배수를 C-ELISA에 사용할 단클론 항체의 최적 반응 조건으로 결정하였다.

C-ELISA

상기의 indirect ELISA를 통하여 결정된 최적 희석 조건하에 C-ELISA를 다음과 같이 실시하였다. 여기에서 사용한 각종 용액은 기본적으로 상기 indirect ELISA에서 사용한 것과 동일하다. 우선, 최적 농도의 재조합 N 단백질 항원을 Nunc Maxisorp ELISA plate의 모든 well에 50 μ l

씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 다음, ELISA plate를 PBST buffer로 세척한 다음 최적 농도의 단클론 항체와 1:5배 희석한 검사 시료 (혈청 또는 난황 항체)를 동량 혼합하여 각 시료당 두 well씩 반복하여 well당 50 µl 분주하고 37℃에서 1시간 동안 반응하게 하였다. 이때 각 ELISA plate마다 양성 대조 닭 혈청과 음성 대조 닭 혈청을 포함시켰다. 같은 방법으로 ELISA plate를 세척한 후 anti-mouse immunoglobulins peroxidase conjugate (1:2000배 희석) 용액을 well당 50 µl씩 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응하게 하였다. 그 후 항원-항체 반응의 정도는 OPD 용액과 1.25 M H₂SO₄ 용액을 사용하여 가시화하여 그 흡광도를 측정하였다. 검사의 결과는 단클론 항체만 첨가한 well (단클론 항체 대조 well)의 흡광도 대비 검사 시료 well의 흡광도를 percent inhibition (PI)로 환산하여 분석하였다. 검사 well의 PI는 다음의 술식에 의거하여 산정하였다.

$$PI = 100 - (\text{검사 well 흡광도}) / (\text{단클론 항체 대조 well}) \times 100$$

검사 시료의 C-ELISA 결과는 PI치가 50% 이상일 경우 항체 양성으로 간주하였다.

바이러스 중화시험

검사 시료 (혈청 또는 난황추출 시료) 중에 존재하는 aMPV 중화 항체는 Lee (35)가 사용한 방법에 따라 96 well-microplate에서 실시하였다. 즉 미리 56℃, 30분간 처리한 검사 혈청을 1:2배 되게 희석한 다음, 2진 단계 희석하여 각 희석액을 96 well-microplate의 well당 25 µl씩 분주한 후 200 TCID₅₀의 바이러스 (aMPV SC1509 strain) 액을 동량으로 첨가하였다. 그 후 37℃, 30분간 반응시킨 후 Vero 세포 (10⁵개/ml)를 well당 100 µl씩 첨가하여 37℃에서 5일간 배양하였다. 그 후 CPE가 나타나지 않은 최종 혈청희석배수의 역수를 중화항체가로 결정하였다. 검사혈청 시료 중 4배 이상의 중화 항체가를 보인 경우 aMPV 항체 양성으로 판정하였다.

Commercial ELISA kit

본 연구에서 개발된 C-ELISA의 유효성 비교 평가를 위하여 현재 aMPV 항체 검출용으로 시판중인 FlockCheck APV Ab ELISA (IDEXX-ELISA) kit (IDEXX Laboratories, Liebefeld-Bern, Switzerland)를 사용하였으며, 제조사에서 제공하는 검사 방법에 따라 실시하였다. 미리 바이러

스 항원에 부착되어 있는 ELISA plate에 검사혈청 (또는 난황 시료) 첨가하여 실온에서 30분간 항원-항체 반응을 실시한 후, kit에서 제공하는 anti-chicken/anti-turkey horseradish peroxidase conjugate 용액을 첨가하여 실온에서 30분, 그리고 TMB 발색용액을 실온에서 15분간 각각 반응시킨 후 반응중지용액으로 발색을 중지시킨 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검사 시료의 검사 결과는 S/P (sample to positive) ratio로 환산하여 분석하였다. 검사 시료의 S/P ratio가 0.2 이상일 경우 항체 양성으로 간주하였다.

$$S/P \text{ ratio} = (S_x - N_x) / (P_x - N_x)$$

여기서 S_x는 검사 시료의 평균 흡광도를, N_x는 음성 대조 평균 흡광도를, 그리고 P_x는 양성 대조 평균 흡광도를 의미한다.

결 과

aMPV N 전체 유전자의 증폭

감염계 양성 시료로부터 추출한 RNA 시료를 대상으로 NF1 primer와 NR1 primer를 사용하여 aMPV N 유전자 전체를 포함한 1,220 nt 크기의 핵산 (Fig. 1A)을 증폭시키기 위하여 RT-PCR법을 실시하였다. 그 결과 예측한 대로 1,220 bp의 크기에 해당하는 DNA 산물이 성공적으로 증폭되었다 (Fig. 1B). 핵산 염기서열 분석을 실시한 결과 RT-PCR에 의해 증폭된 DNA 산물은 N 단백질질을 구성하는 391개의 아미노산을 암호화하는 open reading frame (ORF)을 포함하고 있었다. 분석된 N 유전자의 ORF 염기서열은 GenBank에 등록하였다 (accession No. HM638199). N 유전자 ORF를 구성하는 아미노산 서열을 분석하였을 때 subtype A (8544 strain)와 subtype B (2119 strain)와는 각각 99.1%와 91.1%의 homology를 보였다. 그러므로 본 연구에서 증폭한 유전자 산물은 subtype A에 속하는 aMPV 유전자가 증폭된 것임을 나타낸다.

aMPV 재조합 N 단백질의 발현

aMPV N 유전자를 포함하는 recombinant baculovirus (rBac/AMPVN)를 Sf9 세포에 접종한 후 감염 4일에서 5일째에 감염세포들을 수확한 다음, 단백질을 추출하여 aMPV N 단백질이 발현되었는지 여부를 조사하였다. 우선, 추출 단백질을 SDS-PAGE를 실시한 후 분획된 단백질의 분자량을 측정한 결과 감염세포에서 aMPV N 단백

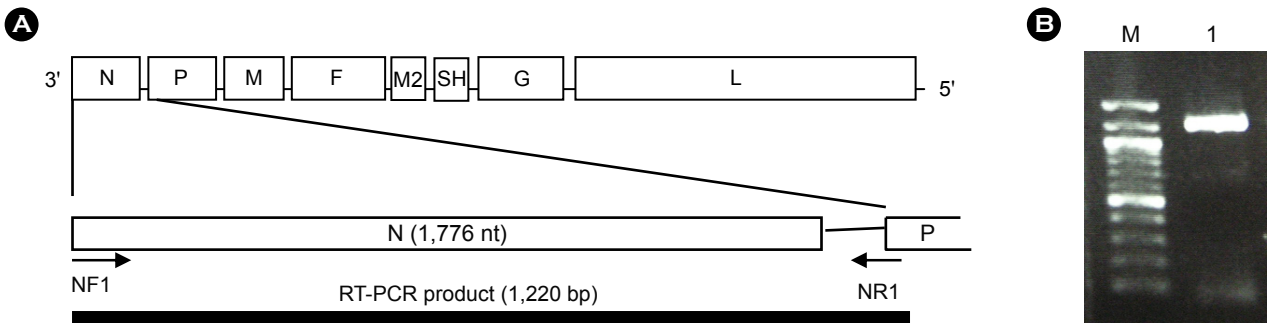


Figure 1. RT-PCR amplification of full-length N gene of aMPV from a nasal turbinate sample of aMPV-infected chicken. (A) Schematic diagram for amplification of full-length N gene of aMPV by RT-PCR using primers NF1 and NR1. (B) RT-PCR result. M, molecular marker; Lane 1, nasal turbinate sample.

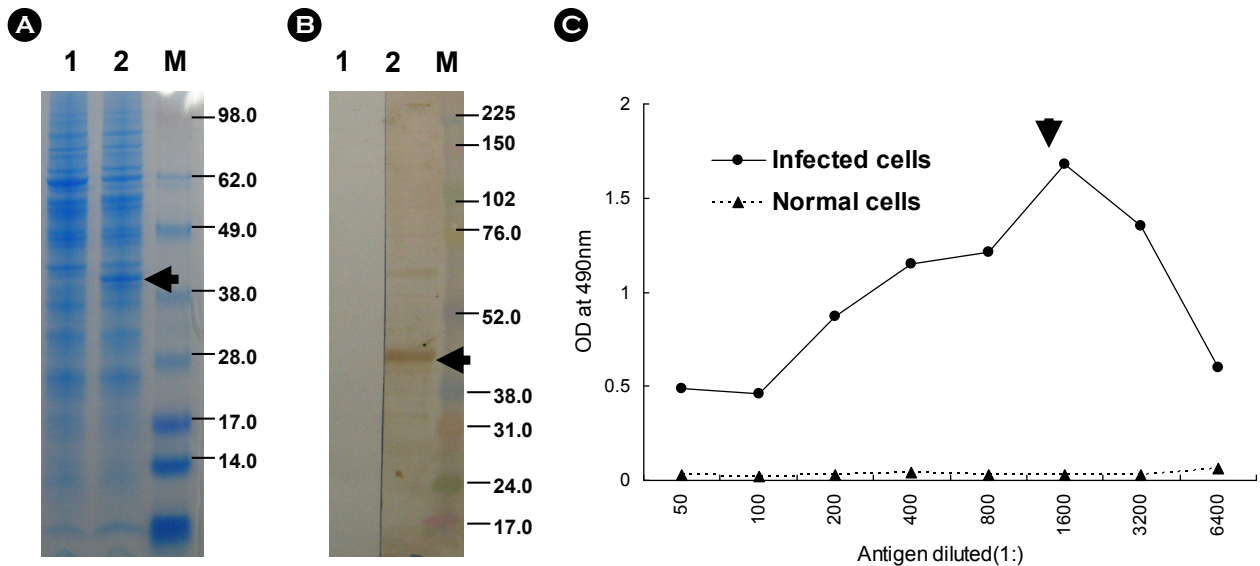


Figure 2. Expression of recombinant aMPV N protein by the rBac/AMPVN. The cell extracts of expressed protein were either fractionated using SDS-PAGE and then visualized by Commaissie blue staining (A) and immunoblotting using anti-aMPV antiserum (B) or titrated by ELISA using mAb12.2.1 (C). Lane 1, normal Sf9 cells; lane 2, Sf9 cells infected with rBac/AMPVN; M, molecular marker. Arrow represents recombinant protein having molecular weight of 44 kDa.

질의 예측되는 분자량에 해당하는 약 44 kDa의 단백질이 발견되어 있음을 확인하였다 (Fig. 2A). 그러나 정상 Sf9 세포에서는 44 kDa에 해당하는 단백질 분획이 검출되지 않았다. 이들 단백질을 immunoblotting법으로 분석하였을 때, 감염세포에서 발견된 44 kDa의 단백질 분획은 aMPV 닭 면역혈청과 강한 항원-항체 반응을 나타내었다 (Fig. 2B). 또한 ELISA로 분석한 결과, 감염세포에서 추출한 단백질은 단백질 농도에 따라 aMPV N 단백질 특이 단클론 항체 12.2.1과 전형적인 항원-항체 반응 곡선을 나타내었으며, 항원을 최대 6,400배 이상 희석한 농도에서도 단클론 항체 12.2.1과의 양성 반응 (흡광도

0.2 이상)을 보였다. 그러나 정상 Sf9 곤충세포 추출물과는 희석배수와 관계없이 0.2 이하의 흡광도를 나타내었다 (Fig. 2C). 이러한 결과를 종합해 볼 때 발견된 단백질은 약 44 kDa에 해당하는 분자량을 가진 aMPV N 단백질이 감염 곤충세포에서 고농도로 발견되었음을 나타낸다.

aMPV N 단백질 특이 단클론 항체의 생산

상기에서 발현한 재조합 N 단백질 항원을 면역원으로 사용하여 마우스 단클론 항체를 작성하였다. 그 결과 aMPV에 반응하는 단클론 항체 1G11, 4G5, 5D7, 5H7,

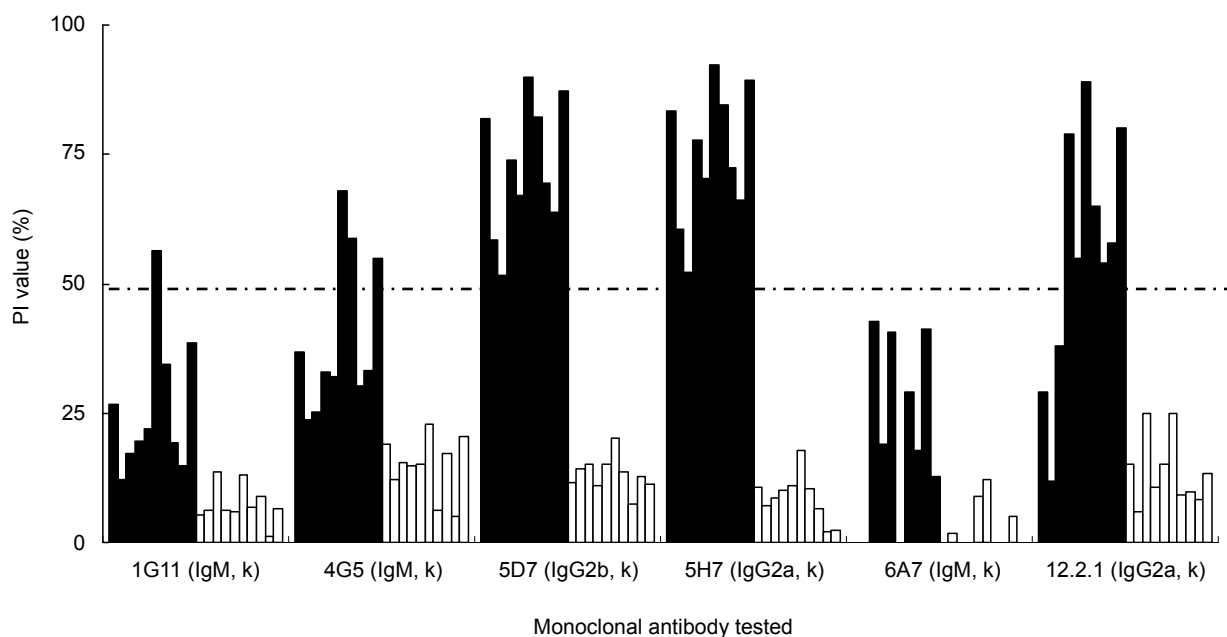


Figure 3. Competitive binding of mAbs and serum antibodies to the recombinant aMPV N protein in a competitive ELISA. Serum panel comprising 10 aMPV antibody-positive and 10 aMPV antibody-negative chicken sera were used for the ELISA. Filled and empty bars represent positive and negative chicken sera, respectively.

6A7를 분리하는 융합세포주 5종을 최종 클로닝하였다. 이들 단클론 항체의 isotype을 조사한 결과 모두 kappa heavy chain을 가지고 있었으며, 3종의 단클론 항체 (1G11, 4G5, 6A7)는 IgM, 단클론 항체 5D7은 IgG2b, 단클론 항체 5H7은 IgG2a의 light chain을 가지고 있었다.

개발된 C-ELISA의 최적 조건 확립

닭에서 aMPV 항체를 검출하기 위한 C-ELISA에 사용하는 재조합 N 단백질 항원과 단클론 항체의 최적 반응 조건을 조사하였다. 재조합 N 단백질 항원은 Figure 2C에서 보는 바와 같이, 1:1600배 희석한 조건에서 가장 높은 흡광도를 나타내었다. 그러므로, C-ELISA에 사용한 재조합 N 단백질 항원의 최적 희석 농도는 1:1600배로 결정하였다. 재조합 N 단백질 항원의 최적 희석 농도 조건하에서 단클론 항체들의 최적 희석배수 조건 (최고 흡광도의 75% 수준)을 조사하였다. 조사 대상 단클론 항체는 본 연구에서 생산한 5종의 단클론 항체 (세포배양 상층액)와 기존에 생산되어 보관 중이던 단클론 항체 12.2.1 (복수액)이었다. 그 결과 단클론 항체 1G11의 경우 1:80배, 4G4의 경우 1:100배, 5D7의 경우 1:20배, 5H7의 경우 1:40배, 그리고 12.2.1의 경우 1:16,000배일 때 최적 반응 조건을 나타내었다.

aMPV N 단백질 특이 단클론 항체의 선발

aMPV N 단백질에 존재하는 immunodominant epitope에 반응하고, 비특이적 반응이 낮은 단클론 항체를 선발하기 위하여 C-ELISA를 실시하였다. 이를 위한 평가 혈청으로서 aMPV 항체 양성 및 항체 음성 닭 야외혈청 각각 10점씩 사용하였다. 대조혈청을 포함하여 모든 검사혈청은 1:5배 희석한 농도에서 실시하였다. 그 결과 Figure 3에서 보는 바와 같이 단클론 항체에 따라 검사혈청과의 경합 반응 정도는 다양하게 나타났다. AMPV 양성혈청 및 음성혈청에 대하여 1G11의 경우 각각 26 ± 13.5 와 7 ± 3.7 , 4G5의 경우 각각 40 ± 15.3 과 15 ± 5.7 , 5D7의 경우 각각 73 ± 12.7 과 13 ± 3.4 , 5H7의 경우 각각 75 ± 13.0 과 9 ± 4.6 , 그리고 6A7의 경우 각각 16 ± 24.4 과 10 ± 19.6 , 12.2.1의 경우 각각 56 ± 24.2 와 14 ± 6.6 의 평균 percent inhibition (PI)을 나타내었다. 이 결과로 볼 때, 검사한 단클론 항체들 중 5H7 항체를 사용하였을 때 양성 혈청에 대하여 가장 높은 평균 PI치를 보였을 뿐만 아니라 양성혈청과 음성혈청간 평균 PI치의 차이에서도 다른 단클론 항체들보다 크게 나타났다.

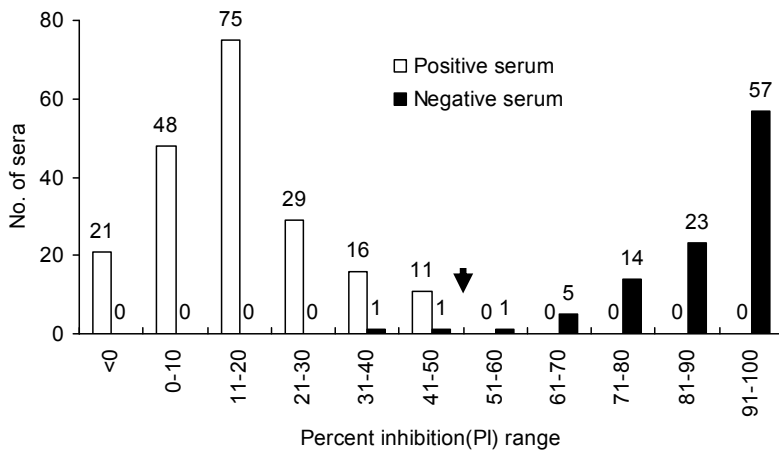


Figure 4. Sensitivity and specificity of a competitive ELISA using positive (n=102) and negative (n=200) chicken sera. Arrow indicates the cutoff value of 50 in the C-ELISA.

개발된 C-ELISA의 특이도 및 민감도

상기의 결과를 바탕으로 검출 항체로서 단클론 항체 5H7을 선발하여 C-ELISA를 개발하였다. C-ELISA 검사 결과의 유효성 검증을 위하여 aMPV N 단백질에 대한 닭 면역혈청을 음성혈청 (SPF 닭 혈청)으로 단계 희석하여 90 이상 및 50내지 70의 PI치를 가지도록 각각 강양성 (strong positive) 및 약양성 (weak positive) 대조혈청을 제조하여 사용하였다. 개발된 C-ELISA의 검사 결과는 검사혈청이 PI치가 50% 이상일 경우 양성, 50% 미만일 경우 음성으로 판정하였다. 바이러스 중화시험을 실시하여 최종 확인된 aMPV 항체 음성 닭 혈청 200점, aMPV 항체 양성 닭 혈청 102점을 검사하여 개발된 C-ELISA의 특이도와 민감도를 측정하였다 (Fig. 4). 그 결과 aMPV 항체 음성혈청의 경우 14.6 ± 13.0 의 평균 ELISA PI치를 보였으며, 검사혈청 모두 50 이하의 PI치를 나타내었다. 그러므로 C-ELISA의 특이도 (specificity)는 100%로 평가되었다. aMPV 항체 양성혈청의 경우 87.7 ± 12.2 의 평균 ELISA PI치를 보였다. 검사한 양성혈청 102점 중 100점은 50 이상의 PI치를 나타내었으며, 나머지 2점의 혈청은 40과 45의 PI치를 나타내었다. 그러므로 C-ELISA의 민감도 (sensitivity)는 98.0%로 평가되었다. 또한 이들 혈청을 현재 시판중인 IDEXX-ELISA 키트로 검사하였을 때 이들 검사혈청 모두 본 연구에서 개발된 C-ELISA 검사 결과와 일치하였다.

실험감염 SPF 닭으로부터 aMPV 항체 검출

aMPV 감염된 닭에서의 항체 출현 (검출) 시기를 조사하기 위하여 실험감염 닭 혈청을 사용하여 C-ELISA로

검사하였다. 이를 위하여 aMPV SC1509 strain (subtype B) 실험접종군 (SPF 닭 6수) 및 대조군 (닭 6수)로부터 각각 접종 전, 접종 후 5일째 및 접종 후 10일째 채혈하여 국립수의과학검역원 조류질병과에 보관중인 닭 혈청 36 점을 사용하였다 (Fig. 5). C-ELISA에 의한 검사 결과는 시판중인 IDEXX-ELISA 검사 키트의 검사 결과와 비교하였다. aMPV 접종 전 혈청은 모두 C-ELISA와 IDEXX-ELISA 검사 키트 검사 결과 항체 음성으로 판정되었다. 접종 5일째 감염 닭 혈청의 경우 개발된 C-ELISA에서는 6수 중 4수에서 항체가 검출되었으나, IDEXX-ELISA 검사 키트에서는 모두 항체 음성이었다. 접종 10일째 감염 닭 혈청의 경우 개발된 C-ELISA에서는 6수 모두에서 항체가 검출되었으나, IDEXX-ELISA 검사 키트는 6수 중 3수에서 항체를 검출하였다. 대조군 닭 혈청의 경우 C-ELISA와 IDEXX-ELISA로 검사하였을 때 실험기간 동안 채취한 닭 혈청들은 모두 항체 음성이었다.

야외감염사례 적용시험

개발된 C-ELISA가 실제 야외농장에서 발생농장에서 aMPV 항체를 효과적으로 검출할 수 있는지 여부를 조사하였다. 이를 위하여 최근 국립수의과학검역원에 의뢰되어 aMPV 감염증으로 진단된 6개 양계농장의 혈청 (n=80) 또는 난황 시료 (n=105)를 대상으로 C-ELISA를 실시하였다 (Table 1). 의뢰 당시 2개 농장 (KS 및 SD)은 subtype A aMPV, 나머지 4개 농장 (SJ, HM, PA 및 CS)은 subtype B aMPV에 감염된 것으로 진단된 사례였다. C-ELISA에 의한 검사 결과는 시판중인 IDEXX-ELISA 검사 키트의 검사 결과와 비교하였다. C-ELISA로 검사한 결과 aMPV 발생농장에서 개체별 항체 검출율이 40%

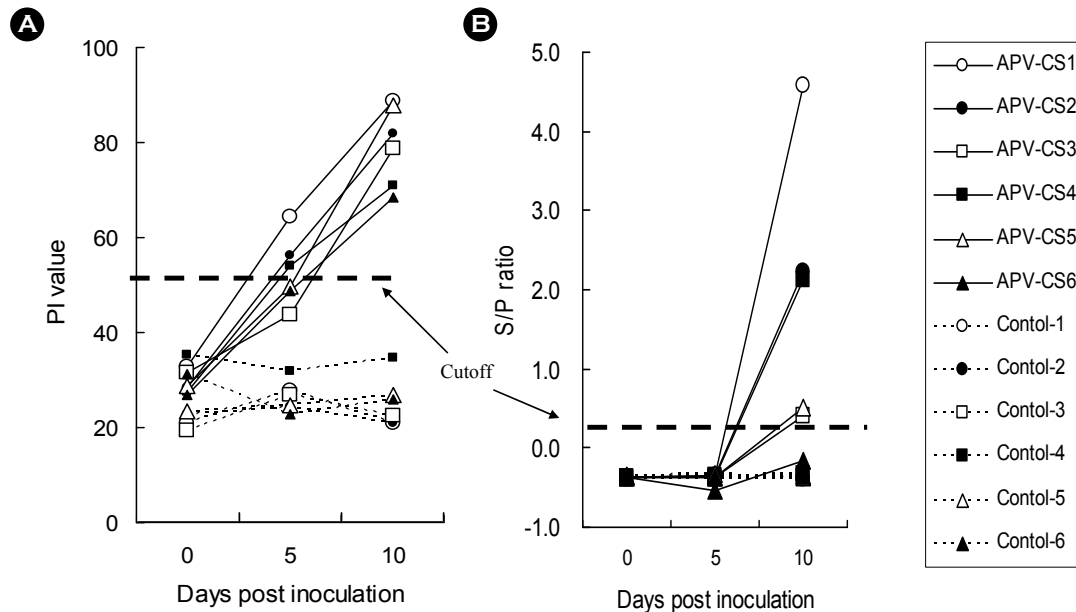


Figure 5. Detection of anti-aMPV antibodies in experimentally aMPV (subtype B)-infected chickens by a competitive ELISA and comparison with IDEXX-ELISA. Cutoff values of C-ELISA (A) and IDEXX-ELISA are PI value of 50 and S/P ratio of 0.2, respectively.

Table 1. Detection of antibodies to aMPV in clinical samples of infected chicken farms in Korea by competitive ELISA

Farm ^a	SHS ^b	Age (w.o)	Serum		Yolk	
			C-ELISA	IDEXX-ELISA	C-ELISA	IDEXX-ELISA
KS (B)	Yes	32	38/40 (95%) ^c	39/40 (98%)	NT	NT
SJ (B)	Yes	30	NT	NT	9/15 (60%)	10/15 (67%)
SD (A)	Yes	35	NT	NT	12/30 (40%)	11/30 (37%)
HM (A) ^d	No	16	9/10 (90%)*	4/10 (40%)*	NT	NT
		20	10/10 (100%)	10/10 (100%)	NT	NT
PA (B)	Yes	30	NT	NT	21/30 (70%)	23/30 (77%)
CS (B)	No	65	18/20 (90%)	19/20 (95%)	29/30 (97%)	28/30 (93%)

^a Letter in parenthesis represents subtype of aMPV at the time of diagnosis. aMPV subtype was determined by phylogenetic analysis based on the sequence of G protein gene of aMPV (7).

^b SHS represents swollen head syndrome observed in affected birds at the time of diagnosis.

^c No. positive/No. tested (percent positive). NT, not tested.

^d HN farm was diagnosed as aMPV infection at the 16 weeks old and 4 weeks later re-sampled from the same chicken flock.

* Values between C-ELISA and IDEXX-ELISA differ significantly (Duncan test, $p < 0.05$)

에서 100%까지 다양하게 검출되었다. IDEXX-ELISA 검사 키트에 의한 검사 결과와 비교하였을 때 16주령의 HM 농장 시료를 제외한 나머지 모든 사례 건에서 C-ELISA 검사 결과는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. HM 농장의 경우 C-ELISA의 경우 바이러스가 검출된 16주령에서는 항체 검출율이 90%이었으나, IDEXX-ELISA에서는 40%의 항체 검출율을 나타내어 두 검사

법간에 유의성 있는 차이를 나타내었다 (Duncan test, $p < 0.05$). 그러나, 동일 농장 계군 (flock)에 대하여 4주 후 채혈하여 검사하였을 때 검사 대상 시료 모두에서 C-ELISA와 IDEXX-ELISA 검사 키트에 의하여 항체가 검출되었다.

고 찰

본 연구를 통하여 aMPV 항체를 검출할 수 있는 C-ELISA를 개발하였다. aMPV 항체를 검출하는데 있어서 재조합 단백질 항원을 사용하여 C-ELISA 형태로 개발된 최초의 사례로서 그 의의가 크다 하겠다. 본 연구에서 발현한 N 단백질의 경우 당단백질이 아니기 때문에 대장균 발현 system을 사용할 수 있으나, 대장균의 경우 닭에서 흔한 병원체이기 때문에 검사혈청 내 존재할 수 있는 대장균 유래 성분과의 비특이 반응 가능성을 배제하기 위하여 대장균 발현체계 대신 baculovirus 발현체계를 사용하였다. 특히 본 연구에서 개발한 C-ELISA는 현재 시판중인 ELISA 검사 키트와 비교하였을 때 여러 가지 장점을 가지고 있다. 첫째, 본 연구에서 개발한 C-ELISA는 바이러스 항원대신에 재조합 단백질을 사용하고 있다는 점이다. 감염성이 있는 aMPV를 증식시켜 제조하는 바이러스 항원과 달리, 재조합 단백질은 합성 단백질 형태이기 때문에 일반 실험실에서 항원 제조 과정 중 병원체에 의한 오염 가능성이 없다. 둘째, 본 연구에서 개발한 C-ELISA는 aMPV 닭 감염 항체와 경쟁적으로 반응하는 단클론 항체를 검출 항체로 사용하기 때문에 다양한 조류 species에서도 항체검사용으로 적용이 가능하다는 점이다. IDEXX-ELISA와 같이 indirect ELISA의 경우 다양한 조류 species에서 aMPV 감염여부를 검사하고자 할 때 검사 대상 조류 species 별로 anti-species secondary antibody를 사용하여야 한다. 셋째, 본 연구에서 개발한 C-ELISA는 aMPV 닭 감염 항체와 단클론 항체와의 경합 반응에 의해 항체 양성 여부를 판정하기 때문에 혈중 또는 난황내 존재하는 항체의 isotype (예를 들면, IgG, IgA, IgM)과 관계없이 검사 시료내 aMPV 항체 존재여부를 판정할 수 있다. 그러므로 단클론 항체를 사용하는 C-ELISA는 감염 초기 출현하는 IgM 항체나 점막면역에 관여하는 IgA 항체를 검출하는데 효과적일 수 있다.

일반적으로 재조합 N 단백질은 비특이 반응 (non-specific reaction)을 유발할 수 있는 세포유래 성분을 제거하기 위하여 6xHis과 같은 단백질을 융합시킨 형태로 발현한 다음 정제 과정을 거쳐서 항원을 제조한다 (31~33). 그러나 본 연구에서는 N 단백질을 6xHis과 같은 단백질과 융합시키지 않은 형태로 발현하였으며, 감염세포로부터

발현 단백질을 detergent로 추출한 후 단백질 정제 과정을 거치지 않은 상태로 C-ELISA에 사용하였다. 이것은 비특이 반응을 유발하지 않는 단클론 항체를 검출 항체로 사용하기 때문에 가능하였다. 또한 항원 제조 과정 및 보관 과정에서 세포 성분에 의한 N 단백질의 변성을 방지하기 위하여 protease inhibitor를 첨가하였다. 본 연구에서 발현한 단백질은 감염 곤충세포로부터 단백질 추출 과정에서 세포배양 원액의 1/20이 되게 농축하여 제조하였으며, ELISA를 위한 적정 항원량은 제조 항원을 1600배 희석한 농도에서 결정되었다. 예를 들면, 두 개의 175-cm² flask (약 100 ml 배양액)를 사용하여 5 ml의 재조합 N 단백질 항원을 제조할 경우 약 8만수 분의 혈청을 검사할 수 있는 ELISA 항원 용액 8 L (5 ml × 1,600배 희석)를 제조할 수 있다. 그러므로 곤충세포에서 N 단백질이 높은 농도로 발현되기 때문에 적은 양의 세포배양액만으로도 다량의 단백질 항원을 제조할 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 사실은 *Paramyxoviridae* family에 속하는 여러 바이러스 N 단백질 발현 사례에서도 보고된 바 있다 (37~39).

aMPV의 경우 비록 단일 혈청형만 존재하고 있지만, 4개의 subtype이 존재하고 있고 이들 subtype간 항원성 차이가 존재하는 것으로 알려져 있다 (9). 국내의 경우 닭에서 병원성을 유발할 수 있는 subtype A와 subtype B에 해당하는 aMPV가 동시에 유행하고 있는 실정이다 (28, 29). 그러므로 국내 사육 닭을 대상으로 aMPV 항체를 바이러스 subtype과 관계없이 효과적으로 검출하기 위해서는 aMPV subtype들 사이에 공통적인 항원적 성상을 가진 단백질을 ELISA 항원으로 사용하여야 한다. 그런 측면에서 보면 N 단백질은 aMPV subtype간 매우 conserve한 부위이면서 감염 조류에서 강한 면역 반응을 유도하는 바이러스 구조 단백질로 알려져 있다 (40~43). 본 연구에서 발현한 N 단백질의 경우 subtype A 및 subtype B에 속하는 aMPV와 최소한 90% 이상의 높은 아미노산 homology를 보였다. 그러므로 본 연구에서 N 단백질을 진단 항원 후보 단백질로 선정하여 발현하였다. Gualti 등 (31)은 대장균 발현체계를 이용하여 subtype C aMPV N 단백질을 발현하여 ELISA법을 개발하였으며, 칠면조 감염혈청을 사용하여 조사한 결과 발현 단백질 항원은 바이러스 항원보다 민감도와 특이도가 우수하였다고 보고한 바 있다. 최근 baculovirus 발현체계를 이용하여 발현한 hMPV N 단백질을 indirect ELISA에 적용한 결과 사

람에서 hMPV 항체를 검출할 수 있는 진단 항원 항원으로 사용 가능성이 보고되었다 (33). 본 연구에서 생산한 재조합 N 단백질을 ELISA에 적용하였을 때 100%의 특이도와 98%의 민감도를 나타내었다.

C-ELISA에 사용되는 단클론 항체는 검사 방법의 특이도와 민감도를 좌우하는 데 매우 중요하다. C-ELISA에 적용하였을 때 5H7 단클론 항체는 검사한 모든 aMPV 양성혈청 시료에서 양성 반응을 나타내었다. 이것은 단클론 항체 5H7의 결합 부위가 감염 닭에서 면역반응을 강하게 유발하는 immunodominant epitope라는 것을 시사해 준다. 향후 5H7 단클론 항체를 이용한 epitope mapping을 통하여 N 단백질상에 존재하는 immunodominant epitope에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 본 연구에서 ELISA 검출 항체로 선발된 단클론 항체 5H7은 비록 subtype A에 속하는 aMPV의 N 단백질 항원으로 작성하였지만, C-ELISA에서 subtype A aMPV 뿐만 아니라 subtype B에 해당하는 aMPV 감염 항체들과도 경합 반응을 나타낼 수 있음을 나타낸다 (Fig. 5). 이것은 단클론 항체 5H7가 반응하는 epitope 부위가 최소한 subtype A와 subtype B aMPV에서 공통적으로 존재하는 conserved region임을 나타낸다. 이러한 결과는 실제 야외감염 농장 사례에 대한 검사에서도 뒷받침되었다. 실제 야외감염 농장의 닭에 적용하였을 때 본 연구에서 개발한 C-ELISA는 aMPV subtype에 관계없이 모든 감염 사례의 닭에서 aMPV 감염 항체를 검출할 수 있었다 (Table 1). 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 N 단백질이 칠면조 (aMPV subtype C)나 사람 (hMPV)뿐만 아니라 닭 (aMPV subtypes A and B)에서 항체를 검출하는 데 사용할 수 있는 유용한 바이러스 단백질임을 나타낸다.

흥미롭게도 aMPV 인공감염 10일 전후에 항체 검출이 가능한 IDXX-ELISA와 달리 본 연구에서 개발한 C-ELISA는 감염 후 5일부터 항체 검출이 가능하였다. 이러한 결과는 aMPV 감염시 N 단백질에 대한 숙주 면역반응이 감염 초기에 매우 강하게 유도된다는 것을 나타내며, 진단학적 측면에서 볼 때 본 연구의 C-ELISA가 감염 직후 초기에 항체 검출이 가능하여 질병 진단에 유용할 수 있음을 나타낸다. 야외 감염 사례에 적용한 검사 결과 (Table 1)는 본 연구에서 개발한 C-ELISA가 질병을 조기에 진단함에 있어서 유용성이 있음을 보여주고 있다. 즉 야외 감염 사례들 중 HM 농장의 경우 16주령 닭에서 검사한 결과 C-ELISA는 IDXX-ELISA (40%)와 달

리 대부분의 닭 (90%)에서 항체를 검출하였다. 동일 농장에 대하여 4주 후 다시 검사하였을 때 모든 닭 혈청 시료에서 항체가 검출되었다는 점과 실험감염 닭 혈청 검사 결과 (Fig. 5)를 바탕으로 미루어 볼 때 16주령의 닭에서 시료를 채취할 당시 HM 농장은 aMPV 감염 초기 상태이었을 가능성이 높다는 것을 말해준다.

결론적으로 본 연구에서 개발한 C-ELISA가 병성감정이나 질병모니터링 검사를 위한 검사법으로 유용하게 사용할 수 있다. 그럼에도 불구하고 현재 국내 양계농장에 aMPV 감염이 만연되어 있는 상황 (24~27)이기 때문에 검사 시료에서 aMPV 항체가 검출되었다는 사실만 가지고 aMPV 감염증을 진단하는 데 있어서 한계가 있다는 점을 염두에 두어야 한다. 혈청을 희석하여 항체가 (antibody titer)를 측정하는 보완된 방법을 개발하여 감염 닭에서의 aMPV에 대한 항체 반응 패턴을 분석하거나 일정 간격 (예를 들면 2주 간격)으로 동일 계군을 모니터링 검사를 실시하는 방법을 통하여 이러한 한계를 보완할 필요가 있다. 가능하다면 감염 초기에 검출되는 aMPV 특이 IgM 항체만을 특이적으로 검출하는 방법을 개발한다면 혈청학적으로 진단하는 데 유용할 수 있다. 향후 aMPV 전염에 있어서 야생 조류에서의 역할을 규명하기 위하여 야생 조류를 대상으로 본 연구에서 개발된 C-ELISA를 적용한 예찰 연구 등이 필요하다.

참 고 문 헌

- 1) Pringle CR. Virus taxonomy--San Diego 1998. Arch Virol 1998;143:1449-59.
- 2) Ling R, Easton AJ, Pringle CR. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. J Gen Virol 1992;73:1709-15.
- 3) Baxter-Jones C, Grant M, Jones RC, Wilding GP. A comparison of three methods for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus. Avian Pathol 1989;18:91-8.
- 4) Jones RC. Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered. Avian Pathol 1996;25:639-48.
- 5) Collins MS, Gough RE, Alexander DJ. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. Avian Pathol 1993;22:469-79.
- 6) Cook JKA, Jones BV, Ellis MM, Jing L, Cavanagh D. Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis

- virus using monoclonal antibodies. *Avian Pathol* 1993;22:257-73.
- 7) Juhasz K, Easton AJ. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol* 1994;75:2873-80.
 - 8) 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.
 - 9) Cook JKA. Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens. *Vet J* 2000;160:118-25.
 - 10) Lwamba HC, Bennett RS, Lauer DC, Halvorson DA, Njenga MK. Characterization of avian metapneumoviruses isolated in the USA. *Anim Health Res Rev* 2002;3:107-17.
 - 11) Bayon-Auboyer MH, Jestin V, Toquin D, Cherbonnel M, Eterradossi 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.
 - 12) Toquin D, Bayon-Auboyer MH, Eterradossi N, Jestin V. Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Vet Rec* 1999;145:680.
 - 13) Broor S, Bharaj P. Avian and human metapneumovirus. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1102:66-85.
 - 14) McDougall JS, Cook JKA. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. *Vet Rec* 1986;118:206-7.
 - 15) Picault JP, Giraud P, Drouin P, Guittet M, Bennejean G, Lamande J, *et al.* Isolation of a TRT-like virus from chickens with swollen head syndrome. *Vet Rec* 1987;121:135.
 - 16) Shin HJ, Nagaraja KV, McComb B, Halvorson DA, Jirjis FF, Shaw DP, *et al.* Isolation of avian pneumovirus from mallard ducks that is genetically similar to viruses isolated from neighboring commercial turkeys. *Virus Res* 2002;83:207-12.
 - 17) Catelli E, De Marco MA, Delogu M, Terregino C, Guberti V. Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. *Vet Rec* 2001;149:56-8.
 - 18) Cadman HF, Kelly PJ, Zhou R, Davelaar F, Mason PR. A serosurvey using enzymelinked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in *Ostriches (Struthio camelus)* from Zimbabwe. *Avian Dis* 1994;38:621-5.
 - 19) Gough RE, Collins MS, Cox WJ, Chettle NJ. Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Vet Rec* 1988;123:58-9.
 - 20) Bennett RS, McComb B, Shin HJ, Njenga MK, Nagaraja KV, Halvorson DA. Detection of avian pneumovirus in wild Canada (*Branta canadensis*) and blue-winged teal (*Anas discors*) geese. *Avian Dis* 2002;46:1025-9.
 - 21) Shin HJ, Njenga MK, McComb B, Halvorson DA, Nagaraja KV. Avian pneumovirus (APV) RNA from wild and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. *J Clin Microbiol* 2000;38:4282-4.
 - 22) Cook JKA, Cavanagh D. Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathol* 2002;31:117-32.
 - 23) Kim JH, Song CS, Seong HW, Mo IP, Kwon JH, Kim KS, *et al.* The investigation of sero-prevalence and occurrence of SHS from broiler breeder in Korea. *Korean J Vet Res* 1992;32:25.
 - 24) 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.
 - 25) 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.
 - 26) Lee JW, Shon KR, Park KS, Kim YT, Kim CC, Han KS, *et al.* Serological survey of avian pneumovirus and reovirus in breeders of Jeonbuk province. *Korean J Vet Serv* 2006;29:9-18.
 - 27) 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.
 - 28) Kwon JS, Lee HJ, Jeong SH, Park JY, Hong YH, Lee YJ, *et al.* Isolation and characterization of avian metapneumovirus from chickens in Korea. *J Vet Sci* 2010;11:59-66.
 - 29) Choi KS, Jeon WJ, Park MJ, Lee EK, Kwon JH. Isolation and characterization of avian metapneumovirus from broiler breeder chickens in Korea. *J Bacteriol Virol* 2009;39:373-82.
 - 30) Gulati BR, Cameron KT, Seal BS, Goyal SM, Halvorson DA, Njenga MK. Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies. *J Clin Microbiol* 2000;38:4010-4.
 - 31) Gulati BR, Munir S, Patnayak DP, Goyal SM, Kapur V.

- Detection of antibodies to U.S. isolates of avian pneumovirus by a recombinant nucleocapsid protein-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2967-70.
- 32) Hamelin ME, Boivin G. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for human metapneumovirus serology based on a recombinant viral protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:249-53.
- 33) Liu L, Qian Y, Zhu R, Zhao L, Deng J. Generation of recombinant nucleocapsid protein of human metapneumovirus in baculovirus for detecting antibodies in the Beijing population. *Arch Virol* 2010;155:47-54.
- 34) Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.
- 35) Lee YJ. Studies on detection of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibody and polymerase chain reaction. Master's Thesis. Konkuk University, 1995.
- 36) Choi KS, Nah JJ, Ko YJ, Choi CU, Kim JH, Kang SY, *et al.* Characterization of antigenic sites on the rinderpest virus N protein using monoclonal antibodies. *J Vet Sci* 2003;4:57-65.
- 37) Choi KS, Nah JJ, Choi CU, Ko YJ, Sohn HJ, Libeau G, *et al.* Monoclonal antibody-based competitive ELISA for simultaneous detection of rinderpest virus and peste des petits ruminants virus antibodies. *Vet Microbiol* 2003;96:1-16.
- 38) Fooks AR, Stephenson JR, Warnes A, Dowsett BA, Rima BK, Wilkinson GW. Measles virus nucleocapsid protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsid-like structure. *J Gen Virol* 1993;74:1439-44.
- 39) Ismail TM, Yamanaka MK, Saliki JT, El-Kholy A, Mebus C, Yilma T. Cloning and expression of the nucleoprotein of peste des petits ruminants virus in baculovirus for use in serological diagnosis. *Virology* 1995;208:776-8.
- 40) Buraphacheep W, Britt WJ, Sullender WM. Detection of antibodies to respiratory syncytial virus attachment and nucleocapsid proteins with recombinant baculovirus-expressed antigens. *J Clin Microbiol* 1997;35:354-7.
- 41) Li J, Ling R, Randhawa JS, Shaw K, Davis PJ, Juhasz K, *et al.* Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. *Virus Res* 1996;41:185-91.
- 42) Samal SK, Pastey MK, McPhillips T, Carmel DK, Mohanty SB. Reliable confirmation of antibodies to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) by enzyme-linked immunosorbent assay using BRSV nucleocapsid protein expressed in insect cells. *J Clin Microbiol* 1993;31:3147-52.
- 43) Shin HJ, Cameron KT, Jacobs JA, Turpin EA, Halvorson DA, Goyal SM, *et al.* 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.