

## 1986년 이전 국내 전염성 기관지염 바이러스의 확인

권혁준 · 이동우 · 안영기 · 윤종웅 · 김선중

서울대학교 수의과대학  
(2001년 1월 13일 게재승인)

### Presence of infectious bronchitis virus in Korea before 1986

Hyuk-joon Kwon, Dong-woo Lee, Young-ki Ahn,  
Jong-ung Yoon, Sun-joong Kim

College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
(Accepted by January 13, 2001)

**Abstract :** To clarify for the presence of infectious bronchitis virus (IBV) in Korea before 1986, in which the virus was first isolated, materials collected from chicken diagnostic consignments between 1980 and 1985 and propagated in chicken embryos or cell cultures were screened by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) targeted to the nucleocapsid gene of the virus. Among 11 samples examined, one sample (IBV-SNU80108) submitted in 1980 showed specific PCR product (281 bp). When the amplified product was sequenced, together with IBV vaccine virus H120 strain, and compared with the data for ten other IBV strains derived from the GeneBank, identities between IBV-SNU80108 and other strains in nucleotide and amino acid sequences ranged 96.3% to 63.7% and 96.4% to 69%, respectively. IBV-SNU80108 was distinct from H120 strain by showing 91.9% and 92.9% identities in the respective sequences. This data suggested that IBV genetically distinctive from other foreign IBV strains might be present before 1986 in Korea.

**Key words :** IBV, nucleocapsid gene, RT-PCR

## 서 론

닭의 전염성 기관지염 바이러스(Infectious bronchitis virus: IBV)는 single-stranded, positive-sense RNA 바이러스로 *Coronaviridae*에 속하며 분리 주에 따라 정도의 차이는 있지만 콧물, 기침, 기관 라임 등의 호흡기 증상과 신장염에 의한 폐사, 그리고 산란장기 손상에 의한 산란 저하, 난질불량 등을 유발한다<sup>1-3</sup>. 이 바이러스는 염기서열의 치환, 결손, 첨가 외에도 다른 strain과의 유전자 재조합이 일어나 다양한 변이 주들이 유행하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>4-7</sup>. 이 바이러스는 1931년 Schalk와 Hawn<sup>8</sup>에 의해 최초로 보고된 이후 전세계적인 발생 양상을 보이고 있는데, 지역적으로는 미국에서 Massachusetts (Mass) 형을 포함한 13종 이상의 혈청형과 다수의 변이형이 보고되었고, 유럽과 호주, 일본 등에서도 Mass 형 이외의 혈청형과 변이형이 보고되었다<sup>9-18</sup>. 국내에서는

1968년 유 등<sup>19</sup>과 1980년 김 등<sup>20</sup>이 전염성 기관지염 바이러스에 대한 항체 양성계군이 있음을 보고한 바 있고, 1986년 이 등<sup>21</sup>이 산란저하 종계군에서 바이러스를 분리하여 최초로 질병발생을 보고하였다. 기존의 전염성 기관지염의 진단은 SPF 발육란에 접종하여 3-5대 맹목계대란 후 나타나는 병변을 관찰하고 증식한 바이러스를 양성혈청으로 중화시험해야 하므로 많은 시간과 노력이 필요하며 혈청형이 다르거나 변이형일 경우 중화시험에 의한 동정에서 위음성이 나타날 수 있다<sup>2,22</sup>. 최근에는 공통항원에 대한 단클론 항체를 이용하여 감염 조직에 대해 형광항체법이나 조직화학염색법으로 직접 IBV 항원을 검출하거나, IBV 1차 배양액을 nitrocellulose membrane에 흡착시켜 검출하는 immunoblotting 법 등이 보고되었다<sup>23-26</sup>.

근년 분자생물학적인 기법의 발달과 그에 따른 유전 정보의 축적으로 IBV의 RNA를 상보적인 DNA로 전환

한 후 특정 부위를 증폭하여 바이러스의 존재 여부를 확인하는 역전사효소-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)법이 개발되었고, RT-PCR로 증폭시킨 산물을 probe로 검출하는 방법, 그리고 바이러스 strain 간의 구분을 위해 증폭된 산물을 제한효소로 처리하여 산생되는 산물의 수와 크기로 구분하는 PCR-RFLP 법 등이 개발되어 응용되고 있다<sup>27-32</sup>. 국내에서 IBV의 분리는 1986년에 최초로 이루어졌으나 최초 분리 이전에 IBV의 존재 여부를 확인하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 발육계란 배양 재료 및 바이러스

1980년부터 1985년 사이에 서울대학교 수의과대학 조류질병학교실에 의뢰된 닭 병성감정 사례중 IBV의 감염이 의심되는 사례로서 SPF 발육계란 배양 요막강액 또는 계태아 간세포 배양액을 사용하였다(Table 1). 모든 재료는 병계 조직 유체액을 발육계란의 요막강내로 직접 접종하거나 chicken embryo liver cell culture에 배양한 후 수확한 재료로서 냉동(-20°C) 보관된 재료를 사용하였다. RT-PCR 증폭 산물의 염기서열 분석을 위해 Mass 형 H120 주로 만든 IBV 백신(BIORAL H120, Rhone Merieux, Lyon, France)에 멸균중류수를 첨가하여 실험에 사용하였다.

### PCR primer 및 RT-PCR

RT-PCR 프라이머로 Falcone *et al*<sup>29</sup>이 IBV nucleocapsid

**Table 1.** Origins and passage histories of chicken embryo propagated virus materials used in this work

Case No.	Specimens	Passage*	Year of Sampling
8050	Lung	E1	1980
80108	CT <sup>1</sup>	E3	1980
8426	Tra	E1	1984
8446	Tra	L2E1	1984
8465	Prov <sup>2</sup>	E1	1984
8490	SI <sup>3</sup>	E1	1984
8538	SI	L5	1985
8544	Liver	L2	1985
8548	Tra <sup>4</sup>	L5E2	1985
8557	AS <sup>5</sup>	L4E2	1985
8559	Tra	L2E2	1985

<sup>1</sup>cecal tonsil, <sup>2</sup>proventriculus, <sup>3</sup>small intestine, <sup>4</sup>trachea, <sup>5</sup>air sac.

\*Capital letters E and L mean chicken embryo and chicken embryo liver cell cultures, respectively, and figures following the capital letters mean number of passages made in respective systems before the final embryo propagation.

유전자의 일부를 증폭하기 위해 nested PCR 용으로 보고한 프라이머는 1차 PCR 프라이머로 IBV1 (nt: 110-117)과 IBV2 (nt: 397-415)이고, 2차 PCR 프라이머로 IBV3 (nt: 135-151)와 IBV4 (nt: 356-374) 이었다. 또한 Falcone *et al*<sup>29</sup>의 프라이머 염기서열과 GenBank에 등록된 IBV N 유전자의 염기서열을 참조하여 대부분의 IBV를 증폭할 수 있도록 IBVF 및 IBVR 프라이머 쌍을 제작하여 사용하였으며 염기서열 및 위치는 다음과 같다.

IBNF(144-163): 5'-CCAGTYATYA AACTAGGAGG-3'

IBNR(406-387): 5'-GCGGCWGGTC CTGTTCCAGT-3'

RNA 분리를 위해 발육계란 배양 요막강액 100 µl에 TRI reagent (MRC Inc, Cincinnati, OH, USA) 1 ml를 첨가하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 RNA를 분리하여 DEPC (diethyl-pyrocabonate; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)로 처리한 멸균 3차 중류수 10 µl에 용해하였다. cDNA 합성을 위해 1st strand buffer (Promega Co, Madison, WI, USA) 4 µl, 0.1M DTT (Promega Co) 1 µl, 2.5 mM dNTP (Bioneer Co, Seoul, Korea) 1 µl, random hexamer (50 ng/µl) 1 µl와 RNA 10 µl를 첨가하여 70°C에서 15분간 가온한 후 얼음 속에서 급냉시켰다. 실온에서 10분간 정치한 후 역전사효소인 Superscript II (Promega Co) 1 µl를 첨가하여 42°C에서 1시간 반응시켰고, 95°C에서 5분간 역전사효소를 불활화 하였다. PCR은 10X PCR buffer 1 µl, 2.5 mM dNTP 0.2 µl, 프라이머 IBV1 또는 IBV3 (5 pmol/µl) 0.2 µl, 프라이머 IBV2 또는 IBV4 (5 pmol/µl) 0.2 µl, Taq polymerase (Bioneer Co; 1U/µl) 0.2 µl, 멸균중류수 7.2 µl, cDNA 1 µl를 혼합하여 Thermocycler 9600 (Perkin-Elmer Co, Foster City, CA, USA)을 이용하여 94°C에서 4분간 변성한 후 94°C-30초, 45°C-15초, 60°C-20초의 반응을 35회 실시한 후 72°C에서 7분간 반응하였다. 증폭산물이 관찰되지 않은 재료들에 대해서는 안쪽 프라이머를 사용하여 같은 조건에서 2차 PCR을 실시하였다. IBNF 및 IBNR 프라이머를 사용한 경우에는 annealing 및 elongation 온도를 48°C와 72°C로 하여 동일한 조건으로 1차 PCR만을 실시하였다. 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide (Sigma Co)로 염색한 후 UV-transilluminator 상에서 관찰하였다.

### DNA sequencing

증폭산물 5 µl에 95% 에탄올 (Merck Co, Darmstadt, Germany) 12.5 µl와 3M sodium acetate (Sigma Co; pH 5.2) 1 µl를 첨가해 -20°C에서 10분간 정치한 후 4°C에서 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 에탄올을 제거하고 다시 70% 에탄올 100 µl를 첨가하여 혼합한 후 5

분간 동일 조건에서 원심분리 하였다. 에탄올을 제거하고 건조시킨 후 1x PCR buffer 10 µ에 용해하였다.

염기서열 결정을 위해 침전시킨 증폭산물 1 µ, PCR 프라이머 IBV3 또는 IBV4 (3 pmol/µ) 1 µ, Dye terminator (Perkin-Elmer Co) 1 µ, 1x PCR buffer 2 µ를 첨가하여 96°C에서 10초 동안 변성시킨 후, 96°C-10초, 52°C-5초, 60°C-30초의 일련의 반응을 25회 반복하였다.

반응물은 동일한 방법으로 에탄올 침전하였고, 건조 후 loading buffer [Blue Dextran/EDTA (Perkin-Elmer Co) 1 vol. + Deionized formamide (Amresco Co, Solon, OH, USA) 6 vol] 2 µ 첨가하여 용해한 후 95°C에서 5분간 가열하여 얼음 속에 넣은 상태로 사용하였다. 비특이적인 증폭산물로 정확한 염기서열을 얻을 수 없는 경우 TOPO TA cloning kit (Invitrogen Co, The Netherlands) 을 사용하여 cloning 하였고, 도입 유전자를 가지고 있는 3개 이상의 colony에 대해 M13 forward와 M13 reverse primer (Bioneer Co.)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 전기영동 및 염기서열 결정을 위해 ABI Prism 377 (Perkin-Elmer Co)과 염기서열 분석 프로그램 버전 1.01 (Perkin-Elmer Co)을 사용하였다.

**염기서열 분석**

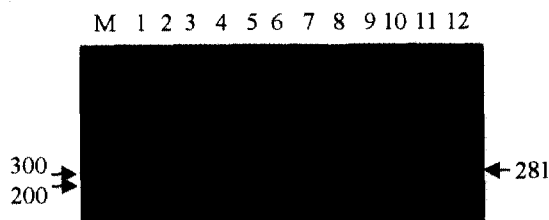
결정된 염기서열을 바탕으로 아미노산 서열을 결정하고, GenBank 데이터베이스에 등록된 염기서열과 함께 다중배열하고 MegAlign 패키지 (Windows version 3.12e; DNASTAR, Madison, Wis, USA)를 이용하여 상동성을

분석하고 분지도를 그렸다. UPGMA와 neighbor-joining 분지도는 Jukes Cantor distance method와 pairwise deletion에 기초하여 MEGA<sup>33</sup> 프로그램을 사용하여 그렸으며 Bootstrap 분석은 100회 반복하였다.

**결 과**

**RT-PCR에 의한 IBV 특이 유전자의 증폭**

1980년부터 1985년 사이에 IBV 감염이 의심되는 병성감정 사례 중 발육계란에 접종하여 배양한 요막강액 11개 재료에 대해 RT-PCR을 실시한 결과 1980년 맹장 편도를 접종하여 수확한 한 재료(Case No. 80108)와 H120 주 IBV 백신에서 특이적인 산물(281 bp; 프라이머 IBV3/IBV2)이 검출되었으며(Fig 1), 음성 결과를 보인



**Fig 1.** Amplification of part of the nucleocapsid gene (nt135-415) of IBV by RT-PCR. M: Molecular marker (Gene Ruler™ 1Kb marker, MBI Co); lanes 1: 8050, 2: SNU80108, 3: 8426, 4: 8446, 5: 8465, 6: 8490, 7: 8538, 8: 8544, 9: 8548, 10: 8557, 11: 8559, 12: H120.

**Table 2.** Sequence pair distances of 12 strains of IBV

	Nucleotide identity (%)											
	SNU <sup>1</sup>	H120	BEA <sup>2</sup>	KB <sup>3</sup>	Ark99	CU-T2	D1466U	M41	Gray	M85246	N1/62	N1/88
SNU		91.8	91.0	96.3	95.5	95.5	92.7	91.0	94.3	91.4	88.6	63.7
H120	92.9		90.6	92.7	93.1	93.5	91.0	89.0	92.2	98.4	87.3	64.9
BEA	95.2	94.0		90.2	91.9	92.7	92.7	93.5	91.9	90.2	88.6	65.3
KB	96.4	92.9	94.0		95.9	96.7	94.3	91.4	95.1	92.2	90.2	63.7
Ark99	95.2	94.0	94.0	96.4		96.7	93.1	91.0	95.9	92.7	89.4	64.1
CU-T2	94.0	94.0	94.0	95.2	95.2		93.9	92.2	95.9	93.1	91.0	64.5
D1466U	92.9	92.9	94.0	94.0	94.0	94.0		94.7	92.7	90.6	90.6	63.3
M41	92.9	92.9	94.0	92.9	92.9	92.9	94.0		90.2	88.6	86.9	62.4
Gray	91.7	92.9	94.0	94.0	94.0	94.0	92.9	91.7		91.9	89.8	63.7
M85246	90.5	96.4	91.7	91.7	91.7	91.7	91.7	90.5	90.5		86.1	62.4
N1/62	89.3	91.7	92.9	89.3	89.3	91.7	89.3	88.1	91.7	89.3		66.5
N1/88	69.0	72.6	71.4	67.9	69.0	69.0	69.0	67.9	67.9	70.2	69.0	

Amino acid identity (%)

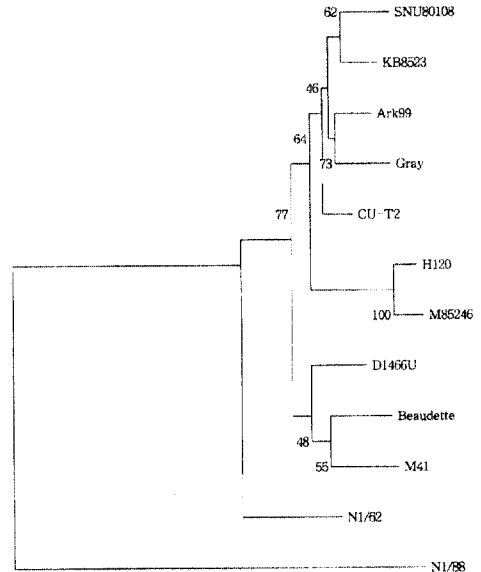
<sup>1</sup>SNU80108, <sup>2</sup>Beaudette, <sup>3</sup>KB8523.

Note: The distances were determined, based on nucleotide sequences from 152-396 (numbering corresponds to that of Bournell *et al*<sup>39</sup>), by using the Clustal program with weighted residue weight table [MegAlign package (Windows version 3.12e); DNASTAR, Madison, Wis.].

나머지 재료에 대해 *nested-PCR*을 수행한 결과 역시 음성을 보여 최종 음성 처리하였다. IBNF 및 IBNR 프라이머를 사용하여 재확인한 결과 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 특이적인 산물을 보여 IBV 양성으로 확인된 요막강액 재료(Case No. 80108)를 IBV-SNU80108 주로 명명하였다.

**염기서열 분석 및 계통 분석**

IBV-SNU80108 및 IBV H120 주의 nucleocapsid 유전자의 염기서열(152-396) 및 아미노산 서열을 결정하여 GenBank에 등록된 바이러스들[GenBank accession no. Beaudette(M28565), KB8523(M21515), Ark99(M85244), CU-T2(U04805), D1466U(X58002), M41(M28566), Gray(S48137), M85246, N1/62(U52596), N1/88(U52599)]과 비교하였다(Table 2, Fig 2). IBV-SNU80108은 염기서열 및 아미노산 서열에서 호주 분리주인 N1/62와 N1/88을 제외하면 모든 바이러스들과 90% 이상의 상동성을 보였으나 1983년 일본에서 분리 보고된 KB8523 주(Sutou 등<sup>36</sup>)와 각각 96.3%와 96.4%로 가장 높은 상동성을 보였다. 또한 Ark99, CU-T2 주와도 염기서열 및 아미노산 서열에서 94.0% 이상의 비교적 높은 상동성을 보였으나 Mass 형 백신주인 H120과는 각각 91.8%와 92.9%로 비교적 상동성이 낮았다(Table 2). 확인된 염기서열을 바탕으로 neighbor-joining 방법으로 분지도(Fig 3)를 작성한 결과 N 유전자 전체 염기서열을 바탕으로 작성한 분지도(결과 제시하지 않음)와 유사하였으며 SNU80108은



Scale: each - is approximately equal to the distance of 0.003169

**Fig 3.** Phylogenetic tree based on the sequences of the part of N gene (152-396) of infectious bronchitis virus. This tree was constructed by the neighbor-joining method. Numbers at branching points are bootstrap values in percentage.

역시 일본 분리주 KB8523과 가장 가까웠고, Ark99, Gray, CU-T2 주와도 진화적으로 높은 관련성을 나타내었다.

18

98

SNU80108	KLG---GPKPPKV	GSAGNASWFQ	AIAKAKLNTP	PPKFEGSGVP	DNENLKTSQQ	HGYWRRQARF	KPSKGGKRPV	PDAWYFYITG	T
H120	....S.....	..L.....	S.....	.....L.....	.....Y..G.....				
Beaudette	.....S.....	.....I.P.....	.....G.....						
KB8523	.....S.....	.....S..L.....							
Ark99	.....S.....	.....SH.....	.....V.....						
CU-T2	.....S.....	.....S..N.....	.....C.....	.....G.....					
D1466U	.....S..V.....	.....S.....	.....A.....	.....H.....	.....G.....				
M41	.....S.....	.....N..I.....	.....S.....	.....T.....	.....G.....				
Gray	.....S.....	.....S..Q.....	.....F.....	.....G.....	.....R.....				
M85246	.....S.....	.....L.....	.....S.....	.....L.....	.....L..Q..G.....	.....S.....			
N1/62	.....S.....	.....P....K..S..	.....Q..N.....	.....I..P.....	.....Y..G.....				
N1/88	..SKNV..A....	..GT.Q....	..SL..E..RTGE	.....S..V..PQF.....	.....K..R..Y..SG.....	.....A.....			
	**	** **** *	** ** *	***** ** *	* ****	** ** *	***** ** *		

**Fig 2.** Amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of the part (152-396) of the N gene of IBV. Gaps(dashes) were introduced to align the sequences. Dots indicate residues identical to IBV-SNU80108. Asterisks indicate residues conserved in all strains.

## 고 찰

국내에서 IBV 분리 동정에 의한 발병보고는 1986년에 처음으로 이루어졌다<sup>19,21</sup>. 본 연구는 1980년부터 1985년 사이에 진단 의뢰된 닭 사례 중 호흡기나 소화기 재료를 발육관에 요막강 경로로 접종하여 배양한 11개 재료를 선정하여 전염성 기관지염 바이러스의 존재 여부를 RT-PCR 방법으로 확인하고자 시도하였다.

본 연구에서 사용한 Falcone *et al*<sup>29</sup>의 N 유전자에 대한 프라이머의 위음성의 가능성을 알아보기 위해 실험에 사용한 프라이머의 염기서열과 GenBank에 등록된 N 유전자의 염기서열을 비교한 결과 IBV1 프라이머의 경우 네덜란드 분리주들과 중간 부분과 3'-말단, 그리고 IBV4의 경우에는 3'-말단 부근에서 mismatch가 있었다. 또한 IBV2와 IBV3의 경우도 primer의 중간에서 염기 한 개에서 두 개까지의 mismatch가 나타나 국내 주가 이들과 유사한 염기서열을 가질 경우 PCR시 증폭 효율이 매우 떨어질 것으로 예상되었다<sup>34,35</sup>. 이러한 가능성을 줄이기 위해 프라이머가 표적 cDNA에 결합하는 온도를 45°C로, DNA 합성이 60°C에서 이루어지도록 PCR 조건을 완화하여 수행하였다. 지금까지 국내 전염성 기관지염 바이러스의 유전형 및 그 다양성이 명확히 알려져 있지 않고, 혈청형과 N 유전자형과의 관련성이 적은 관계로 혈청형에 근거하여 국내 분리 주 모두를 증폭할 수 있는 최적의 프라이머를 예측하는 것은 어려운 것으로 생각되었으며, 혈청형과 상대적으로 높은 관련성을 보이는 S 유전자의 경우에는 그 변이가 매우 심해 일반적인 IBV 검출을 위한 표적 유전자로서는 적합하지 않다<sup>29</sup>. 지금까지 알려진 IBV N 유전자의 염기서열을 비교하여 그 모두를 효율적으로 증폭할 수 있는 새로운 프라이머를 작성하여 PCR을 실행한 결과 본 실험에 사용한 재료의 경우 Falcone *et al*<sup>29</sup>의 프라이머를 사용한 경우와 동일한 결과를 보여주었다.

IBV-SNU80108은 염기서열에서 외국 주와 96.3%에서 63.7%, 아미노산 서열에서 96.4%에서 69%의 상동성을 보였고, SNU80108은 1980년대 초부터 1990년대 중반까지 국내에서 유일하게 사용한 IBV 백신 H120과는 염기서열과 아미노산 서열에서 각각 91.8%와 92.9%의 비교적 낮은 상동성을 보여 백신 바이러스일 가능성은 낮은 것으로 생각되었다. IBV-SNU80108은 1983년에 일본에서 분리된 KB8523과 염기서열 및 아미노산 서열에서 각각 96.3%와 96.4%의 상동성을 보여 가장 밀접한 관계를 보여 지역적인 관련성을 보였다<sup>36</sup>. 호주 분리주인 N1/62와 N1/88을 제외하면 대부분 90% 이상의 상동성을 보여 S 유전자의 S1 부분에서 보이는 1%-40%의 변이율에 비해 상당히 보존되어 있어 두 유전자의 진화 방

식에 차이가 있음을 알 수 있었다<sup>28,37</sup>.

N 유전자의 염기서열 일부를 이용하여 분지도를 그려 본 결과 혈청형과 관계없는 cluster를 형성하였으며, S1 유전자를 이용한 계통분석에서 KB8523과 H120이 가깝게 나타난 것에 비해, N 유전자를 이용한 계통분석에서는 비교적 진화적으로 거리가 있는 것으로 나타나 실험적으로 IBV strains을 혼합 접종한 계태아와 세포주에서 관찰되는 바이러스간 유전자 재조합이 실제로 야외에서도 야외 주와 백신주인 H120 간에 일어나고 있을 것으로 생각되었다<sup>7,38</sup>. 이러한 결과는 S1, S2 또는 M 유전자를 이용해 분지도를 그렸을 때와 N 유전자로 분지도를 그렸을 때 차이를 보였다는 이전의 보고와 일치하였다<sup>28,36</sup>.

## 결 론

1980년부터 1985년 사이에 수집된 요막강액 11개 재료 내 전염성 기관지염 바이러스의 존재 유무를 N 유전자에 대한 RT-PCR 법을 이용하여 확인하고, 증폭 산물의 염기서열을 분석하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 1980년 가검물을 접종하여 얻은 요막강액에서 RT-PCR에 의해 IBV가 검출되어 바이러스 분리 및 동정에 의해 최초로 발병이 보고된 1986년 이전에도 전염성 기관지염이 국내 계군에서 유행하고 있었던 것으로 확인되었다.

2. 이 바이러스(IBV-SNU80108)는 N 유전자의 염기서열에서 외국의 병원성주들 중 일본 분리주인 KB8523과 비교적 높은 상동성을 보여 지리적인 근연성을 보여 주었다.

3. IBV-SNU80108은 국내에서 IBV 생백신이 사용되기 전부터 존재하던 야외주이므로 국내분리 IBV 중 백신 주와 야외 주간의 유전자 재조합 여부를 조사할 경우 대조주로서 사용이 가능하며, 국내 병원성 주의 진화 연구에 중요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Holmes KV. Coronaviridae and their replication. In Fields BD, Knipe DM, ed *Virology*, 2nd ed, Raven press, New York:841-856.
- King DJ, Cavanagh D. Infectious bronchitis. In Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder Jr HW, eds. *Diseases of poultry*. 9th ed Iowa State University Press, Ames, Iowa:471-494.
- Van Roekel H, Clarke MK, Bullis OM, *et al*. Infectious bronchitis. *Am J Vet Res*, 12:140-146, 1951.
- Lai MMC, Baric RS, Makino S, *et al*. Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine

- coronaviruses. *J Virol*, 56:449-456, 1985.
5. Keck JG, Matsushima GK, Makino S, *et al.* In vivo RNA-RNA recombination of coronavirus in mouse brain. *J virol*, 62:1810-1813, 1988.
  6. McIntosh K. Coronaviruses. In Fields BD, Knipe DM, ed *Virology*, 2nd ed, Raven press, New York:857-864.
  7. Cavanagh D, Davis PJ, Cook JKA. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Path*, 21:40-408, 1992.
  8. Schalk AF, Hawn MC. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc*, 78:413-422, 1931.
  9. Purchase HG, Cunningham CH, Burmester BR. Identification and epizootiology of infectious bronchitis in a closed flock. *Avian Dis*, 9:111-120, 1965.
  10. Hopkins SR. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis by the plaque-reduction test. *Avian Dis*, 22:71-81, 1978.
  11. Gelb J Jr, Wolff JB, Moran CA. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis*, 35:82-87, 1991.
  12. Karaca K, Naqi SA, Palukaitis P, *et al.* Serological and molecular characterization of three enteric isolates of infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Dis*, 34:899-904, 1990.
  13. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis*, 37:194-202, 1993.
  14. Cook JKA. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Path*, 13:711-741, 1984.
  15. Picault JP, Drouin P, Guittet M, *et al.* Isolation, characterization and preliminary cross-protection studies with a new pathogenic avian infectious bronchitis virus (strain PL-84084). *Avian Path*, 15:367-383, 1986.
  16. Kusters JG, Niesters HGM, Bleumink-pluym NMC, *et al.* Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. *J Gen Virol*, 68:343-352, 1987.
  17. Jagoda I, Peter M, Lisa G. Antigenic relationship of Australian infectious bronchitis viruses: analysis using polyclonal and monoclonal antibodies. In *Proceedings of the 2nd International Symposium on Infectious Bronchitis*. Rauischholzhausen, Germany. 161-167, 1991.
  18. Doi M, Yamakami T, Koimaru H, *et al.* Serotypes of avian infectious bronchitis virus isolates from field cases in Japan. *Avian Dis*, 26:946-956, 1982.
  19. 유태석. 닭의 전염성 기관지염 바이러스에 관한 연구: 전염성 기관지염 바이러스에 대한 항체분포조사. 대한수의학회지, 8:24-29, 1968.
  20. 김순재, 이영옥, 김선중, 전우상, 박근식. 특정 전염성 병원체에 대한 국내종계의 항체 보유상황. 대한수의학회지, 20:59-64, 1980.
  21. 이영옥, 김재홍, 김재학, 모인필, 윤희정, 최상호, 남궁선. 전염성 기관지염의 국내발생. 대한수의학회지, 26(2):277-282, 1986.
  22. Lukert PD. Infectious bronchitis. In Hitchner SB, Domermuth CH, Purchase HG, Williams JE, ed *Isolation and identification of avian pathogens*, 2nd ed, American Assoc of Avian Pathologist, College station, Texas, 70-72, 1980.
  23. Mockett APA, Cavanagh D, Brown TDK. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. *J Gen Virol*, 65:2281-2286, 1984.
  24. Naqi SA. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Dis*, 34:893-898, 1990.
  25. Wainright PO, Vilegas P, Brugh M, *et al.* Characterization of infectious bronchitis virus using monoclonal antibodies. *Avian Dis*, 33:482-490, 1989.
  26. Song CS, Kim JH, Lee YJ, *et al.* Detection and classification of infectious bronchitis viruses isolated in Korea by dot-immunoblotting assay using monoclonal antibodies. *Avian Dis*, 42:92-100, 1998.
  27. Andreasen JR Jr, Jackwood MW, Hilt DA. Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*, 35:216-220, 1991.
  28. Zwaagstra KA, Zeijst Van Der BAM, Kusters JG. Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. *J Clin Microbiology*, 30:79-84, 1992.
  29. Falcone E, D'Amore E, Trani LD, *et al.* Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 64:125-130, 1997.
  30. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis*, 37:194-202, 1993.
  31. Jackwood MW, Kwon HM, Hilt DA. Infectious bronchitis virus in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Dis*, 36:403-409, 1992.
  32. Kwon HM, Jackwood MW, Brown TP. Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. *Avian Dis*, 37:149-156, 1993.
  33. Kumur S, Tamura K, Masatoshi N. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park, 1993.
  34. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning* 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY:11.47, 1989.
  35. Petruska J, Goodman MF, Boosalis MS, *et al.* Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:6252-6256, 1988.
  36. Sutou S, Sato S, Okabe T, *et al.* Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of avian infectious bronchitis virus. *Virology*, 165:589-595, 1988.

37. Wang L, Junker D, Hock L, *et al.* Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 34:327-338.
38. Kottier SA, Cavanagh D, Britton P. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, 213:569-580, 1995.
39. Bournnell MEG, Binns MM, Foulds IJ *et al.* Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol*, 66:573-580, 1985.