

효소면역법에 의한 소 로타바이러스 항원 검출

안재문·유기조·이용희·이종인
충청북도농축산사업소북부지소

Detection of bovine rotavirus antigen by enzyme linked immunosorbent assay

Jae-Moon Ahn, Ki-jo Yoo, Yong-Hee Lee, Jong-In Lee

Northern branch of Veterinary Service Laboratory, Chungbuk Office
of Agriculture and Livestock

Abstract

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to detect rotavirus antigen in fecal samples using VP6-specific monoclonal antibody(2B12). The ELISA for rotavirus antigen detection found to have specificity to all bovine and porcine rotaviruses tested but not to bovine viral diarrhea virus and bovine coronavirus. The ELISA appeared to have similar sensitivity and specificity compared to fluorescence antibody assay(FA) and electropherotyping (PAGE).

Key words : *ELISA, rotavirus, fecal sample*

서 론

로타바이러스는 Reoviridae에 속하는 바이러스로서 포유류와 조류를 포함한 많은 종류의 어린 동물에서 위장관염을 일으키는 원인으로 밝혀졌다.^{1~4)} 로타바이러스에 의한 신생 송아지의 위장염은 세균과 혼합감염되는 경우가 많으며 로타바이러스 단독으로는 일반적으로 폐사를 일으키지는 않으나 1차 병원체로 작용하여 설사를 일으키

거나 세균감염을 용이하게 한다.⁴⁾ 대부분 로타바이러스 감염은 임상증상이 심하게 나타나지 않으나 병원성 *E. coli*나 다른 바이러스 또는 스트레스에 의해 증상이 심해진다. 사람과 동물의 감염은 감염된 동물이나 오염된 환경에서의 직접적인 경구감염이 주요한 전파 방식이다.⁵⁾ 로타바이러스에 의한 어린 동물의 감염은 심한 설사와 치료의 어려움으로 많은 경제적인 문제를 일으키지만 성숙에서는 무증상감염이 일어나는 경우가 대부분이며 질병을 전파시키는 주요한 원인이 된다.

병리학적인 연구 결과 로타바이러스는 우선 십이지장과 소장 상부의 상피세포를 침입하는 것이 대부분이지만 동물의 폐사를 일으키는 로타바이러스 감염증에서 전체 장에 감염되는 경우도 있다.⁶⁾ 바이러스가 침입되면 용모세포는 일시적으로 표면이 탈락되고 짧아진다. 감염된 상피세포는 빠르게 회복이 되지만 설사증세가 나타난 며칠 이내에 로타바이러스와 이 바이러스에 감염된 세포들이 분변중에 나타나며 위장관 이외의 장기에서 바이러스가 검출된 경우는 아직까지 보고되지 않았다. 로타바이러스의 잠복기는 48~72시간 정도이며 질병의 발현은 구토에 이은 설사로 시작되는데 분변중에는 혈액이나 점액이 섞이지 않으며 질병과 관련한 발열이 나타난다. 바이러스의 증식은 잘 분화되고 효소활동이 왕성한 장세포 용모의 끝부분에서 일어나며 바이러스가 용모의 밑부분이나 crypt cell에서 검출되는 경우는 거의 없다.⁴⁾ 바이러스 증식이 일어나면 장세포는 소화, 흡수기능을 상실하고 소장내에서 탈락되어서 바이러스를 배출한다. 그러면 삼투압 불균형과 흡수장애에 의한 설사가 일어나며 감염된 용모세포는 미성숙 crypt cell로 대체된다. 로타바이러스에 감염된 송아지의 혈청중에는 중화항체가 발견되었으며⁶⁻⁷⁾ 면역이 형성된 동물에서 계속되는 바이러스의 감염과 배출이 일어난다.

소에서 분리되는 로타바이러스는 대부분 Serogroup A에 속하며 최근에 Serogroup C 로타바이러스가 분리된 바 있다.⁸⁾ 그룹A 로타바이러스는 이중나선 RNA(dsRNA)를 가지고 있으며 이것은 11개의 segment로 나뉘어져 있고 여러층의 capsid 막으로 둘러싸여 있다. RNA를 둘러싸고 있는 주요한 외피 단백질에는 VP4, VP6, VP7이 있는데 VP4와 VP7은 각각 중화항체의 생산에 관여하며 이들은 로타바이러스의 혈청형분류에 이용되고⁹⁻¹¹⁾ VP6는 모든 로타바이러스가 가

지고 있는 공통의 그룹항원으로서 로타바이러스 감염증의 진단에 이용된다.¹²⁻¹⁵⁾

로타바이러스의 진단에는 세포배양에 의한 바이러스 분리, 분변 가검물로부터 전자현미경을 통한 관찰, electropherotyping에 의한 RNA분석, 형광항체법등이 시행되고 있으나 세포배양에 의한 로타바이러스의 분리는 많은 시간 과 비용이 소요되며 전자현미경에 의한 바이러스 검출은 특이성이 높지만 sensitivity가 낮으며 특수한 장비가 필요하다. electropherotyping에 의한 RNA 분석은 비교적 간단하고 검출율이 높지만 아직까지 널리 이용되고 있지 않다.¹⁶⁾ 형광항체법에 의한 바이러스 검출은 널리 쓰이는 방법이지만 결과의 판독이 주관적일 수가 있다. 따라서 신속하고 간편하게 바이러스 항원을 검출할 수 있는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

단크론항체는 면역원중 하나의 면역원 결정기(epitope)에 대하여 항체를 생산하는 단세포균의 산물이므로 면역원에 대한 결합력이 동일하고 특이적이다.¹⁷⁾ 이 단크론항체의 특성 및 장점이 바이러스 항원의 분석 및 질병의 치료, 특히 진단에 널리 이용되고 있다.¹⁸⁾ 이 시험에서는 국내 송아지 설사변에서 분리된 로타바이러스에 대한 단크론항체를 생산하여 로타바이러스의 공통항원(VP6)에 특이적인 단크론항체를 선발하여 분변중의 로타바이러스를 검출할 수 있는 신속하고 민감도가 높은 효소면역진단법(capture ELISA)을 개발하여 로타바이러스 RNA 검출법과의 특이성 및 감수성을 비교하여 보았다.

재료 및 방법

• 바이러스

충북대학교 수의과대학에서 분리된 소 로타바이러스 중 V strain을 TF104 cell에 감염시켜

2~3일 후 세포변성효과(CPE)를 나타내면 얼리고 녹이는 과정을 3번 반복하여 세포내 바이러스를 유리시켰다. 이 바이러스가 증식된 배양액을 5,000rpm에서 30분 원심하여 세포를 제거하고 혈청이 들어있지 않은 배지(serum free media : SFM)로 polyethylene glycol(PEG)과 NaCl이 각각 80%와 0.1M이 되도록 첨가하여 4℃에서 하룻밤 동안 진탕하여 바이러스를 침전시키고 다시 PBS로 부유시켜 8,000rpm에서 2시간 원심하여 바이러스 pellet을 PBS로 20ml가 되도록 만들었다. 이것을 반투막에 넣고 PBS로 4℃에서 진탕하면서 투석하였다.

• 단클론항체 생산

Kohler와 Milestein, Saif 등⁴⁾의 방법을 수정하여 세포융합을 실시하였다. 6주령된 암놈 BALB/c 마우스에 위에서 만든 바이러스를 Freund's complete adjuvant와 동량으로 섞어서 0.4ml씩 1차 복강주사하였다. 2차와 3차 접종은 각각 마지막 접종 2주 후에 바이러스를 Freund's incomplete adjuvant와 동량으로 섞은 다음 0.4ml씩 복강주사하였다. 3차 접종 후 마우스의 꼬리에서 채혈하여 로타바이러스에 대한 혈청역가를 FA법으로 검사하여 1:5,000배 이상의 로타바이러스 항체 역가를 나타내는 것을 대상으로 융합전 마지막으로 바이러스 희석액을 0.4ml 정맥주사하였다. 정맥주사후 3일째 되는 날 마우스의 비장을 무균적으로 채취하여 비장세포를 모아 SFM으로 3회 세척하였다. 여기에 미리 준비한 SP2/0 myeloma cell과 1:5로 혼합하여 3회 원심세척한 뒤 PEG/DMSO를 넣어 세포를 융합시켰다. 융합된 세포들을 HAT(hypoxanthine, amonopterin, thymidine) media로 부유시킨 다음 96-well microplate에 well당 200ul씩 분주하여 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 2일 간격

으로 HAT media를 100ul씩 교체하였으며 세포 융합 7일 후 colony가 1/3이상 형성된 well의 배양상층액을 채취한 후 로타바이러스에 대한 항체 생산여부를 FA법과 FFN(Fluorescence focus neutralization test)법을 이용하여 검사하였다. 로타바이러스에 대한 항체를 생산하는 hybridoma limiting dilution법을 3회 이상 실시하여 single clone을 선발하였다. 선발된 항체 생산 hybridoma는 pristane으로 미리 감작시킨 BALB/c 마우스에 접종하여 복수를 생산하였다.

• 단클론 항체의 Isotyping

생산된 단클론항체의 isotype을 결정하기 위하여 monoclonal antibody isotyping kit(Sigma)를 사용하였다. isotype specific한 antibody를 PBS로 1:1,000으로 희석하여 96 well microplate에 50ul씩 넣고 37℃ 1시간 배양하였다. 이것을 PBS-tween20으로 3회 세척하여 coating solution을 제거한 뒤 hybridoma 배양 상층액을 0.1ml씩 넣고 실온에서 1시간 배양하였다. 다시 PBS-tween20으로 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG(Fab specific) peroxidase conjugate를 PBS에 1:600으로 희석하여 0.1ml씩 각 well에 넣었으며 이것을 실온에서 30분 배양한 뒤 3회 세척하고 5-aminosalicylic acid(1mg/ml)와 1% H₂O₂를 기질로 첨가하여 15분 후 발색반응을 관찰하였다.

• 단클론항체의 바이러스단백 특이성 조사

단클론 항체의 로타바이러스 구조단백특이성을 조사하기 위하여 SDS-PAGE 및 Western blotting은 Laemmli와 Moore & Burke의 방법에 따라 reducing condition에서 실시하였다. 정제된 바이러스를 2X sample buffer(0.125M Tris-

Hcl, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.02% bromophenol blue, pH6.8)와 동량 혼합하여 100℃에서 2분간 끓인 후 1.0mm 두께의 5% separating gel에서 20mA로 전기영동하였다. 분리된 바이러스 구조단백질은 transphor electrophoresis unit(Hoefer, TE50)을 이용하여 150mA로 16시간동안 nitrocellulose(NC) paper에 전이시켰다. 이 NC paper는 3% bovine serum albumin (BSA)으로 37℃에서 3시간 blocking후 1:1,000으로 희석한 복수와 37℃에서 1시간 반응시키고 Tween20이 0.05% 함유된 PBS(pH 7.4)로 5분씩 3회 세척하였다. 세척된 NC paper에 phosphatase-labeled goat anti-mouse IgG+A+M를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시키고 같은 방법으로 5분씩 3회 세척 후 BCIP /NBT phosphatase substrate system을 이용하여 단크론항체와 반응하는 BRV의 구조단백질을 확인하였다.

• 고도면역혈청 제조

로타바이러스에 대한 고도면역혈청은 정제된 소 로타바이러스를 토끼에 3회 연속 주사하여 만들었다. 접종전의 토끼 혈청을 채취하여 FFN (Fluorescence focus neutralization test)법으로 소 로타바이러스 항체 음성을 확인하였다. 1차 접종은 바이러스를 Freund's complete adjuvant와 섞어서 접종하였고 2차접종은 바이러스와 Freund's incomplete adjuvant를 섞어서 접종하였으며 3차접종은 PBS(pH 7.4)와 섞어서 접종하였다. 접종은 근육과 피하로 나누어 각각 2군데 이상 접종하였고 접종간격은 2주로 하였다. 마지막 접종후 5일에 토끼의 이정맥을 절개하여 혈액을 채취하였으며 여기서 혈청을 분리하여 -20℃에 보관하며 사용하였다.

• 단크론항체를 이용한 효소면역법에 의한 BRV검출

분변재료는 0.01M PBS(pH 7.4)와 0.05% (v/v)tween20 그리고 0.5%(w/v) bovine serum albumin(BSA)를 함유하는 희석액으로 10배 희석하여 2분동안 진탕한 뒤 4,000rpm에서 20분동안 원심하였으며 이 상층액을 -20℃에 보관하며 사용하였다. 소 로타바이러스 검출을 위하여 간접 항체 sandwich법을 사용하였는데 capture antibody의 희석농도와 conjugate의 최적 희석비율은 교차희석법으로 결정하였다. 96-well microplate에 소 로타바이러스 VP6에 특이적인 항체인 2B12 hybridoma 배양상층액을 coating buffer로 1:5배로 희석하여 100ul씩 넣고 37℃에 1시간 배양한 다음 4℃에 overnight시킨뒤 PBS로 세번 세척하였다. 비특이반응을 제거하기 위하여 1% BSA를 함유하는 blocking 용액으로 well당 200ul씩 넣고 37℃ 2시간 배양하였다. 다시 microplate를 세번 세척하고 위에서 만든 분변 검사재료를 100ul씩 넣어 37℃ 1시간 배양하였는데 양성대조로 소 로타바이러스 분리주 A strain과 V strain 그리고 표준주인 ATCC-NCDV, I-801, B223, OSU, Gottfried strain을 사용하였고 음성대조로 BVDV(Bovine viral diarrhea virus), BCV(Bovine coronavirus)를 사용하였다. 다시 PBS로 세번 세척한 뒤 2차항체로 토끼에서 만든 고도 면역혈청을 1:2,000으로 희석하여 각 well에 100ul씩 넣고 37℃ 1시간 배양하였다. 이것을 다시 PBS로 3회 세척하고 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG 를1:3,000으로 희석하여 각 well에 100ul씩 넣고 37℃ 1시간 배양하였다. 다음에 PBS로 3회 세척한 후 substrate로 pNPP(p-Nitrophenyl phosphate) solution(1μg/ml)을 100ul씩 넣고 실온에서 30분 동안 발색하였으며 100ul의 stop

solution(1M EDTA)을 넣어 반응을 중지시켰다. microplate는 ELISA reader로 450nm에서 판독하였다.

결 과

• 단클론항체의 특성조사

송아지 설사변으로부터 분리한 로타바이러스에

대한 단클론항체를 만들어 이들의 특성을 조사하였다. 소 로타바이러스 국내분리주 V strain(G10)에 대한 단클론항체는 2개가 만들어졌는데 isotype은 IgM(2A11)과 IgG1(2B12)이었으며 단백질 특이성은 모두 VP6로 나타났다. 이들은 중화력이 없었고 형광시험(FA test)에서 10,240이상의 역가를 나타내었다.(표 1)

Table 1. Characterization of monoclonal antibodies against G10 bovine rotavirus(V strain) by isotype, protein specificity and activity

MAbs	Isotype	Protein specificity	Antibody titer	
			FFN	FA
2A11	IgM	VP6	<10	10,240
2B12	IgG1	VP6	<10	20,480

• 단클론항체와 다른 바이러스와의 반응

생산된 단클론항체를 장관내 병원성이 있는 바이러스와 형광항체법으로 반응시켜 본 결과 소 로타바이러스와 돼지 로타바이러스에서 혈청형에

관계없이 모두 반응하였으나 bovine viral diarrhoea virus(BVDV)와 bovine coronavirus(BCV)와는 반응하지 않았다.(표 2)

Table 2. Reactivity pattern of monoclonal antibodies with other enteric viruses by FA test

MAbs	Bovine Rotavirus				Porcine Rotavirus		BVDV	BCV
	A(6)	NCDV(6)	B223(10)	I801(8)	Gott(4)	OSU(5)		
2A11	+	+	+	+	+	+	-	-
2B12	+	+	+	+	+	+	-	-

• 단클론항체를 이용한 ELISA

V strain에 대한 단클론항체중 2B12는 isotype이 IgG1으로서 로타바이러스 공통항원인 VP6에 특이적인 항체로 밝혀졌다. 이 단클론항체를 capture antibody로 하여 분변중의 항원을 검출하는 capture ELISA를 개발하였다. 양성대조로 사

용한 모든 로타바이러스(A strain, ATCC - NCDV, I-801, B223, OSU, Gottfried)는 양성 반응을 나타내었고 음성대조로 사용한 BVDV와 BCV는 음성반응을 나타내었다. ELISA법의 민감도를 다른 로타바이러스 검사법인 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)나 FA법

Table 3. Comparison of ELISA with other detecting methods of rotavirus antigen

Virus	PAGE*	FA	ELISA
1(6)	+	+	+
2(9)	+	+	+
3(8)	+	+	+
4(1)	+	+	+
5(VRI-1)	NT**	+	+
6(VRI-2)	NT	-	-
7(VRI-3)	NT	+	+
8(VRI-4)	NT	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
A	+	+	+
B	+	+	+
Po(C)	-	NT	-
Po(D)	-	NT	-
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
5	-	+	+
6	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
12	+	+	+
15	-	-	+
16	+	+	+
17	+	+	+
No. positive /total No. tested (%)	18 /22(81.8%)	22 /24(87.5%)	23 /26(88.4%)

* PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis, ** NT : not tested

과 비교한 결과 검출율에 있어 PAGE 81.8%, FA 87.5%에 비하여 ELISA방법은 88.4%로서 이들 방법보다 약간 높게 나타났다.(표 3)

고 찰

소 로타바이러스 V strain에 대한 단크론항체

는 2개가 만들어졌는데 이들은 중화력이 없었으며 형광시험에서 모든 로타바이러스와 반응하였다. Roseto등⁶⁾은 로타바이러스에 대한 단크론항체를 생산하여 bovine, human, simian rotavirus와 반응시킨 결과 모두 양성반응을 나타내어 이것을 VP39가 가지는 group antigen이라고 하였는데 V strain에 대한 단크론항체 2개(2A11,

2B12)는 이 group antigen에 대한 단클론항체로 생각된다. 로타바이러스 Subgroup은 6번째 유전자에 의해 만들어진 42K 단백질(VP6)에 의해 구분되며¹⁹⁾ 이 단백질은 내부 구조 단백질로서 바이러스에 많은 양이 존재하여 보체결합반응이나 면역부착 혈구응집반응(IAHA), 면역 방사선법(RIA), 효소면역반응(ELISA)에 의해 쉽게 검출된다. 이러한 42K 단백질의 다양성은 중화특이성을 나타낸다고 생각되었으나 나중의 유전학적인 연구에서 Subgroup 특이성은 중화특이성과는 별개인 것으로 밝혀졌다.²⁰⁾ 최근에는 ELISA가 장내 바이러스 항원의 검출에 널리 쓰이고 있다.²¹⁾ Roseto등⁶⁾은 로타바이러스에 대한 단클론항체를 생산하여 bovine, human, simian rotavirus와 반응시킨 결과 모두 양성반응을 나타내어 이것을 group antigen이라고 하였는데 이 실험에서 만들어진 V strain에 대한 단클론항체 2개(2A11, 2B12)는 이 group antigen에 대한 단클론항체로서 이 단클론항체 중 FA 시험에서 20,480의 높은 역가를 나타내고 isotype이 IgG1인 2B12를 선발하여 ELISA 시험의 coating MAb으로 사용하였다. 2차항체로 마우스 IgG와의 결합에 의한 비특이 반응을 줄이기 위하여 토끼에서 생산된 고도면역혈청을 사용하였는데 conjugate로 사용한 anti-rabbit IgG와 마우스 IgG와의 결합에 의한 비특이 반응은 거의 나타나지 않았다. 이 결과 CPE에서 양성을 나타낸 26개의 분리주중에서 ELISA에 23개의 분리주가 양성반응을 나타내어 88.4%의 검출율을 보였다. Sherrer등²²⁾은 ELISA법으로 분변중의 로타바이러스를 검출하기 위하여 토끼의 로타바이러스 항혈청을 coating하고 2차항체로 소에서 만든 로타바이러스 항혈청을 사용하였으며 conjugate로 anti-bovine IgG를 사용하였다. 이 시험방법으로 분변중의 바이러스검출은 $10^7 \sim 5 \times 10^7$ particles/ml

정도에서 검출이 가능하다고 하였는데 이번에 시험한 ELISA는 10^2 TCID₅₀/ml 정도의 농도에서도 검출이 가능하였다. 전자현미경에 의한 바이러스 검출은 바이러스의 농도가 $10^5 \sim 10^6$ particles/ml 이상이 되어야 하므로²¹⁾ 분변중 바이러스 양이 적을 경우 검출율이 낮은 단점이 있다. 로타바이러스는 장 유향세포에서 증식하여 장세포가 용해된 뒤 바이러스 입자가 장관내로 유리되어 분변중으로 배출되므로 질병의 단계에 따라서 분변으로 배출되는 바이러스의 양이 달라진다. 따라서 로타바이러스의 진단은 배출되는 바이러스의 양에 관계없이 검출할 수 있는 방법이 필요하므로 고가의 장비가 필요한 전자현미경보다 ELISA 방법이 보다 실용적이며 민감도가 높다고 생각되며 이 방법은 바이러스의 진단이나 역학조사에 이용이 될 수가 있을 것이다. 또한 이 검사방법에 의한 ELISA는 소에서 설사증을 일으키는 바이러스인 BVDV나 BCV에 음성반응을 나타내어 특이성이 높음을 알 수 있었다.

결 론

국내 송아지 설사분변에서 분리된 로타바이러스 V strain(G10)에 대하여 단클론항체를 생산하여 이들의 특성조사 및 효소면역진단법(capture ELISA)을 개발한 성적은 다음과 같다.

1. 소 로타바이러스 국내분리주 V strain에 대한 단클론항체 2개(2A11, 2B12)는 중화력이 없었으며 로타바이러스 공통항원인 VP6에 특이적인 것으로 확인되었다.
2. 단클론항체는 FA법에 의하여 다른 소 로타바이러스 및 돼지 로타바이러스와 반응하였으며 BVDV, BCV와는 반응하지 않았다.
3. 단클론항체를 이용하여 분변중의 로타바이러스를 검출할 수 있는 효소면역진단법(capture

ELISA)을 개발하여 로타바이러스 RNA검출법과 한 것으로 나타났다.
의 특이성 및 감수성을 비교한 결과 거의 동등

참 고 문 헌

1. Beards GM, Desselberger U. 1989. Determination of rotavirus serotype-specific antibodies in sera by competitive enhanced enzyme immunoassay. *J Virol Methods*, 24:103~110.
2. Kang SY, Nagaraja KV, Newman JA. 1988. Physical, chemical, and serological characterization of avian rotaviruses. *Avian Diseases*, 32:195~203.
3. Khlen HM, Dimmock SJ. 1982. Identification of a neutralization specific antigen of a calf rotavirus. *J gen Virol*, 62:297~311.
4. Saif LJ, Rosen BI, Kang SY, et al. 1988. Cell culture propagation of rotaviruses. *J Tissue Cult Meth*, 11(3):147~156.
5. Hess GR, Bachmann PA. 1981. Distribution of antibodies to rotavirus in serum and lacteal secretions of naturally infected swine and their suckling pigs. *J Vet Research*, 42:1149~1152.
6. Roseto A, Scherrer R, Cohen J, et al. 1982. Isolation and characterization of anti-rotavirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines. *J gen Virol*, 64:237~240.
7. Besser TE, Gay CC, McGuire TC, et al. 1988. Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. *J Clin Microbiol*, 62(7):22318~2242.
8. Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ. 1992. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by ELISA. *J Clin Microbiol*, 30:2129~2134.
9. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. 1994. VP4 typing of bovine and porcine Group A rotaviruses by PCR. *J Clin Microbiol*, 32:1333~1337.
10. Coulson BS, Fowler KJ, White JR, et al. 1987. Non-neutralizing monoclonal antibodies to a trypsin-sensitive site on the major glycoprotein of rotavirus which discriminate between virus serotypes. *Arch Virol*, 93:199~211.
11. Thouless ME, Beards GM, Flewett TH. 1982. Serotyping and subgrouping of rotavirus strains by the ELISA tests. *Arch Virol*, 73:219~230.
12. Lucchelli A, Kang SY, Jayasekera MK, et al. 1994. A survey of G6 and G10 serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA, unpublished.
13. Santos N, Talty MR, Clark HF, et al. 1994. VP4 genotyping of human rotavirus in the

- United States. *J Clin Microbiol* 32:205~208.
14. Kang SY, Benfield DA, Gorziglia M, et al. 1993. Characterization of the neutralizing epitopes of VP7 of the Gottfried strain of porcine rotavirus. *J Clin Microbiol*, 31:2291~2297.
 15. 장정호, 정정원, 조재진 등. 1994. 소 로타바이러스 및 코로나바이러스 혼합생독백신 개발에 관한 연구. *농시논문집*. 158~171.
 15. Theil KW, Benfield DA, Lopez JW, et al. 1990. Comparison of three bovine group A rotaviruses possessing supershort genome electropherotypes. *J Vet Diagn Invest*, 2:246~248.
 17. 신광순. 1992. 단세포균 항체를 이용한 한탄바이러스 검출용 ELISA법에 대한 연구. *대한미생물학회지*. 27(3):297~305.
 18. Greenberg H, McAuliffe V, Valdesuso J, et al. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect and Immun*, 39(1):91~99.
 19. Jang KO, Parwani AV, Saif LJ. 1995. Use of restriction fragment length polymorphism and sequence analysis to characterize the genetic diversity(genotyping) of field strains of group A bovine rotavirus. Unpublished.
 20. Sonza S, Breschkin AM, Holmes IH. 1982. Derivation of neutralizing monoclonal antibodies against rotavirus. *J Virol*, 45:1143~1146.
 21. Lu W, Osorio FA, Rhodes MB, et al. 1991. A capture-enzyme immunoassay for rapid diagnosis of transmissible gastroenteritis virus. *J Vet Diagn Invest*, 3:119~123.
 22. Scherrer R, Corthier G, L'Haridon R. 1977. ELISA for the detection of rotavirus and rotavirus/antibody complexes in France. 40~48.