

소 Coronavirus 분리에 관한 연구

안재문 · 유기조 · 이종인

충청북도 농축산사업소 북부지소

Isolation of bovine Coronavirus from calves with diarrhea

Jae-Moon Ahn, Ki-Jo Yoo, Jong-In Lee

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

Abstract

Fecal samples were collected from 47 calves with diarrhea and 12 clinically normal co-habitants, and tested for virus using MDBK cell cultures. Three cytopathic viruses were isolated from 8 fecal samples obtained from diarrheic calves. The isolated viruses were neutralized by bovine coronavirus hyperimmune serum in plaque reduction assay and were detected in the cytoplasm of MDBK cell by bovine coronavirus hyperimmune serum using immunofluorescence staining. The viruses agglutinated mouse erythrocytes only among the various animal erythrocytes tested and new isolates were identified as bovine coronavirus.

Key words : Bovine Coronavirus, Calf diarrhea, Virus isolation

서 론

Coronavirus는 1968년 Tyrrell 등¹⁾에 의해 처음 발견되어 형태학적으로 구분되는 하

나의 그룹으로 정해졌으나 50년 동안이나 다른 이름으로 불리어졌다. Coronaviridae에는 하나의 속이 있으며 이것은 척추 동물에 감염을 일으키는 11개의 바이러스로 구성되어

있다²⁾. 바이러스 입자는 107~160nm 정도의 크기를 가지며 envelope에는 11nm의 꽃잎 모양의 돌기를 가지고 있다²⁾. coronavirus는 4개의 주요한 단백질로 구성되어 있는데 transmembrane(M), spike(S), nucleocapsid(N), hemagglutinin-esterase protein(HE)가 있으며 분자량은 120~140kd이며 S와 HE protein은 envelope 표면에 각각 길고 짧은 돌기를 형성하는데 이들 두 단백질은 혈구응집을 일으키며 중화와 관계된 epitope를 가지고 있다³⁾. Genome은 감염성이 있으며 positive polarity를 가지는 single-stranded RNA로 구성되어 있다²⁾.

Coronavirus는 항원성에 따라 크게 avian group과 mammalian group으로 나뉘어 지는데⁴⁾ avian group 에는 infectious bronchitis virus(IBV)와 turkey enteric coronavirus가 있으며, 소 coronavirus는 human coronavirus OC43, mouse hepatitis virus와 함께 mammalian group에 속하며 strain간에 약간의 항원성이나 생물학적 특성의 차이가 있지만 하나의 혈청형으로 구성된다. 또한 이 그룹에 속하는 바이러스들은 N protein을 encoding하는 N mRNA안에 I protein을 encoding하는 또다른 open reading frame(internal ORF)를 공통적으로 가지고 있다. Mammalian group의 다른 subgroup에는 transmissible gastroenteritis virus(TGEV), canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, human coronavirus 229E가 있는데 이들은 BCV와 달리 internal ORF를 가지고 있지 않는 것으로 알려졌다⁵⁾.

소 Coronavirus(BCV)는 생후 3~30일령의 신생 송아지에 심한 설사를 일으켜 탈수와 산성증으로 폐사를 일으키며^{6,7)} 또한 BCV는 장세포와 호흡기 상피세포에서 증식을 하여 장관에서뿐 아니라 상부 호흡기도의 감염을 일으키는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 대부분 송아지에서 감염은 1~3주령에 일어나며 상부 호흡 기도를 통한 지속감염 및 재감염이 일

어난다⁹⁾. 30일령 이상의 송아지는 BCV의 감염에 의하여 혈청중의 항체가 상승한다⁹⁾.

그런데 rotavirus나 respiratory syncytial virus 또는 parainfluenza virus type 3 (PI-3)에 감염되어 이들 항체가 존재할 때는 coronavirus의 항체반응이 저하된다는 보고가 있다¹⁰⁾. Benfield 등¹¹⁾은 winter dysentery에 감염된 송아지의 설사분변에서 coronavirus particle를 발견하였고, 이 바이러스를 송아지에 인공감염 시킨 결과 설사증세가 나타났으며, 이 설사분변에서 coronavirus를 분리하였다고 보고하였다. 여러 연구자들^{2,6,7,8,11)}이 BCV를 분리하기 위하여 organ culture(bovine trachea, bovine embryonic lung cell 등)와 cell culture를 실시하였는데, 소 신장유래세포주인 MDBK와 human rectal tumor cell(HRT-18)에서 분리가 잘 되는 것으로 보고하였다. 또 BCV를 분리하기 위해서는 배지중에 단백분해효소(trypsin, chymotrypsin, pancreatin)를 첨가해 줄 경우 분리가 잘 된다고 보고하였다¹¹⁾. 국내에서도 BCV가 송아지의 설사증에 주요한 원인체로 보고된 바가 있으며^{12,13)}, 배양세포를 이용하여 coronavirus를 분리하였다¹³⁾. 소 코로나바이러스 감염증의 진단에는 전자현미경에 의한 바이러스 관찰, 세포배양에 의한 바이러스 분리, 장세포 절편의 형광염색, ELISA에 의한 바이러스 항원증명, RT-PCR을 이용한 RNA 검출 등이 이용되고 있다¹²⁻¹⁵⁾.

이 실험에서는 설사증세를 나타내는 송아지의 분변으로부터 coronavirus를 MDBK 세포주를 이용하여 분리하였으며 분리된 바이러스의 특성을 plaque reduction assay와 형광항체법, 혈구응집법으로 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료 : 우리 사업소에 병성감정 의뢰된 송아지 분변 가검물과 양축농가에서 사육하고 있는 1개월 미만 송아지에서 설사증세

를 나타내는 소를 대상으로 분변 가검물 47건을 채취하였고, 이들과 동거하고 있는 건강한 송아지에서도 분변가검물을 12건 채취하여 모두 59건의 가검물을 시험재료로 하였다.

분변 가검물은 Eagle's minimum essential medium(EMEM)으로 10배 희석하여 3,000 rpm에서 10분 동안 원심하여 상층액을 0.45 μ m 시린지 필터로 여과하여 -20°C 에 보관하며 사용하였다.

ELISA 검사 : 분변가검물에 대한 coronavirus와 rotavirus의 존재여부를 간접 항체 sandwich ELISA 법으로 검사하였다. 96-well ELISA plate에 coronavirus와 rotavirus에 대한 단클론항체를 coating buffer(pH 9.6)로 1:10으로 희석하여 100 μ g씩 넣고 37°C 에서 1시간 배양한 다음 4°C 에서 overnight 시킨 뒤 PBS로 3회 세척하였다. 비특이반응을 제거하기 위하여 1% bovine serum albumin(BSA)를 각 well에 200 μ l 씩 넣고 37°C 에서 2시간 배양하였다. 다시 microplate를 3회 세척하고 희석한 분변 검사재료를 100 μ l 씩 넣어 37°C 에서 1시간 배양하였다. 2차항체로는 토끼와 기니피에서 각각의 바이러스를 접종하여 만든 고도 면역혈청을 사용하였는데 이것을 1:2,000으로 희석하여 각 well에 100 μ l 씩 넣고 37°C 에서 1시간 배양하였다. conjugate는 peroxidase conjugated anti-rabbit IgG 또는 anti-guinea pig IgG를 사용하였고 substrate로 ABTS를 사용하였다. ELISA reader로 450nm에서 판독하여 양성인 나타나는 가검물을 바이러스 분리재료로 사용하였다.

세포배양 : 소 신장유래 세포주인 MDBK cell을 10% fetal calf serum이 첨가된 EMEM으로 배양하였으며 여기에는 0.15% sodium bicarbonate와 80 μ g/ml의 gentamicin을 첨가하여 사용하였다. 바이러스 접종 후의 유지배지로는 fetal calf serum이 첨가되지 않은 EMEM을 사용하였다.

바이러스 분리 : 세포배양 플라스크(25cm²)에 단층배양된 MDBK cell을 혈청이 첨가되

지 않은 EMEM (SFM)으로 3회 세척하고 각각의 플라스크에 바이러스 분리재료를 0.1ml 씩 접종한 후 37°C 에서 60분 동안 바이러스를 흡착시켰다. 다음에 다시 SFM으로 1회 세척하고 각각의 플라스크에 EMEM을 5ml씩 넣어 CO_2 incubator에서 배양하였다. 일부는 바이러스의 증식을 촉진하기 위하여 EMEM에 trypsin을 2.5 μ g/ml의 농도로 첨가하였다.

이때 바이러스를 접종하지 않은 세포를 대조군으로 삼았으며 가검재료 접종 후 4~5일에 세포변성(cytopathic effect : CPE)여부를 관찰하였으며 세포변성이 일어나지 않는 플라스크는 다시 blind passage를 실시하였다. 세포변성이 나타나는 것은 3회 이상 plaque를 형성시켜 바이러스를 순수 분리하였고 이것은 plaque reduction test나 hemagglutination(HA) test를 실시하여 coronavirus임을 확인하였다.

항혈청 생산 : 수의과학연구소에서 분양받은 BCV Kakegawa strain을 MDBK cell에 배양하여 배양상층액을 polyethylene glycol(PEG)침전법으로 침전한 뒤 투석막으로 하루밤동안 투석하여 바이러스를 농축시켰다.

접종전의 토끼 혈청을 채취하여 plaque reduction test로 소 coronavirus 항체 음성임을 확인하였다. 1차 접종은 바이러스를 Freund's complete adjuvant와 섞어서 접종하였고 2차와 3차 접종은 바이러스와 Freund's incomplete adjuvant를 섞어서 접종하였다.

접종은 근육과 피하로 나누어 각각 8군데 이상 접종하였고 접종간격은 2주로 하였다.

마지막 접종후 7일에 토끼의 이정맥을 절개하여 혈액을 채취하였으며 혈청을 분리하여 -20°C 에 보관하며 사용하였다.

간접형광항체법 : 배양세포에서 coronavirus가 증식되는지 확인하기 위하여 가검물 접종후 3~4일된 플라스크의 세포를 cell scraper로 모아서 슬라이드글라스 위에 80% acetone으로 고정시켰다. 여기에 BCV 항혈청을 PBS로 1,000배 희석하여 슬라이드글라스 위

에 덮은 다음 37°C에서 1시간 반응시켰다.

다음에 PBS로 3회 세척하고 FITC conjugated anti-rabbit IgG를 넣어 37°C에서 1시간 동안 형광염색하였으며 PBS로 3회 세척한 뒤 mounting buffer를 넣고 형광현미경으로 관찰하였다.

바이러스 역가측정 및 중화시험 : 바이러스 역가측정을 위하여 바이러스를 10배 계단 희석한 후 96-well microplate에 100 μ l 씩 넣고 세포부유액(1×10^5 /ml)을 각 well에 100 μ l 씩 넣어 37°C에 3일간 배양하면서 CPE를 관찰하였다. 바이러스의 역가는 median tissue culture infective dose(TCID₅₀/ml)로 나타내었다. 바이러스 중화시험은 plaque reduction test를 사용하였다. 먼저 토끼에서 만든 coronavirus 항혈청을 2배 계단 희석하여 동량의 바이러스(200 TCID₅₀/ml)를 섞어 37°C에서 60분 반응시킨 다음 MDBK cell이 배양된 24-well plate에 각각의 희석배수당 4 well씩 100 μ l 의 양으로 접종한 다음 37°C에서 60분 반응시키고 흡착되지 않은 바이러스를 제거하기 위하여 EMEM으로 2회 세척한 다음 primary agar overlay를 넣고 plate를 뒤집어서 37°C에서 48시간 배양하였다. 여기에 5% neutral red가 첨가된 stain agar overlay를 넣고 37°C에서 4시간 반응시킨 후 plaque를 계산하여 대조군보다 80%이상 plaque가 감소된 well을 양성으로 판정하였다.

혈구응집시험 : MDBK cell에 배양된 바이러스의 상층액을 사람 O형, 소, 면양, 마우스, 기니픽, 토끼 혈액을 사용하여 혈구응집시험을 실시하였다. 먼저 바이러스 배양액을 0.2% gelatin이 함유된 PBS(pH7.4)로 2배 계단희석하여 96-well microplate에 50 μ l 씩 넣고 여기에 0.5% 혈구액을 동량 섞어 4°C에서 4시간 반응시킨 다음 혈구응집여부를 관찰하였다.

결 과

바이러스 분리 : 47건의 송아지 설사분변 가검물중에서 ELISA검사 결과 8개는 coronavirus 양성으로 나타났고 7개는 rotavirus 양성으로 나타났다. 임상증상을 나타내지 않는 가검물 12개중에서도 1개가 coronavirus 양성으로 나타났다. 이중에서 1개는 coronavirus와 rotavirus 모두 양성반응을 나타내어 혼합 감염된 것으로 나타났다. coronavirus에 대하여 ELISA 양성인 9개의 sample에서 coronavirus의 분리를 시도한 결과 3개의 세포변성을 나타내는 바이러스가 분리되었다(Table 1).

임상증상을 나타내지 않는 분변가검물에서는 coronavirus가 분리되지 않았다. MDBK cell에 가검재료를 접종한 후 6회 계대까지는 CPE가 나타나지 않았으나 blind passage를 계속한 결과 7회 계대배양이후에는 CPE가 나타나기 시작하였다. 배지중에 trypsin을 2.5 μ g/ml의 농도로 첨가해 준 것은 trypsin을 첨가해주지 않은 것보다 CPE가 빨리 나타났다. CPE의 형태는 감염된 세포들이 종창되고 커졌으며 이 세포들은 융합되어 거대세포(syncytia)를 형성하였다. 바이러스에 감염된 세포들은 세포질내에 산발적으로 공포를 형성하였으며 이렇게 CPE가 나타난 것은 8~10회까지 계속 계대배양을 하였다. 이때에는 세포들이 배양용기로부터 탈락되어 배지중에 부유된 상태이었다.

Table 1. Isolation of BCV from feces of 47 diarrheic and 12 normal calves in MDBK cell cultures

Calves	ELISA		BCV isolated
	coronavirus	rotavirus	
Diarrheic(n=47)	8	7	3
Normal(n=12)	1	0	0
Total(n=59)	9	7	3

형광항체검사 : 바이러스 배양세포에 대한 형광항체검사 결과 감염된 세포의 세포질에서 특이적인 형광이 나타났다. 형광은 세포질에서 나타났으며 어떤 세포는 작은 형광소체들이 세포질에서 집단으로 나타나기도 하였다(Fig 1). 형광은 하나의 세포로 구성되었

으며 형광세포는 전체세포의 20%정도를 차지하고 있었다. 형광이 나타난 가검물은 계속 blind passage를 실시하였을 때 세포변성이 나타났으며 형광이 나타나지 않은 것은 blind passage를 8회 이상 실시하여도 세포변성이 나타나지 않았다.

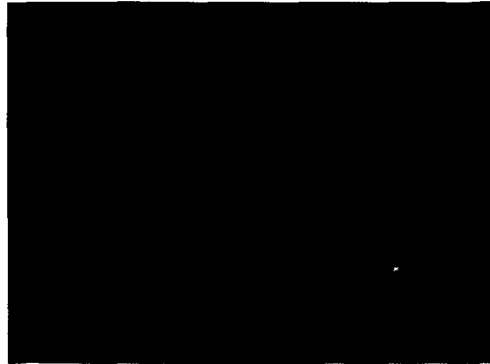


Fig 1. Immunofluorescence of MDBK cells 4 days after inoculation with the 96034 isolate of bovine coronavirus. The fluorescence was restricted to the cytoplasm

바이러스 역가 및 중화시험 : 세포배양에서 CPE를 나타낸 소 coronavirus 분리주의 역가를 TCID₅₀/ml로 측정하여 본 결과 1×10^{4.8}에서 1×10^{5.2} TCID₅₀/ml로 나타났다(Table 2). 바이러스의 역가는 형광세포의 출현 비율과 비례하였으며 plaque reduction test와 HA test의 결과와 비슷하게 나타났다. 바이러스의 역가는 계대배양 횟수가 증가할수록 높게 나타났으며 8회 이상 계대하였을 때 1×10⁵TCID₅₀/ml 이상으로 나타났다. 분리된 바이러스는 BCV Kakegawa strain의 항혈청으로 중화시킨 후 plaque reduction test를

실시한 결과 분리주 모두 중화능을 가지고 있었다(Table 2).

Plaque는 지름 1~2mm정도의 원형이었으며 stain overlay로 염색하였을 때 주변의 세포와 달리 neutral red에 염색되지 않았다.

혈구응집시험 : MDBK cell에 배양한 소 coronavirus 분리주에 대한 혈구응집능의 숙주 특이성을 여러가지 혈구로 시험한 결과 마우스 혈구만이 응집반응을 나타내었고 사람, 소, 염소, 마우스, 기니픽, 토끼 등의 적혈구에서는 혈구응집이 일어나지 않았다. 마우스 혈구의 응집역가는 32~64로 나타났다.

Table 2. Characterization of bovine coronavirus fecal isolates from calves with diarrhea

BCV isolates	Plaque reduction test	Infectivity titer log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	% fluorescent cells	Hemagglutination test(HA titer)
95215	256	5.2	40	64
96034	64	4.8	20	32
96148	128	5.0	30	64

Table 4. Hemagglutinating activity of the bovine coronavirus isolates from the calves with diarrhea to various mammalian erythrocytes

Source of erythrocyte	Bovine coronavirus isolates		
	95215	96034	96148
Human-O	<2	<2	<2
Cattle	<2	<2	<2
Goat	<2	<2	<2
Mouse	64	32	64
Guinea-pig	<2	<2	<2
Rabbit	<2	<2	<2

고 찰

Mebus 등¹⁶⁾은 1973년에 처음으로 송아지 설사변에서 초대 배양된 소 신장세포를 이용하여 coronavirus like agent를 분리하였으며 이 바이러스는 CPE를 형성하였고 이 세포에서 잘 증식이 되었다. Takahashi 등¹⁷⁾도 초대배양한 소 신장세포를 이용하여 BCV의 kakegawa strain을 배양하였는데 바이러스 접종 후 8대 배양이후에서 CPE가 나타났다. Inaba 등¹⁸⁾은 BEK-1 cell line을 이용하여 BCV를 배양하였는데 CPE는 배양 후 3일에 세포가 원형으로 되고 융합을 일으키며 단층으로부터 분리되는 형태로 나타났고 이때의 바이러스 역가는 $10^4 \sim 10^6$ TCID₅₀/ml 정도이었다.

Hirano 등¹⁹⁾은 BEK-1 cell line으로 plaque assay를 실시하였는데 바이러스를 90분간 흡착시키고 48시간동안 배양하였을 때 neutral red의 염색없어도 볼 수 있는 plaque가 형성되었다고 보고하였다. Dea 등⁴⁾은 Vero cell, MDBK, PK-15를 이용하여 BCV의 Mebus strain을 분리 및 증식시키는 것이 가능하다고 보고하였다. 이 시험에서는 MDBK cell을 사용하여 bovine coronavirus를 분리하였는데 여기에서 분리된 바이러스는 다른 연구자들의 실험에서 나타난 CPE 형태와 같이 세

포의 원형화, 세포융합, 세포탈락등이 나타났다. CPE는 7회 이상 blind passage를 하였을 때 나타났는데 이것은 바이러스가 배양세포에 적응하는데 소요되는 기간으로서 Takahashi 등¹⁷⁾의 결과와 비슷하였다. Laporte 등²⁰⁾은 야외에서 분리된 BCV를 primary calf kidney(PCK) cell에 배양하였는데 CPE는 나타나지 않았으나 감염 8~12일 후 특이적인 형광반응을 나타내었다. 이들은 PCK에 적응된 바이러스들은 bovine skin cell, bovine lung cell, MDBK, K3 pig kidney cell line에서 증식이 됨을 확인하였다. 본 실험에서도 CPE가 나타나지 않은 세포를 간접형광항체법으로 형광염색한 결과 세포질내에서 특이적인 형광이 나타났는데 이는 Laporte 등²⁰⁾의 결과와 일치하였다. 형광이 나타난 가검재료는 계속 blind passage를 실시한 결과 7~8대 배양에서 CPE를 나타내었고 이들 세포를 형광염색 하였을 때도 마찬가지로 특이적인 형광이 나타났다(Fig 1).

Saif 등²⁾은 trypsin이 BCV의 Mebus strain이 증식하는데 중요한 역할을 한다고 하였고 Benfield 등¹¹⁾은 trypsin을 포함한 단백분해 효소(trypsin, chymotrypsin, pancreatin)가 coronavirus의 증식을 돕는다고 하였으며 coronavirus에 공통적으로 나타나는 CPE 형태

인 polykaryon은 배지중의 단백분해효소가 존재할 때 나타난다고 하였다. Hirano 등¹⁹⁾은 trypsin을 바이러스 회석액과 배지중에 5 µg/ml의 비율로 첨가해 주었을 때 plaque의 크기와 숫자가 증가하였다고 보고하였다. 바이러스와 세포간의 상호작용에서 trypsin의 역할은 아직 밝혀지지 않았으나 trypsin처리된 세포의 receptor를 노출시켜서 바이러스의 부착을 도와 주거나 바이러스 envelope의 단백질 구조를 변화시켜 세포의 receptor와 잘 부착될 수 있도록 하는 것으로 생각된다. 한편 trypsin이 세포에서 생산되는 viral inhibitor를 파괴시켜 바이러스의 증식을 돕는 것으로 추정하고 있다²⁾. 이 실험에서 배지중에 trypsin을 2.5 µg/ml의 농도로 첨가해 준 것은 trypsin을 첨가하지 않은 것보다 CPE가 빨리 나타났으며 바이러스의 역가도 높게 나타났다.

BCV는 초유를 먹지않은 송아지를 이용하여 대량으로 증식시킬 수가 있으며 포유동물인 마우스의 뇌에 BCV를 접종하면 신경증상을 일으켜서 죽게 된다⁶⁾. Saif 등²⁾은 BCV 야외 분리주를 primary bovine kidney와 vero cell에서 분리할 수 있다고 하였으며 BEK-1, vero, MDBK, PK-15, BEL, HRT-18 세포주를 이용하여 TCID₅₀를 구할 수 있고 BEK-1, MDBK, BFT, HRT-18 세포주를 이용하여 plaque assay를 할 수 있다고 하였다. 본 실험에서는 MDBK cell을 이용하여 bovine coronavirus 야외주를 분리하였으며 TCID₅₀, plaque assay 등을 실시하였다. MDBK cell을 이용하여 TCID₅₀를 구할 때는 trypsin의 첨가 유무에 관계없이 결과에 큰 차이가 없었으나 plaque assay에서는 trypsin을 첨가한 것에서 눈으로 식별할 수 있는 plaque가 형성되었는데 이에 따라 plaque assay를 할 때에는 배지중에 단백분해효소를 반드시 첨가해 주어야 좋은 결과를 얻을 수 있다는 것을 확인하였다.

손 등¹³⁾은 국내에서 사육중인 소에서 코로나바이러스에 대한 항체를 조사한 결과 19

88년에 93.5%, 1989년에 96.0%, 1990년에 82.6 %가 양성을 나타내어 우리나라에 코로나바이러스의 감염이 상당히 만연되어 있는 것을 밝혔으며 이들 설사변에서 MDBK cell을 이용하여 3주의 coronavirus를 분리한 바가 있다.

따라서 우리나라도 북미, 유럽, 일본등에서 발생되고 있는 코로나바이러스 감염증^{6, 8, 20)}과 같이 소 사육농가에 어린 송아지의 설사증 원인으로 중요한 부분을 차지하고 있는 것으로 생각된다.

Tsunemitsu 등⁸⁾은 코로나바이러스가 설사변뿐만 아니라 임상적으로 증상을 나타내지 않는 성우의 비강 분비물에서도 분리되었다고 하였으며 Reynolds 등²¹⁾은 비강에서 분리된 BCV와 설사변에서 분리된 BCV 간에는 혈청학적인 차이가 존재하지 않는다고 하였다. Tsunemitsu 등⁸⁾은 코로나바이러스의 조직친화성이 상부 호흡기와 장관에 있다고 하였으며 비강에 있는 코로나바이러스가 병원성이 있는지는 확실하지 않다고 하였다. McNulty 등¹⁵⁾은 호흡기도에서 분리된 BCV는 실험적으로 감염을 일으켰을 때 약한 호흡기 증상을 일으킨다고 보고하였다. 비강에서 코로나바이러스가 분리된 것으로 보아 BCV의 장관내 감염은 경구 감염과 함께 비말감염도 일어날 수 있다는 점을 시사해준다⁸⁾.

본 실험에서 분리된 3주의 바이러스는 모두 BCV Kakegawa strain의 항혈청에 의해 중화가 되었는데 이들이 Kakegawa strain과 혈청형이 일치하는지는 아직 확실하지 않으며 이들 바이러스의 혈청형 조사를 위해서는 BCV의 다른 strain과 교차중화시험을 하여야 한다. 또한 이들 바이러스의 병원성에 관하여는 계속 실험을 하여야 할 것으로 생각되며 설사변에서 코로나바이러스의 검출율이 낮은 것은 분변중의 바이러스 양과 항체에 영향을 받는 것으로 생각된다. Benfield 등¹¹⁾은 분변 가검물로부터 coronavirus를 분리하기 위하여는 분변중에 바이러스가 많은 양이

존재하여야 하며 또한 분변중의 coronavirus는 항체와 결합된 형태로 존재하기 때문에 바이러스의 분리가 잘 되지 않는다고 하였다. 이외에도 바이러스의 분리는 배양세포의 종류 및 바이러스와 세포간의 친화성등에 많은 영향을 받는 것으로 생각된다. coronavirus에 대한 ELISA에 양성을 나타낸 가검물에서도 바이러스가 분리되지 않은 경우가 있었는데 이는 야외 바이러스가 배양세포주에 잘 적응하지 못하기 때문인 것으로 생각된다. 배양세포에서 분리되지 않는 바이러스의 검출을 위해서는 전자현미경, ELISA, 형광항체법, RT-PCR 등에 의해서 검출이 가능하다^{14, 21, 22}.

결 론

송아지 설사변으로부터 소 coronavirus를 분리하기 위한 실험을 한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 송아지 설사변 47개로부터 coronavirus ELISA 시험을 한 결과 8개에서 양성으로 나타났다.

2. ELISA 양성인 8개의 가검물로부터 MD-BK cell을 사용하여 바이러스 분리시험을 한 결과 세포변성을 나타내는 3주의 coronavirus를 분리하였다.

3. 분리된 3주의 바이러스는 plaque reduction test, 간접형광항체법 및 혈구응집반응에 의해 coronavirus로 확인되었다.

4. 분리된 바이러스로 동물 적혈구에 대한 응집시험을 실시한 결과 마우스 혈구만이 응집되었다.

참 고 문 헌

1. Tyrrel DA, Almeida J, Berry J. 1968. Coronavirus. *Nature*. 220 : 650.
 2. Saif LJ, Heckert RA, Miller KL et al. 1988. Cell culture propagation of bovine co-

ronavirus. *J Tiss Cult Method* 11 : 139-145.
 3. Heckert RA, Saif LJ, Mengel JP, et al. 1991. Isotype-specific antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in serum, feces, and mucosal secretions from experimentally challenge-exposed colostrum deprived calves. *Am J Vet Res* 52 : 692- 699.
 4. Dea S, Verbeek AJ, Tijssen P. 1990. Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. *J Virol* 64 : 3112-3118.
 5. Senanayake SD, Hofman MA, Maki JL, et al. 1992. The nucleocapsid protein gene of bovine coronavirus is bicistronic. *J Virol* 66 : 5277-5283.
 6. Saif LJ, Redman DR, Moorhead PD, et al. 1986. Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am J Vet Res* 47 : 1426-1432.
 7. Stair EL, Rhodes MS, White RG, et al. 1972. Neonatal calf diarrhea : purification and electron microscopy of a coronavirus-like agent. *Am J Vet Res* 33 : 1147-1156.
 8. Tsunemitsu H, Yonemichi H, Hirai T, et al. 1991. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. *J Vet Med Sci* 53 : 433-437.
 9. Heckert RA, Saif LJ, Myers GW, et al. 1991. Epidemiologic factors and isotype-specific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. *Am J Vet Res* 52 : 845-851.
 10. Heckert RA, Saif LJ, Myers GW. 1991.

- Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in naturally infected dairy calves. *Am J Vet Res* 52 : 852-867.
11. Benfield DA, Saif LJ. 1990. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J Clin Microbiol* 28 : 1454-1457.
 12. 윤용덕, 박남용, 강문일 등. 1991. 소 코로나바이러스 감염증의 병리학적 연구. 시험연구보고서. 159-163.
 13. 손성완, 장정호, 박봉균 등. 1991. 소 코로나바이러스 감염증 발생조사. 시험연구보고서. 111-112.
 14. 안수환, 송재영, 현방훈 등. 1994. 소 코로나바이러스 유전자진단법 개발연구. 농사시험연구보고서. 224-223.
 15. McNulty MS, Bryson DG, Allan GM, et al. 1984. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Vet Microbiol* 9 : 425-434.
 16. Mebus CA, Stair EL, Rhodes MS, et al. 1973. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation and characteristics of a coronavirus-like agent. *Am J Vet Res* 34 : 145-150.
 17. Takahashi E, Inaba Y, Sato K, et al. 1980. Epizootic diarrhea of adult cattle associated with a coronavirus-like agent. *Vet Microbiol* 5 : 151-154.
 18. Inaba Y, Sato K, Kurogi H, et al. 1976. Replication of bovine coronavirus in cell line BEK-1 culture. *Arch Virol* 50 : 339-342.
 19. Hirano N, Sada Y, Tuchiya K, et al. 1985. Plaque assay of bovine coronavirus in BEK-1 cells. *Jpn J Vet Sci* 47 : 679-681.
 20. Laporte J, L'Haridon R, Bobulesco P. 1979. In vitro culture of bovine enteric coronavirus(BEC). *L'INSERM* 90 : 99-102.
 21. Reynolds DJ, Chasey D, Scott AC, et al. 1984. Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine feces. *Vet Rec* 114 : 397-401.
 22. Crouch CF, Raybould TJ, Acres SD. 1984. Monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine enteric coronavirus. *J Clin Microbiol* 19 : 388-393.