

보행실조증 자돈의 뇌조직에서 돼지 호흡기 코로나바이러스의 분리

권창희 · 한명국 · 이재길 · 황의경 · 강영배 · 이광원*

수의과학연구소
국립종축원*
(1996년 8월 19일 접수)

Isolation of porcine respiratory coronavirus from pig showing ataxia

Chang-hee Kweon, Myung-guk Han, Jae-gil Lee, Eui-kyung Hwang,
Yung-bai Kang, Kwang-won Lee*

National Veterinary Research Institute, Anyang, Korea
*National Animal Breeding Institute, Sunghwan, Korea**

(Received Aug 19, 1997)

Abstract : A cytopathogenic virus was isolated from the brain tissues of pig showing ataxia. The biophysical, morphological and serological assay showed that the isolate belongs to a coronavirus. The differential identification of the isolate with monoclonal antibodies against A and X sites of transmissible gastroenteritis virus indicated that the virus has a characteristics of porcine respiratory coronavirus. The RT-PCR on nucleocapsid region of TGEV also showed that the isolate has the same conserved sequence.

The diverse pathogenesis of PRCV and its implication in field were discussed.

Key words : porcine respiratory virus, ataxia, isolation, characterization.

서 론

돼지 호흡기 코로나바이러스(porcine respiratory coronavirus; PRCV)는 Coronaviridae에 속하는 바이러스로 1983년 벨기에에서 처음으로 발생이 보고된 이후 영국, 프랑스, 네덜란드, 독일 등을 비롯한 유럽 전역에서 감염이 확인되었으며 1990년에는 미국에서도 발생이 확인되었다¹⁻³.

현재까지의 연구결과 PRCV는 돼지전염성 위장염바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV)의 변이주로 추정되어지고 있으며 장관내에서 증식하는 전염성 위장염바이러스와는 다르게 호흡기 장기에 증식하여 발열, 식욕상실, 일시적 체중감소 및 간질성 폐렴 등의 호흡기 장애를 유발한다⁴⁻¹¹.

PRCV는 TGEV와 혈청학적으로 교차하며 실제 RNA 구조가 거의 동일하여 기존의 진단법에 의한 감별이 매우 어려운 실정이다⁵⁻⁸.

Address reprint requests to Dr. Chang-Hee Kweon, National Veterinary Research Institute, Rural Development Administration, Anyang, 430-016, Republic of Korea.

본 연구는 보행실조증상(ataxia)을 나타낸 자돈에서 분리한 바이러스가 PRCV로 확인되었으므로 이에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

세포 : 초대 돼지 신장세포(primary porcine kidney cell; PPKC) 및 고환세포(primary porcine testicle cell; PPTC)는 건강한 3-4주령 자돈의 장기를 채취하여 2.5% trypsin으로 소화시킨 다음 α -MEM(GibcoBRL, USA) 배지에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 항생제(GibcoBRL, USA)를 첨가하여 배양하였다. 분리한 바이러스를 계대 증식시키기 위한 세포로서 돼지 고환세포주(swine testicle line cell; STL)도 사용하였으며 5% FBS가 함유된 α -MEM으로 증식시킨 후 바이러스를 접종한 다음에는 2-3% FBS를 첨가하여 유지하였다.

바이러스의 분리 및 크로닝 : 보행실조증을 보이는 6주령 자돈의 뇌로부터 바이러스를 분리하였다(Fig 1). 즉, 가검 자돈의 뇌를 무균적으로 채취하여 인산완충염수(phosphate buffered saline; PBS)로 10% 유제액을 만든 다음 2500rpm으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리

후 상층액을 채취하여 10^{-1} - 10^{-6} 까지 10배 계단희석한 후 PPKC나 PPTC에 접종하였다.

접종후 세포변성효과(cytopathic effect; CPE)를 나타낸 세포를 선정하여 3회 동결용해시킨 다음 상층액을 PPKC에 접종한 후 1%의 Sea Plaque Agarose(FMC, USA)를 세포에 도포하고 4-5일 후 0.1% neutral red로 염색하여 plaque를 채취하였다. 크로닝된 바이러스는 PPKC 및 PPTC에 접종한 다음 CPE를 관찰하면서 계대하였으며 계대한 바이러스는 -70°C 에 보관하였다.

분리 바이러스의 이화학적 특성시험 : 바이러스의 물리화학적 성상은 바이러스 배양 상층액을 chloroform, pH 3.0, pH 8.0 및 60°C 에서 30분간 각각 처리한 다음 단계별 회석재료를 96 well(Greiner, USA) 세포배양 용기에 배양된 PPKC와 STL에 접종한 다음 37°C , 5% CO_2 농도 조건에서 유지하였다. 혈구응집반응(hemagglutination test; HA)과 마우스 뇌내접종(intracerebral inoculation; IC), 바이러스의 형태학적 동정은 Kweon 등¹²이 보고한 방법에 준하여 실시하였다.

분리바이러스의 비중은 바이러스 농축액을 15-35%의 potassium tartarate density gradient 상층부위에 적하하여 22,000rpm(Beckman, 28Ti)에서 22시간 동안 원심분리한



Fig 1. Piglet showing ataxia.

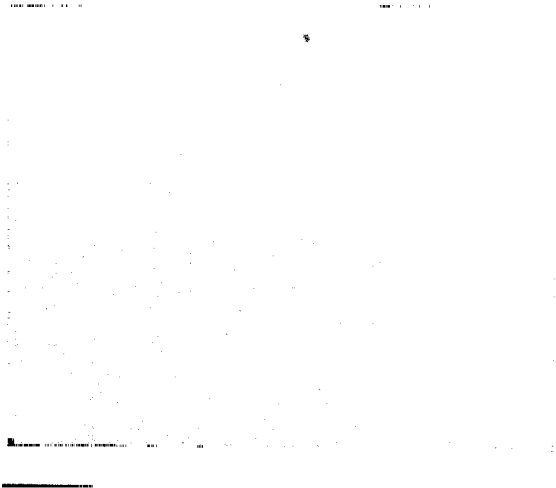


Fig 2. Cytopathic effect of the isolate in primary porcine testicle and kidney cells.

a : Control testicle cells, b : Infected testicle cells. c : Control kidney cells and d : Infected kidney cells, respectively.

후 각각의 fraction을 채취한 후 회석하여 PPTC에 접종한 다음 CPE를 측정하였다.

바이러스의 동정 : 바이러스의 동정시험은 PPK와 PPST를 cover slip에 배양하여 분리바이러스를 접종한 후 일본뇌염바이러스(Japanese encephalitis virus; JEV), 돼지 콜레라바이러스(Hog cholera virus; HCV), 오제스키병 바이러스(Aujeszkys disease virus; ADV)에 대한 항체들을 이용하여 간접형광항체(Indirect immunofluorescence assay; IFA) 방법으로 검사하였으며 TGEV에 대한 단클론 항체는 네덜란드 수의과학연구소(ID-DLO)의 Dr. Nieuwstadt로부터 분양받은 항체 MAb 57.16, MAb 57.22 및 MAb 57.110과 미국 미네소타대학 Dr. Molitor로부터 분양받은

MAb PSGS-1, MAb P6G4 및 MAb 5A5 항체를 이용하였다.^{6,13,14}

PRCV와 TGEV의 감별시험은 분양받은 단클론항체를 이용하여 IFA와 효소면역법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 실시하였다.

이 실험에서 표준 TGEV는 강 등^{15,16}이 수의과학연구소에서 분리보고한 평택주를 사용하였으며 P/N ratio를 산정하기 위한 대조항체로서 JEV에 대한 단클론항체인 MAb C-1-60을 이용 권 등¹⁷이 보고하였던 ELISA 방법에 준하여 동일한 조건에서 실험한 다음 MAb C-1-60에 대한 absorbance치를 음성치로한 P/N ratio를 산정하였다.

분리주에 대한 항혈청은 정제한 바이러스를 Freund's

complete adjuvant와 동량혼합하여 두마리의 guinea pig에 근육내로 접종하였으며 1차접종 3주 후에 다시 바이러스와 동량의 Freund's incomplete adjuvant를 혼합하여 2차 근육접종하였고 2차접종이 끝난 3주 후에 정제한 바이러스만을 접종하여 3주 후 채취한 혈청을 실험에 사용하였다.

분리주의 유전자 증폭(Rreverse transcription polymerase chain reaction : RT-PCR)및 염기서열 분석 : 바이러스의 유전자 추출은 바이러스 농축액에 Ultraspec III(Biotecx, USA)를 이용하여 추출하였으며 TGEV의 nucleocapsid에 대한 primer(18 mer, 5'-TTAGTTCGTTACCTCATC-3')를 작성한 다음 cDNA를 합성하였다^{18,19}. RT-PCR은 TGEV의 nucleocapsid에 대한 2차 primer(20 mer, 5'-TGGAAGAGAACTGCAGGTAA-3')를 첨가하여 중합증폭시킨 후 pUC19 vector에 크로닝하였다. 크로닝한 유전자는 Kweon 등²⁰이 보고하였던 방법으로 유전자 염기서열을 분석하였다.

결 과

Ataxia증을 일으킨 자돈으로부터 바이러스의 분리 및 이화학적 성상 : Ataxia증 자돈의 뇌를 유제한 가검재료를 PPKC 및 PPTC에 접종하였던 바 접종 4~5일 후부터 CPE를 나타내었다(Fig 2). CPE를 나타낸 세포의 상층액을 이용하여 바이러스를 크로닝한 다음 이화학적 성상을 조사하였던 바 Table 1에서 보는 바와 같이 chloroform, 60℃ 및 pH 3.0의 조건에서 감염가의 저하를 나타내었다. 그러나 pH 8.0에서는 pH 3.0에 비하여 약한 감염가의 저하를 나타내었고 혈구응집능과 마우스에서의 병원성은 관찰할 수 없었다.

Table 1. Biophysical characteristics of isolated virus

| Titer (TCID ₅₀ /ml) | Treatment | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|--------------|------|
| | pH 3.0 | pH 8.0 | 60℃ | chloroform | HA activity* | IC** |
| 10 ^{5.0} | 10 ^{1.0} | 10 ^{4.0} | 10 ⁰ | 10 ^{1.0} | <2 | - |

*Hemmagglutinating activities on guinea pig or chicken red blood cells.

**Intracerebral inoculation into suckling mice.

특히 chloroform 처리시 바이러스가 감수성을 나타내었으므로 분리바이러스가 envelope를 갖는 것으로 추정되었다. 실제 정제항원을 이용 전자현미경으로 검사하



Fig 3. Electron microscopy of the isolates. Bar represents 100nm.

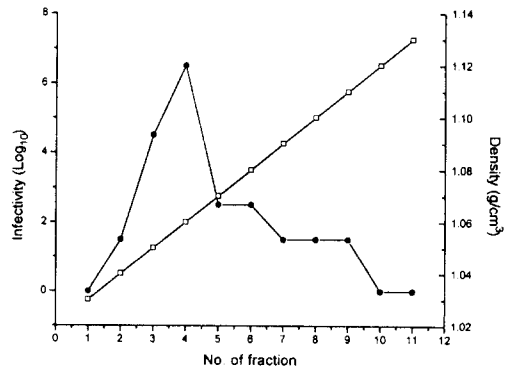


Fig 4. Purification profile of isolate in density gradient.

였던 바 100~150nm 크기의 coronavirus의 특징을 관찰할 수 있었다(Fig 3). 또한 바이러스 시료를 density gradient 상에서 각기 다른 fraction별로 채취하여 PPTC에 접종하였던 바 분리 바이러스의 비중은 1.06g/cm³에서 최대 감염가를 나타내었다(Fig 4).

단크론항체를 이용한 분리바이러스의 동정 : 분리 바이러스를 PPTC에 접종한 다음 JEV, HCV, ADV 및 TGEV에 대한 단크론항체를 이용 IFA로 검사하였던 바 JEV, HCV 및 ADV에 대해서는 반응을 나타내지 않은 반면 TGEV 단크론항체에 양성반응을 나타내었다(Table 2).

Table 2. Differential diagnosis of cytopathic virus using monoclonal antibodies

| | IFA* | | | |
|--|------|------|------|-------|
| | JEV# | HCV† | ADV‡ | TGEV¶ |
| | - | - | - | + |

*Immunofluorescence antibody assay using monoclonal antibodies against JEV, ADV, HCV and TGEV, respectively.

#JEV : Japanese encephalitis virus.

†HCV : Hog cholera virus.

‡ADV : Aujeszky's disease virus.

¶TGEV : Transmissible gastroenteritis virus.

그러나 TGEV의 단클론항체를 이용 ELISA로 검사시 Fig 5 및 6에서 나타난 바와 같이 단클론항체의 특성에 따라 차이를 나타내었다. 즉 TGEV에 대한 ELISA 반응시 검사에 사용된 단클론항체 모두 1.5~3.0에 달하는 P/

N ratio를 나타낸 반면 분리주에 대한 ELISA 반응시에는 MAb PSGS-1, MAb P6G4 및 MAb 5A5에서는 2.0 이상의 P/N ratio를 나타내었으나 MAb 57.110과 MAb 57.22는 P/N ratio가 1.0 미만으로 반응하지 않았고 MAb 57.16의 경우 P/N ratio는 1.1~1.5로 매우 낮았다. 그러나 분리주를

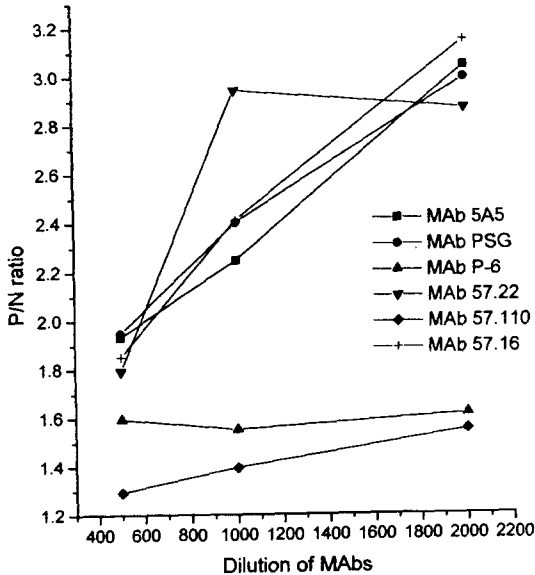


Fig 5. Comparison of ELISA with monoclonal antibodies using TGEV(Pyung-tak strain) antigen.

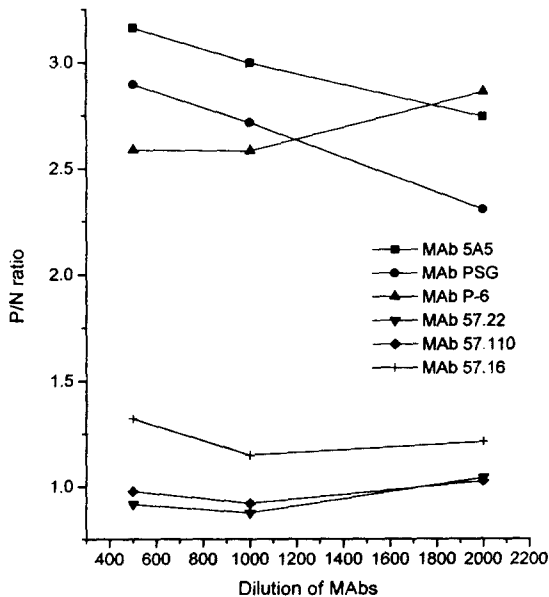


Fig. 6. Comparison of ELISA with monoclonal antibodies using isolate.

Table 3. Indirect immunofluorescence assay of isolate against TGEV monoclonal antibodies

| IFA titer* | | | | Antibody | SN titer on TGEV** |
|------------|-----------|------------|----------|---------------------------|--------------------|
| MAb 57.16 | MAb 57.22 | MAb 57.110 | MAb P6G4 | | |
| 800 | <200 | <200 | 800 | Immunized guinea pig sera | 32~64 |

*Tested on primary swine testicle cells inoculated with isolate.
**200 TCID₅₀/ml of TGEV (Pyung-tak strain).

a

b

Fig 7. Immunofluorescence of the isolate with monoclonal antibody 57.16(a) and P6G4(b).

A

| | | | |
|---------|------|--|------|
| TGEV | 746 | TGGAAGAGAACTGCAGGTAAAGGTGATGTGACAAGATTTTATGGAGCTAGAAG | 798 |
| Isolate | | TGGAAGAGAACTGCAGGTAAAGGTGATGTGACAAGATTCTATGGA [↓] ACT [↓] CGAAG | |
| TGEV | 799 | CAGTTCAGCCAATTTTGGTGACAGTGACCTCGTTGCCAATGGGAGCAGTGCCAA | 852 |
| Isolate | | CAGTTCAGCCAATTTTGGTGACAGTGACCTT [↓] GTTGCCAATGGGAGCAGTGCTAA | |
| TGEV | 853 | GCATTACCCACAATTGGCTGAATGTGTTCCATCTGTGTCTAGCATT [↓] TTGTTTGG | 906 |
| Isolate | | GCATTACCCACAATTGGCC [↓] GAGTGTGTTCCATCTGTGTCTAGCATT [↓] TTGTTTGG | |
| TGEV | 907 | AGCTATTGGACTTCAAAGGAAGATGGCGACCAGATAGAAGTCACGTTACACAC | 961 |
| Isolate | | AGCTATTGGACTTCAAAGGAAGATGGCGACCAGATAGAAGTCACGTTACACAC | |
| TGEV | 962 | AAATACCACTTGCCAAAGGATGATCCTAAAAC [↓] TGAACAATTCCTTCAGCAGATT | 1015 |
| Isolate | | AAATACCACTTGCCAAAGGATGATCCTAAAAC [↓] TGAACAATTCCTTCAGCAGATT | |
| TGEV | 1016 | AATGCCTATGCTCGTCCATCAGAAGTGGCAAAGAACAGAGAAAAAGAAAATCT | 1069 |
| Isolate | | AATGCCTATGCTCGCCATCAGAAGTGGCAAAGAACAGAGAAAAAGAAAATCT | |
| TGEV | 1070 | CGTTCTAAATCTGCAGAAAGGTCAGAGCAAGAGGTGGTACCTGATGCATTAATA | 1123 |
| Isolate | | CGTTCTAAATCTGCAGAAAGGTCAGAGCAAGAGGT [↓] GTACCTGATTC [↓] ACTAATA | |
| TGEV | 1124 | GAAAATTATACAGATGTGTTTGATGACACACAGGTTGAGATGATTGATGAGGT | 1176 |
| Isolate | | GAAAATTATACA [↓] AATGTGTTTGATGACACACAGGTTGAGATGATTGATGAGGT | |
| TGEV | 1177 | AACGAACTAA | 1186 |
| Isolate | | AACGAACTAA | |

B

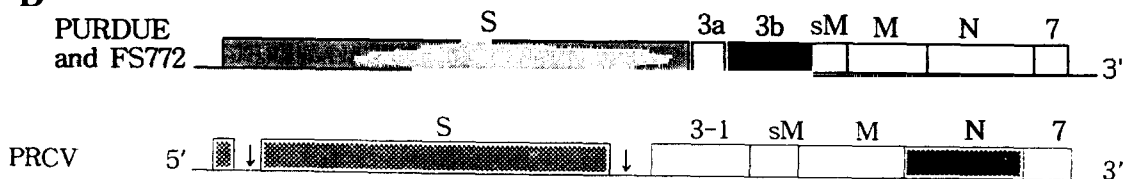


Fig 8. A : Comparison of the nucleotide sequences of the nucleocapsid region(N) of TGEV(upper) and isolate. The nucleotide sequences of the nucleocapsid region(N) of TGEV are based on the information of virulent TGEV strain FS772 by Britton *et al*¹⁸.

B : The genome organization of TGEV and PRCV based by Rasschaert *et al*. Differences of the nucleotide sequence and deletion are arrow indicated.

PPTC에 접종한 다음 MAb 57.16, MAb 57.22, MAb 57.110과 MAb P6G4를 IFA로 검사하였던 바 Table 3, Fig 7에서와 같이 MAb 57.16는 MAb P6G4의 경우와 같이 양성반응을 나타내었다.

또한 정제된 바이러스를 guinea pig에 면역시킨 후 채취한 혈청을 이용하여 TGEV와 분리주에 대한 혈청학적 중화항체를 검사하였던 바 모두 32배의 항체를 검출할 수 있었다.

분리주의 유전자 확인시험 : 분리주가 TGEV와 혈청학적으로 교차하는 PRCV 계통으로 확인되었으므로 TGEV의 nucleocapsid에 대응하는 primer를 이용하여 분리주의 유전자 일부에 대하여 염기서열분석을 실시하였다. 즉, RT-PCR 방법으로 유전자를 증폭시킨 후 크로닝하여 염기서열을 분석하였던 바 TGEV의 nucleocapsid 염기서열과 97.3% 일치하는 것으로 판명되었다(Fig. 8).

고 찰

PRCV는 TGEV와 거의 동일한 코로나 바이러스로서 TGEV가 소화기 장해를 일으키는데 반하여 폐, 기관지나 인후두부의 호흡기 계통의 기관에서 주로 증식하는 특징을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다¹⁴. 현재까지 분리 보고된 수종에 달하는 PRCV주의 유전적 특징은 Fig 8에서 요약된 바와 같이 TGEV의 외부 당단백항원(Spike protein)의 N-terminal 단백질이 621개 내지 672개까지 결손되었으며 그 외 비구조단백질(Nonstructural protein)의 일부 유전자가 결손된 것으로 보고되어 있다^{1,9,21}.

그러나 PRCV의 병원성에 관하여서는 인공접종시 경증의 호흡기증상에서 치사성폐렴(fatal pneumonia)까지 매우 다양하며 이와 같은 차원에서 야외감염시 피해는 정확하게 규명되어 있지 않은 실정이다^{2,3,4,9,21}. 실제 PRCV가 공기를 통한 전파가 가능하다는 역학적 특징은 이 바이러스가 농장내 감염시 만성적으로 존재할 수 있다는 점에서 TGEV와는 상이한 질병의 발생빈도를 나타내는 것으로서 확인되어 있다. 그러므로 PRCV 감염증은 돼지 호흡기 및 생식기 증후군(porcine respiratory reproductive syndrome) 바이러스나 기타 호흡기계통의 병원성세균, 마이코플라스마 등의 여러 호흡기 장해를 유발하는 세균병인체와 복합감염시 PRCV의 단독 감염시보다 더욱 심각한 호흡기 증상을 일으킬 수 있는 가능성을 내포하고 있다. 반면 PRCV 감염에 의해 돼지 in-

fluenza 바이러스의 생체내 증식을 억제한다는 결과도 보고되어 있다²¹.

실제 본 연구에서 분리된 바이러스의 경우 TGEV의 외부 당단백항원의 N-terminal 단백질 부위(X site)에 대응하는 단크론항체인 MAb 57.110과 MAb 57.22를 사용하였을 때 분리주와 반응하지 않은 반면 공통항원부위(A site)에 해당되는 항체로 보고된 MAb 57.16의 경우 ELISA 및 IFA에서 교차하였다는 사실은 van Nieuwstadt 등의 보고결과와 일치하고 있으며 분리주가 PRCV의 일종이라는 사실을 입증하고 있다^{5,6,8,23}. 또한 TGEV의 nucleocapsid에 해당되는 부위를 선정하여 RT-PCR 방법으로 분리주의 유전자를 분석한 결과 역시 TGEV와 동일한 유전적 특징을 나타내었다.

그러나 ataxia를 나타내는 자돈의 뇌에서 분리된 바이러스가 PRCV로 동정되었다는 사실은 현재까지 보고되어 있지 않다는 점에서 PRCV의 다양한 병원성의 결과라고도 추정된다²⁴. 그러므로 본 연구결과 확인된 PRCV주의 병원성 및 유전자 분석은 추후 지속적인 연구가 필요한 흥미로운 과제라 생각된다.

결 론

보행실조증상을 나타내는 자돈의 뇌조직으로부터 바이러스를 분리하여 이화학적, 형태학적 성상을 조사하였던 바 coronavirus로 판명되었다.

분리된 바이러스는 초대 돼지 고환세포나 신장세포에서 세포변성효과를 나타내었으며 돼지전염성 위장염바이러스의 A나 X부위에 대응하는 단크론항체를 이용한 분석결과, 돼지호흡기 코로나바이러스의 특징을 나타내었다. 돼지전염성 위장염바이러스 nucleocapsid 유전자 내부의 primer 작성하여 RT-PCR을 이용, 분리주의 유전자를 확인하였던 바, 돼지전염성 위장염바이러스의 염기서열과 97.3%의 일치율을 나타내었다.

이상의 결과로서 본 연구에서 확인된 PRCV주의 병원성은 추후 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

Acknowledgement : We express our deepest appreciation to Dr. van Nieuwstadt in IL-DLO(Netherlands) and Dr. T. Molitor for their valuable MABs for the differential identification of PRCV. We also thank Park Jung Won at National Veterinary Research Institute(Anyang, Korea) for his earnest support for electron microscopy.

참고 문헌

1. Laude H, Van Reeth K, Pensaert M. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Vet Res*, 24:125-150, 1993.
2. van Nieuwstadt AP, Pol JMA. Isolation of a TGE virus-related respiratory coronavirus causing fatal pneumonia in pigs. *Vet Rec*, 124:43-44, 1989.
3. O'Toole D, Brown I, Bridges A, et al. Pathogenicity of experimental infection with 'pneumotropic' porcine coronavirus. *Res Vet Sci*, 47:23-29, 1989.
4. van Nieuwstadt AP, Zetstra T, Boonstra J. Infection with porcine respiratory coronavirus does not fully protect pigs against intestinal transmissible gastroenteritis virus. *Vet Rec*, 125:58-60, 1989.
5. Garwes DJ, Stewart F, Cartwright SF, et al. Differentiation of porcine coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. *Vet Rec*, 122:86-87, 1988.
6. van Nieuwstadt AP, Boonstra J. Comparison of the antibody response to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus, using monoclonal antibodies to antigenic sites A and X of the glycoprotein. *Am J Vet Res*, 53(2):184-190, 1992.
7. Patrick GH, Paul PS, Vaughn EM et al. Experimental reproduction of pneumonia in gnotobiotic pigs with porcine respiratory coronavirus isolate AR310. *J Vet Diagn Invest*, 5:184-188, 1993.
8. Callebaut P, Correa I, Pensaert M, et al. Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J gen Virol*, 69:1725-1730, 1988.
9. Rasschaert D, Duarte M, Laude H. Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J gen Virol*, 71: 2599-2607, 1990.
10. Cox E, Hooyberghs J, Pensaert MB. Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Res Vet Sci*, 48: 165-169, 1990.
11. Kamogawa O, Tomita Y, Kaneko M, et al. Isolation of porcine respiratory coronavirus from pigs affected with porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Med Sci*, 58:385-388, 1996.
12. Kweon CH, Kwon BJ, Lee HJ, et al. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Korea. *Korean J Vet Res*, 34:77-83, 1994.
13. 권창희, 안수환, 김용희 등. 돼지 가성광견병에 대한 연구. 1. 돼지 가성광견병바이러스에 대한 단크론항체 작성. *농시논문집(L & V)*, 28:71-76, 1986.
14. 권창희, 안수환, 김용희 등. 단크론항체 이용 일본뇌염 신속진단. *농시논문집(L & V)*, 28:53-59, 1986.
15. 강병직, 최창수, 주한수 등. 돼지 전염성 위장염 생독백신에 관한 연구. I. 돼지 전염성 위장염바이러스 분리. *농시보고*, 23:115-119, 1981.
16. 강병직, 최창수, 주한수 등. 돼지 전염성 위장염 생독백신에 관한 연구, II. 분리바이러스(평택주)의 조직배양순화주 작출시험. *농시보고*, 23:120-124, 1981.
17. Kweon CH, Kwon BJ, Kang YB, et al. Cell adaptation of KPEDV-9 and serological survey on porcine epidemic diarrhea virus(PEDV) infection in Korea. *Korean J Vet Res*, 34(2):321-326, 1994.
18. Britton P, Carmenes RS, Page KW et al. Sequence of the nucleoprotein gene from a virulent british field isolate of transmissible gastroenteritis virus and its expression in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 2:89-99, 1988.
19. Kapke PA, Brian DA. Sequence analysis of the porcine transmissible gastroenteritis virus coronavirus nucleocapsidprotein gene. *Virology*, 151:41-49, 1986.
20. Kweon CH, Kee YJ, Yoon YD, et al. Molecular cloning and comparison of envelope(E2) gene of bovine diarrhea virus. *RDA J Agri Sci(Korea)*, 36:597-606, 1994.
21. Vaughn EM, Halbur PG, Paul PS. Sequence comparison of Porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. *J Virol*, 69:3176-3184, 1995.
22. van Reeth K, Pensaert MB. Porcine respiratory coronavirus-mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *Am J*

Vet Res, 55:1275-1281, 1994.

23. Simkins RA, Weilnu PA, Van Cott J, *et al.* Competition ELISA, using monoclonal antibodies to the transmissible gastroenteritis virus(TGEV) S protein, for serologic differentiation of pigs infected with TGEV or porcine respiratory coronavirus. *Am J Vet*

Res, 54:254-259, 1993.

24. Ahn K, Chae C, Kweon CH. Immunohistochemical identification of porcine respiratory coronavirus antigen in the lung of conventional pigs. *Vet Pathol*, 34: 167~169, 1997.
-