

음성대조 염색법을 이용한 설사 한우송아지 분변내 바이러스양 입자 검색

임종수, 강춘원, 이태욱, 김내영, 정용운*, 강문일*, 한동운*, 최현성*, 이채용*

전남축산기술연구소, 전남대학교 수의과대학 수의학과*

Detection of viral-like particles in feces of Korean indigenous calves with diarrhea by negative staining

Jong-Su Lim, Chun-Won Kang, Tae-Uk Lee, Nae-Young Kim, Yong-Wun Jeong*, Mun-Il Kang*, Dong-Un Han*, Hyon-Sung Choi*, Chai-Yong Lee*

*Chonnam Province Livestock Research Institute · College of Veterinary Medicine,
Chonnam National University*

Abstract

Presently, viral isolation in the diarrheal feces can be reached by many tools such as fluorescent antibody test(FA), negative contrast electron microscopy(NCEM), virus neutralization test, cell culture, and so on. The purpose of the study was to aimed at the establishment of simplified NCEM technique which can be efficiently applied for diarrheal feces and also the understanding on prevalence of viral-induced diarrhea in calves.

One hundred forty-seven korean indigenous calves with diarrhea were examined to their feces by the modified NCEM. Among them, 98(66.7%) were confirmed to have one or more viruses in feces. The viruses detected were identified as rotavirus(33.3%), coronavirus(16.3%), togavirus(10.2%) and herpesvirus(0.7%). Ten cases of combined viral infection were consisted of 8 with rotavirus+coronavirus, one with rotavirus+togavirus and one with rotavirus+herpesvirus. Diarrheal types could classified by yello-wish watery(44.9%), blood-tinged(19.7%), white watery(17.7%), brownish watery(14.3%), greenish watery(3.4%) diarrhea, respectively. Yello-wish watery diarrhea(66cases) was frequently included rotavirus(31.8%), coronavirus(15.2%), and togavirus(13.6%), respectively.

Consequently, these results suggest that the modified NCEM is reliable and efficient diagnostic tool for detection of viruses in the diarrheal feces and many calves rearing in Chonnam province have been exposed to some enteric viral agents mainly including rotavirus and coronavirus.

Key words : Viral diarrhea, Negative staining, Korean indigenous calf, Rotavirus.

서 론

송아지의 분변 상태는 정상적인 소화기능은 물론 다양한 장염 유발을 직·간접적으로 나타내는 중요한 진단 지표가 될 수 있다. 따라서 분변의 병리소견이 질병의 감별진단에 중요한 가치를 지니고 있다¹⁾. 분변에서 가장 쉽게 관찰되는 이상 소견인 설사는 병원성 미생물, 사육환경 및 숙주인 송아지 자체 등 세 요소의 상호 연관성아래 발생하며²⁾ 다양한 원인에 의해 일어나는 임상 증상의 한 증후군으로, 송아지 폐사의 가장 중요한 원인중 하나로써³⁾ 이것의 경제적인 중요성은 우군의 관리체계나 경영형태에 따라 많은 차이가 있으나 그 피해는 매우 크다고 할 수 있다. 국내의 한 연구에 의하면 전체 송아지의 97.6%에서 설사증이 발생하며 이중 대부분이 포유기간중에 1회 이상 설사가 발생했다고 한다²⁾.

지금까지 국내외의 조사에 의하면 송아지 설사의 가장 중요한 원인체로 주로 어린 송아지의 경우 로타바이러스, 코로나바이러스, 소바이러스성 설사바이러스, 장독혈성 *E. coli* 등을 보고하고 있다^{2,4-6)}. 이외에 송아지의 장관내 감염성을 지닌 바이러스들로는 파보바이러스를 비롯하여 아데노바이러스, 아스트로바이러스, 엔테로바이러스, 칼리시바이러스, 그리고 브레다바이러스 등이 알려져 있다^{2,4,5,9-12)}.

송아지에 바이러스성 장염 발생시 바이러스마다 다소 사용범위의 차이는 있으나 현재 응용 가능한 진단법으로는 바이러스의 분리법, 형광항체법, 중화항체법, 면역조직화학법, 음성 대조 전자현미경법, 혈구응집 억제반응, ELISA, 면역전기영동법, solid phase장치, 혈액흡수-용출 응집분석법, 보체결합법, plaque환원법, 중합연쇄반응법, *in situ* hybridization 등이 보고되고 있다^{3-8,10-26)}.

그러나 이러한 많은 진단법들은 바이러스의 종류와 양, 검사재료, 구비시설 및 장비, 진단능력 등 여러 가지 조건에 따라 진단율에 큰 차이를 나타낸다. 최근의 바이러스성 설사질환의 진단법으로는 세포배양을 통한 바이러스분리, ELISA, 형광항체법, 음성대조 전자현미경법

등이 주로 이용되고 있다. 음성대조 전자현미경법은 시료채취가 간편하고 검사방법이 간편하고 소요시간이 상대적으로 짧으며 바이러스 검사영역이 넓어 많은 가검물을 검사하는데 적합한 진단법으로 알려져 있다.

따라서 이 연구에서는 설사를 보이는 한우 송아지들의 설사분변을 채취하여 음성 대조 전자현미경법의 활용성을 평가해 보고, 더불어 최근 문제시되는 송아지 설사유발 바이러스의 종류와 감염동향을 파악하는데 목적을 두었다.

재료 및 방법

검사재료

검사재료는 전남 지역내에서 설사를 보이는 생후 1일에서 6개월령 사이의 한우의 송아지로부터 분변을 채취하였다. 검사 대상 송아지는 품종, 연령, 성별, 설사의 특징, 설사의 경과일수 등을 기록한 후 분변을 직장으로부터 채취하여 멸균된 분변채취용기에 보관하였다. 분변은 채취 후 4℃에 유지하여 실험실로 운반한 다음 세균분리를 시도한 후 -70℃에서 보관하면서 음성대조 전자현미경법을 실시하였다. 채취 후 1주일 이내에 실험하기 어려운 경우에는 냉동고(-20℃)에 보관한 후 실험실로 운반하여 실험하였다.

세균분리 및 동정

검사분변을 5% 면양혈액배지에 도말하고 37℃에서 24시간 배양한 다음, Gram 염색성을 확인 하였고, KPI 20E(Biometrix)로 생화학검사를 실시하여 동정하였다.

분변처리

설사 분변 1~2g을 PBS(pH 7.4) 1ml에 잘 혼합하여 3,000rpm에 10분간 원심분리하였다. 이 혼합액의 상층액중 800μl를 시험관에 옮긴 다음 앞과 같은 조건으로 1회 원심분리한 후 상층액 600μl를 PBS(pH 7.4) 20ml가 들어

있는 초원심분리용 용기(70Ti)에 분주하고 31, 200rpm에서 3시간동안 초고속 원심분리(900-XL, Beckman)하였다.

음성 대조염색

Copper grid(400 mesh)를 amyl-acetate내 2% colloidion용액으로 코팅한 후 silicagel blue가 들어있는 건조기에 넣어 사용전까지 진공상태에서 보관하였다. 초고속 원심분리 후 용기내의 액체를 제거하고 PBS(pH 7.4) 1 ml를 넣어서 조심스럽게 용기의 밑부분을 세척하여 바이러스를 수집하였다. 수집된 액체 10 μ l를 grid위에 얹고 3분 후에 여과지로 grid위의 수분을 일정수준까지 제거하였다. 그 후 2% phosphotungstic acid (PTA) 10 μ l를 넣어 10분간 염색한 후 여과지로 grid위의 수분을 일정량 제거한 다음 37 $^{\circ}$ C에 1시간 동안 정치한 후 진공상태의 건조기내에 보관하면서 검경하였다.

투과전자현미경 관찰

위의 과정을 거친 grid를 투과전자현미경(JEM-2000 FX II, Jeol)을 이용하여 가속전압 80 kV 아래에서 검경하였다. 먼저 저배율에서 가장 선명한 구획을 찾아 2~3구획에서 주로 10만배로 관찰하였다.

결 과

설사변내 세균분리

10두의 설사분변에서 세균분리를 실시한 결과, *E. coli*와 *Salmonella* sp가 7두와 3두의 설사변에서 각각 분리되었다. 이 분변을 음성대조 전자현미경법으로 검사한 결과 모두 로타바이러스가 분리되었다.

설사변내 바이러스의 동정

총 147개의 설사분변중 바이러스가 확인된 것은 전체의 66.7% (98두)였으며, 이중 로타바이러스(33.3%)와 코로나바이러스(16.3%)가

주로 검출되었고, 토가바이러스는 10.2% (15 case)에서 검출되었다. 로타바이러스와 코로나바이러스가 동시검색된 것은 5.5%이었다(Table 1).

Table 1. Detection of viral-like particles in the feces collected from 147 Korean indigenous calves with diarrhea

Virus(es)	No detected(%)
Rotavirus	49(33.3)
Coronavirus	24(16.3)
Togavirus	15(10.2)
Rotavirus+ Coronavirus	8(5.4)
Rotavirus+ Togavirus	1(0.7)
Rotavirus+ Herpesvirus	1(0.7)
Not detected	49(33.3)
Total	147(100.0)

동정된 바이러스의 특징

송아지 설사 분변내 로타바이러스는 직경이 65~75nm인 이중나선 RNA 바이러스로서, 크게 감염력있는 이중외피 입자와 뉴클레오킵시드와 genomic RNA가 소실된 단층외피 입자 등 두 가지 형태로 관찰된다. 전자의 경우 캡소머 주변의 외층에 전형적인 전차바퀴 모양을 띠고 있으며, 후자의 경우 중앙부위가 관통된 듯한 형태를 취하고 있다. 본 실험에서 2종 모두 검출되었고 그 크기는 약 60~70nm 정도로 이전에 관찰된 로타바이러스와 일치되는 형태였다(Fig 1).

코로나바이러스는 직경이 80~160nm의 단일나선 RNA바이러스로서 원형 혹은 불규칙한 모양의 표면에 곤봉모양의 단백질 돌기가 다수 분포해 있는 것이 특징이다. 본 실험에서 관찰된 코로나바이러스는 약 110~130nm 직경에 단백질돌기가 관찰되는 전형적인 형태를 취하고 있었다(Fig 2).

허피스바이러스는 직경이 120~200nm의 이

중나선 DNA 바이러스로서 음성 대조염색시 주로 뉴클레오캡시드가 결여되어 중앙이 관통된 듯한 형태로 자주 관찰된다. 본 실험에서 관찰된 허피스바이러스는 직경이 약 130nm 정도의 중앙이 관통된 전형적인 형태를 띠고있고 외피 주변에 털과 같은 특징적인 구조물이 관찰되었다(Fig 3).

단일나선 RNA바이러스인 토가바이러스는 40~70nm의 크기로 전자현미경상에서 원형 혹은 불규칙한 형태로 주로 비어있는 형태로 관찰되었다. 이 실험에서 관찰된 토가바이러스는 약 50nm의 크기로 난원형의 공복형과 불규칙형 등 여러 가지 형태로 관찰되었다.

설사 송아지 일령별 분변내 바이러스 동정

설사 송아지의 일령별 바이러스 검색률을 알아본 결과(Table 2), 1주일령의 경우 19마리의 분변에서 바이러스가 분리되었고(73.1%) 이들은 주로 로타바이러스와 코로나바이러스이었다. 2주일령과 3주일령 이상의 경우 각각 10두(66.7%)와 16두(69.6%)의 송아지에서 바이러스가 분리되었으며, 1주일령과 비슷한 바이러스 분포를 보이고 있었다. 설사분변의 성상과 바이러스 검색률을 비교한 결과, 설사변중 황백색 수양성 설사가 가장 많은 비율로 관찰되었고 혈액, 백색, 갈색, 녹색 수양성 설사변 순이었다. 각 성상별로 검색된 바이러스 종류는 유사하였고 주로 로타바이러스와 코로나바이러스이었다(Table 3).

Table 2. Prevalence of viral-like particles in the feces of 147 Korean indigenous calves by age

Age(weeks)	No examined	No detected(%*)
1	26	19(73.1)
2	15	10(66.7)
3	23	16(69.6)
4	4	4(100.0)
>4	79	49(62.0)

* : (No detected/No tested) × 100

Table 3. Correlation between the kinds of diarrhea and the viral-like particles in the feces of 147 Korean indigenous calves with diarrhea

Diarrhea	No of detected (%)	Viruses detected
Yellow	44.9	Rotavirus Coronavirus Togavirus Rota + Coronavirus Rota + Herpesvirus
Bloody	19.7	Rotavirus Coronavirus Togavirus Rota + Togavirus
White	17.0	Rotavirus Coronavirus Togavirus
Brown	14.3	Rotavirus Coronavirus Togavirus Rota + Togavirus
Green	3.4	Rotavirus Coronavirus

고 찰

송아지 설사에 관여하는 바이러스에 대해서는 국내외적으로 다양한 방향으로 연구가 진행되고 있다. 초기에는 주로 항체보유율 및 바이러스 분리에 대한 연구가 집중적으로 이루어 졌고, 후에는 진단법에 대한 다양한 연구가 수행되었다.

송아지 설사에 대한 지금까지의 보고를 보면, 가장 중요한 원인체로 주로 어린 송아지의 경우 로타바이러스, 코로나바이러스, 소바이러스성 설사바이러스, 대장균 등이 있으며^{2,4-8)}, 그외에도 송아지의 장관내 감염성을 지닌 바이러스들로는 파보바이러스를 비롯하여 아데노바이러스, 아스트로바이러스, 엔테로바이러스, 켈리시바이러스, 브레다바이러스 등이 알려져 있다^{2,4,5,9-12)}.

현재까지 설사유발 바이러스들의 특징에 대한 많은 연구가 누적되어 있으나 본 실험에서는 형태학적인 특징을 토대로 분변내 바이러스의 검색을 시도하여, 로타바이러스, 코로나바이러스, 토가바이러스, 허피스바이러스 등을 검색하였다.

소 로타바이러스는 1969년에 최초로 분리된 Reoviridae에 속하는 이중나선 RNA바이러스로서^{5,11,25)} 직경이 약 65~75nm이며 외피가 없고 6개의 구조성 다펩티드로 구성되어 있다⁷⁾. 이 바이러스는 주로 출생 후 1~2주 이내의 신생 송아지에 심한 설사를 일으키는 비율이 높다^{2,5,7,10,25)}. 일련의 연구에 의하면 스코틀랜드의 소의 23%에서⁵⁾, 미국내 5~14일령의 설사증상을 보이는 송아지의 70%에서¹⁰⁾ 각각 로타바이러스가 검출되었고, 1980년대와 1990년대의 국내 발생이 보고되는¹¹⁾ 등 세계적으로 널리 분포되어 발생되고 있다.

소 코로나바이러스는 1972년에 최초로 검출되었으며, 그후 여러 나라에서 분리되었다. 직경이 80~160nm의 크기에 단백질 돌기로 덮여있는 특징적인 표면구조를 가진 단일나선 RNA바이러스로서¹³⁾ 미국, 일본, 북아메리카와 유럽 등에서 각각 16.4%, 59%, 3~31%에서 분리되는 등^{5,15)} 세계 각국에 걸쳐 분포하고 있다¹⁰⁾. 이 바이러스는 정상 송아지의 비강에서도 분리되었지만 직장에서 분리된 코로나바이러스와 혈청학적 및 생물학적으로 차이가 없고⁸⁾ 호흡기에서도 경미한 임상증상을 나타내는 것 이외에는 아직 정확한 병원성이 밝혀지지 않았다¹³⁾.

소 토가바이러스로는 대표적인 소 바이러스성 설사 바이러스가 속해 있다. 이 바이러스는 1946년 최초로 보고된 질병으로 일명 점막병이라고도 하는 전신성 질환을 유발하는 바이러스이다^{5,20,27)}. 이 바이러스는 페스티바이러스에 속하는 단일나선 RNA바이러스로서 난원형 및 여러 불규칙한 형태를 띠고 있으며 직경은 120(±30)nm이고 바깥 외피층에는 5~7nm의 두께의 수많은 단백질 돌기가 있다¹⁴⁾. 여러 연구결과 이 바이러스는 세계도처에 분포되어 있고 국내 소의 38.4%가 항체를 보유하고 있다는

보고가 있었다^{17,20,26,27)}.

아스트로바이러스는 설사증상을 보이는 어린이의 분변에서 최초로 분리된 직경 28~30nm의 단일나선 RNA바이러스로써 어린 양, 송아지, 칠면조, 사슴을 포함한 여러 동물에서 검출되고 있으나 이들 바이러스주는 항원성의 관련이 없고⁵⁾, 분변에서 분리되지만 일반 소에 공격접종시 병원성은 없다¹⁰⁾. 바이러스의 모양이 별모양과 비슷하여 아스트로바이러스라 명명하였지만 이 명칭은 잠정적이다. 신생무균동물에 공격접종시 경미한 설사나 준임상형을 유발하지만 아직 국내에서는 보고된 바 없고 이 실험에서도 발견되지 않았다. 또한 캘리시바이러스가 1978년 영국에서 송아지의 장내병원체로 보고되었는데 직경이 33nm의 단일나선 RNA 바이러스이며 송아지에서 설사를 일으키지만 수일 내에 회복된다. 그러나 이런 설사유발에 대한 영향은 그 정도의 차이가 심하기 때문에 장내의 병원성을 명백히 하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다^{5,10)}.

소 아데노바이러스는 1958년 최초로 사람의 아데노바이러스와 유사한 소 아데노바이러스 1형과 2형이 분리된 후 세계 각국에서 다른 형들이 보고되어 지금까지 10여개의 혈청형이 보고되었다. 국내에서도 박 등¹²⁾에 의하여 전남의 한우 사육농가에서 집단 발생보고가 있었다. 소아데노바이러스 감염증은 주로 송아지에 감염되는 이환률이 높은 질환으로써 전신 감염과 폐렴과 설사를 유발하는데^{10,12)} 금번 이 조사에서는 나타나지 않았다.

브레다바이러스는 최근에 미국과 프랑스에서 송아지 설사 원인체로 새롭게 대두되고 있는 바이러스로서 사람의 장염 유발과 관계가 있다. 구형에서 신장모양까지 형태학적으로 다양하지만 코로나바이러스와 비슷한 형태를 나타내며, 주로 1주령 이하의 송아지에서 발견되곤 하는데¹⁰⁾ 이 바이러스 역시 이번 조사에서 검색할 수 없었다.

송아지 설사에 대한 전반적인 조사결과 전체의 97.6%에서 설사가 있었으며, 대부분의 송아지에서 포유기간 중 1회 이상 발생하였다²⁾. 바이러스성 송아지 설사의 원인체별 발생율을

보면, 외국의 경우 로타바이러스(30.8%), 코로나바이러스(14.0%)에 의한 설사가 많은 부분을 차지하고 있다¹⁶⁾. 그러나 국내에서는 로타바이러스(35.3%), 소바이러스성 설사바이러스(35.3%), 코로나바이러스(5.9%) 등의 순으로 외국의 경우와 많은 차이를 나타내고 있다²⁸⁾. 본 연구결과에서는 로타바이러스(33.3%), 코로나바이러스(16.3%), 토가바이러스(10.2%)로 상당한 지역적인 차이는 보이지만 국내의 적으로 로타바이러스가 송아지의 바이러스성 설사의 중요한 원인체임이 재확인되었다.

바이러스성 설사질환의 진단법으로는 세포배양을 통한 바이러스 분리, 중화반응, 혈구응집반응, 음성 대조 전자현미경검사(negative 염색법), 형광항체법, ELISA, 보체결합법, 미세역가 혈구응집억제반응, 전기영동법, 중합연쇄반응 등이 있다. 이중에서도 각각의 바이러스의 특징과 진단법의 장단점을 고려하여 바이러스 분리, 음성대조 염색법, 형광항체법 등의 방법이 자주 이용되고 있다^{4,5,13-26)}. 그러나, 세포배양을 통한 바이러스 분리법은 가장 고전적이면서도 신뢰도가 높지만^{10,13,20)}, 원인 바이러스의 특성에 따라 배양의 어려움³⁾, 배양시간의 차이, 고비용이 드는 등의 단점이 있다. 특히 세포변성효과가 나타나지 않거나 복합감염일 때는 진단법으로 적합하지 못하다는 단점이 있다¹⁸⁾. 형광항체법은 분변, 소화관, 파라핀 포매 조직 등 다양한 시료를 대상으로 설사유발 바이러스 검사에 광범위하게 사용되고 있다^{13,15)}. 이 방법은 바이러스 분리법보다 더 민감하고 바이러스 분리법의 단점인 세포변성효과를 나타내지 않는 경우나 복합감염시에도 진단법으로 유용하다. 그러나 집단 건강관리를 위한 검색법은 특이 항체의 준비나 의양성 등에 대한 감별진단의 어려움, 진단기술 및 판정의 객관성 등을 보완해야 한다. 그럼에도 이 방법은 이 실험에 사용한 음성대조 염색법과의 비교실험 결과 전자가 민감도가 더 뛰어나다는 보고가 있는가 하면^{3,15,17,18)} 후자가 오히려 더 민감하다는 실험결과도 있어 이들의 진단율에는 상반된 주장이 나오고 있다^{4,8,18)}. 그러나 최근 연구결과 실제 이 두 진단법사이의 진단율 차이는 미미하였고, 형광항

체법이 음성대조 염색법에 비해 검사할 수 있는 바이러스영역이 좁고 상대적으로 장시간이 소요된다는 단점이 부각되었다^{3,8,13,14,18)}. 그리고 형광항체법은 장절편을 대상으로 실시할 경우 상피내의 바이러스 양에 의존하며, 급성감염의 경우 일시적으로 양성반응을 보일 경우 등 시기에 따라 다른 결과가 나타나는 단점이 보고되었다^{19,20)}.

1955년에 Hall^{29,30)}에 의해 처음 개발된 음성대조 염색법은 PTA 또는 uranyl acetate 등과 같은 전자밀도가 높은 시약을 이용하여 관찰하고자 하는 생체물질의 경계부분과 반응시켜 대조를 강조시켜 바이러스를 검경하는 진단법이다. 이런 원리를 갖는 음성대조 전자현미경 검사법은 투과전자현미경이라는 고가장비를 확보해야 하고 감염수준 측정이 어렵다는 단점이 있다. 그러나, 음성대조 염색법은 아주 간단한 과정으로 10⁶/ml 이상의 바이러스 농도일 경우 대부분의 바이러스를 검색할 수 있는 넓은 진단 영역의 장점 외 다른 진단법에 비해 매우 신속하다는 특성이 있다^{3,8,13,14,16)}. 형광항체법은 부검 등에 의해 재료를 확보하지만 음성대조 염색법은 이런 과정없이 단순히 설사변을 대상으로 실시하며^{4,8)} 3~7일이 소요되는 다른 진단방법에 비해 시료제작에서 검경 및 검색까지 하루내에 실시할 수 있어 송아지 설사의 진단에 매우 유용한 진단법이다¹⁸⁾.

과거에 음성대조 염색법은 분변을 1차 원심 분리 후 2차 초고속 원심분리하고 생리식염수로 희석하여 2% PTA로 염색하고 grid에 올려 formvar 등으로 코팅하고 탄소증착을 실시한 후 검경하는 복잡한 처리과정으로 실시하였다^{1,18,31)}. 국내에서도 윤 등³¹⁾에 의해 이와 비슷한 방법으로 음성대조 염색법을 실시하여 소 코로나 바이러스를 검색하는 등의 시도가 있었다.

본 연구에서는 이런 복잡한 처리과정을 단순화하여 간편하고 소요시간을 단축하면서도 검색이 용이한 새로운 방법으로 음성대조 염색법을 실시하였다. 즉, 1차 원심분리를 2회 실시하여 검경하는 grid내에 분변 내용물을 최소화하고 소량의 분변으로도 시료를 제작할 수 있도록 2차 초고속원심분리시 생리식염수를

첨가하였다. 염색단계에서 과거에 1%로 희석하여 사용하였던 PTA를 2%로 높여서 사용하고 amyli acetate내 2% colloidion으로 코팅하여 기존의 탄소증착과정을 생략하였다. 그 결과 재료제작시간을 단축하고 80kV의 가속전압에서도 견딜 수 있는 grid를 사용하여 기존의 시료와 대등한 조건하에 검경할 수 있었다.

이 실험은 기존의 방식을 개선한 음성대조 염색법을 설사 송아지의 진단에 응용하여 전남지역내 송아지의 분변내의 각종바이러스 분포를 조사하였다.

본 연구의 실험결과 총 147개의 가검물 중에서 바이러스가 분리된 것은 전체의 66.7% (98 case)였고, 이중 대부분을 로타바이러스와 코로나바이러스가 차지하고 있어 지역적인 차이를 나타내고 있음을 알게되었다.

대부분 설사분변 시료를 채취하여 상당기간 멸균되지 않은 상태에서 냉동고에 저장된 후 검사가 실시되어 세균분리에 이의가 없었다. 이중 신선한 설사분변 10개에서 세균분리를 시도한 결과 이제까지의 여러 보고내용과 같이 E coli와 Salmonella sp가 각각 7개 및 3개의 샘플에서 분리되었다. 이 샘플들을 음성대조염색하여 전자현미경상에서 검경한 결과 여러 문헌에서와 같이 대부분 로타바이러스가 검색되었다^{5,8,12,14,15,24,27}.

본 실험은 지금까지의 음성대조 염색방법을 개선하여 실시하였지만 이 방법으로는 민감도의 수준을 측정할 수 없고 검색된 바이러스가 설사의 원인체 혹은 2차감염체로 확실하게 단정할 수 없다는 점은 미흡했다. 그러나 음성대조 염색법을 개선하고 이것의 넓은 바이러스검색영역을 재확인, 전남지역내 설사송아지에서 분리되는 바이러스의 분포조사를 실시하였다는 점에 그 의의가 있으리라 사료된다. 아울러 앞으로 계속적인 사용 및 다른 검사방법과의 비교·보완을 통해 사용된다면 빠르고 간편한 바이러스 진단법이 되리라 사료된다.

결 론

야의 한우목장에서 설사로 인해 임상 수의

사의 왕진을 요청한 147두의 송아지 분변을 투과 전자현미경을 이용하여 개선된 음성대조 염색법으로 바이러스를 검색한 결과는 다음과 같다.

147두의 설사분변의 검사결과 98예(66.7%)에서 1종이상의 바이러스가 확인되었다. 이들 검출된 바이러스의 종류는 로타바이러스가 49예(33.3%)로 가장 많았고, 이 뒤를 이어 코로나바이러스가 24예(16.3%), 토가바이러스가 15예(10.2%)이었다. 이외에 2종이상의 혼합감염은 로타바이러스+코로나바이러스가 8예(5.5%)이었고, 로타바이러스+토가바이러스, 로타바이러스+허피스바이러스 등도 각각 1예씩 관찰되었다.

송아지의 주령별 설사 발생빈도는 5주령이상이 53.7%로 가장 흔하였고, 3주령이내가 43.6%이었다. 1~3주사이의 주령별 평균 바이러스 검출율은 69.8%이었고, 5주령이상의 설사분변내 바이러스 검출율은 62%이었다.

147두의 설사 분변은 황색 수양성 설사(44.9%)가 가장 많았고, 혈액성(19.7%), 백색(17.7%), 흑갈색(14.3%), 청색(3.4%) 수양성 설사의 순으로 구분되었다. 이들 설사 유형별 바이러스 검출율은 60.0~72.7%(평균 63.6%)까지 다양하였으나 평균 설사유형별 차이는 인정되지 않았다($p < 0.01$). 황색수양성 설사분변(66예)의 경우 로타바이러스가 31.8%로 가장 빈번히 검출되었고, 코로나바이러스와 토가바이러스가 각각 15.2%와 13.6%의 검출률을 보였으며, 특히 바이러스가 검색된 설사분변 가운데 로타바이러스+코로나바이러스 혼합감염이 확인된 8예중 7예(87.5%)가 이 유형에 속하였다.

이 조사에 사용된 개량형 음성 대조 투과전자현미경 검사는 설사 분변내 바이러스를 검출해내는데 효과적인 진단법이었다.

감사의 글

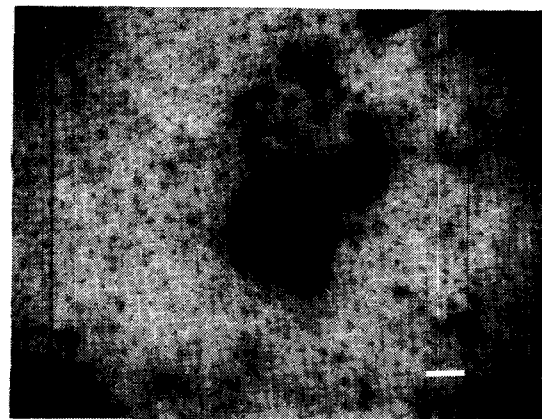
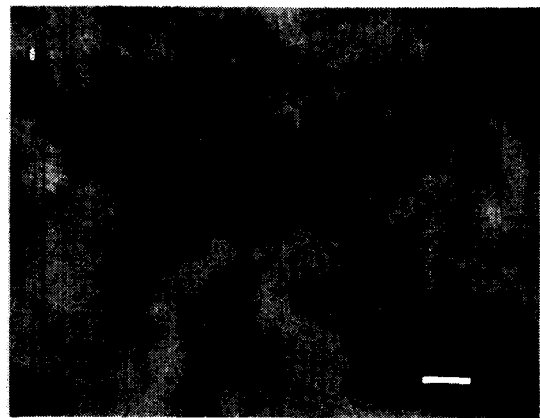
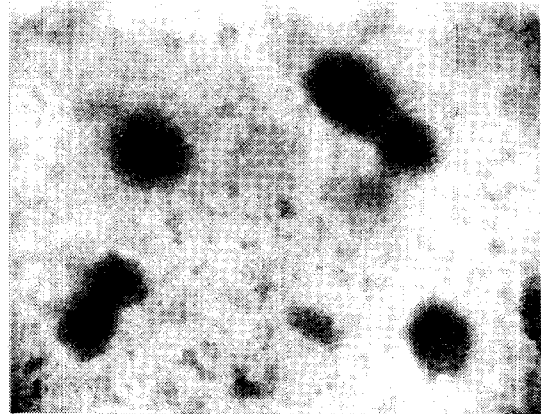
이 실험을 위해 임상재료 채취에 협조해주신 임금기 한일동물병원장과 백남수 백동물병원장에게 감사를 표합니다.

Legends for Figures

Fig 1. Electron photomicrograph of rotavirus-like particles from diarrheal feces of Korean indigenous calf. PTA stain. Bar=50nm.

Fig. 2. Electron photomicrograph of coronavirus-like particles from diarrheal feces of Korean indigenous calf. PTA stain. Bar=100nm.

Fig. 3. Electron photomicrograph of herpesvirus-like particles from diarrheal feces of Korean indigenous calf. PTA stain. Bar=50nm.



참고문헌

1. 정운익. 1977. 우변의 병리소견과 진단적 가치. *대한수의사회지* 13(4) : 245~248.
2. 김 두, 유영수, 유한상 등. 1990. 한우 송아지의 포유기간 중의 설사발생에 관한 연구. *대한수의학회지* 30(2) : 255~260.
3. Marsolais G, Assaf R, Montpetit C, et al. 1978. Diagnosis of viral agents associated with neonatal calf diarrhea. *Can J Comp Med* 42(2) : 168~171.
4. Peter JK, Lori EH, Norman GR, et al. 1989. Viruses and virus-like particles detected during examination of feces from calves and piglets with diarrhea. *Can Vet J* 30(11) : 876~881.
5. 박봉균. 1984. 송아지의 바이러스성 설사. *대한수의사회지* 20(3) : 147~153.
6. Crouch CF, Acres SD. 1984. Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the feces of normal cows. *Can J Comp Med* 48(3) : 340~342.
7. 류영수. 1988. 로타바이러스에 의한 송아지 설사. *대한수의사회지* 24(11) : 657~660.
8. Reynolds DJ, Debney TG, Hall GA, et al. 1985. Studies on the relationship between coronavirus from the intestinal and respiratory tract of calves. *Arch Virol* 85 : 71~83.
9. Weldon SL, Blue JL, Wooley RE, et al. 1979. Isolation of picornavirus from feces and semen from an infertile bull. *JAVMA* 174(2) : 168~169.
10. Janke BH. 1989. Protecting calves from viral diarrhea. *Vet Med* 84(8) : 803~810.
11. 진영화, 이수부, 방진학 등. 1990. 송아지 로타바이러스 감염증의 국내발생 예. *대한수의사회지* 30(5) : 279~284.
12. 박남용, 배성열, 기혜영. 1991. 소아데노바이러스 감염증의 국내발생. *대한수의사회지* 27(8) : 483~487.
13. Tsunemitsu H, Yonemichi H, Hirai Y, et al. 1991. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. *J Vet Med Sci* 53(3) : 433~437.
14. Chu HJ, Zee YC. 1984. Morphology of bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res* 45(5) : 845~850.
15. Langpap TJ, Bergeland ME, Reed DE. 1979. Coronaviral enteritis of young calves : Virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. *Am J Vet Res* 40(10) : 1476~1478.
16. Deregt D, Smithson S, Gerry CK. 1992. A short incubation serum neutralization test for bovine viral diarrhea virus. *Can J Vet Res* 56(2) : 161~164.
17. Baszler TV, Evermann JF, Kaylor PS, et al. 1995. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhea virus infections in ruminant using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Vet Pathol* 32(6) : 609~618.
18. England JJ, Cathy SF, Elizabeth AE. 1976. Negative contrast electron microscopic diagnosis of viruses of neonatal calf diarrhea. *Cornell Vet J* 66(2) : 172~182.
19. Acres SD, Laing CJ, Radostits. Acute undifferentiated neonatal diarrhea in beef calves I. occurrence and distribution of infectious agents. *Can J Comp Med* 39(2) : 116~132.
20. Ronald EW, Trevor RA, Sagar MG, et al. 1989. Diagnostic investigation of bovine viral diarrhea infection in a Minnesota dairy herd. *J Vet Diagn Invest* 1(1) : 57~61.
21. Liauw HKH. 1984. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea. *Dissertation Abstracts International* 45(5) : 1396~1397.
22. Rieger BE. 1983. Calf diarrhea coronavirus : Studies for the detection and isolation.

- tion of the virus. *Dissertation Abstracts International* 43(11) : 3501.
23. Bezek DM, Mechor GD. 1992. Identification and eradication of bovine viral diarrhoea virus in a persistently infected dairy herd. *JAVMA* 201(4) : 580~586.
 24. Chasey D, Lucas M. 1977. A bovine coronavirus identified by thin-section electron microscopy. *Vet Rec* 100(25) : 530~531.
 25. 안재문. 1996. 소 로타바이러스(국내분리주)의 특성 및 단크론항체 생산. 충북대학교 대학원 수의예방학(석사논문).
 26. 진무형. 1988. 소바이러스성 설사의 특성과 병인기전. *대한수의사회지* 24(6) : 337~343.
 27. 인교진, Masaki Tsuji. 1996. 고분자의 전자현미경 관찰. *고분자과학과 기술*7(4) : 437~444.
 28. 인교진. 1996. 고분자과학과 기술. *고분자과학과 기술* 7(2) : 227~234.
 29. Horne RW, Ivonne PR. 1974. A negative staining-carbon film technique for studying viruses in the electron microscope. *J Ultrastructure Res* 47 : 361~383, 1974.
 30. 주이석, 배유찬, 박최규 등. 1994. 면역전자현미경기법 이용-소바이러스성 설사증 정밀진단 기법 개발연구. 가축위생연구소 시험연구보고서 247~250.
 31. 석호봉. 1986. 소의 바이러스성 설사병의 임상학적인 의의와 백신에 관련된 문제. *대한수의사회지* 22(11) : 695~700.