

## 충남 서산태안지역에서 사육중인 송아지의 코로나바이러스 감염률 조사

육심용\* · 남이현 · 이미성 · 한우수 · 강형주 · 전동민 · 이재봉  
충청남도가축위생연구소 태안지소

(접수 2009 8. 25, 게재승인 2009. 9. 22)

### A study on the prevalence of bovine coronavirus infection for calves in Seosan-Taeon Area

Sim-Yong Yook\* Nam-I Hyun, Mi-Sung Lee, Woo-Soo Han,  
Hyeong-Joo Kang, Dong-Min Jeon, Jea-Bong Lee

Taeon branch of the Chungnam Veterinary Research Institute, Taeon, Chungnam 305-904, Korea

(Received 25 August 2009, accepted in revised from 22 September 2009)

#### Abstract

This survey was carried out to investigate the prevalence of bovine coronavirus (BCV) infection for the calves in Seosan-Taeon Area. A total of 75 samples were collected from fecal swab to detect BCV by RT-PCR. Results obtained through the survey were as follows; By RT-PCR (455bp) BCV was detected from 13 of the 75 sample of fecal swab from calves. The calves under 3 month showed the highest BCV detection rate.

**Key words** : Bovine Coronavirus (BCV), Calves, Diarrhea

#### 서 론

소 코로나바이러스(bovine coronavirus, BCV)로 인한 송아지 설사증은 세균성 질병인 캄필로박터속균이 동시에 감염되어 심한 수양성 설사증을 일으키며 겨울철에 다발한다고 하여 “겨울철 설사병(Winter dysentery)”이라고도 불리기도 한다(Saif 등, 1991; Jubb 등, 1993). 특히 BCV는 생후 3~30일령의 송아지 소장엔 침입하여 장운동 파괴와 더불어 장염으로 인한 설사와 탈수, 산증을 유발하여 경제적 손실이 큰 질병으로 알

려져 있다(Speicher와 Hepp, 1973; 강 등, 2001). 만성으로 경과시 성장지연, 쇠약, 피부주름, 안구함몰, 식욕부진, 무기력, 호흡곤란 등의 임상증상으로 증상별 대증요법이 선행되지 않으면 폐사를 일으킨다(Jubb 등, 1993; Speicher와 Hepp, 1973; 강 등, 2001)

BCV는 전염성이 강한 질병으로 겨울철에 다발하며, 높은 이환율을 나타내지만 폐사율은 매우 낮은 것으로 보고(Jubb 등, 1993)되어 있지만, 국외에서 Speicher와 Hepp(1973)는 BCV감염을 분포조사에서 영국에서는 42%, 유럽에서 3~31%, 미국은 감염률이 16.4%에 이른다고 보고하였으며, 국내에서 BCV 감염률 조사에서 손 등(1991)이 16.3%, 임 등(1999)이 경기도 지역 유우에서 35.3%로 조사되었으며, 정 등(1997) 경상북도지

\*Corresponding author: Sim-Yong Yook, Tel. +82-41-675-4349,  
Fax. +82-41-675-4348, E-mail. yook8098@korea.kr

역 육우에서 27% 감염률을 보고하였다, 특히 충남서산 태안지역에서도 양축농가의 BCV 감염으로 인한 폐사 사례가 많아 감염률 조사의 필요성이 절실하게 대두되었다.

소 코로나바이러스의 검사방법으로는 감염 의심축의 혈액내 바이러스 항체가 조사 및 효소면역법, 형광항체 등을 이용한 여러가지 검사법이 보고(Smith 등, 1996)되어 있는 실정이나, 혈청학적 검사에서는 혈액내 비특이적 요인이 많아 신뢰도가 저하된다고 보고되었다(Benefied와 Saif, 1990). 이번 연구과정에서는 간섭효과를 제거하고, 바이러스 특이적 증폭산물만을 생성하여 신속하고 정확성이 확보된 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법으로 BCV 감염률을 조사하였다.

본 시험에서는 충남 서산 태안지역 양축농가에서 의뢰된 가검물과 분변시료를 조사하여 송아지의 코로나 바이러스 감염률을 조사한 후, 농가 피해를 경감시키는 물론 방역지도 및 질병 예방을 위한 기초 자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

2008년 1월부터 2008년 12월까지 서산·태안지역 내 소 사육농장에서 의뢰된 분변 75건을 공시하였다.

### RNA 추출

설사증 이환 송아지의 분변에서 RNA를 추출하기 위해 설사분변을 phosphate-buffered saline으로 5% (w/v) 농도로 희석하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 3회 동결·융해를 반복 후, 3,000rpm에서 10분간 원심분리 한 다음 상층액 200 $\mu\text{l}$ 를 취하여 RNA를 추출에 사용하였고, RNA 추출은 RNasy Minikit (Qiagen, USA)의 glass fiber column을 이용하여 공시된 방법에 준하여 수행하였다.

**Table 1.** Nucleotide sequence of primers for the amplification of BCV

Virus	Primer	Nucleotide sequence	Product size
BCV	15 (55)	5'-CCAATGGTAGGAAGGTTGACC-3'	455bp
	6 (20)	5'-CAGTAGAACAAGTAGTACCAC-3'	

### Primer 제작

BCV의 반응 증폭산물은 생성하기 위해 Table 1와 같이 안 등(1999)의 방법에 따라 제작된 primer를 이용하여 증폭시켰다(강, 2008).

### RNA 핵산 증폭

설사 증상축의 분변에서 RNA를 추출하기 위해 설사분변을 PBS로 5%(w/v) 농도로 희석하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 3회 동결·융해를 반복 후, 3,000rpm에서 10분간 원심분리 한 다음 상층액 200 $\mu\text{l}$ 를 취하여 RNA를 추출에 사용하였고, RNA 추출은 RNasy Minikit (Qiagen, USA)의 glass fiber column을 이용하여 공시된 방법에 준하여 수행하였다.

### BCV 핵산 증폭

BCV의 유전자 증폭은 안 등(1999)과 허 등(2008)의 방법을 응용하여 실시하였다. 역전사 및 증폭을 위해 Quiagen Onestep RT-PCR kit를 사용하였다. RNase-free water 12 $\mu\text{l}$ , 5 RT-PCR buffer 5 $\mu\text{l}$ , dNTP Mix 1 $\mu\text{l}$ , RT-PCR Enzyme Mix 1 $\mu\text{l}$ , Primer (R) 0.5 $\mu\text{l}$ , Primer (F) 0.5 $\mu\text{l}$ , RNA 추출물 5 $\mu\text{l}$ 를 순서대로 가하여 최종 반응액을 25 $\mu\text{l}$ 로 되게 하였고 이 혼합액을 Thermocycler (Bio-metra)에서  $45^{\circ}\text{C}$  30분,  $94^{\circ}\text{C}$  15분 반응후 증폭을 위해  $94^{\circ}\text{C}$  10초,  $50^{\circ}\text{C}$  10초,  $72^{\circ}\text{C}$  15초씩 총 35회 반응시킨 다음 최종  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 연장시켰다.

### PCR 증폭산물 확인

PCR로 증폭된 산물을 확인하기 위하여 5 $\mu\text{l}$ 의 PCR 산물을 1 $\mu\text{l}$ 의 gel loading buffer (0.25% bromophenol blue tracking dye in 25% Ficoll)와 혼합하여 ml당 0.5 $\mu\text{g}$  ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에 로딩한 다음 전기영동이 끝난 gel을 UV illuminator에서 BCV의 455bp 증폭산물의 유무를 확인하였다(강, 2008; 안 등, 1999)

## 결 과

### BCV 유전자 증폭

서산·태안지역 양축농가에서 사육중인 송아지 분

**Table 2.** The Detection of coronavirus from fecal swab of calves according to Region

Regions	No. of tested samples	No. of positive samples	positive rate (%)
Seosan	55	10	18
Teaan	20	3	15
Total	75	13	17

변내 BCV 검출을 위한 RT-PCR 검사결과 Fig. 1과 같이 증폭산물 밴드를 확인하였다.

**지역별 감염률**

공시된 75건에 대해 지역별 coronavirus (BCV) 감염률은 Table 2와 같다. 요약하면, 총 75건의 분변 중에 13건이 검출되었으며, 서산지역에서는 10건(18%), 태안지역에서 3건(15%)이 검출되어 서산지역이 비교적 높게 검출되었다.

**연령에 따른 감염률**

BCV의 연령에 따른 감염율을 조사한 결과 Table 3과 같이 조사되었다. 연령별 BCV의 감염률을 조사한 결과 1월령 미만에서는 3건, 1-3월령에서는 9건, 3월령 이상에서 1건이 검사결과 양성으로 조사되었다.

**고 찰**

어린 송아지 설사병은 소화관을 통과한 내용물 중 수분 또는 용질이 송아지체내에서 상호교환이동 이상으로 발생할 수 있으며, 점액성, 수양성으로 진전되어 체액손실과 흡수불량으로 성장지연, 사료소모량이 저하되고, 치명적일 경우 폐사할 수 있다고 보고하고 있다. 병원성 원인체로는 로타바이러스, 코로나바이러스, 소바이러스성 설사점막병, 대장균, 살모넬라, 기생충 등이 보고되고 있으며, 그 중 송아지 장관내 감염성을 지닌 바이러스로는 파보바이러스를 비롯한 아데노바이러스, 아스트로바이러스, 엔테로바이러스, 캘리시바이러스, 브레다바이러스 등이 알려져 있다(Speicher JA 등, 1973; Saif LJ 등, 1991).

특히 소에서 설사증을 유발하는 코로나바이러스는 직경이 80~160nm의 크기에 단백질 돌기로 덮여 있는 특징적인 표면 구조를 가진 단일 나선 RNA 바이러스로서, 미국에서 16.4%, 일본에서 59%, 유럽 등에서

**Table 3.** Prevalence of bovine coronavirus from fecal swab of calves by age

Age (Month)	No. of exam.
< 1	3
1-3	9
>3	1
Total	13



**Fig. 1.** Amplification of the cDNA from field isolates BCV from diarrhea calves [Lines: M, 100kb size DNA Ladder: 1-5, sample; 6, positive control].

3~31%로 분리 및 감염이 보고되어 전 세계적으로 발생하고 있는 실정이다(Jubb 등, 1993; Speicher와 Hepp, 1973; Smith 등, 1996). 송아지 설사 분변으로부터 병원체 검출 결과는 영국의 경우 bovine rotavirus (BRV), bovine coronavirus (BCV), enterotoxin (ETEC F5), *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. 등 5종의 미생물이 설사와 관련된 주요한 병원체라고 보고하였으며, 그 중에서도 BRV의 경우는 계절적인 요인과 설사유행과 관련이 있으며, 지역적으로 설사송아지 분변샘플검사에서 높은 감염율로 검출되며 송아지 설사증에 가장 중요한 병원체라고 보고하고 있다(Holland, 1990; Curit 등, 1988).

소 코로나바이러스 감염증은 우리나라에서 많이 발생되고 있는데 손 등(1991)은 국내 사육중인 소에서 소 코로나바이러스에 대한 항체가를 조사한 결과 1988년 93.5%, 1989년에 96%, 1990년에 82.6%가 양성으로 조사되어 소 코로나바이러스 감염증이 상당히 만연되고 있다고 보고하였다(김 등, 1999), 또한 국내에서는 소 코로나바이러스 감염률은 지역별 연령별 다양한 차이를 나타내고 있다. 본 조사에서도 17.3%로 국내 조사성과 유사함을 확인할 수 있었다. 특히, 충남 서산 지역에서는 타 지역과 달리 사양 환경과 송아지의 포유기에 사양관리에 따른 비교적 높은 감염률을 나타낸 것으로 사료된다.

송아지는 분만직후부터 많은 위험요인을 갖고 있는

외부환경에 노출되며, 그 중에서 설사 원인체 감염에 의한 경제적 손실은 김 등(1990)에 의하면 16%에 이른다고 보고하고 있다. 신생 송아지 단계에서 설사증은 치명적인 영향을 미치며, 포유기중 폐사율을 16.1%까지 이르게 하는 주된 폐사요인이 되고 있으며, 특히 설사를 주증으로 하는 소화기 질병은 대부분 환경적인 요인에 기인한다고 알려져 있다.

초유 중 면역글로블린은 분만 후 3일경에 급속히 감소되며, 초유 중에 함유된 소 코로나바이러스 항체는 장관 내에서만 방어력을 지내고 있는 반면 혈액내로 흡수된 혈청 면역항체는 장 감염을 방어하지 못하므로 소 코로나바이러스는 분만 후 주로 7일이내 집중적으로 발생하여 감염된 송아지는 약 3주 동안 분변을 통해 대량 배출되어 다른 송아지로 전파되어 조기에 차단방역을 실시해야한다고 보고(허 등, 2008; Tsunemitsu 등, 1991; 김 등, 1999)하고 있어 송아지에 대한 관리가 분만 후부터 위생적 관리가 철저하게 시행되어야 설사증상을 예방할 수 있다고 사료된다.

또한 시기적으로 송아지 설사 발생은 분만 직후 어린 일령에서 가장 많이 발생하여 10일령 이내에 53.8%가 집중적으로 발생된다고 보고(강 등, 2001)되어 있어 신생송아지 설사는 분만 초기부터 중요한 질병으로 분류되고 있다고 보고하고 있는 상황이다. 본 시험에서는 송아지 설사병의 BCV의 검사에서는 1~3월령(이 등, 1997)에서 비교적 높은 검출률로 이 등(2008)이 보고한 연령과는 다소 차이가 있으나 어린 일령에서 발생하여 발생시기와 상관없이 상시 백신접종 및 관리가 필요하다고 판단된다.

소 코로나바이러스의 검사방법으로는 분변에서 바이러스를 직접 관찰하는 전자현미경법과 분변에서 직접 바이러스를 분리하는 방법, 효소면역법, 형광항체법 등이 보고되고 있다(Smith 등, 1996). 전자현미경으로 분변내 소 코로나바이러스를 검출하기 위해서는 많은 양의 바이러스가 존재해야하며 고가의 장비가 필요한 실정이다.

분변가검물에서 소 코로나바이러스를 분리 할 때는 분변 중의 바이러스가 항체와 결합된 형태로 존재하기 때문에 바이러스가 잘 분리되지 않는 경우를 다고 보고하고 있다(Tsunemitsu 등, 1991; Langpap 등, 1979). 효소면역방법과 형광항체법은 소 코로나바이러스 항원을 짧은 시간내 검출할 수 있으나 분변 내에 존재하는 여러가지 비특이적 반응이 작용하여 민감도가 감소한다고 보고하고 있다(Benefied와 Saif, 1990). 국내에

서 안 등(1999)이 ELIS검사법과 RT-PCR검사법을 비교 검사한 결과 95.3%의 양호한 성적을 얻어 분변내 검사방법 확인으로 최적의 검출성적을 나타낸다고 사료된다.

분변 가검물에서 신속하고 간편하게 소 코로나바이러스를 검출하기 위해서는 S1 유전자에 특이적인 Primer를 이용 증폭산물을 얻어 제한분리효소결과 차이가 없다고 보고하여 이용하는데 문제점은 발생하지 않았다(안 등, 1997; 안 등, 1999). 본 실험에서도 간편하고 정확한 RT-PCR검사를 실시하여 증폭산물 확인 결과 455bp로 양성으로 판정하였다

설사 원인체에 대한 세균학적 검사에서는 대장균, 살모넬라, 캄필로박터 등이 복합감염되어 설사증상을 악화시켜 폐사에 이를 수도 있어 조기치료 및 일반대중요법을 병행 실시 해야 효과적인 치료가 가능하다고 사료된다.

본 실험에서는 분리 대장균에 대한 항생제감수성 시험을 실시한 결과 유효항생제는 amikacin (85%), ampicilline (55%), enorfloxacin (70%)로 순으로 감수성이 나타나 유사한 성적으로 조사되었다.

본 조사에서는 송아지 분변 swab에서 신속하고 간편하게 소 코로나바이러스를 검출하고자 RT-PCR법이 개발되어 이를 응용하여 서산태안지역 양축농가의 감염률을 조사하였다. 그 결과 소 코로나바이러스 감염된 것으로 확인된 분변 시료에서 소 코로나바이러스의 특이한 증폭산물을 확인할 수 있었다. 또한 검사결과 설사증상을 나타낸 송아지 분변으로부터 신속하게 소 코로나바이러스를 검출하고 이에 적합한 치료방법을 농가에 제시하고 조기 및 적기에 치료를 유도함으로써 농가의 경제적 손실을 조기에 방지할 수 있는 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

## 결 론

충남 서산·태안지역 소 사육 농가를 대상으로 송아지 설사병 원인체의 일종인 코로나바이러스 감염률 및 항생제 감수성 검사를 실시한 결과 아래와 같은 결과를 얻었다.

송아지 분변에서 코로나 바이러스의 감염률 조사에서는 75건 중 13건이 양성으로 검출되었다. 지역별 감염률에서는 서산 10건, 태안 3건이 각각 검출된 것으로 조사되었다. 송아지 설사병의 연령별 감염률은 1월

령 미만의 송아지에서는 3건 1~3월령에서는 9건, 3월령 이상에서 1건이 각각 검출되었다. 송아지설사 원인균 중 대장균에 대한 항생제 감수성 결과에서는 아미카신, 엔로플록사신, 설파메타진 순으로 조사되었다. 송아지 설사분변에서 코로나바이러스 특이유전자의 RT-PCR 증폭산물(455bp)을 확인되었다.

이상의 결과로 충남 서산·태안 지역에서 사육 중인 송아지의 코로나바이러스 감염률은 17%로 타지역에 비해 높은 감염율을 나타내었으며 송아지 백신사업 지원사업이 계절과 관계없이 농가에 지속적으로 공급되어 사전예방을 통해 농가 경제적 손실을 최소화하여야 한다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 강문일, 한동운, 정동운, 정도영, 이채용, 이정길, 위성환, 조재진. 2001. 한우송아지의 질병발생과 폐사율 조사. *한국가축위생학회지* 24(3): 223-241.
- 강문일. 2008. 가축혈청검사 및 병성감정용 진단액 사용설명서. 국립수의과학검역원.
- 김기석, 진영화, 윤순식, 김재훈, 배유찬, 우계형. 1999. 소 코로나바이러스 설사증 요주의. *대한수의사회지* 35(8): 658-661.
- 김 두, 류영수, 유한상. 1990. 한우 송아지의 포유기간 중의 설사 발생에 관한 연구. *대한수의학회지* 30(2): 255-260.
- 손성완, 장정호, 박봉균. 1991. 소 코로나바이러스 감염증 발생조사. 국립수의과학검역원 시험연구보고서(1991). 111-112.
- 안재문, 조우영, 이종인, 조부제. 1999. RT-PCR기법을 이용한 분변내 소코로나바이러스 검출. *한국가축위생학회지* 22(3): 239-245.
- 안재문, 유기조, 이종인. 1997. 소 Coronavirus 분리에 관한 연구. *한국가축위생학회지* 20(2): 195-203.
- 임종수, 강춘원, 이태욱, 김내영, 정용운, 강문일, 한동운, 최현성, 이채용. 1999. 음성대조 염색법을 이용한 설사 한우송아지 분변내 바이러스양 입자 검색. *한국가축위생학회지* 22(1): 43-52.
- 이상훈, 강주원, 정용운, 이채용, 한동운, 위성환, 윤소라, 조재진, 강문일. 2008. 전남지방의 홀스타인 송아지의 질병발생률 조사. *한국가축위생학회지* 31(4): 521-532.
- 이성효, 한수철, 이종호, 윤여백, 송희중, 채효석. 1997. 설사 및 수포발생 육성 육우에서 바이러스설사·점막병 진단. *한국가축위생학회지* 20(4): 331-338.
- 정정원, 조재진, 조인수. 1997. 국내 송아지 및 성우의 설사변으로부터 소코로나 바이러스 분리 및 특성조사. *국립수의과학검역원, 수의과학논문집(1997)* 39: 11-18.
- 허정호, 조명희, 이국천, 박미남, 조은정, 최만수, 김충희, 강정부, 김의경, 김종수. 2008. 경남 남부지방에서 송아지설사병 원인체 바이러스 검출 조사. *한국가축위생학회지* 31(3): 265-272.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45(4): 493-496.
- Bryant MC. 1972. Antibiotics and their laboratory control. 2nd. ed. Buffer Worth, London: 34-65.
- Benefied DA, Saif LJ. 1990. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J Clin Microbiol* 28: 1454-1457.
- Curit CR, Erb NH, White ME. 1988. Descriptive epidemiology of calfhood morbidity and mortality in New York Holstein herds. *Pre Vet Med* 5: 293-298.
- Holland RF. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin Microbiol Rev* 3: 345-375.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Parmer N. 1993. Pathology of domestic animals. Academic Press, Inc. 4th ed. 2: 184-193.
- Langpap TJ, Bergeland ME, Reed DE. 1979. Coronavirus enteritis of young calves: Virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. *Am J Vet Res* 40(10): 1476-1478.
- Saif LJ, Brock KV, Redman DR, Kohler EM. 1991. Wintery dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet Rec* 128: 447-449.
- Smith DR, Tsunemitsu H, Heckert RA, Saif LJ. 1996. Evaluation of two antigen-capture ELISAs using polyclonal or monoclonal antibodies for the detection of coronavirus. *J Vet Diagn Invest* 8: 99-105.
- Speicher JA, Hepp RE. 1973. Factors associated with calf mortality in Michigan dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 162(6):463-466.
- Tsunemitsu H, Yonemichi H, Hirai T, Kudo T, Onoe S, Mori K, Shimizu M. 1991. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. *J Vet Med Sci* 53(3): 433-437.