

최 종
보 고 서

소 동절기 적리의 국내 발생 역학조사와
진단법 개발

Epidemiological Survey and Development of
Diagnostic Methods for Bovine Winter
Dysentery in Korea

동 신 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “소 동질기 적리의 국내 발생 역학조사와 진단법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 20일

주관연구기관명 : 동신대학교

총괄연구책임자 : 김 계 엽

세부연구책임자 : 김 계 엽

연 구 원 : 김 태 열

연 구 원 : 임 종 수

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 조 경 오

요 약 문

I. 제 목

소 동절기 적리의 국내 발생 역학조사와 진단법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

동절기 적리는 1915년 최초 보고이후 "소 유행성 설사증", "소 동절기 설사증", "소 유행성 장염" 등으로 불리우며 미국을 비롯한 서방 축산 선진국에서 낙농업에 막대한 손실을 초래하는 질병중 하나이다. 원인체로 로타바이러스, 캄필로박터 등으로 알려져 왔으나 최근에 들어서야 이 질환의 원인체가 소 코로나바이러스라는 것으로 규명되었다. 국내에서도 근래 들어 특히 동절기에 우유를 생산하는 젖소나 출하기의 비육우에서 전파성이 강한 급성의 수양성 설사로 인해 축산농가에서 막대한 경제적 피해를 보고 있다. 이러한 질병은 Winter dysentery(동절기 적리)로 의심되는 질병으로서 국내에서는 동절기 적리로 막대한 경제적 피해가 있지만 이에 대한 과학적인 역학조사, 원인 바이러스의 분리 및 동정 등이 미흡한 실정이며, 국외에서도 예방대책이 수립되어 있지 않았다.

코로나바이러스는 동물에서만 크게 문제를 야기하고 있으며, 혈청형에 의해서 4가지 유형으로 구분된다. 제 1혈청형은 돼지의 전염성 장염을 발생시키는 원인체로, 이 질환은 국내에서도 발생하고 있으며, 어린 자돈에 100%에 가까운 발병율과 70% 이상의 폐사율을 야기하고 있기 때문에 국내 양돈업에서 중요하게 다루어지고 있다. 제2 혈청형으로서 가축에서 중요하게 취급되고 있는 것은 소 코로나바이러스 감염증이다. 소 코로나바이러스는 다른 혈

청형 바이러스와는 달리 바이러스의 외막에 제2의 spike인 hemagultin이 있어서 형태학적, 혈청학적 및 유전학적으로 구별이 된다. 제 3혈청형으로는 닭에서 호흡기, 비뇨기 및 산란장애를 유발하는 닭 전염성 기관지염이 있다. 이러한 상기의 세가지 혈청형에 속하지 않는 코로나바이러스로는 최근들어 국내 돼지에 장염을 유발하여 심각한 피해를 야기하고 있는 돼지 유행성 설사증이 있다.

소 코로나바이러스에 의한 장염은 세계적으로 크게 두가지 유형으로 보고되어 있다. 첫째는 송아지에서 설사를 야기하는 송아지 코로나바이러스가 있으며, 둘째는 기온이 낮은 동절기에만 성우인 젖소나 비육우에서 심한 설사를 유발하고 더불어서 유량감소와 체중저하를 일으키는 동절기 적리 코로나바이러스가 있다. 이렇게 송아지나 성우에서 설사를 유발하는 송아지 코로나바이러스와 동절기 적리 코로나바이러스의 감염증은 미국을 비롯하여 캐나다와 가까운 일본에서도 보고 되고 있지만, 이 두 원인체에 대해 비교한 결과 매우 유사하다는 보고가 있는 반면에 혈청학적으로 아주 다르다는 보고가 더욱 많아서 국내는 물론 세계적으로도 이에 대한 확실한 정설이 없는 실정이다.

전파성이 강한 질환에 대해서는 초기의 정확한 진단과 대처가 중요하다. 동절기 적리는 한번 발생하면, 농장 전체의 소에 폭발적으로 전파되어서 심한 수양성 및 혈액성 설사를 유발할 뿐만 아니라 인근 농장에도 쉽게 전파된다. 또한, 동절기 적리의 초기나 후기에는 원인체 바이러스인 코로나바이러스가 극소수 존재하여 진단을 어렵게 한다. 이러한 진단의 애로점과 전파력이 강하다는 특성 때문에 질병이 인근 농장까지 급속히 전파되는 경우가 있다. 따라서, 이러한 문제점을 해결하기 위하여 단시간내에 수백개의 설사 분변 재료를 동시에 진단할 수 있는 기법의 개발뿐만 아니라, 바이러스 수가 극소수로 미량 존재하는 감염 초기나 회복 후기의 분변내에서도 바이러스를 정확히 검출할 수 있는 분자생물학적 기법의 개발이 절실하다. 이와 같은 질환에 대해서는 초기의 정확한 진단과 대처가 필요함과 더불어, 발생 가능성이 있는 농장을 질병 발생 전에 선별할 수 있는 기법의 개발이 중요하다.

사람과 동물에서 일반적으로 혈중의 특정 항체가의 검사를 통하여 앞으로 질병이 발생 가능할 수 있는가를 예측 가능하다. 동절기 적리의 경우에도 마찬가지로 전파성이 강하기 때문에 인근의 농장에서 발생 잠재적으로 발생되고 있는 지역의 경우는 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 항체가를 검사한이 보고되거나 결과를 토대로 예방대책을 수립할 수 있다. 따라서, 다수의 혈액 재료를 동시에 정확하게 항체가를 검사할 수 있는 기법의 개발은 동절기 적리의 발생을 근원적으로 차단할 수 있기 때문에 국내의 동절기 적리의 발생 상황을 비추어 볼 때 절실하다 하겠다.

동절기 적리 코로나바이러스에 대한 분자생물학적 연구는 세계적으로 많이 되어 있지 않다. 최근 몇몇 연구자의 보고에 의하면, 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지 코로나바이러스와 일부의 유전자에서 유사성이 높다고 보고 되어 있지만, 이에 대해서도 국제적으로 논란이 많이 되고 있다. 따라서, 국내에서 발생하고 있는 동절기 적리 코로나바이러스의 유전자에 대한 정확한 염기서열 분석은 단지 원인체의 규명에 의한 예방대책의 수립 등에 의한 경제적인 제고뿐만 아니라, 학문적으로도 크게 공헌 할 것으로 사료된다. 뿐만 아니라, 국내 분리주를 이용한 인공감염 실험을 통한 기병론의 규명은 이 질병의 진행과정이나 숙주의 면역기능 등을 정확히 파악할 수 있어 예방대책의 수립이나 치료대책의 확립에 기여할 수 있어서 의미하는 바가 아주 크다 할 수 있다.

개방화시대에 있어 우리 축산이 살아남기 위해서는 가축의 생산성을 향상시켜야 한다. 한편 국민 경제 수준의 향상에 따른 소득증대는 축산농가의 소득증대에 대한 필요성을 크게 강화시키고 있다. 이러한 시대적 요청에 부응키 위해서는 무엇보다 질병을 근절시킴으로써 생산능력을 향상시켜야 한다.

더욱이 우리 축산업의 사육형태는 가축사육 두수가 증가하고 있음에도 불구하고 농가수는 크게 감소하고 있어 결국 호당 평균사육 두수가 크게 증가하고 있다. 따라서 우리 축산업의 대단위화·전업화 경향(소의 경우; > 50두, 1907호 '92 → 2,796호 '98)은 더욱 가속화될 전망으로 이에 알맞는 질병의 진단 및 예방을 통한 저비용 고효율의 생산 개발이 시급하다.

동절기 적리는 소에서 다발하는 전염성이 매우 높은 질병으로 다량의 수양성 흑갈색 변을 보이며, 높은 이환율(70~100%) 및 폐사율을 나타낸다. 미국을 비롯한 서방 선진국에서도 반세기 이상 소에 전염성이 강한 설사를 일으켜 심각한 경제적 피해를 유발하였다. 축산 선진국에서는 설사, 폐렴, 번식장애라는 동물의 3대 질병중의 하나인 설사성 질환을 근절하기 위해서 막대한 예산을 사용하고 있는 실정이다.

이 질환은 한번 발생하면, 강한 전파력에 의해 농장 전체의 소에 심한 설사를 야기함은 물론 상기한 대로 우유 생산량의 급격한 감소와 출하전의 비육우에서는 심한 체중 감소로 심각한 경제적 피해를 일으킨다. 뿐만 아니라, 생체의 방어기능이 저하되어서 세균 등에 의한 이차감염이 쉽게 일어나 치료를 더욱 어렵게 한다. 따라서, 한번 발생하면 산유량 감소와 체중의 급격한 저하에 의한 직접적인 경제적 손실과 더불어 이 질환의 치료와 전파의 차단을 위한 간접적인 손실까지 고려한다면 실제 그 피해는 매우 심각하다 아니할 수 없다.

국민의 급격한 보건인식 향상에 의해 안정성이 확보된 위생적인 식품에 대한 욕구가 더욱 증가하고 있다. 최근 국내에서 발생한 구제역 파동은 좋은 예라 할 수 있다. 동절기 적리도 한번 발생하면 심각한 경제적 피해를 야기할 뿐만 아니라, 사람에게도 심한 설사나 식중독을 일으킬 수 있는 대장균이나 살모넬라균 등의 이차감염을 쉽게 일으킬 수 있다. 더불어 이와 같은 질병 발생시 치료 약제로 주로 쓰이는 항생물질과 설파제 등의 사용은 식육 및 우유중 잔류로 이어져 “축산물내 안전성 확보”는 우리 축산업이 속히 해결해야 할 문제들이다.

국내 발생 소 동절기 적리의 역학조사와 신속정확한 진단법의 개발을 통하여 적게는 산업적으로 양질의 우유나 식육의 안정적 공급과 크게는 공중보건학적으로 동물에서 사람으로 질병을 근절할 수 있는 안전성이 확보된 위생적인 식품을 제공할 수 있다고 할 수 있다. 결국 생산자인 축산농가에는 경제적 이득과 함께 WTO 협약에 따른 축산농가의 국가 경쟁력 확보로 전환할 수 있으며, 소비자에게는 양질의 축산물을 공급할 수 있어 궁극적으로

국민보건 향상에 기여하는 수단이 될 수 있다.

본 연구에서는 국내에서 발생하고 있는 동절기 적리의 발생 실태와 역학적 조사를 비롯하여 원인체 바이러스의 분리 및 동정, 신속정확한 진단법 개발, 원인체의 인공감염 실험에 의한 기병론 규명 및 분자생물학적인 기법들을 이용한 원인 바이러스 유전자의 염기서열을 분석하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

동절기 적리의 국내 발생현황을 역학적으로 연구하기 위해서는 동절기 적리가 발생한 것으로 추정되는 농장의 소에서 설사분변을 채취하여 원인 바이러스의 검출과 분리가 무엇보다 시급하다 할 수 있다. 동절기 적리가 발생한 소의 설사 분변내에는 일반적으로 다수의 바이러스가 포함되어 있어서 이를 먼저 면역전자현미경으로 검출하여야 한다. 또한, 본 연구진의 선행 연구결과 동절기 적리의 원인체는 어린 송아지에서 설사를 유발시키는 코로나 바이러스와 형태학적으로 유사하지만 송아지에서 발생하고 있는 코로나바이러스 분리배양용 세포주에서는 자라지 않거나 아주 늦게 자란다는 차이가 있다. 따라서, 동절기 적리 바이러스를 분리 배양하기 위해서는 사람의 직장 선암종 유래의 세포주인 HRT-18 세포주를 사용하였다. 이러한, 연구를 통해서 국내에서 발생하고 있는 동절기 적리의 정확한 발생현황과 바이러스의 분리를 시도하였다. 이러한 역학조사 및 바이러스의 분리·동정에 이어 신속정확한 진단법을 개발하였다.

동절기 적리는 한번 발생시 폭발적으로 발생하고 인근 농장까지 순식간에 전파한다는 특징 때문에 신속한 진단법의 개발이 절실하다 하겠다. 또한, 동절기 적리의 초기나 후기에는 바이러스 양이 극소수여서 일반적인 진단법으로는 진단이 어렵다. 이러한 이유로 동절기 적리의 원인체가 극소수에 의해서도 전파성이 강하기 때문에 인근 농장으로 쉽게 전파될 수 있다. 또한, 설사가 끝난 회복기의 소에서도 바이러스가 배출이 되기 때문에 이에 의한 타 농장으로의 전파가 문제가 된다. 따라서, 대량 발생시 신속하게 진단할 수

있는 진단법의 개발과 동시에 극소수의 바이러스까지 정확히 진단할 수 있는 진단법의 개발이 절실하다 하겠다. 본 연구에서는 수백개의 설사분변 재료를 동시에 신속하게 진단할 수 있는 기법으로서 Indirect antigen-capture ELISA를 개발하였다. 이 기법에 사용되는 재료는 저가로서 또한 간단히 수행할 수 있다는 장점이 있어서 실제 동절기 적리를 진단하는데 유용하게 사용할 수 있을 것으로 전망된다.

동절기 적리의 초기나 회복기에는 바이러스의 수가 극소수로 존재하여서 일반적인 진단법으로는 정확하게 진단할 수 없는 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 분자생물학적 기법인 Reverse transcript PCR (RT-PCR)과 Nested PCR 기법을 수립하였다. 본 연구진에 의한 선행 실험 결과 일반적으로 바이러스를 검출하기 위해서 RT-PCR 단독의 진단으로는 상술한 Indirect antigen-capture ELISA보다 바이러스 검출의 감도가 높지만, 초기나 회복기의 감염까지는 정확히 진단할 수 없음을 알 수 있었다. 따라서, 감도를 더욱 높여 초기나 회복기 감염시의 극소수의 바이러스까지 진단할 수 있는 Nested PCR 기법을 개발하였다.

동절기 적리가 발생할 수 있는 농장을 선별할 수 있으면, 바로 예방대책을 수립할 수 있기 때문에 이러한 기법의 개발은 아주 중요하다 할 수 있다. 동절기 적리는 일반적으로 늦가을에서 시작하여 초봄까지 기온이 낮은 계절에 발생하는 특징이 있으며, 특히 농장내 소의 혈액내에서 동절기 적리의 원인체에 대한 항체가 없으면 발생한다. 따라서, 기온이 낮아지기 전에 농장별로 소의 혈중 동절기 적리 원인체에 대한 항체가의 검사를 수행하여, 동절기 적리의 발생을 예측할 수 있는 기법을 개발하였다. 이러한 기법으로는 항체 검출용 ELISA가 있는데, 이는 다수의 혈액 재료를 동시에 신속하게 진단할 수 있는 장점이 있다.

동절기 적리 코로나바이러스에 대한 분자생물학적 연구는 세계적으로 많이 되어 있지 않다. 최근 소수의 보고에 의하면, 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지 코로나바이러스와 일부의 유전자에서 유사성이 높다고 보고 되어 있지만, 이에 대해서도 국제적으로 논란이 많이 되고 있다. 따라서, 국내

에서 발생하고 있는 동절기 적리 코로나바이러스의 유전자에 대한 정확한 염기서열 분석은 단지 원인체의 규명에 의한 예방대책의 수립등에 의한 경제적인 제고뿐만 아니라, 학문적으로 크게 공헌 할 것으로 사료된다. 그래서 국내에서 발생하고 있는 동절기 적리의 원인체인 코로나바이러스의 특성을 규명하기 위하여 분리된 바이러스의 유전자 염기서열을 규명하였다. 코로나 바이러스는 일반적으로 스파이크 단백질을 코드화하는 S 유전자에 변이성이 강하여, 병원성에 영향을 가장 많이 준다고 한다. 따라서 동절기 적리 바이러스의 S 유전자의 염기서열을 검사한 후, 기존의 송아지에서 발생하고 있는 코로나바이러스의 S 유전자와 비교 검사하여 병원성에 영향을 미칠 수 있는 유전자의 변화가 있는지 검사하였다.

동절기 적리에 대한 자세한 기병론은 세계적으로 규명되어 있지 않다. 뿐만 아니라, 송아지 코로나바이러스와 형태학적으로나 혈청학적으로 유사하다는 특징이 있으나 질병의 발병기전이나 병변의 국제 및 바이러스의 배설 기간에 대해서는 아직까지 불명확하다. 따라서, 동절기 적리의 국내 분리주를 이용한 인공감염 실험을 통한 기병론의 규명은 이 질병의 진행과정이나 숙주의 면역기능 등을 정확히 파악할 수 있어 예방대책의 수립이나 치료대책의 확립에 기여할 수 있어서 의미하는 바가 아주 크다 할 수 있다.

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
<p>1. 동절기 적리의 국내 발생 실태조사 및 역학분석과 야외 발생 증례의 병리학적 연구</p>	<p>국내 동절기 적리의 감염실태조사와 역학분석 국내 발생한 동절기 적리 설사분변의 채취 동절기 적리에 이환된 소에서의 혈청채취 전자현미경 기법을 이용한 바이러스의 검출 동절기 적리뿐만 아니라 기타 장염을 유발할 수 있는 바이러스의 검출 동절기 적리에 특이성이 있는 항체를 이용한 면역전자현미경 기법에 의한 바이러스의 검출 야외 발생 증례의 병리학적 연구</p>
<p>2. 동절기 적리 원인 바이러스의 분리·동정과 기타 질환과의 혼합감염여부 조사</p>	<p>HRT-18 세포주를 이용한 바이러스 분리 면역형광항체법을 이용한 분리바이러스의 동정 전자현미경, 면역전자현미경기법에 의한 분리바이러스 동정 다양한 코로나바이러스 항체를 이용한 바이러스의 동정 세균성, 기생충성 감염원과의 혼합감염여부 조사</p>
<p>3. 분자생물학적 기법을 이용한 동절기 적리 바이러스의 유전자 분석</p>	<p>Automatic sequencer을 이용한 국내 분리 동절기 적리 바이러스의 유전자 염기서열 분석 국내 분리 동절기 적리 바이러스의 유전자 염기서열 분석의 결과를 토대로한 바이러스 구조단백질의 아미노산 서열의 분석 국내 분리 동절기 적리 바이러스의 유전자와 국외의 바이러스간(표준균주)의 유전자 변이성 조사 국내 분리 동절기 적리 바이러스 유전자 분석에 의한 표준바이러스주 선택</p>

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
4. 침단기법을 이용한 동절기 적리 진단법 개발	<p>대량의 설사분변을 이용한 신속한 동절기 적리의 진단을 위한 Indirect antigen-capture ELISA 개발</p> <p>분변내에 극소수의 바이러스가 존재하는 초기나 회복기의 소에서의 동절기 적리의 정확한 진단을 위한 RT-PCR 기법의 개발</p> <p>분변내에 극소수의 바이러스가 존재하는 초기나 회복기의 소에서의 동절기 적리의 정확한 진단을 위한 Nested PCR 기법의 개발</p> <p>동절기 적리가 발생할 수 있는 농장의 선별을 위한 항체 검출용 ELISA 기법의 개발</p>
5. 분리 바이러스 인공접종에 의한 동절기 적리 기병론 연구	<p>Antigen-capture ELISA, RT-PCR, Nested PCR 기법을 이용한 분변내 바이러스 배출기간 연구</p> <p>항체 검출용 ELISA 기법을 이용한 혈중 항체가 연구</p> <p>병리조직학적 연구를 통한 병변의 분포 연구</p> <p>면역조직화학적 연구를 통한 바이러스 항원의 국재부위 연구</p> <p>전자현미경적 연구를 통한 바이러스 입자의 세포내 국재 연구</p> <p><i>In Situ</i> Hybridization을 이용한 바이러스 유전자의 세포내 분포 연구</p>

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 소 동절기 적리 코로나바이러스의 진단을 위한 RT-PCR, nested PCR, ELISA기법의 개발, 국내 발생 역학조사 및 원인 바이러스 분리·동정

국내에서 소 동절기 적리가 빈발한다고 추측되고 있으나 아직까지 그 정확한 역학 및 원인체 분리에 대해서는 보고 된 바 없다. 따라서 그 정확한 발생 실태를 조사하기 8개 도에서 소 동절기 적리가 발생한 32개 농장 97개 설사분변에서 바이러스의 검출을 시도하였다. 바이러스의 검출은 고전적인 방법인 전자현미경법 외에도 국내에서는 사용되지 않았던 ELISA, RT-PCR, nested PCR 기법들을 개발·응용하였다. 또한 이러한 기법들에 의해서 강한 양성 반응을 보이는 설사분변에서 소 동절기 적리 바이러스의 분리 및 동정을 시도하였다. 32개 농장 97개 설사분변에서 소 동절기 적리 코로나바이러스는 지속적으로 관찰되었다. 그 외 소 바이러스성 설사병, 소 로타바이러스, 살모넬라 등의 원인체는 이러한 설사분변에서 검출되지 않았으며, 단지 콕시듐만이 간혹 소 동절기 적리바이러스와 동반되어 검출되었다. 10개의 소 동절기 적리 바이러스가 HRT-18G 세포에서 분리되었으며, 이 바이러스 분리주는 세포합포체 형성, 세포 분리 및 괴사 소견을 HRT-18G 세포에서 일으켰다. 감염된 세포를 이용한 면역형광항체법에서 세포질 내에서 소 동절기 적리 바이러스에 대한 강한 양성반응이 관찰되었고, 그 상층액을 전자현미경 및 면역전자현미경으로 관찰한 결과 전형적인 코로나바이러스 입자 및 바이러스 응집체를 관찰하였다. 또한 소 동절기 적리 바이러스에 특이적인 ELISA, RT-PCR, nested PCR 기법을 이용하여 바이러스 감염 상층액을 검사한 결과 특이적인 양성반응을 확인할 수 있었다. 본 연구결과 국내에서는 소 동절기 적리가 빈발하고 있음을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 국내 소 동절기 적리의 조사를 위한 중요한 역학 데이터로서 활용 할 수 있을 것이다.

2. 동절기 적리 소 코로나바이러스 스파이크 당단백질 유전자의 분자생물학적 특성

소 코로나바이러스 스파이크 당단백질 유전자의 분자생물학적 특성에 대한 연구는 오직 미국 및 캐나다에서 분리된 소 코로나바이러스들에 대해서만 비교·분석되었다. 따라서 국내는 물론 미국과 캐나다를 제외한 나라에서 발생하고 있는 소 코로나바이러스의 분자생물학적 특성에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 2002년에서 2004년도에 걸쳐서 분리된 10개의 소 동절기 적리 분리주의 스파이크 당단백질 유전자의 핵산 및 아미노산 염기서열에 대한 분자생물학적 특성을 미국과 캐나다에서 보고된 결과와 비교·분석하였다. 그 결과 prototype Mebus strain과의 핵산염기서열을 비교·분석한 결과 국내 10개 분리주는 S1 subunit와 S2 subunit에서 총 77개와 52개의 핵산 염기서열의 차이가 있었다. 이러한 핵산염기의 변환은 46개 및 21개의 아미노산 치환을 S1 subunit 41개소에서 S1 subunit 20개소에서 일으켰다. 국내 10개 분리주의 전체 S 유전자에 대한 계통분석도에서 모든 국내 소 동절기 적리 분리주는 상호간에 높은 상동성을 보였으며, 또한 호흡기형 소 코로나바이러스주인 OK주와 소화기형 소 코로나바이러스주인 LY-138과 그 염기서열이 매우 밀접함을 알 수 있었다. 반면에 그 외의 소 코로나바이러스주와는 상당한 그 염기서열의 상동성에 차이가 있었다. S1 subunit 내의 추가변부위의 계통학적 분석에서 국내 분리주 모두는 호흡기형 코로나바이러스 OK주와 BCQ3994 그리고 소화기형 코로나바이러스인 LY-138과 같은 클러스터에 포함되었다. 반면에 캐나다 분리주인 송아지 설사 코로나 바이러스 BCQ주 및 소 동절기 적리 바이러스주와 미국 호흡기형 분리주 LSU, 프랑스 소화기형 F15, 비병원성주인 VACC, L9등은 각각 다른 클러스터에 속하였다. 호흡기형 소 코로나바이러스의 특이적인 아미노산 염기서열로 알려진 4개소에서 aa 510, aa 543, aa 578은 국내 소 동절기 적리 코로나바이러스에서도 관찰되었다. 소 코로나바이러스 강독성과 관련되었다는 7개의 아미노산 염기서열은 9개의 국내 분리주에서 관찰되었다. 더욱이

국내 분리주는 외국주와 비교하였을 때, aa 149와 aa 617에서 외국 분리주와는 전혀 다른 유일한 아미노산 변이를 보였다. S2 subunit 내의 첫 번째 소수성 부위를 외국주와 비교하였을 때, 강독주인 국내 분리주와 외국에서 보고된 강독주 모두는 약독주에 비해서 특징적으로 친수성기가 증가하였음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 국내 분리 소 동절기 적리 코로나바이러스는 호흡기형 및 소화기형 소 코로나바이러스의 양쪽 특성을 가지고 있는 바이러스임을 시사하고 있다. 또한 국내 분리주 및 외국의 강독주는 약독주에 비해서 S2 subunit의 첫 번째 소수성기의 친수성기의 증가로 바이러스에 의한 세포의 융합력 증가 혹은 병원성에 차이가 있을 수 있음을 알 수 있었다.

3. 국내 성우에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스의 송아지에 대한 병원성

소 동절기 적리 코로나바이러스는 성우에 전염성이 강한 수양성에서 혈변에 이르는 중증의 설사와 유우에서는 심한 산유량 감소를 유발한다. 최근에 들어서 소 동절기 적리에서 분리한 코로나바이러스를 실험적으로 성우에 접종하였을 때, 소 동절기 적리를 성공적으로 재현하였다. 하지만 소 동절기 적리 코로나바이러스의 인공접종에 의한 소에서의 자세한 병리학적 연구는 전 세계적으로 없다. 더욱이 성우에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스의 송아지에 대한 감수성은 전혀 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스의 송아지에 대한 감수성 및 그 병원성을 규명하기 위해서, 초유를 급여하지 않는 송아지 6마리에 국내 분리주를 구강(40 ml) 및 비강(10 ml)으로 인공접종한 후, 1일령(1두), 3일령(2두), 5일령(1두), 8일령(2두) 때 각각 안락사 시킨 후 각각의 장기를 채취하여 병리학적으로 관찰하였다. 분변 내 바이러스의 배출기간을 확인하기 위하여 각각의 송아지를 안락사 하기 전까지 매일 분변을 채취하여, 소 코로

나바이러스에 특이적인 primer pairs를 이용하여 RT-PCR과 nested PCR과 indirect antigen-capture ELISA를 수행하였다. 또한 소 코로나바이러스에 대한 항체의 생성여부를 확인하기 위하여 접종 전과 안락사 당시에 혈액을 채취하여 indirect antigen-capture ELISA로 소 코로나바이러스에 대한 혈중 항체를 측정하였다. 설사는 접종 익일인 1일령부터 모든 접종 송아지에서 관찰되었으며, 감염 2일령부터는 분비성 설사를 하였다. 바이러스도 감염 1일령부터 RT-PCR에 의해 검출되었으며, 바이러스 배출 기간은 모든 송아지에서 안락사 때까지였다. 각각의 바이러스 접종 실험우의 육안적 소견은 소장 팽대와 장벽의 위축이 특징이었는데, 접종 시간이 지날수록 장벽의 위축은 그 정도가 심하여졌다. 또한 접종 3일령 이후부터는 결장의 충혈과 경도의 출혈도 바이러스 접종 송아지에서 관찰되었다. 소 동절기 적리 바이러스에 감염된 소장의 특징적인 병리조직학적 소견은 용모 상피세포의 탈락 및 괴사, 용모의 위축 및 융합, 음와의 증식, 용모 대 음와 길이의 감소, 고유층의 림프구 침윤이었다. 대장의 특징적인 병리학적 소견은 음와 상피세포의 탈락, 음와의 융합, 고유층의 림프구 및 대식세포의 침윤, 충혈 혹은 출혈이었다. 이러한 기준을 감염된 송아지에 적용하면, 감염초기에는 주로 상부 소장에 더욱 심하였으며, 감염시간이 지날수록 병변의 정도는 점점 하강하여 감염 후기인 5일령과 8일령에서는 대장의 병변이 소장의 병변에 비해서 그 정도가 조금 높았다. 혈중 항체도 접종 전에는 관찰되지 않다가 감염초기부터 점점 상승하기 시작하여 감염 8일령에서는 최고치를 나타내었다. 이상의 결과 국내 분리 소 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지의 소장과 대장에 병변을 유발하여 바이러스의 배출과 설사를 일으킨다고 결론지을 수 있다. 본 연구의 이러한 결과는 차후 소 동절기 적리와 송아지 설사의 방역 및 역학을 규명하는데 있어서 중요한 자료로서 사용될 수 있을 것이다.

4. 국내 도축장 성우에서 채취한 혈청 내 소 코로나바이러스에 대한 항체가 조사

소 코로나바이러스는 송아지 설사, 성우의 동절기 적리, 비육우의 이동에 따른 호흡기 감염을 일으킨다. 본 연구진들은 국내 분리 소 동절기 적리 코로나바이러스가 송아지에 인공접종을 하였을 경우에 소장과 대장에 병변을 일으켜 설사를 유발하며, 이러한 설사분변에 다수의 바이러스 배출이 일어나는 것을 규명하였다. 따라서 역으로 송아지에 설사를 일으키는 코로나바이러스도 성우에서 설사를 일으킬 수 있다는 것을 암시한다. 따라서 송아지가 백신이나 감염에 의해서 소 코로나바이러스에 대한 충분한 항체가 형성되어 있으면 성우가 되어서도 소 동절기 적리의 발생을 예방할 수 있다는 가설을 만들 수 있다. 이러한 상호관계를 규명하기 위한 기초조사로서 성우의 소 코로나바이러스에 대한 혈청가 검사는 그 의미가 있으나, 아직까지 국내 성우에 대한 소 코로나바이러스에 대한 혈청가 조사는 수행되어 있지 않다. 따라서 국내 성우의 소 코로나바이러스에 대한 혈청가 검사를 위해서 겨울(2월10일-23일), 봄(4월 22일-5월 1일), 여름(7월 13일-19일)에 걸쳐서 312두 분의 혈청을 채취하여 소 코로나바이러스에 특이적인 항체를 이용한 indirect antigen-capture ELISA로 혈청가를 검사하였다. 겨울에 채취한 102두 분의 혈청에서는 혈청역가가 12,800이상이었고, 대부분(77.5%)은 혈청역가가 51,200이상이었다. 봄에 채취한 108두 분의 혈청에서는 혈청역가가 3,200 이상이 104두(96.3%)였으며, 51,200 이상의 혈청역가를 보이는 것은 51두(47.2%)을 차지하고 있었다. 그 외에 1,600에서 2두, 25 이하에서 2마리가 관찰되었다. 여름에 채취한 102두 분의 혈청에서는 3,200 이상이 94두(92.2%)였으며, 51,200 이상을 차지하는 혈청도 52두(51.0%)였다. 그 외에 1,600에서 2두, 800에서 2두, 400에서 2두, 25 미만에서 2두가 관찰되었다.

5. 활용에 대한 건의

본 연구를 성공적으로 수행한 결과 동절기 적리를 효과적으로 방제할 수 있는 효율적인 시스템구축이 가능할 것이다. 동절기 적리 진단방법을 개발함으로써 기존 기법의 단점인 검사재료수의 한계성, 낮은 민감도 및 특이성 및 기타 복잡성, 장시간의 진단소요시간 등을 극복할 수 있을 것이다. 이러한 진단기법을 각 연구소나 시험소에 현지 보급화로 조기 방역체계를 확립할 수 있을 것이며. 이러한 원천기술은 타 전염성 질병의 현장 진단 기술에 응용함으로써 동물 질병의 진단, 치료 개발 분야에 첨단기술의 파급으로 진단 및 치료약 개발의 활성화가 기대된다. 또한 바이러스의 유전자 분석기법의 확립으로 유용한 백신주의 선택이 가능하며 이러한 기술은 국내 유용미생물 유전자원 확보에 응용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 동절기 적리의 조기 진단체계의 확립, 예방대책의 확립 및 방역대책을 확립하여 육류와 우유의 고급화 및 생산성을 향상시킴으로써 막대한 경제적 효과를 얻을 수 있을 것이다. 또한, 감염증에 따른 치료비 손실 및 인력낭비 등을 절감할 수 있을 것이다. 본 연구결과 신속 정확한 진단법 및 예방기법을 확립함으로써 치료제 사용 경비절감, 인력낭비 절감, 폐사율 감소, 사료효율 향상, 성장촉진 및 우유와 고기 생산량 증가 등으로 농가의 수익증대에 크게 이바지 할 것이다. 또한 위생적이고 건강한 우유 및 우육의 공급으로 식품의 안정성을 제고하여 소비를 획기적으로 늘릴 수 있는 기회가 될 수 있을 것이다. 학문적으로도 동절기 적리에 대한 백신의 국내개발을 할 수 있는 중요한 자료가 될 수 있으며, 동절기 적리 바이러스의 유전자에 대한 분자생물학적 연구로 야외 병원성 동절기 적리 바이러스와 병원성이 낮아서 백신으로 사용할 수 있는 바이러스의 구별이 가능하게 되며, 이에 따른 장차 백신의 사용시 잔류백신 바이러스의 역학적인 연구가 가능할 것으로 예상된다. 상기와 같은 성과에 힘입어 국내 축산업의 생산성 향상과 경쟁력 제고로 우유 및 우육을 수출산업으로서 지속적인 성장을 가능하게 할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서 개발한 바이러스 검출용 antigen-capture ELISA, 1 step

RT-PCR 및 Nested PCR과 항체 검출용 ELISA 기법들을 각 연구소, 시험소 및 기업의 진단기관에 전수하여 동절기 적리의 진단에 활용토록 할 수 있을 것이다. 특히 다수의 검체를 진단할 수 있는 antigen-capture ELISA 및 항체 검출용 ELISA의 생산 기법을 민간 기업에 기술 이전하여 진단키트를 생산·보급하게 한다. 본 연구에서 개발된 자료들은 백신 제조시 중요한 데이터로써 민간 기업에 이전하여 백신을 개발·생산할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 수행된 동절기 적리의 원인체 분리와 동정 및 역학조사 그리고 진단법 개발 등의 결과를 양축농가에 보급하는 것은 물론 동물약품 및 사료를 판매하는 일선 임상 수의사에 대한 진단법 및 기술정보를 제공하며, 양축농가의 방역에 관한 기술적 지원을 해야 할 것이다. 본 연구에서 수행된 지역별, 연령별 및 생산단계별 동절기 적리 바이러스 감염 실태에 대한 역학적 연구 분석결과는 동절기 적리의 근절 및 예방대책 수립의 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다. 이와 같은 연구를 수행하는 과정에서 개발된 기술들은 돼지, 닭 등 다른 가축 질병의 진단 및 예방에 적극 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

동절기 적리의 국내 발생역학조사와 분자생물학적 기법을 활용한 진단법 개발, 분리 바이러스주의 분자유전학적 특성 규명 및 원인바이러스 생체내 기병론 등의 연구방법 및 결과를 관련 학계, 연구소, 산업계와 협의하여 개발된 기술을 적극 활용할 수 있도록 할 예정이다. 역학조사를 통하여 얻어진 동절기 적리의 국내 발병현황을 축산농가에 적극 홍보하여 이 질병의 근절을 도모할 것이다. 본 연구를 통해 개발된 바이러스 검출용 antigen-capture ELISA와 항체 검출용 ELISA의 진단키트 생산기술을 산업화할 수 있도록 한다. 또한 동절기 적리 바이러스 백신 생산의 중요한 자료로서 산업화 하도록 한다.

SUMMARY

Bovine coronavirus (BoCV), a member of the Coronaviridae family, causes severe diarrhea in newborn calves (CD) and is associated with winter dysentery (WD) in adult cattle. WD is characterized by a sudden onset of diarrhea that rapidly affects many adult cattle in the herd and has been reported in many parts of the world. WD-affected cattle lose body condition and results in a dramatic decrease in milk production.

BoCV has been incriminated by many researchers around the world as a causative agent of WD. Evidence for BoCV as an etiologic agent of WD is circumstantial, often based on the isolation of the virus from WD-affected cattle or on the detection of BoCV in the fecal samples by electron microscope (EM) or on the presence of high antibody titers against the BoCV in the sera of affected cattle. Experimental reproduction of WD in adult cattle has met with difficulties in the past. Recently, however, experimental WD was successfully reproduced in the BoCV-seronegative adult cattle after they had been exposed to a calf experimentally infected with BoCV.

It has been suspected that WD caused by BoCV does occur and causes enormous economic losses in dairy and beef industry of South Korea. However, the exact epidemiology of WD and the causative agent of WD have never been documented. Therefore, we performed to survey the prevalence of WD by using electron microscopy (EM) as well as antigen-capture ELISA, RT-PCR and nested PCR specific for bovine coronavirus (BoCV) from 97 fecal samples of 32 herds with WD collected from 9 provinces during 2002-2004 and to isolate BoCV from the fecal samples positive for BoCV by ELISA, RT-PCR and nested PCR. The BoCV were consistently detected in all herds with WD collected from 9

provinces. Of other pathogens including bovine viral diarrhea virus, rotavirus, salmonella and coccidian oocysts, only coccidian oocysts were inconsistently but concurrently detected with BoCV. Ten WD BoCV were isolated from the fecal samples and exhibited cytopathic effects on inoculated HRT-18G cells and typical morphology of BoCV on electron microscopy. The isolated BoCV was identified as determined by an agglutination of virus particles by IEM with antiserum to BoCV, positive reaction by immunofluorescent test and ELISA using antisera or monoclonal antibodies specific for BoCV, and amplification of BoCV specific nucleocapsid gene by RT-PCR. From these results, it is concluded that WD caused by BoCV occurred in high frequency and was widespread in Korea. The results provide important epidemiological data for the control and establishment the surveillance system of WD in Kore.

BoCV possesses a single-stranded, enveloped, non-segmented RNA genome of positive polarity (De Vries et al., 1997). The virion contains five major structural proteins; the nucleocapsid (N) protein, the transmembrane (M) protein, the hemagglutinin/esterase (HE) protein, the spike (S) protein and the small membrane (E) protein. Although both S and HE glycoproteins of BoCV use N-acetyl-9-O acetyl neuraminic acid as receptor determinant to initiate infection, the S glycoprotein requires fewer of these receptors on the surface of erythrocytes for agglutination than the HE protein . Thus the S glycoprotein is the major hemagglutinin of BoCV ,and it is also proposed to be responsible for the primary attachment of BoCV to other cell surface receptors. The variation in host range and tissue tropism of coronaviruses is largely attributable to variations in the S glycoprotein. The S glycoprotein is a type 1 membrane glycoprotein that carries distinct functional domains near the amino (S1) and carboxy (S2) termini. The S1 subunit is peripheral and is

associated with receptor binding functions, whereas the S2 subunit is a transmembrane protein mediating fusion of viral and cellular membranes. In general, the S glycoprotein facilitates viral attachment to susceptible cells, causes cell fusion, and induces neutralizing antibodies. Of the two functional subunits, S1 and S2 that contain several antigenic domains, S1 appears to most efficiently elicit monoclonal antibodies (Mabs) with higher neutralizing activity.

The biologic and genetic differences are determined in many viruses by the geographic localities and different time points. Like most RNA viruses, coronaviruses are thought to mutate at a high frequency because of the high error frequencies of RNA polymerases. In addition, a unique feature of coronavirus genetics is a high frequency of RNA recombination. For example, a progenitor of the group II coronaviruses acquired the HE gene from an mRNA of influenza C virus and porcine respiratory coronavirus (PRCV) contained point mutations or deletions within the first 250 amino acids (aa) of transmissible gastroenteritis virus S1 which were associated with reduced enteropathogenicity and loss of hemagglutinating activity. The BoCV causing CD, WD and respiratory infection had point mutations or deletions especially in S1 subunit of S glycoprotein. Besides, molecular analysis of S gene of BoCV has been conducted and compared mainly between American and Canadian isolates and/or strains.

In the present study, we analyzed the S glycoprotein gene to characterize ten winter dysentery (WD) coronavirus isolates circulated in Korea during 2002-2003 and compared the nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequences with the other known BoCV. A total of 77 and 52 polymorphic nucleotides were identified in the S1 and S2 subunits of the S glycoprotein of Korean WD isolates compared with the prototype

Mebus strain. These polymorphisms led to 46 and 24 aa substitutions at 41 and 20 distinct sites, respectively. The phylogenetic analysis of the entire S glycoprotein gene revealed that the aa sequences of all Korean WD isolates were more homologous to each other and were very closely related to respiratory bovine coronavirus (RBCV) strain OK and enteric bovine coronavirus (EBCV) strain LY-138 but distinct from the other known BoCVs. Based on the phylogenetic analysis of hypervariable region of S1 subunit, all Korean WD isolates clustered with the respiratory strain OK and BCQ3994 and enteric strain LY-138, while the Canadian BCQ calf diarrhea and WD strains, and the American RBCV LSU, French EBCV F15 and avirulent VACC, L9 and Mebus strains clustered on a separate major branch, respectively. Among four aa sites known for RBCV-specific aa substitutions, aa sequences at aa 510, aa 543 and aa 578 were identical in all Korean WD isolates with RBCV specific sites. Seven virulent specific sites in S gene of BoCV were conserved in 9 Korean WD isolates except for a Korean WD isolate KWD9 having aa substitution at aa 965, leading to increased total charge. Furthermore, all Korean WD isolates had unique aa substitutions at aa 149 and aa 617 of S glycoprotein gene in comparison with all other BoCV. Comparisons of the first hydrophobic region of S2 subunit among virulent and avirulent BoCV represented that virulent BoCVs including all Korean WD isolates had marked increase of hydrophilicity. These data suggest that the WD isolates circulated in Korea had a genetic property of both RBCV and EBCV. In addition, Korean WD isolates as well as virulent BoCVs may have alteration of the fusion activity or pathogenicity due to marked increase of hydrophilicity in the first hydrophobic region.

WD is characterized by huge occurrence in the cattle herds with severe watery to blood diarrhea. Since WD has incriminated by many etiological

agents including *Campylobacter jejuni*, BoCV has been consistently detected or isolated agents by many researchers around the world as a causative agent of WD. However, experimental reproduction of WD in adult cattle has been unsuccessful in the past. Recently, experimental WD was successfully reproduced in the BoCV-seronegative adult cattle after they had been exposed to a calf experimentally infected with BoCV.

The studies on the pathogenicity of BoCV causing calf diarrhea was reported during 1970 decade. However there are no reports about the studies on the pathogenicity of WD BoCV. In addition, the relationships and epidemiology between calf diarrhea and WD BoCV has been still unknown. Therefore, we performed experimental studies in which colostrum-deprived and BoCV-seronegative calves was inoculated with Korean strain of WD BoCV and then sequentially sacrificed at 1, 3, 5, and 8 post-inoculation day (PID), respectively. Each organs and tissues were carefully examined grossly and histopathologically. Fecal virus shedding in each experimental animal was evaluated by antigen-capture ELISA, RT-PCR and nested PCR specific for BoCV. In addition, the change of antibody titer for the BoCV in each experimental animal was checked by indirect antigen-capture ELISA.

Diarrhea was occurred after 1 PID and became more severe as a profuse form after 2 to 3 PID in all experimental animal inoculated with Korean strain of WD BoCV. Grossly, mild atrophy of intestinal wall was only characteristic lesion in the small intestine. Histopathologically, desquamation of villi epithelial cells, atrophy of villi, fusion of villi, increased villi vs crypt ratio, and crypt hyperplasia were detected in the small intestine of BoCV-inoculated experimental animals. Large intestine revealed desquamation of crypt epithelial cells, fusion of each lamina propria, and infiltration of lymphoid cells into lamina propria. At PID 1,

the lesions was more severe in small intestines than those in large intestine. Sequentially lesions of large intestine became severe. Finally both small and large intestine had almost equal severe lesions at PID 5 and 8, respectively. Fecal shedding of BoCV was consistently detected in the feces of BoCV inoculated experimental animals from PID 1 to 8 by nested PCR but not in the feces of mock-inoculated animal. From these results, it is concluded that the Korean strain of WD BoCV had a pathogenicity to calves. These results can provide essential data to make protocols of quarantine and epidemiology of WD and calf diarrhea caused by BoCV in Korea.

Although calf diarrhea, WD in adult cattle, and respiratory infection in beef cattle can be caused by infection of BoCV, the exact co-relationship between these diseases are still obscure. At least, we have clarified that the Korean strain of WD BoCV can cause severe diarrhea in the calf. Therefore, these things can provide that calf diarrhea BoCV can induce WD in the adult cattle on the contrary. How does antibody titer of BoCV play the occurrence of WD in the adult cattle? This question should be solved to make a vaccine program to prevent WD in the adult cattle.

In our previous studies, WD caused by BoCV occurred in high frequency and was widespread in Korea. Moreover, the WD strains circulated in Korea had a genetic property of both RBCV and EBCV and were significantly distinct from the ancestral enteric strain. In the veterinary literature as far as we known, there are no reports to survey the antibody titer of BoCV in the adult cattle in Korea. Therefore we performed to survey the antibody titer of BoCV by indirect antigen-capture ELISA in the adult cattle in Korea using the blood specimens sampled seasonally from the 312 cows submitted to the slaughterhouse, respectively.

In the present study, almost all cows had over the 1,600 antibody titer of BoCV. From the seasonal evaluation of antibody titer of BoCV, the blood samples of winter season had higher antibody titer than that of spring and summer. Age distribution of antibody titer of BoCV revealed no difference between the different age population. By the comparison of antibody titer of BoCV among the cattle submitted from Jeonnam, Jeonbuk, and Gwangju, there were no significant difference of antibody titer of BoCV among these districts. However, Sunchang county in Jeonbuk had more 20.3% cattle with high antibody titer than that of Goksung county in Jeonnam. The discrepancy of BoCV antibody titer between beef (Hanwoo) and dairy (Holstein) cattle was not observed. From these results, the adult cattle in Korea had high antibody titer of BoCV, resulting from high occurrence of BoCV infection even of calf diarrhea or WD and meaning widespread of BoCV (calf diarrhea or WD) infection. These results will provide important epidemiological data for the control and establishment of the surveillance system of WD in Korea.

In conclusion, we have developed advanced techniques (indirect antigen-capture ELISA, RT-PCR, and nested PCR) for the detection of WD BoCV as well as calf diarrhea BoCV in the fecal samples and indirect antigen-capture ELISA for the evaluation of BoCV antibody titer in serum. Moreover, we have clarified the molecular characterization of Korean WD strain of BoCV, the pathogenicity of Korean WD BoCV strain to calves, and seroprevalence of BoCV in the adult cattle.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	37
Section 1. Objectives and significance of the project	37
Section 2. Categories of the project	39
Chapter 2. Literature review and case study	42
Chapter 3. Research contents and Results	43
Section 1. Development of Assays of RT-PCR, nested PCR and ELISA for the Detection of Winter Dysentery Bovine Coronavirus (BoCV), and Detection and Isolation of BoCV Circulated in Korea During 2002-2004	43
1. Introduction	45
2. Materials and methods	46
(1) Fecal sampele	46
(2) Electron microscopic examination	46
(3) BoCV antigen ELISA	47
(4) Extraction of viral RNA	48
(5) Preparation of oligonucleotide primers, RT-PCR and nested PCR....	50
(6) one-step RT-PCR	50
(7) Nested PCR	51
(8) Virus isolation	52

(9) IF test	52
(10) Electron microscopy and Immune electron microscopy	52
3. Result	56
(1) Virus detection by EM	56
(2) By use of a BoCV antigen-capture ELISA	58
(3) Virus detection by RT-PCR and nested PCR	58
(4) Bacteriological and parasitic examination	60
(5) BVD and Rota virus detection by RT-PCR	60
(6) Virus isolation in HRT-18G	60
4. discussion	65
Section 2. Molecular Analysis of S Gene of Spike Glycoprotein of Winter Dysentery Bovine Coronavirus Circulated in Korea During 2002-2004	68
1. Introduction	70
2. Materials and methods	72
(1) Preparation virus	72
(2) Extraction of virus RNA	72
(3) Preparation of RT-PCR primer	73
(4) RT-PCR	73
(5) DNA sequencing	73
3. Result	76
(1) Comparison of S gene sequences between Korean WD isolates	76

(2) Comparison of S gene sequences of Korean WD isolates with other known BoCV strains	76
(3) Comparison of S2 subunit of Korean WD strains with other known BoCV	78
(4) Comparison of RBCV or EBCV strain-specific strains of S gene sequences with other known BoCV strains	79
(5) Comparison of the virulent specific site of S gene sequences with other known BoCV strains	79
4. discussion	85
(1) Phylogenetic comparison of Korean WD isolates with other known BoCV.....	85
(2) Comparison of aa substitutions in hypervariable region between Korean WD isolates and other known BoCV	86
(3) Comparison of putative receptor binding region and S1A immunoreactive region between Korean WD isolates and other known BoCV	87
(4) Amino acid variation surrounding the cleavage site of the S glycoprotein	88
(5) Comparison of S2 subunit of Korean WD isolates with other known BoCV	89
(6) Comparison of the virulent-specific sites of S gene sequences with other known BoCV strain	89
 Section 3. Pathogenicity of Winter Dysentery (WD) Bovine Coronavirus to Calves Isolated from Fecal Samples of WD-Affected Cattle	90
1. Introduction	92

2. Materials and methods	93
(1) Preparation virus	93
(2) Experimental design	93
(3) BoCV antigene ELISA	94
(4) Extraction Viral RNA	95
(5) Preparation of oligonucleotide primers, RT-PCR and nested PCR...	95
(6) One-step RT-PCR	96
(7) Nested PCR	96
(8) ELISA for detection of BoCV antibody.....	97
(9) Histopathological finding	98
3. Result	99
(1) Clinical signs	99
(2) Gross lesions	99
(3) Histopathological finding	99
(4) Shedding of virus in feces	100
(5) Changes of blood antibody titer	100
4. discussion	111
Section 4. Seroprevalence of Bovine Coronavirus in Adult Dairy	
and Beef Cattle	113
1. Introduction	115
2. Materials and methods	117
(1) Blood sample	117
(2) ELISA for detection of BoCV antibody titer	117

3. Result	121
(1) Seasonal distribution of antibody titer of BoCV	121
(2) Total age distribution of antibody titer of BoCV	122
(3) Regional distribution of antibody titer of BoCV	125
(4) Comparison of antibody titer of BoCV between dairy and beef cattle	127
4. discussion	134
Chapter 4. The achievement degree of research goals and the degree of contribution to the related field	136
1. The achievement degree of research goals	136
2. The degree of contribution to the related field	138
Chapter 5. Plan for using research results	140
1. Application	140
2. Industrialized programs	141
Chapter 6. Collection of joreign technique inforamtion	142
1. Comparison of gene sequences of Korean WD isolates with other known BoCV strains	142
2. Comparison of S ₂ subunit of Korean WD strains with other known BoCV	144
3. Comparison of S ₂ subunit of Korean WD isolates with other known BoCV	144

Chapter 7. References145

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	37
제 1절 연구개발의 목적과 필요성	37
제 2절 연구개발의 범위	39
제 2 장 국내외 기술개발 현황	42
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	43
제 1절 소 동절기 적리 코로나바이러스의 진단을 위한 RT-PCR, nested PCR 및 ELISA기법의 개발, 국내 발생 역학조사 및 원 인 바이러스 분리·동정	43
1. 서설	45
2. 재료 및 방법	46
가. 설사분변	46
나. 분변의 전자현미경적 관찰	46
다. 소 동절기 적리 코로나바이러스 검출을 위한 ELISA 기법	47
라. 바이러스 RNA 추출	48
마. 소 동절기 적리 코로나바이러스 검출을 위한 RT-PCR 및 nested PCR용 primer 제작	50
바. RT-PCR 기법의 수행	50
사. Nested PCR 기법의 수행	51
아. 소 동절기 적리 코로나바이러스 분리	52
자. 면역형광항체법을 이용하여 분리한 바이러스의 동정	52
차. 전자현미경 및 면역전자현미경 기법에 의해 분리한 바이러스의 동정	

.....	52
3. 결과	56
가. 전자현미경을 이용한 바이러스 검출	56
나. Antigen-capture ELISA 기법을 이용한 바이러스 검출	58
다. RT-PCR 및 nested PCR 기법을 이용한 소 동절기 적리 코로나바이 러스 검출	58
라. 설사분변 내 세균 및 기생충 검사	60
마. RT-PCR 기법을 이용한 설사분변 내 소 바이러스성 설사병 바이러스 및 로타바이러스 검출	60
바. HRT-18G 세포주를 이용한 바이러스 분리	60
4. 고찰	65
제2절 동절기 적리 소 코로나바이러스 스파이크 당단백질 유전자의 분 자생물학적 특성	68
1. 서설	70
2. 재료 및 방법	72
가. 바이러스	72
나. 바이러스 RNA 추출	72
다. RT-PCR용 primer 제작	73
라. 염기서열 분석을 위한 RT-PCR의 수행과 증폭산물의 정제	73
마. 염기서열 분석	73
3. 결과	76
가. 국내 분리주간의 S유전자 염기서열의 비교	76
나. 국내 분리주와 외국 보고주간의 S유전자 염기서열의 비교	76
다. 국내 분리주와 외국 보고주와의 S2 subunit의 비교	78

라. 국내 분리주와 소화기형 및 호흡기형 바이러스의 특이 염기서열 분석	79
마. 강독주 관련 특이 염기서열의 분석	79
4. 고찰	85
가. 국내 보고주와 외국 보고주간의 계통학적 분석	85
나. 국내 분리주와 외국 보고주간의 hypervariable region의 아미노산 치환의 비교	86
다. 국내 분리주와 외국 보고주간의 수용체 결합부위 및 SIA immunoreactive region의 비교	87
라. S 글라이코단백질 절단부위 주위의 아미노산 차이의 비교	88
마. 국내 분리주와 외국 보고주간의 S2 subunit 부위의 염기서열 비교	89
바. 국내 분리주와 외국 보고주간의 병원성 특이 염기서열의 비교	89
제 3절 국내 성우에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스의 송아지에 대한 병원성	90
1. 서설	92
2. 재료 및 방법	93
가. 바이러스	93
나. 공시동물 및 실험설계	93
다. 소 동절기 적리 코로나바이러스 검출을 위한 ELISA 기법	94
라. 바이러스 RNA 추출	95
마. 소 동절기 적리 코로나바이러스의 검출을 위한 RT-PCR 및 nested PCR용 primer 제작	95
바. RT-PCR 기법의 수행	96
사. Nested PCR 기법의 수행	96

아. 소 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 항체 검출을 위한 ELISA 기 법	97
자. 병리조직학적 검사	98
3. 결과	99
가. 임상소견	99
나. 육안적 소견	99
다. 병리조직학적 소견	99
라. 분변 내 바이러스 배출	100
마. 혈중 항체가 변화	100
4. 고찰	111
제 4절 국내 도축장 성우에서 채취한 혈청 내 소 코로나바이러스에 대 한 항체가 조사	113
1. 서설	115
2. 재료 및 방법	117
가. 혈액 재료	117
나. 소 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 항체 검출을 위한 ELISA 기법	117
3. 결과	121
가. 계절별 소 코로나바이러스에 대한 항체가 변동	121
나. 연령별 소 코로나바이러스에 대한 항체가 변동	122
다. 지역별 소 코로나바이러스에 대한 항체가 변동	125
라. 품종별 소 코로나바이러스에 대한 항체가 변동	127

4. 고찰	134
제4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	136
1. 연구개발 목표의 달성도	136
2. 관련 분야에의 기여도	138
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	140
1. 활용방안	140
2. 산업화 추진방안	141
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보	142
1. 외국분리주와 국내분리주간의 유전자 비교 결과	142
2. 외국 보고주와 국내분리주와의 유전자 S2 subunit의 비교 결과	144
3. 외국 및 국내 강독주 관련 특이 염기서열의 분석 결과	144
제 7 장 참고문헌	145

제 1장 연구개발 과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적과 필요성

동절기 적리는 1915년 최초 보고이후 “소 유행성 설사증”, “소 동절기 설사증”, “소 유행성 장염” 등으로 불리우며 미국을 비롯한 서방 축산 선진국에서 낙농업에 막대한 손실을 초래하는 질병중 하나이다. 최근까지도 원인체로 로타바이러스, 캄필로박터 등으로 알려져 왔으나 최근에 들어서야 이 질환의 원인체가 소 코로나바이러스라는 것으로 규명되었다. 국내에서도 근래 들어 특히 동절기에 우유를 생산하는 젖소나 출하기의 비육우에서 전파성이 강한 급성의 수양성 설사로 인해 축산농가에서 막대한 경제적 피해를 보고 있다. 이러한 질병은 Winter dysentery(동절기 적리)로 의심되는 질병으로서 국내에서는 동절기 적리로 막대한 경제적 피해가 있지만 이에 대한 과학적인 역학조사, 원인 바이러스의 분리 및 동정 등이 미흡한 실정이며, 국외에서도 예방대책이 수립되어 있지 않았다.

코로나바이러스는 동물에서만 크게 문제를 야기하고 있으며, 혈청형에 의해서 4가지 유형으로 구분된다. 제 1혈청형은 돼지의 전염성 장염을 발생시키는 원인체로, 이 질환은 국내에서도 발생하고 있으며, 어린 자돈에 100%에 가까운 발병율과 70% 이상의 폐사율을 야기하고 있기 때문에 국내 양돈업에서 중요하게 다루어지고 있다. 제2 혈청형으로서 가축에서 중요하게 취급되고 있는 것은 소 코로나바이러스 감염증이다. 소 코로나바이러스는 다른 혈청형 바이러스와는 달리 바이러스의 외막에 제2의 spike인 hemagultin이 있어서 형태학적, 혈청학적 및 유전학적으로 구별이 된다. 제 3혈청형으로는 닭에서 호흡기, 비노기 및 산란장애를 유발하는 닭 전염성 기관지염이 있다. 이러한 상기의 세가지 혈청형에 속하지 않는 코로나바이러스로는 최근 들어 국내 돼지에 장염을 유발하여 심각한 피해를 야기하고 있는 돼지 유행성 설사증이 있다.

소 코로나바이러스에 의한 장염은 세계적으로 크게 두가지 유형으로 보고되어 있다. 첫째는 송아지에서 설사를 야기하는 송아지 코로나바이러스가 있으며, 둘째는 기온이 낮은 동절기에만 성우인 젖소나 비육우에서 심한 설사를 유발하고 더불어서 유량감소와 체중저하를 일으키는 동절기 적리 코로나바이러스가 있다. 이렇게 송아지나 성우에서 설사를 유발하는 송아지 코로나바이러스와 동절기 적리 코로나바이러스의 감염증은 미국을 비롯하여 캐나다와 가까운 일본에서도 보고 되고 있지만, 이 두 원인체에 대해 비교한 결과 매우 유사하다는 보고가 있는 반면에 혈청학적으로 아주 다르다는 보고가 더욱 많아서 국내는 물론 세계적으로도 이에 대한 확실한 정설이 없는 실정이다.

동절기 적리는 다자란 젖소나 비육우에서 급성의 심한 혈액성 및 수양성 설사를 특징으로 하며, 급격한 산유량의 감소 및 체중의 저하와 심한 침울 및 빈혈을 수반한다. 한번 발생하면, 전 우군에 걸쳐서 폭발적으로 발생하며, 심하게는 이환된 소가 폐사까지 이른다. 또한 전파력이 매우 강하여서 인근의 농장까지 순식간에 전파될 수도 있어서, 경제적으로 매우 심각한 피해를 일으킨다. 하지만 동절기 적리의 국내에서 정확한 발생상황이나 송아지 코로나바이러스 감염증과의 명확히 구분할 수 있는 자세한 연구가 되어 있지 않아, 국내에서도 동절기 적리의 정확한 발생 상황과 역학 조사와 더불어 원인 바이러스인 동절기 적리 코로나바이러스의 분리 및 동정이 수행되어야 한다.

동절기 적리는 한번 발생시 폭발적으로 발생하고 인근 농장까지 순식간에 전파한다는 특징 때문에 신속한 진단법의 개발이 절실하다 하겠다. 또한, 동절기 적리의 초기나 후기에는 바이러스 양이 극소수여서 일반적인 진단법으로는 진단이 어렵다. 또한 전파성이 강하기 때문에 인근 농장으로 쉽게 전파될 수 있다. 설사가 끝난 회복기의 소에서도 바이러스가 배출이 되기 때문에 이에 의한 타 농장으로의 전파가 문제가 된다. 따라서, 대량 발생시 신속하게 진단할 수 있는 진단법의 개발과 동시에 극소수의 바이러스까지 정확히 진단할 수 있는 진단법의 개발이 절실하다 하겠다. 동절기 적리의 초기나 회복기에는 바이러스의 수가 극소수로 존재하여서 일반적인 진단법으로는 정

확하게 진단할 수 없는 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 분자생물학적 기법들을 활용하여 손쉽게 정밀진단 할수 있는 기법이 시급한 실정이다.

동절기 적리 코로나바이러스에 대한 분자생물학적 연구는 세계적으로 많이 되어 있지 않다. 최근 소수의 보고에 의하면, 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지 코로나바이러스와 일부의 유전자에서 유사성이 높다고 보고 되어 있지만, 이에 대해서도 국제적으로 논란이 많이 되고 있다. 따라서, 국내에서 발생하고 있는 동절기 적리 코로나바이러스의 유전자에 대한 정확한 염기서열 분석은 단지 원인체의 규명에 의한 예방대책의 수립 등에 의한 경제적인 제고뿐만 아니라, 학문적으로 크게 공헌 할 것으로 사료된다.

동절기 적리에 대한 자세한 기병론은 세계적으로 규명되어 있지 않다. 뿐만 아니라, 송아지 코로나바이러스와 형태학적으로나 혈청학적으로 유사하다는 특징이 있으나 질병의 발병기전이나 병변의 국제 및 바이러스의 배설 기간에 대해서는 아직까지 불명확하다. 따라서, 동절기 적리의 국내 분리주를 이용한 인공감염 실험을 통한 기병론의 규명은 이 질병의 진행과정이나 숙주의 면역기능 등을 정확히 파악할 수 있어 예방대책의 수립이나 치료대책의 확립에 기여할 수 있어서 의미하는 바가 아주 크다 할 수 있다.

제 2절 연구개발의 범위

1. 동절기 적리의 국내 발생 실태조사 및 역학분석과 야외 발생 증례의 병리학적 연구

- 가. 국내 동절기 적리의 감염실태조사와 역학분석
- 나. 국내 발생한 동절기 적리 설사분변의 채취
- 다. 동절기 적리에 이환된 소에서의 혈청채취
- 라. 전자현미경 기법을 이용한 바이러스의 검출
- 마. 동절기 적리뿐만 아니라 기타 장염을 유발할 수 있는 바이러스의 검출

- 바. 동절기 적리에 특이성이 있는 항체를 이용한 면역전자현미경 기법에 의한 바이러스의 검출
- 사. 야외 발생 증례의 병리학적 연구

2. 동절기 적리 원인 바이러스의 분리·동정과 기타 질환과의 혼합감염여부 조사

- 가. HRT-18 세포주를 이용한 바이러스 분리
- 나. 면역형광항체법을 이용한 분리바이러스의 동정
- 다. 전자현미경, 면역전자현미경기법에 의한 분리바이러스 동정
- 라. 다양한 코로나바이러스 항체를 이용한 바이러스의 동정
- 마. 세균성, 기생충성 감염원과의 혼합감염여부 조사

3. 분자생물학적 기법을 이용한 동절기 적리 바이러스의 유전자 분석

- 가. Automatic sequencer을 이용한 국내 분리 동절기 적리 바이러스의 유전자 염기서열 분석
- 나. 국내 분리 동절기 적리 바이러스의 유전자 염기서열 분석의 결과를 토대로 한 바이러스 구조단백질의 아미노산 서열의 분석
- 다. 국내 분리 동절기 적리 바이러스의 유전자와 국외의 바이러스간(표준군주)의 유전자 변이성 조사
- 라. 국내 분리 동절기 적리 바이러스 유전자 분석에 의한 표준 바이러스주 선택

4. 첨단기법을 이용한 동절기 적리 진단법 개발

- 가. 대량의 설사분변을 이용한 신속한 동절기 적리의 진단을 위한 Indirect antigen-capture ELISA 개발
- 나. 분변내에 극소수의 바이러스가 존재하는 초기나 회복기의 소에서의 동절기 적리의 정확한 진단을 위한 RT-PCR 기법의 개발
- 다. 분변내에 극소수의 바이러스가 존재하는 초기나 회복기의 소에서의 동절

- 기 적리의 정확한 진단을 위한 Nested PCR 기법의 개발
- 라. 동절기 적리가 발생할 수 있는 농장의 선별을 위한 항체 검출용 ELISA 기법의 개발

5. 분리 바이러스 인공접종에 의한 동절기 적리 기병론 연구

- 가. Antigen-capture ELISA, RT-PCR, Nested PCR 기법을 이용한 분변내 바이러스 배출기간 연구
- 나. 항체 검출용 ELISA 기법을 이용한 혈중 항체가 연구
- 다. 병리조직학적 연구를 통한 병변의 분포 연구
- 라. 면역조직화학적 연구를 통한 바이러스 항원의 국제부위 연구
- 마. 전자현미경적 연구를 통한 바이러스 입자의 세포내 국제 연구
- 사. *In Situ* Hybridization을 이용한 바이러스 유전자의 세포내 분포 연구

제 2장 국내외 기술개발 현황

동절기 적리는 국내에서 많은 발생으로 막대한 경제적 손실이 있다고는 알려져 있지만 이에 대한 실질적인 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 이에 대한 발생 역학조사와 원인체의 분리·동정 및 특성조사나 신속·정확한 진단법의 개발 등은 국내에서는 시도되지 않았다. 해외에서도 최근 들어서야 바이러스의 분리를 통한 진단이 보고 되어 있다. 하지만, 바이러스의 분리 동정은 통상 2-3주간 이상의 시간이 소요되어 실제 발생하고 있는 동절기 적리의 진단으로는 문제점이 많다. 그래서 수백개의 재료를 한꺼번에 그것도 단시간내에 진단할 수 있는 신속한 기법의 개발이 시급하다 할 수 있다. 뿐만 아니라, 바이러스의 수가 적은 초기나 회복단계의 감염까지 정확하게 진단할 수 있는 분자생물학적 기법의 개발도 절실하다 하겠다.

이상에서 언급한 국내의 현황들과 연구내용에서 제시된 연구내용들은 동절기 적리의 예방 및 근절을 위해서는 반드시 수행되어야 할 과제로 국내에서 시급히 연구되어야 할 것으로 사료된다.

동절기 적리에 대한 발생역학 조사를 시작으로 원인체 분리·동정이나 특성조사, 기병론 연구 및 진단법 개발 등의 체계적이고 지속적인 연구가 이루어져야 하는 이유는 만성적으로 감염될 경우 그 경제적 손실이 매우 클 뿐 아니라 특별한 근절 대책이 없는 한 농장에서 이웃 농장으로 전파가 용이하다는 특징으로 피해가 거의 영구적으로 일어난다는 점이다. 외국에서도 최근 들어서야 원인체를 분리되었다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 소 동절기 적리 코로나바이러스의 진단을 위한 RT-PCR, nested PCR 및 ELISA기법의 개발, 국내 발생 역학조사 및 원인 바이러스 분리·동정

Development of Assays of RT-PCR, nested PCR and ELISA for the Detection of Winter Dysentery Bovine Coronavirus (BoCV), and Detection and Isolation of BoCV Circulated in Korea During 2002-2004

국내에서 소 동절기 적리가 빈발한다고 추측되고 있으나 아직까지 그 정확한 역학 및 원인체 분리에 대해서는 보고 된 바 없다. 따라서 그 정확한 발생 실태를 조사하기 8개 도에서 소 동절기 적리가 발생한 32개 농장 97개 설사분변에서 바이러스의 검출을 시도하였다. 바이러스의 검출은 고전적인 방법인 전자현미경법 외에도 국내에서는 사용되지 않았던 ELISA, RT-PCR, nested PCR 기법들을 개발·응용하였다. 또한 이러한 기법들에 의해서 강한 양성 반응을 보이는 설사분변에서 소 동절기 적리 바이러스의 분리 및 동정을 시도하였다. 32개 농장 97개 설사분변에서 소 동절기 적리 코로나바이러스는 지속적으로 관찰되었다. 그 외 소 바이러스성 설사병, 소 로타바이러스, 살모넬라 등의 원인체는 이러한 설사분변에서 검출되지 않았으며, 단지 콕시듐만이 간혹 소 동절기 적리바이러스와 동반되어 검출되었다. 10개의 소 동절기 적리 바이러스가 HRT-18G 세포에서 분리되었으며, 이 바이러스 분리주는 세포합포체 형성, 세포 분리 및 괴사 소견을 HRT-18G 세포에서 일으켰다. 감염된 세포를 이용한 면역형광항체법에서 세포질 내에서 소 동절기 적리 바이러스에 대한 강한 양성반응이 관찰되었고, 그 상층액을 전자현미경

및 면역전자현미경으로 관찰한 결과 전형적인 코로나바이러스 입자 및 바이러스 응집체를 관찰하였다. 또한 소 동절기 적리 바이러스에 특이적인 ELISA, RT-PCR, nested PCR 기법을 이용하여 바이러스 감염 상층액을 검사한 결과 특이적인 양성반응을 확인할 수 있었다. 본 연구결과 국내에서는 소 동절기 적리가 빈발하고 있음을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 국내 소 동절기 적리의 조사를 위한 중요한 역학 데이터로서 활용 할 수 있을 것이다.

1. 서 설

코로나바이러스과에 속하는 소 코로나바이러스는 송아지 설사를 일으키며, 성우의 동절기 적리에 관여한다고 보고 되고 있다. 소 동절기 적리는 성우 군집에서 급성의 심한 설사로 특징지을 수 있으며, 세계 많은 나라에서 그 발생이 보고 되고 있다. 소 동절기 적리에 감염된 성우는 심한 설사와 그로 인해 유우에서는 심각한 우유생산량 감소를 일으킨다.

소 코로나바이러스는 소 동절기 적리의 원인체로서 세계 많은 나라의 연구자들에 의해서 지적되고 있다. 이러한 증거로 소 동절기 적리가 발생한 설사분변에서 소 동절기 적리 코로나바이러스가 전자현미경에 의해서 검출되었고, 세포에서 분리되었으며, 감염된 소의 혈청에서 바이러스 항체가 형성된 것이다. 소 동절기 적리의 성우에서의 재현 실험은 그동안 실패로 끝났었지만, 최근 소 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 항체가 없는 성우에서 성공적으로 재현시키기도 하였다.

국내에서 그동안 소 코로나바이러스에 의해 소 동절기 적리가 육우뿐만 아니라 유우에서도 발생하여 막대한 경제적 피해가 발생되고 있다고 추정되고 있었다. 하지만 소 동절기 적리의 정확한 역학 및 그 원인체에 대한 보고는 없는 실정이었다. 따라서 본 연구진은 전자현미경, ELISA, RT-PCR, nested PCR 기법을 이용하여 국내 소 동절기 적리의 발생현황을 조사하며, 이러한 설사분변에서 바이러스의 분리를 시도하였다.

2. 재료 및 방법

가. 설사분변

국내 8개 도 32개 농장에서 발생한 소 동절기 적리에 이환된 성우에서 97개의 설사분변을 2002년 11월말부터 2004년 2월말까지 채취하였다. 설사에 이환된 소의 연령은 10개월령부터 8세령까지 다양하였다.

설사분변 내 *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., *Mycobacterium paratuberculosis*의 검출을 위하여 선택배지를 통한 배양을 시도하였다. 또한 분변 내 *Eimeria* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., 검출은 부유법 및 침전을 사용하였다. 이러한 초기 검사를 수행한 후, 분변을 유지배양액(1% Na bicarbonate, 1% penicillin과 streptomycin이 포함된 minimum essential medium)으로 10배 희석하여 30초간 vortex하였다. 분변 희석액은 1200 g에서 20분간 원심한 후, 바로 실험에 사용하든가 아니면 사용 때까지 -70℃에서 보관하였다.

나. 분변의 전자현미경적 관찰

분변 내에서 동절기 적리 바이러스인 코로나바이러스를 검출하기 위해서 분변을 0.45 μm 필터로 여과시킨 PBS로 5배 희석 한 후, 2분간 강하게 Vortex 시켰다. 4℃ 2000 rpm에서 30분간 원심 한 후, 상층액을 새 튜브내로 옮겼다. 상층액을 4℃ 25000 rpm에서 60분간 초고속원심한 후, 상층액을 조심히 전부 버린 후에 여과시킨 DDW 1 ml을 넣고 강하게 60초간 Vortex한다. 4℃ 25000 rpm에서 35분간 재차 초고속 원심한다. 원심하는 동안에 잠금장치가 있는 전현용 핀셋으로 그리드를 잡아서 고정 시켜 고정시켜 놓는다 (한번에 최대 3장의 그리드를 동시에 염색할 수 있다.). 상층액을 조심히 파스텔 피펫으로 완전히 버린다. 25 μl 의 여과된 3차 증류수를 튜브내에 넣은후 잘 섞는다. 25 μl 의 여과된 3% PTA 용액을 넣는후, 피펫으로 잘 혼합한다. 25 μl 의 바이러스-염색액 혼합액을 폰바필름이 덮여있는 그리드 위에 조심히 놓고 2분간 정치한다. 여분의 그리드 위의 용액을 제거한 후 건조한

다. 전자현미경으로 90-150 nm 크기의 코로나바이러스 입자를 관찰하였다. 또한 기타 설사를 유발하는 바이러스들을 관찰하였다.

다. 소 동절기 적리 코로나바이러스 검출을 위한 ELISA 기법

분변 내 소 동절기 적리 코로나바이러스의 배출을 측정하기 위하여 indirect antigen-capture ELISA를 개발하였다. 즉 96-well flat-bottom microtiter plates에 소 코로나바이러스의 nucleocapside, spike 및 hemagglutinin/esterase 단백질에 대한 특이 단클론 항체를 각각 8000씩 희석하여 100 μ l을 각 컬럼의 모든 well에 분주한 후에 15시간 동안 4°C 냉장고에서 정치하였다. 그 후, 단클론 항체의 비특이 반응을 극소화시키기 위해서 5% nonfat, dry milk를 각 well에 200 μ l씩 분주한후, 상온에서 2시간 작용시킨다. 여기에 분리된 동절기 적리 원인바이러스를 각각 컬럼의 a, b, e, f well에 100 μ l씩 분주하고, 바이러스가 포함되지 않은 정상 배양액인 EMEM은 각 컬럼의 c, d, g, h well에 분주한다. 분주가 끝나면, 상온에서 1시간 PBS pH 7.4로 10배 희석한 분변 상층액을 plate의 각 well의 밑에 흡착시켰다. 이 반응이 끝난 후에 소에서 제작한 소 코로나바이러스에 대한 단클론 항체를 각각의 컬럼 4개의 well에 100 μ l씩 분주하였다. 첫번째 컬럼의 4개 well과 2번째 컬럼의 4개 well은 각각 양성 및 음성대조로 사용한다. 상온에서 1시간 정치 후에, 각 well에 horseradish peroxidase가 부착된 소 IgG 항체에 대한 염소에서 제작된 항혈청을 4000배 희석하여 분주하고 1시간 정치하였다. 상기의 각 단계사이에는 각각의 well을 PBST로 3회간 각각 10분씩 세척한다. 항원의 검출을 위해서 발색제로는 최종농도가 0.03%인 과산화수소수가 포함된 ABTS 100 μ l을 각각의 well에 분주하였다. 15분간 정치한 후에 414 nm의 파장에서 흡광도를 측정한 후, 이들 결과를 자동으로 판독할 수 있는 컴퓨터에서 흡광도가 양성 단클론 항체가 들어있는 well의 흡광도 수치에서 음성 항체가 들어있는 well의 흡광도의 수치가 평균 0.03 이상일 때는 양성으로 판정하였다. 이러한 반응을 Fig 1에 보여주고 있다.

라. 바이러스 RNA 추출

RT-PCR 기법을 개발하기 위해서 무엇보다 먼저 분변내의 동절기 적리 원인체인 코로나바이러스의 RNA를 효율적으로 추출할 수 있어야한다. 또한, 분변내에는 PCR을 억제하여 실제 해당 원인이체가 다수 들어있음에도 불구하고 RT-PCR에 위음성으로 나오는 경우가 자주 있으므로 이를 해결하여야 한다. 이러한 것을 해결하기 위해서 바이러스 RNA의 추출을 다음과 같이 수행하였다. 분변을 PBS로 5배 희석한 후에 4C 3000 rpm에서 30분간 원심 분리한다. 분변 상층액 200 μ l에 500 μ l의 Solution D(4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM Sodium citrate, pH7, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)와 50 μ l 2M sodium acetate(pH4.0)을 넣고 강하게 vortex하였다. 여기에 500 μ l의 water saturated phenol(pH4.5)와 100 μ l의 chloroform과 isoamylalcohol(49:1)을 넣고 강하게 vortex를 한 후에 얼음속에 15분간 정치하였다. 이들 혼합액은 4 $^{\circ}$ C 15000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상층액 700 μ l을 새 에펜돌프 튜브에 옮긴 후 여기에 Rnaid kit(BIO 101사)내의 binding solution 700 μ l와 matrix solution 15 μ l을 넣고 강하게 vortex한다. 상온에서 10분간 정치하면서 가끔 위아래로 흔들어가면서 혼합액이 잘 섞이도록 하였다. 이들 혼합액을 4 $^{\circ}$ C 10000 rpm에서 2분간 원심한 후, 상층액을 버린다. 튜브밑의 침전물은 kit내의 세척액으로 3회 원심 및 상층액 제거를 통해서 세척하였다. 세척이 끝나면 튜브밑의 침전물에 50 μ l의 DEPC 처리 멸균증류수를 넣고 잘 혼합한 후 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하여 matrix에 결합한 바이러스 RNA가 분리되도록 하였다. 분리가 끝나면, 상온에서 3분간 15000 rpm에서 원심분리하여 matrix를 침전시키고, 상층액만 조심히 깨끗한 에펜돌프 튜브로 옮겨서 사용때까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

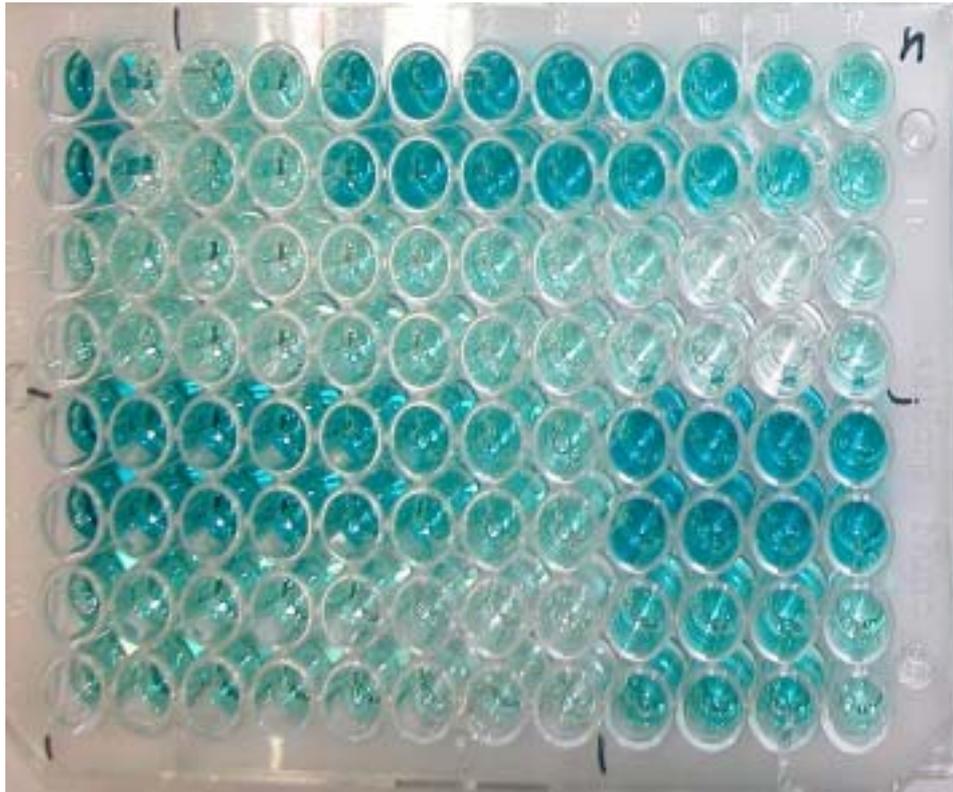


Fig 1. Indirect antigen-capture ELISA for the detection of bovine coronavirus in the fecal samples. Column No. 1 and well no. a-d are used for the positive control. Column No. 2 and well no. a-d are used for the negative control. Each sample needs 4 wells.

마. 소 동절기 적리 코로나바이러스의 검출을 위한 RT-PCR 및 nested PCR용 primer 제작

소 코로나바이러스의 유전자 중에서 nucleocapside 단백질에 대한 유전자가 보존성이 높다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에 사용할 primer쌍들은 GeneBank에 보고된 소 코로나바이러스주중에서 Mebus 주를 검색하여 사용하였다(Table 1).

소 코로나바이러스의 유전자 중에서 S 글라이코단백질 유전자가 변이가 자주 발생하여 세포의 친화성과 병원성에 영향을 준다고 한다. 따라서 본 실험의 진단용 외에 유전자의 변이를 검출하기 위해 PR-PCR 및 nested PCR 용 primer를 제작하였다(Table 2). 그 외에 진단용과 유전자 변이를 알아보기 위해서 HE gene과 M gene에 대해서도 primer pairs를 제작하였다(Table 2).

바. RT-PCR 기법의 수행

본 실험에서는 동절기 적리의 원인체인 코로나바이러스의 검출을 위해서 기존에 보고된 RT-PCR 기법의 응용뿐만 아니라 간단히 적용할 수 있는 RT-PCR 기법을 수행하였다. 먼저 기존에 보고된 RT-PCR 기법을 수행하기 위해서 상술한 바대로 추출된 바이러스 RNA용액 10 μ l에 RT-PCR용 downstream primer (50 pmol) 2 μ l을 첨가하고 100 $^{\circ}$ C에서 2분간 정치하고 얼음위에서 5분간 정치하여 3차원 구조의 바이러스 RNA를 1차원 구조로 변형 시킨다. 이 혼합액에 4 μ l의 5X RT buffer [250 mM tris-HCl (pH8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 1 μ l의 0.1 M dithiothreitol, 2 μ l의 10 mM dNTPs, 0.5 μ l의 RNAsin(Promega사)와 0.5 μ l의 AMV RT(Promega사)을 넣고 잘 섞은 후에 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 작용시켰다. 이 혼합액 10 μ l를 PCR 혼합액 40 μ l와 혼합시킨다. PCR 혼합액은 5 μ l 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin], 1 μ l 10 mM dNTPs, 0.5 μ l Upstream primer (50 pmol), 0.5 μ l downstream primer (50 pmol), 32.5 μ l 증류수 그리고 0.5 μ l Taq polymerase (Promega사)로 구

성되어 있다. 이들 혼합액은 94℃에서 5분간 preheating한 후에 94℃에서 1분, 58℃에서 1분, 72℃에서 1분의 cycle을 35회 PCR thermocycler에서 한 후 최종적으로 72℃에서 7분간 반응시켜서 반응의 강도를 높인다. RT-PCR 산물은 ethidium bromide에 염색된 1.5% agarose gel에서 확인하였다.

기존의 RT-PCR 기법에 비해서 민감도는 같으나 간단히 수행할 수 있는 1 step RT-PCR 기법을 확립하였다. 즉, 추출한 바이러스 RNA 5 μ l에 1 μ l의 DMSO를 넣어서 70℃에서 10분 반응시킨 후, 5분간 얼음위에서 반응을 정지시켰다. 여기에 44 μ l의 RT-PCR 혼합액을 넣고 잘 혼합시킨다. RT-PCR 혼합액은 5 μ l의 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin], 1 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l Upstream primer (50 pmol), 1 μ l downstream primer (50 pmol), 0.5 μ l의 AMV RT(Promega사), 0.5 μ l의 RNAsin (Promega사), 24.5 μ l의 증류수 그리고 0.5 μ l Taq polymerase (Promega사)로 구성되어 있다. PCR thermocycler내에서 42℃ 60분간 RT반응을 한 후에, 94℃에서 5분간 preheating 한다. PCR cycle은 94℃에서 1분, 58℃에서 1분, 72℃에서 1분의 cycle을 35회로서 최종적으로 72℃에서 7분간 반응시켜서 반응의 강도를 높인다. RT-PCR 산물은 ethidium bromide에 염색된 1.5% agarose gel에서 확인하였다.

사. Nested PCR 기법의 수행

동절기 적리 진단의 민감도와 특이성을 높이기 위해서 Nested PCR 기법을 확립하였다. 즉, RT-PCR 산물 5 μ l에 45 μ l의 PCR 혼합액을 잘 혼합한다. PCR 혼합액은 5 μ l의 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin], 1 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l upstream primer (50 pmol), 1 μ l downstream primer (50 pmol), 36.5 μ l의 증류수 그리고 0.5 μ l Taq polymerase (Promega사)로 구성되어 있다. PCR thermocycler내에서 94℃에서 5분간 preheating 한후, PCR cycle은 94℃에서 1분, 58℃에서 1분, 72℃에서 1분의 cycle을 30회하고 최종적으로 72℃에서 7분간 반응시켜서 반응의 강도를 높인다. Nested PCR 산물은 ethidium

bromide에 염색된 1.5% agarose gel에서 확인하였다.

아. 소 동절기 적리 코로나바이러스 분리

동절기 적리 코로나바이러스를 분리하기 위해 먼저 6 well plate에서 4일간 배양하여 monolayer가 형성된 HRT-18 세포주를 3시간동안 소 혈청이 들어있지 않는 Eagle's minimum essential medium (EMEM)으로 세척하였다. 0.45 μm 필터에 여과된 200 μl 분변액을 6 well plate에 각각 주입하고 가끔 흔들어 주면서 37°C CO₂ 배양기에서 1시간동안 바이러스의 흡착을 시켰다. 흡착이 끝난 후 소 혈청이 들어있지 않는 EMEM배양액 3 ml을 넣고 최종농도가 5 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 Pancreatin을 첨가한 후 37°C CO₂ 배양기에서 3-4일간 배양한다. 세포변성효과(CPE)가 관찰되면, Liquid-limiting dilution 방법으로 바이러스의 clone을 만든 후 HRT-18 세포주의 monolayer가 형성된 plask에 분주하고 CPE가 80%가 되었을 때, 3차례 freeze-thaw를 한 후 배양액을 수거하였다. 배양액은 4°C 3000 rpm에서 30분간 원심하여 세포찌꺼기를 제거하고, 상층액은 다시 sucrose 원심을 하여 바이러스를 정제하여 차후 연구에 사용한다. 만약, CPE가 관찰되지 않으면 10회까지 blind passage를 수행한다.

자. 면역형광항체법을 이용한 분리한 바이러스의 동정

HRT-18 세포가 monolayer 되어 있는 96 well plate에 바이러스를 분주 후 배양하고 3일후에 80% 아세톤으로 고정하였다. PBS로 3회 조심히 세척한 후에 동절기 적리 바이러스에 대한 형광항체가 부착된 항체를 1시간 작용시킨 후에 PBS로 세척한 후에 60% 글리세롤로 봉입하고 형광현미경으로 검정하였다.

차. 전자현미경 및 면역전자현미경 기법에 의한 분리한 바이러스의 동정

상술한 전자현미경 기법을 이용하여 분리한 바이러스의 동정에 사용하였

다. 즉, liquid-limiting dilution으로 clone화한 바이러스 상층액을 바로 상술한 바대로 원심 및 초원심분리하여 전자현미경 및 면역전자현미경 기법을 이용하여 바이러스를 검출하였다.

면역전자현미경 기법의 수순은 전자현미경 수순과 거의 유사하다. 즉 상술한 바대로 희석 분변을 3000 rpm에서 원심분리한 후 상층액 1000 μ l을 소코로나바이러스의 항혈청으로 혈청농도가 10000이 되도록 희석되게 한 후 9시간 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 결합시킨다. 분변과 혈청 혼합액을 4 $^{\circ}$ C 25000 rpm에서 1시간 초고속 원심한 후 상층액을 조심히 버린다. 튜브 밑의 침전물은 다시 멸균증류수로 잘 혼합한 후, 35분간 재차 초고속원심하였다. 이후의 수순은 전자현미경수순과 동일하다.

Table 1. The oligonucleotide primers designed from the HE, S, M, and N genes of the BoCV Mebus strain (GenBank accession No. M31053) used for RT-PCR and nested PCR, respectively

Name	Sequence	Region	Product size
HEAF ^a	CCA TGT TTT TGC TTC TTA GAT TTG	22354-23064	712 bp
HEAR ^b	TTC AAT AAA GAC ACT GGT GTT ATT TA	(HE gene)	
HEBF	TGA CGA GTA TAT CGT ACC ACT T	22958-23843	685 bp
HEBR	CTA AGC ATC ATG CAG CCT AGT ACC	(HE gene)	
SAF	ATG TTT TTG ATA CTT TTA ATT TCC	23641-27732	920 bp
SAR	ACA CCA GTA GAT GGT GCT AT	(S gene)	
SBF	GGG TTA CAC CTC TCA CTT CT-3	24422-25190	769 bp
SBR	5'-GCA GGA CAA GTG CCT ATA CC-3'	(S gene)	
SCF	5'-CTG TCC GTG TAA ATT GGA TG-3'	25099-25926	828 bp
SCR	5'-TGT AGA GTA ATC CAC ACA GT-3'	(S gene)	
SDF	5'-TTC ACG ACA GCT GCA ACC TA-3'	25691-26562	872 bp
SDR	5'-CCA TGG TAA CAC CAA TCC CA-3'	(S gene)	
SEF	5'-CCC TGT ATT AGG TTG TTT AG-3'	26331-27249	919 bp
SER	5'-ACC ACT ACC AGT GAA CAT CC-3'	(S gene)	
SFF	5'-GTG CAG AAT GCT CCA TAT GGT-3'	27079-27732	654 bp
SFR	5'-TTA GTC GTC ATG TGA TGT TT-3'	(S gene)	
MF	CCA CCA GTT CTT GAT GTG GA	28695-29387	693 bp
MR	CCA GAA CGA TTT CCA AAG GA	(M gene)	
NF	GCA ATC CAG TAG TAG AGC GT	21-750	730 bp
NR	CTT AGT GGC ATC CTT GCC AA	(N gene)	
n-NF ^c	GCC GAT CAG TCC GAC CAA TG	79-485	407 bp
n-NR ^d	AGA ATG TCA GCC GGG GTA G	(N gene)	

F^a : upstream primer

R^b : downstream primer

n-NF^c : nested PCR upstream primer

n-NR^d : nested PCR downstream primer

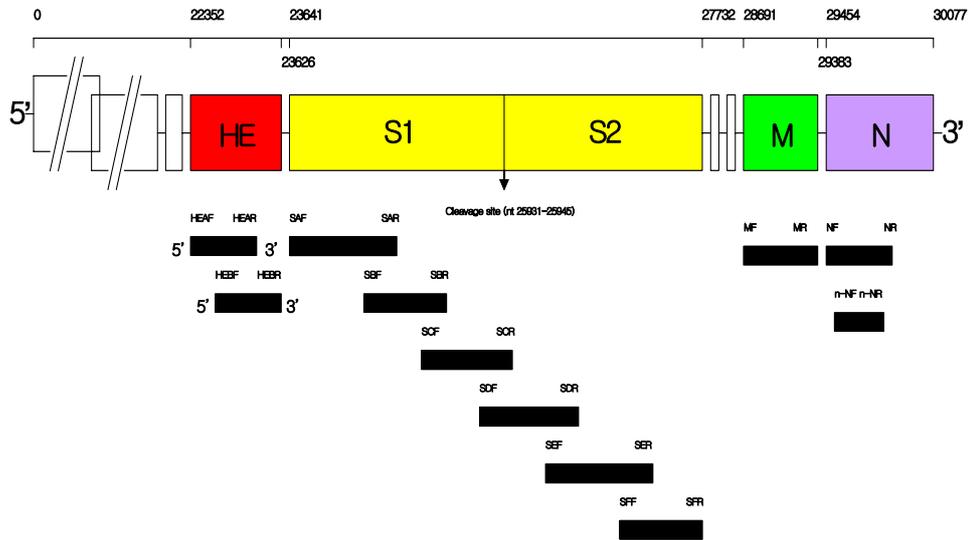


Fig 2. Location of each primer for RT-PCR and nested PCR for detecting HE, S, M, N gene of BoCV.

3. 결 과

가. 전자현미경을 이용한 바이러스 검출

전자현미경 기법을 이용하여 21개 농장 63개 설사분변 재료를 검사하였다 (Table 1). 그 결과 두개의 spike 즉 outer long surface spike (spike protein)과 inner short spike (hemagglutinin-esterase protein)을 가지고 있는 80-150 nm 크기의 전형적인 소 코로나바이러스가 63개 분변 중 9개(14.3%)에서 관찰되었다(Fig 3). 그렇지만, outer long surface spike를 가지고 있지 않는 코로나바이러스양 바이러스들도 63개 분변 중에서 23개의 분변(36.5%)에서 관찰되었다. 전형적인 소 코로나바이러스나 코로나바이러스양 바이러스가 한 개 이상의 설사분변에서 관찰된 농장은 21개 농장 중에서 12개(57.1%)였다(Table 1). 이러한 설사분변 중에서는 소 바이러스성 설사병 바이러스나 로타바이러스는 관찰되지 않았다.

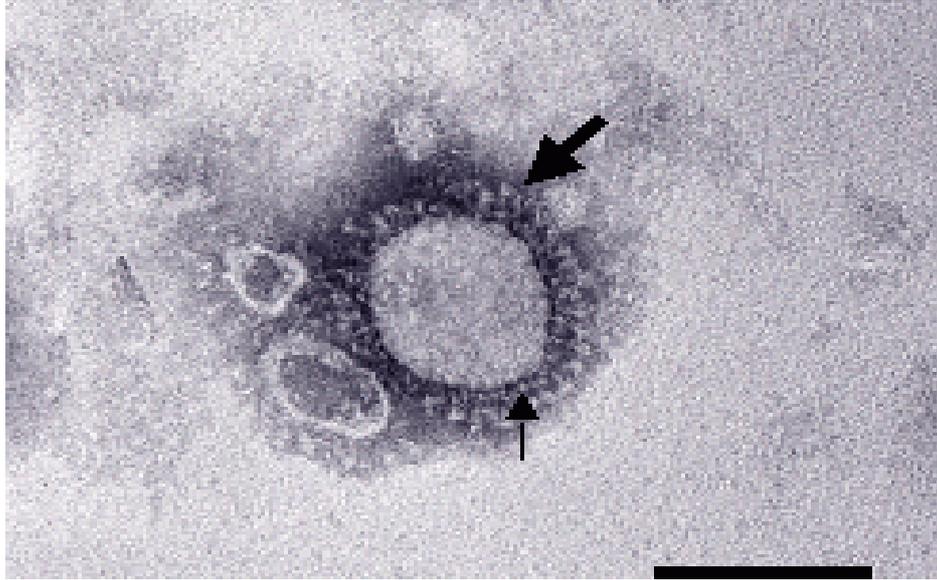


Fig 3. Electron micrograph of characteristic bovine coronavirus particle detected from an adult cow with winter dysentery. Note outer long projection (thick arrow) and inner short hemagglutinin-esterase spike (thin arrow). Phosphotungstic acid negative staining. Bar = 100 nm.

나. Antigen-capture ELISA 기법을 이용한 바이러스 검출

소 코로나바이러스에 특이적인 항체를 사용한 ELISA 기법을 이용하여 분변 내 소 동절기 적리 코로나바이러스를 검출한 결과, 97개 설사 분변 중에서 34개가 양성이었다(Table 1). 이러한 양성반응이 적어도 한 개 이상의 설사분변에서 관찰된 농장은 32개 농장 중에서 17개였다(Table 1).

다. RT-PCR 및 nested PCR 기법을 이용한 소 동절기 적리 코로나바이러스 검출

RT-PCR 기법은 소 코로나바이러스 nucleocapsid protein gene 중에서 730 bp을 증폭하도록 고안되었다. 이 기법을 이용하여 설사분변 중에서 소 코로나바이러스를 검출한 결과, 97개 설사분변 중에서 32개(33.0%) 분변에서 소 코로나바이러스에 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었다(Fig 4). 이러한 양성반응이 적어도 한 개 이상의 설사분변에서 관찰된 농장은 32개 농장 중에서 15개(46.9%)였다(Table 1).

Nested PCR 기법은 RT-PCR에 의한 증폭 부위 중, 그 내부 부위 407 bp를 증폭하도록 고안하였다. 이 기법을 이용하여 설사분변 중에서 소 코로나바이러스를 검출한 결과, 총 97개 설사분변 중에서 77개(79.4%)에서 소 코로나바이러스에 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었다(Fig 4). 이러한 양성반응이 적어도 한 개 이상의 설사분변에서 관찰된 농장은 32개 농장 중에서 32개(100%)였다(Table 1).

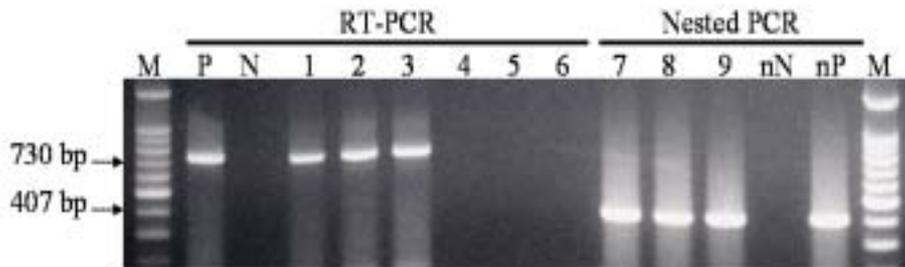


Fig 4. Detection of bovine coronavirus (BoCV) by RT-PCR and nested PCR in the fecal samples from adult cattle with winter dysentery (WD). M; 100 bp marker. P; BoCV inoculated culture medium. N; mock infected fecal sample. Lanes 1-6; diarrheic fecal samples from adult cattle with WD. Lanes 7-9; diarrheic fecal samples negative for BoCV by RT-PCR. nN; mock infected fecal sample. nP; 5,000 times diluted RT-PCR positive product.

이러한 설사분변들을 전자현미경적, ELISA, RT-PCR, nested PCR 기법들에 의해서 양성반응이 하나 이상으로 나온 것을 집계하여 보면, 총 97개 설사분변 중에서 90개(92.8%)와 총 32개 농장 중에서 32개의 농장이 양성으로 확인되었다.

그 외에 S gene, HE gene, M gene을 검출하기 위한 primer pairs들도 야외 증례에 응용한 결과, N gene에 양성반응을 보이는 설사분변에서 음성으로 나오는 증례가 많았다. 따라서 이러한 primer pairs들은 진단용으로는 부적합하다는 것을 알 수 있었다.

라. 설사분변 내 세균 및 기생충 검사

설사분변 내 세균의 감염여부를 확인하기 위하여 균분리를 시도하였다. 하지만 *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Yersinia* spp 등 어떠한 병원성세균도 분리되지 않았다. 또한 분변 내 기생충 검사를 실시한 결과, *Eimeria bovis*에 해당되는 원충만이 소수의 분변 중에서만 관찰되었으며, 분변 내 그 수도 아주 적었다.

마. RT-PCR 기법을 이용한 설사분변 내 소 바이러스성 설사병 바이러스 및 로타바이러스 검출

소 바이러스성 설사병 바이러스 및 로타바이러스에 특이적인 primer pairs를 이용하여 설사분변 내 이러한 바이러스의 검출을 시도하였다. 하지만 이러한 바이러스들은 97개 분변 중에서 전혀 관찰되지 않았다.

바. HRT-18G 세포주를 이용한 바이러스 분리

ELISA와 RT-PCR에 강한 양성반응을 보이는 총 20개의 설사분변에서 소 동절기 적리 코로나바이러스 분리를 시도한 결과, 10개의 바이러스를 분리하였다. 분변을 HRT-18G 세포주에 접종한 2번째 계대배양에서 CPE가 관찰되었다. 2번째 계대배양에서 CPE는 감염 후 2-3일 후부터 관찰되기 시작하였는데, 이러한 CPE의 특징은 세포의 원형화 및 분리였다. 또한 감염된 세포는 융합하여서 다수의 핵들을 보유한 syncytia를 형성하였다(Fig 5). 이러한 CPE는 mock-infected HRT-18G 세포주에서는 관찰되지 않았다

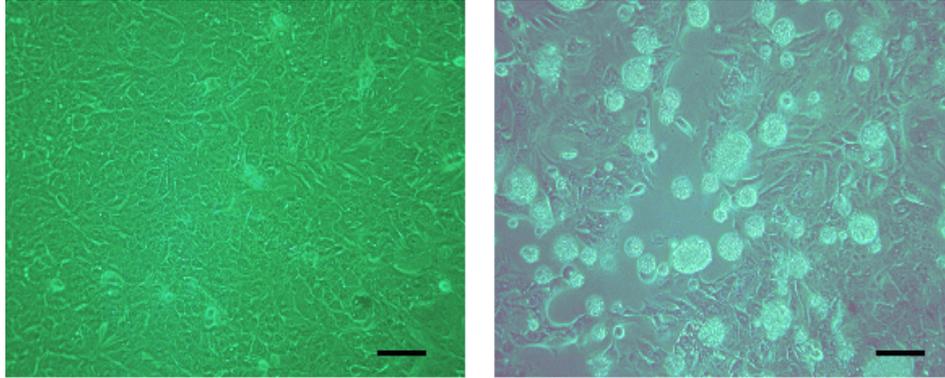


Fig 5. (A). Uninoculated monolayer of HRT-18G cells 4 days after seeding. (B). CPE at 2 days postinoculation induced by the KWD1 isolate of winter dysentery bovine coronavirus on passage 3 in HRT-18G cells. The CPE were characterized by enlarged, rounded, and densely granular cells that occurred singly or in clusters. Bar = 50 μ m.

이렇게 CPE 소견을 보이는 상층액을 HRT-18G 세포가 형성된 96 well plate에 접종하여 소 코로나바이러스에 특이적인 항체를 이용한 직접면역형광항체법을 수행한 결과, 강한 양성형광반응이 세포질에서 관찰되었다 (Fig 6). 이러한 형광양성반응은 바이러스의 계대를 늘릴수록 그 수와 반응의 정도가 증가하였다.

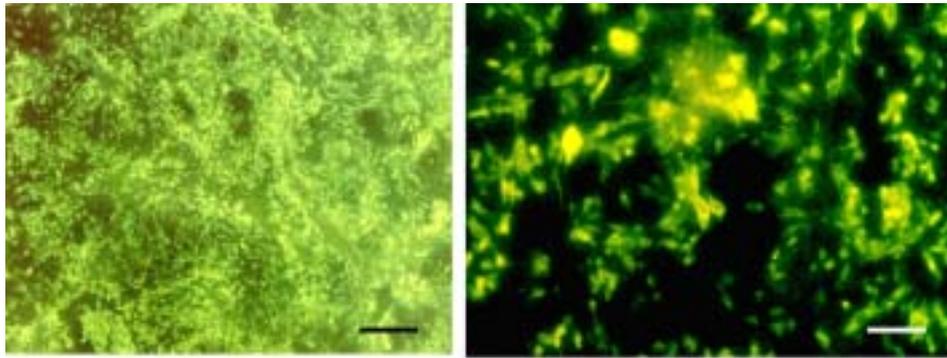


Fig 6. Immunofluorescence of HRT-18G cells 2 days after inoculation with the KWD1 isolate of winter dysentery bovine coronavirus. Cells were stained with fluorescein-conjugated bovine anti-bovine coronavirus (Mebus strain) serum. Immunofluorescence was restricted to the cytoplasm. Bar = 50 μ m.

바이러스가 감염된 HRT-18G 세포의 상층액을 전자현미경으로 관찰한 결과, outer long projection과 inner short spike를 가지고 있는 80-150 nm 크기의 전형적인 코로나바이러스를 확인할 수 있었다. 또한 소 코로나바이러스에 특이적인 항혈청을 이용한 면역전자현미경적 관찰에서 다수의 코로나바이러스 집락체를 관찰할 수 있었다(Fig 7).

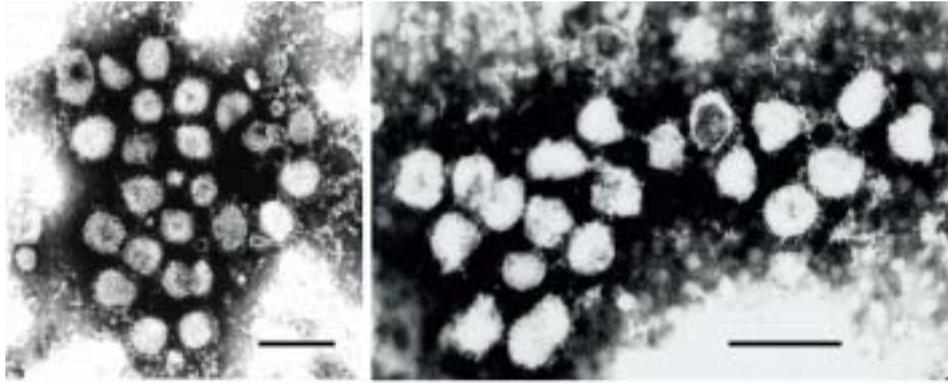


Fig 7. Immune electron micrograph of the KWD1 isolate (passage 8 on HRT-18 cells) of winter dysentery bovine coronavirus treated with a hyperimmune bovine anti-bovine coronavirus (Mebus strain) serum. Aggregate typically contained 23 virions. Phosphotungstic acid negative staining. Bar = 300 nm.

더욱이 10개의 분리주는 소 코로나바이러스에 특이적인 항체를 이용한 ELISA에서 강한 양성반응을 보였다. 또한 소 코로나바이러스 nucleocapid gene에 특이적인 primer pair를 이용한 RT-PCR에서도 강한 양성반응을 확인할 수 있었다. 따라서 소 동절기 적리가 발생한 소의 설사분변에서 분리한 10개의 바이러스 분리주를 KWD1에서 KWD10 strains로 명명하였다.

Table 2. Detection of winter dysentery (WD) bovine coronavirus (BoCV) in the fecal samples from herds with WD by EM, ELISA, RT-PCR and nested PCR

Methods Provinces	EM (Typical coronavirus)		EM (Coronavirus -like)		ELISA		RT-PCR		Nested PCR	
Gyeonggi	4/18 ^a	2/7 ^b	1/18	1/7	6/23	5/9	8/23	4/9	21/23	9/9
Jeonnam	0/16	0/3	11/16	2/3	16/32	5/6	13/32	4/6	24/32	6/6
Chungnam	3/17	1/6	5/17	2/6	9/24	5/9	7/24	5/9	21/24	9/9
Gyeongbuk	0/4	0/1	4/4	1/1	0/10	0/4	1/10	1/4	4/10	4/4
Gyeongnam	0/3	0/1	2/3	1/1	2/3	1/1	0/3	0/1	2/3	1/1
Chungbuk	0/3	0/1	0/3	0/1	0/3	0/1	2/3	1/1	3/3	1/1
Gangwon	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1
Jeonbuk	1/1	1/11	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Total	9/63	5/21	23/63	7/21	34/97	17/32	32/97	15/32	77/97	32/32

^aNo. of positive fecal samples for BoCV/No. of tested fecal samples.

^bNo. of positive herds for BoCV/No. of tested herds.

4. 고 찰

본 연구에 의해서 국내에서도 소 동절기 적리가 다발하고 있음을 국내 최초로 규명하였다. 국내에서 소 동절기 적리가 다발하고 있음을 규명하기 위해서, 국내 처음으로 본 연구진은 소 동절기 적리 바이러스에 특이적인 RT-PCR, nested PCR, ELISA, 면역전자현미경 기법들을 사용하였다. 이러한 기법들은 소 동절기 적리의 원인체인 소 코로나바이러스의 검출을 성공적으로 할 수 있었으며, 특히 nested PCR 기법은 그 민감도에 있어서 아주 훌륭하였다. 따라서 이 nested PCR 기법은 차후 국내 소 동절기 적리의 진단에 폭넓게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

국내 소 동절기 적리의 임상증상 즉 심한 수양성에서 혈액성 설사, 고열, 우유 생산량 감소 등은 외국에서 보고된 소 동절기 적리와 동일하였다. 이러한 외국의 보고에서 동일한 점은 이러한 소 동절기 적리 설사분변에서 항상 코로나바이러스가 검출되었다는 점이다. 본 연구결과에서도 소 코로나바이러스가 동절기 적리에 이환된 성우의 설사분변에서 지속적으로 관찰된 병원성 인자였다. 비록 급성의 소 바이러스성 설사나 살모넬라증이 소 동절기 적리와 유사한 임상증상을 유발하지만, 이러한 병원체는 소 동절기 적리에 이환된 성우의 설사분변에서는 전혀 관찰되지 않았다. 본 연구에서는 단지 콕시듐만이 간혹 소 동절기 적리에 이환된 설사분변에서 간혹 관찰되었는데, 이러한 결과는 외국의 보고와 유사하였다. 따라서 이러한 결과를 종합하여 보면 국내에서 발생한 소 동절기 적리의 원인은 소 동절기 적리 코로나바이러스로 결론지을 수 있다. 이러한 결과는 외국에서 보고된 바와 같이 소 동절기 적리가 발생한 소의 설사분변을 소에 다시 접종하였을 때, 동절기 적리가 발생하였다는 것으로 증명할 수 있다.

본 연구에서 antigen-capture ELISA 데이터는 소 동절기 적리 설사분변에서 검출된 바이러스의 항원성이 소 코로나바이러스의 prototype인 Mebus strain과 유사하다는 것을 보여주고 있다. 외국 연구자들의 보고에 의하면 소 동절기 적리 분리주는 prototype Mebus strain에 대한 항체에 의하여 cross

reaction한다고 한다. 더욱이 국내 분리주의 면역전자현미경, 면역형광항체법, ELISA법에 의한 검사결과, 이러한 국내 분리주도 prototype Mebus strain에 대한 항체에 의해서 cross reaction하였다. 이러한 결과는 국내 소 동절기 적리 코로나바이러스는 Mebus strain과 매우 유사한 항원성을 가지고 있음을 보여준다.

본 연구자는 소 동절기 적리에 이환된 성우의 설사분변에서 코로나바이러스를 검출하기 위한 1-step RT-PCR 및 nested PCR을 개발하였다. 이러한 검사법은 소 동절기 적리 코로나바이러스를 검출하기 위한 고전적인 전자현미경, 면역전자현미경, ELISA 기법에 비해서 매우 우수함을 알 수 있었다. 한편 소 동절기 적리에 이환된 성우의 설사분변에서 소 코로나바이러스가 RT-PCR과 ELISA 기법에 의해서는 검출되지 않고 단지 nested PCR 기법에 의해서는 검출되었다. 물론 nested PCR 기법의 민감도가 이러한 기법들에 비해서 높아서 그러할 수 있지만, 소 동절기 적리가 감염되었음에도 ELISA 기법과 RT-PCR 기법에 의해서 검출되지 않은 점은 다음과 같은 이유였을 것이다. 즉 1) 설사분변 내에는 일반적으로 PCR 반응을 억제하는 물질들이 함유되어 있어서 RT-PCR 기법에서는 검출되지 않았든지, 2) 설사는 발생하고 있지만 바이러스의 배출은 그리 높지 않은 감염 후기이든지, 3) 혹은 설사분변의 이동 중에 열에 노출됨으로써 바이러스가 파괴되어 검출되지 않았기 때문일 것이다. 다른 피막을 가지고 있는 바이러스와 같이 소 코로나바이러스는 freezing & thawing, 고온 혹은 햇볕에 의해서 쉽게 파괴된다. 따라서 이러한 분변의 이동 중에서 부적절한 취급이 이러한 기법에서 음성으로 나오게 하는 가장 강력한 원인으로 추정된다.

본 연구결과 ELISA 및 RT-PCR 기법에서 강한 양성반응을 보이는 설사분변에서 10개의 소 동절기 적리 바이러스주가 분리되었다. 이러한 분리된 바이러스는 외국의 논문에서 보이는 CPE의 양상, 전자현미경에 의한 바이러스의 형태, 면역전자현미경에 의한 바이러스의 집락성, 면역형광항체법에 의한 감염된 세포질에서의 강한 형광성, 소 코로나바이러스에 특이적인 항체를 이용한 ELISA 및 RT-PCR과 nested PCR에 의한 양성반응의 소견을 보아

전형적인 소 동절기 적리 바이러스임을 알 수 있다. 이러한 분리주의 특징은 미국이나 일본에서 보고 된 소 동절기 적리 바이러스와 동일함을 알 수 있다. 한편 많은 바이러스 분리주들의 생물학적 및 유전적 특성이 분리된 지역의 차이성이나 시간적 차이에 의해서 다를 수 있음이 보고 되고 있다. 코로나바이러스는 다른 RNA 바이러스와 동일하게 RNA polymerase의 high error frequencies와 RNA recombination의 high frequency에 의해서 돌연변이가 자주 발생한다고 한다. 전 세계적으로 소 동절기 적리 코로나바이러스 뿐만 아니라 송아지 설사의 원인체인 송아지 코로나바이러스에 대한 유전자 검사는 단지 미국과 캐나다 분리주에서만 수행되었다. 따라서 본 연구진에 의해서 분리된 소 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 지놈의 특성을 외국의 것과 비교하여, 규명할 필요가 있다.

본 연구에 의하면, 국내 8개 도에서 의뢰된 성우의 설사분변에서 소 동절기 적리가 검출됨으로써, 국내에서 소 동절기 적리가 만연되었음을 알 수 있다. 타 도에 비해서 특히 경기도에서 소 동절기 적리에 이환된 설사분변의 의뢰건수 및 검출율이 높았다. 이러한 결과는 경기도가 타 도에 비해서 소 사육두수가 많아서 이러한 소견을 보였음을 추측케 한다.

제 2절. 동절기 적리 소 코로나바이러스 스파이크 당단백질 유전자의 분자생물학적 특성

Molecular Analysis of S Gene of Spike Glycoprotein of Winter Dysentery Bovine Coronavirus Circulated in Korea During 2002-2004

소 코로나바이러스 스파이크 당단백질 유전자의 분자생물학적 특성에 대한 연구는 오직 미국 및 캐나다에서 분리된 소 코로나바이러스들에 대해서만 비교·분석되었다. 따라서 국내는 물론 미국과 캐나다를 제외한 나라에서 발생하고 있는 소 코로나바이러스의 분자생물학적 특성에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 2002년에서 2004년도에 걸쳐서 분리된 10개의 소 동절기 적리 분리주의 스파이크 당단백질 유전자의 핵산 및 아미노산 염기서열에 대한 분자생물학적 특성을 미국과 캐나다에서 보고된 결과와 비교·분석하였다. 그 결과 prototype Mebus strain과의 핵산염기서열을 비교·분석한 결과 국내 10개 분리주는 S1 subunit와 S2 subunit에서 총 77개와 52개의 핵산 염기서열의 차이가 있었다. 이러한 핵산염기의 변환은 46개 및 21개의 아미노산 치환을 S1 subunit 41개소에서 S1 subunit 20개소에서 일으켰다. 국내 10개 분리주의 전체 S 유전자에 대한 계통분석도에서 모든 국내 소 동절기 적리 분리주는 상호간에 높은 상동성을 보였으며, 또한 호흡기형 소 코로나바이러스주인 OK주와 소화기형 소 코로나바이러스주인 LY-138과 그 염기서열이 매우 밀접함을 알 수 있었다. 반면에 그 외의 소 코로나바이러스주와는 상당한 그 염기서열의 상동성에 차이가 있었다. S1 subunit 내의 초가변 부위의 계통학적 분석에서 국내 분리주 모두는 호흡기형 코로나바이러스 OK주와 BCQ3994 그리고 소화기형 코로나바이러스인 LY-138과 같은 클러스터에 포함되었다. 반면에 캐나다 분리주인 송아지 설사 코로나 바이러스 BCQ주 및 소 동절기 적리 바이러스주와 미국 호흡기

형 분리주 LSU, 프랑스 소화기형 F15, 비병원성주인 VACC, L9등은 각각 다른 클러스터에 속하였다. 호흡기형 소 코로나바이러스의 특이적인 아미노산 염기서열로 알려진 4개소에서 aa 510, aa 543, aa 578은 국내 소 동절기 적리 코로나바이러스에서도 관찰되었다. 소 코로나바이러스 강독성과 관련되었다는 7개의 아미노산 염기서열은 9개의 국내 분리주에서 관찰되었다. 더욱이 국내 분리주는 외국주와 비교하였을 때, aa 149와 aa 617에서 외국 분리주와는 전혀 다른 유일한 아미노산 변이를 보였다. S2 subunit 내의 첫 번째 소수성 부위를 외국주와 비교하였을 때, 강독주인 국내 분리주와 외국에서 보고된 강독주 모두는 약독주에 비해서 특징적으로 친수성기가 증가하였음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 국내 분리 소 동절기 적리 코로나바이러스는 호흡기형 및 소화기형 소 코로나바이러스의 양쪽 특성을 가지고 있는 바이러스임을 시사하고 있다. 또한 국내 분리주 및 외국의 강독주는 약독주에 비해서 S2 subunit의 첫 번째 소수성기의 친수성기의 증가로 바이러스에 의한 세포의 융합력 증가 혹은 병원성에 차이가 있을 수 있음을 알 수 있었다.

1. 서 설

*Nidovirales*목 *Coronaviridae*과에 속하는 소 코로나바이러스는 송아지의 심한 설사와, 성우의 동절기 적리, 송아지와 비육우의 호흡기 감염과 관련되어 있다. 소 코로나바이러스는 외막 내에 양성의 단일쇄 RNA 지놈을 보유하고 있다. 이 바이러스의 구조단백질에는 nucleocapsid (N), transmembrane (M), hemagglutinin/esterase (HE), spike (S), small membrane (E)이 있다. 비록 S와 HE 글라이코단백질이 감염초기의 수용체로서 N-acetyl-9-acetyl neuraminic acid를 사용하지만, S 글라이코단백질이 HE 글라이코단백질보다 적혈구 응집을 위한 표면 항원을 적게 사용한다. 따라서 S 글라이코단백질이 소 코로나바이러스의 주요 응집소이며, 장 세포를 포함한 세포의 부착에 일차적으로 사용된다. 코로나바이러스의 host range와 세포 친화성은 S 글라이코단백질의 다양성에 의해서 결정된다. 이 S 글라이코단백질은 1형 막 글라이코단백질로서 아미노기(S1)와 카복실기(S2)에 명확한 기능성 도메인을 가지고 있다. S1 subunit는 수용체 결합 기능을 가지고 있으며, S2 subunit는 바이러스나 세포의 융합을 유도하는 막 투과성 단백질이다. 따라서 S 글라이코단백질은 친화성 있는 세포에 접촉할 수 있도록 하여 세포의 융합이나 중화항체의 생성을 유도한다. 이러한 기능성 subunit인 S1과 S2 중에서 S1이 강력한 중화반응을 일으킬 수 있는 단클론 항체의 생성을 유도한다.

많은 바이러스의 생물학적 및 유전적 차이점이 지역별, 시간별 차이에 의해서 발생되고 있다. 다른 대부분의 RNA 바이러스와 마찬가지로 코로나바이러스는 RNA polymerases의 높은 error frequencies에 의해서 높은 빈도의 돌연변이가 발생한다. 또한 코로나바이러스의 독특한 특징 중의 하나는 RNA recombination이 자주 발생한다는 것이다. 그 예로 group II coronavirus의 progenitor은 HE 유전자를 인플루엔자 C 바이러스와 혼합감염에 의해서 획득하였다. 또한 돼지 호흡기형 코로나바이러스는 돼지 전염성 위장염 바이러스 S1의 250 아미노산이 결손 내지 점 돌연변이가 발생하여, 장 친화성은 줄어들고 호흡기 친화성은 증가하게 되었다. 이와 같이 코로나

바이러스의 S 단백질은 이 바이러스의 병원성에 관련되어 있다는 것을 알 수 있다. 한편 소 코로나바이러스 지놈의 핵산 비교·분석은 오직 미국과 캐나다에서 분리된 바이러스주에 대해서만 수행되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 발생하고 있는 소 동절기 코로나바이러스의 특성을 규명하기 위해서 S 유전자 전부에 대한 핵산 및 아미노산 서열을 외국주와 비교·분석하였다.

2. 재료 및 방법

가. 바이러스

열개의 소 동절기 적리 국내 분리주인 KWD1-KWD10은 HRT-18G 세포주를 이용하여 국내 소 동절기 적리에 이환된 성우의 설사분변에서 분리하였다. 이 바이러스는 면역전자현미경, ELISA, RT-PCR 기법을 이용하여 동정하였다. 또한 이 바이러스들은 HRT-18G 세포주에서 대량으로 배양하였으며, 4번째까지 계대 배양하였다.

나. 바이러스 RNA 추출

3번의 freezing & thawing을 거친 바이러스 감염 배양액을 4°C 3000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 상층액 200 μ l에 500 μ l의 Solution D (4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM Sodium citrate, pH7, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)와 50 μ l 2M sodium acetate(pH4.0)을 넣고 강하게 vortex하였다. 여기에 500 μ l의 water saturated phenol (pH4.5)와 100 μ l의 chloroform과 isoamylalcohol (49:1)을 넣고 강하게 vortex를 한 후에 얼음속에서 15분간 정치하였다. 이들 혼합액은 4°C 15000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액 700 μ l을 새 에펜돌프 튜브에 옮긴 후 여기에 Rnaid kit(BIO 101사) 내의 binding solution 700 μ l와 matrix solution 15 μ l을 넣고 강하게 vortex한다. 상온에서 10분간 정치하면서 가끔 위아래로 흔들어가면서 혼합액이 잘 섞이도록 하였다. 이들 혼합액을 4°C 10000 rpm에서 2분간 원심한 후, 상층액을 버렸다. 튜브밑의 침전물은 kit내의 세척액으로 3회 원심 및 상층액 제거를 통해서 세척하였다. 세척이 끝나면 튜브 밑의 침전물에 50 μ l의 DEPC 처리 멸균증류수를 넣고 잘 혼합한 후 50°C에서 10분간 방치하여 matrix에 결합한 바이러스 RNA가 분리되도록 하였다. 분리가 끝나면, 상온에서 3분간 15000 rpm에서 원심분리하여 matrix를 침전시키고, 상층액만 조심히 깨끗한 에펜돌프 튜브로 옮겨서 사용 때까지 -70°C에 보관하였다.

다. RT-PCR 용 primer 제작

국내 동절기 적리 코로나바이러스 S 유전자의 염기서열을 분석하기 위해서는 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 특이 primer의 제작이 관건이었다. 문헌 조사를 통하여 각각의 코로나바이러스에 대한 염기서열을 분석하여 얻은 결과를 기본으로 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 특이 primer를 제작하였다(Table 1 및 Fig 1).

라. 염기서열 분석을 위한 RT-PCR의 수행과 증폭산물의 정제

동절기 적리에서 분리된 바이러스 유전자 염기 서열의 분석을 위해서 분리된 후 정제된 바이러스를 1 step RT-PCR과 동절기 적리 코로나바이러스의 S 유전자에 특이적인 6쌍의 primer를 이용하여 동절기 적리 바이러스 유전자의 각각 부분을 증폭하여 1.5% agarose gel 전기영동을 한다. Gel내에서 증폭부위를 절제한 후, GeneClean Kit를 이용하여 순수 S 유전자의 dDNA만을 분리·추출하였다. 이렇게 추출·정제된 증폭산물은 자동염기서열 분석기를 이용하여 염기서열을 검사하였다. 국내 분리 동절기 적리 코로나바이러스의 염기서열은 Genebank상에 보고된 외국의 동절기 적리 코로나바이러스의 염기서열과 비교·분석하였다. 또한, 이렇게 얻은 국내분리주의 염기서열 분석의 결과를 토대로 바이러스 구조단백질의 아미노산 서열의 변화 등을 조사하였다. 이렇게 얻은 결과를 토대로 국내 동절기 적리 바이러스의 표준 바이러스로 선택하였다.

마. 염기서열 분석

국내 분리 소 동절기 적리 코로나바이러스의 핵산 염기서열 분석을 위해서 DNA Basic module (DNAsis MAX, Alameda, CA)을 이용하였다. 이러한 염기서열 분석은 송아지 설사 코로나바이러스인 Mebus주(GenBank accession No. U00735), BCQ2070 (GenBank accession NO. U06090), BCQ571 (GenBank accession NO. U06093), BCQ20 (GenBank accession NO. U06092), BCQ9 (GenBank accession NO. U06091), BCQ1523

(GenBank accession NO. AAG40601), 소 동절기 적리 코로나바이러스주인 BCQ7373(GenBank accession NO.AAG40595)와 BCQ2590 (GenBank accession NO. AK01071), 호흡기형 소 코로나바이러스주인 BCQ3994 (GenBank accession NO. ASAK14398), LSU (GenBank accession NO. AAF25509), OK (GenBank accession NO. AAF25519), 소화기형 소 코로나 바이러스주인 LY-138 (GenBank accession NO. AAF25499)와 F15 (GenBank accession NO. D00731)로 수행하였다. 이러한 핵산 염기서열을 이용한 deduced amino acid 염기서열 분석은 Amino Acid Basic module (DNAsis MAX, Alameda, CA)로 수행하였다.

Table 1. The oligonucleotide primers designed from the S gene of the spike glycoprotein of the BoCV Mebus strain (GenBank accession No. M31053) used for DNA sequencing

No.	Primer pairs	Products	Regions
A	F: 5'-ATGTTTTTGATACTTTTAATTTCC-3' R: 5'-ACACCAGTAGATGGTGCTAT-3'	920 bp	1-920
B	F: 5'-GGGTACACCTCTCACTTCT-3' R: 5'-GCAGGACAAGTGCCTATAACC-3'	769 bp	782-1550
C	F: 5'-CTGTCCGTGTAAATTGGATG-3' R: 5'-TGTAGAGTAATCCACACAGT-3'	828 bp	1459-2286
D	F: 5'-TTCACGACAGCTGCAACCTA-3' R: 5'-CCATGGTAACACCAATCCCA-3'	872 bp	2151-3022
E	F: 5'-CCCTGTATTAGGTTGTTTAG-3' R: 5'-ACCACTACCAGTGAACATCC-3'	919 bp	2691-3609
F	F: 5'-GTGCAGAATGCTCCATATGGT-3' R: 5'-TTAGTCGTCATGTGATGTTT-3'	654 bp	3439-4092

F: Forward primer. R: Reverse primer.

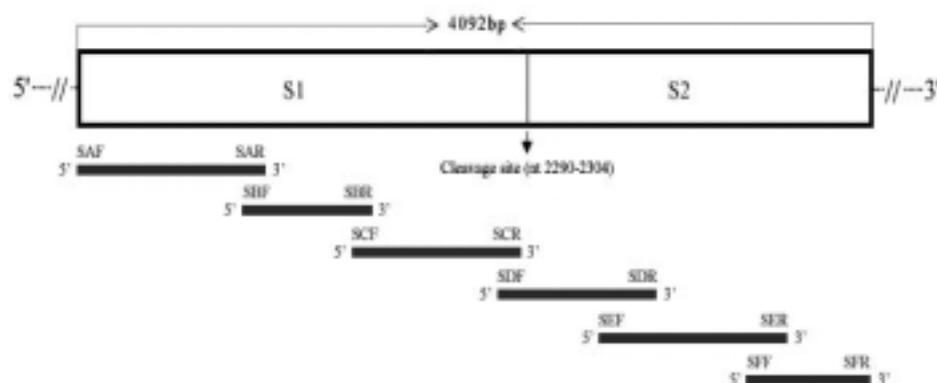


Fig. 1. S glycoprotein gene of BoCV and sequencing strategy. The figure depicts the location and direction of the oligonucleotide primers used to sequence a 4092 bp region.

3. 결 과

가. 국내 분리주간의 S 유전자 염기서열의 비교

본 연구에서는 국내 분리주인 10개의 소 동절기 적리 코로나바이러스에 대해서 S 유전자 염기서열을 서로 비교·분석하였다. 국내 분리주의 S gene은 4092 bp로 구성되어 있었으며, 이들은 150 kDa에 해당되는 1363 aa residues를 encoding 하고 있었다. S 단백질은 86 kDa과 65 kDa에 해당되는 S1 분절과 S2 분절로 구분되었다.

국내 분리주간의 핵산 염기서열 분석에서 차이점은 단지 핵산 염기서열의 치환이며, 결국 이것은 아미노산 치환을 일으켰다는 것이다. 즉 국내 분리주간의 핵산 염기서열의 상동성 차이는 KWD5와 KWD7사이에서 최대 1.3%로 관찰되었다. 국내 분리주간의 핵산염기서열 중에서 frameshift, deletion, insertion, nonsense mutations은 관찰되지 않았다. 이러한 핵산 염기서열 치환은 아미노산 염기서열의 치환을 최대 1.3% (KWD5와 KWD10사이) 일으켰다. 국내 분리주간의 이러한 핵산 및 아미노산 염기서열은 국내 분리주간의 상동성이 매우 높다는 것을 의미한다.

나. 국내 분리주와 외국 보고주간의 S 유전자 염기서열의 비교

국내 분리주와 소 코로나바이러스 prototype인 Mebus strain 간의 핵산 염기서열을 비교한 결과, 총 77개와 52개의 핵산의 치환이 S1 및 S2 subunits에서 각각 관찰되었다. 이러한 핵산 염기서열의 치환은 최대 2.1%의 상동성 차이를 보였으며, 이러한 치환은 유전자 전체에 걸쳐서 무작위로 분포하고 있었다. 국내 분리주와 Mebus strain 간의 frameshift, deletion, insertion, nonsense mutations은 관찰되지 않았다. 또한 이러한 핵산의 치환은 총 46개와 22개의 아미노산 치환을 S1 및 S2 subunits에 일으켰다. 국내 분리주와 그 외 외국 보고주와의 핵산 염기서열 분석에서 가장 가까운 상동성을 보이는 것은 호흡기형 코로나바이러스인 LSU strain (96.6%) 이었으며, 가장 동떨어진 것은 prototype인 Mebus strain (93.4%) 이었다. 이러한 분석결과 강독주인 국내 소 동절기 적리 코로나바이러스는 30여년 전에 분리된 약독주

인 L9 strain, Vaccine strain, Mebus strain과 진화론적으로 상당한 차이가 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 아미노산 치환을 기본으로 외국 보고주와 국내 분리주간의 계통분석을 실시한 결과, 국내 분리주 상호간에 높은 상동성이 관찰되었고, 국내 분리주와 외국 보고주 사이에서는 강독주인 호흡기형 OK strain과 소화기형인 LY-138이 국내주와 매우 가까운 사이에 있었다 (Fig 2).

S1 subunit의 N terminal region (aa 1-330)은 마우스 간염 바이러스의 수용체 결합 도메인으로 알려져있다. 이 부위에서 국내 분리주는 Mebus strain과 비교하였을 때 총 15개의 아미노산 치환이 발생하였다. S1A immunoreactive domain은 aa 351-403 사이에 있는데, 이 부위에서 국내 분리주는 Mebus strain, 강독형 호흡기 및 소화기형 주들과 비교하여서 1개의 아미노산 치환(aa 365; S->F)이 관찰되었다(Fig 3). 이 부위의 아미노산 치환은 총 전하의 차이 없이 소수성기의 상당히 높은 변화를 일으켰다. S1B immunoreactive domain은 aa 517-621 사이에 있으며, 이 부위에서는 총 4개의 아미노산 치환이 Mebus strain과 비교 시 관찰되었다(Fig 3).

소 코로나바이러스는 aa 456-592 사이에 hypervariable region이 존재하는데, 이 부위는 S1B immunoreactive domain과 중첩되어 있다. 이 부위를 Mebus strain과 비교하였을 때 총 11개의 아미노산 치환이 관찰되었는데, 특히 aa 531, aa 543, aa 578은 S1B immunoreactive domain과 중첩된 부위였다(Fig 3). 이 부위에서 아미노산 염기서열의 최대 차이를 보이는 바이러스주는 KWD7과 Mebus strain 사이(7.8%)이었다. 특징적으로 이 부위를 계통 분석한 결과, 국내 분리주는 호흡기형 OK strain 및 BCQ3994 strain 그리고 소화기형 LY-138과 같은 cluster 내에 속해 있었으며, 캐나다 분리주인 송아지 설사주인 BCQ 및 소 동절기 적리 분리주는 다른 cluster 내에 속해있었고, 미국 분리주인 호흡기형 LSU strain, 프랑스 소화기형 분리주인 F15, 약독주인 Vaccine strain, L9 strain, Mebus strain은 또다른 cluster을 형성하였다(Fig 4).

국내 분리주 모두에서 외국 보고주와는 다른 아미노산 염기서열이 aa 149

와 617에서 관찰되었다. aa 149 (N->S)는 전하나 소수성기에 차이를 일으키지 않았지만, aa 617 (T->I) 치환은 소수성기를 증가시켰다.

소 코로나바이러스는 aa 763에서 시작하는 KRRSRR 염기서열이 있는데, 이 부위가 cleavage site이며, 결국 aa 768과 aa 769 사이에서 cleavage가 일어난다. 숙주세포의 trypsin-like enzyme은 이 부위를 절단하여서 결국 S1과 S2 subunit로 만든다. 이 효소 절단부위인 KRRSRR은 국내 분리주 모두에서 보존되어 있었다. 흥미롭게도 효소 절단부위의 바로 위 부분인 aa 769가 Ala에서 Ser로 치환되어 있었는데, 실은 이 부위가 Ser인 경우 호흡기형 소 코로나바이러스라고는 보고가 있었기 때문이다.

다. 국내 분리주와 외국 보고주와의 S2 subunit의 비교

국내 분리주와 Mebus strainrks의 첫 번째 hydrophobic (aa 955-992) 및 heptad repeat (aa 993-1032) region을 비교한 결과 총 4개(aa 959, aa 965, aa 984, aa 988)와 총 2개(aa 1026, aa 1030)의 아미노산 치환이 관찰되었다. 국내 분리주의 첫 번째 hydrophobic region의 이러한 아미노산 치환은 높은 친수성기로 변환을 일으켰다. 더욱이 국내주는 물론이고 강독주인 호흡기형 LSU 및 OK strain과 소화기형인 LY 및 F15 strain도 약독주인 Mebus나 Vaccine strain과 비교하였을 때, 이 부위에서 높은 친수성기를 보였다.

Leucine zipper motif는 aa 1273-1294에 존재하며, 이 부위는 F15주 (V->L) 외에는 국내 분리주는 물론 외국 보고주에서도 보존되어 있었다. Anchor sequence (KWPWYVWL, aa 1305-1312)도 국내 분리주는 물론 외국 보고주에서도 보존되어 있었다. 두 번째 hydrophobic region (aa 1312-1328)은 transmembrane domain이며 소화기형인 LY strain (aa 1316; F->L)외에는 국내 분리주와 외국 보고주에서 잘 보존되어 있었다. Cysteine-rich hydrophilic C-terminus인 35개의 아미노산 서열도 약독주들과 비교하였을 때 단지 한 개의 아미노산 치환(aa 1341; I->K)이 국내 분리주와 외국의 강독주에서 관찰되었다.

라. 국내 분리주와 소화기형 및 호흡기형 바이러스의 특이 염기서열 분석

지금까지 11개와 2개의 호흡기형 아미노산 특이 염기서열이 있어서 기존의 호흡기형 바이러스와 구별할 수 있었다고 보고 되었다. 하지만 이러한 염기서열을 국내 분리주와 비교하였을 때 S1에서는 오직 두개의 아미노산(aa 118과 aa 531)만이 차이가 있었다(Fig 3). 소화기형 바이러스의 특이 염기서열로 알려진 aa 13과 aa 744은 최근에 보고된 호흡기형 및 약독주와 동일하였다.

마. 강독주 관련 특이 염기서열의 분석

국내 분리주와 지금까지 보고 된 모든 외국 보고주와의 강독주 관련 특이 염기서열을 비교·분석하였다. 강독주 특이 염기서열은 총 7개가 보고 되었는데, 이 중에서 aa 33, aa 40, aa 278, aa 470, aa 1241, aa 1341이 약독주와 비교하였을 때 국내 분리주는 물론 모든 강독주에서 보존되어 있었다. 하지만 나머지 강독주 관련 특이 서열인 aa 965는 오직 KWD9을 제외한 모든 강독주에서 보존되어 있었다.

	1	11	13	33	35	36	38	40	88	100	113	115	118	147	149	169	173	174	179	181	196	215	248	253	256	273	277	320	331
F15	*	*	L	V	*	*	*	T	T	*	*	H	*	*	*	N	*	*	R	*	*	*	M	N	*	*	*	*	*
LY	*	*	L	V	*	V	*	T	T	*	*	N	*	*	*	*	*	*	R	I	*	*	M	N	*	*	*	*	*
G95	*	*	*	V	*	*	R	T	*	T	T	H	*	*	*	N	*	*	R	*	*	*	M	N	*	*	*	*	G
LSU	*	T	*	V	*	*	*	T	T	T	*	D	K	*	*	N	N	*	Q	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
OK	*	T	*	V	*	*	*	T	T	T	*	D	K	*	*	N	N	*	Q	*	*	*	M	N	*	*	*	*	*
L9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*	*	*	*
BCQ7373	*	T	*	V	F	T	*	T	T	T	*	D	*	*	*	N	*	S	Q	*	N	K	M	N	*	P	N	N	*
BCQ2590	*	T	*	V	*	I	*	T	T	T	*	D	K	*	*	N	N	*	Q	*	N	K	M	N	*	P	N	N	*
M	M	M	F	A	S	I	T	I	R	I	I	K	M	L	N	H	H	P	K	V	K	E	L	S	M	A	D	D	C
KWD1	*	T	*	V	*	*	*	T	T	T	V	N	*	F	S	N	N	*	R	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
KWD2	*	T	*	V	*	*	*	T	T	T	V	N	*	F	S	N	N	*	R	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
KWD3	*	*	*	V	*	*	*	T	T	T	V	N	*	F	S	N	N	*	R	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
KWD4	*	*	*	V	*	*	*	T	T	T	V	N	*	F	S	N	N	*	R	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
KWD5	*	T	*	V	*	*	*	T	T	T	V	N	*	F	S	N	N	*	R	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
KWD6	*	*	*	V	*	*	*	T	T	T	V	N	*	F	S	N	N	*	R	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
KWD7	*	*	*	V	*	*	*	T	T	T	*	D	*	F	S	N	N	*	R	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
KWD8	*	*	*	V	*	*	*	T	T	T	V	N	*	F	S	N	N	*	R	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
KWD9	*	*	*	V	*	*	*	T	T	T	V	N	*	F	S	N	N	*	R	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*
KWD10	*	T	*	V	*	*	*	T	T	T	*	D	*	F	S	N	N	*	Q	*	*	*	M	N	L	*	*	*	*

	341	362	365	440	447	458	465	470	484	499	501	509	510	531	543	571	578	580	591	608	617	648	651	707	716	742	744	767
F15	*	*	*	L	I	S	*	D	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	A	A	V
LY	*	*	*	*	*	S	*	D	T	S	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*
G95	*	*	*	*	*	S	A	D	T	T	*	T	*	D	*	H	*	*	A	G	*	*	*	*	*	*	*	*
LSU	*	*	*	*	*	S	A	D	T	S	S	*	T	G	A	*	S	*	*	*	*	*	*	F	*	*	*	*
OK	*	*	*	*	I	S	A	D	T	S	S	*	T	G	A	*	S	R	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
L9	*	C	*	*	*	S	*	*	T	*	*	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	P	*	*	*	*
BCQ7373	L	*	*	*	*	S	A	D	T	S	S	T	*	*	A	H	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
BCQ2590	*	*	*	*	I	S	A	D	T	*	*	T	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M	S	S	S	V	T	F	V	H	S	N	P	N	S	N	S	Y	T	Q	S	D	T	V	T	I	T	S	V	R
KWD1	*	*	*	*	*	S	A	D	T	S	S	*	T	D	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	I	*	*	*
KWD2	*	*	*	*	*	S	A	D	T	S	S	*	T	D	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*
KWD3	*	*	*	*	*	S	A	D	T	*	S	*	T	D	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*
KWD4	*	*	*	*	*	S	A	D	T	S	S	*	T	D	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	I	*	*	*
KWD5	*	*	*	*	*	S	A	D	T	K	S	*	T	D	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	I	*	*	*
KWD6	*	*	*	*	*	S	A	D	T	S	S	*	T	D	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*
KWD7	*	*	*	*	*	S	A	D	T	S	S	*	T	D	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*
KWD8	*	*	*	*	*	S	A	D	T	*	S	*	T	D	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	I	*	*	*
KWD9	*	*	*	*	*	S	A	D	T	K	*	*	T	D	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	I	*	*	*
KWD10	*	*	F	*	*	S	A	D	T	S	S	*	T	H	A	*	S	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*

	769	778	817	834	906	909	927	936	965	984	988	1026	1030	1085	1095	1100	1223	1241	1269	1286	1316	1341	1363
F15	*	N	*	C	E	*	*	*	E	W	A	*	*	R	F	A	*	K	*	L	*	K	*
LY	*	N	I	*	*	*	*	*	E	W	A	*	*	*	*	A	*	K	*	*	L	K	*
G95	*	N	*	*	*	R	S	Y	E	W	A	G	*	*	*	A	*	K	N	*	*	K	*
LSU	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	*	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*
OK	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	*	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*
L9	*	N	*	*	*	*	*	*	*	W	A	*	*	*	*	A	A	*	*	*	*	*	*
BCQ7373																							
BCQ2590																							
M	A	T	T	Y	D	K	A	N	V	L	V	D	E	A	L	V	V	I	T	V	F	I	D
KWD1	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	*	*	*	A	*	K	*	*		K	*
KWD2	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	*	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*
KWD3	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	*	*	*	S	*	K	*	*	*	K	*
KWD4	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	*	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*
KWD5	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	*	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*
KWD6	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	*	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*
KWD7	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	D	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*
KWD8	S	N	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	*	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*
KWD9	S	N	*	*	*	*	*	*	Q	W	A	G	*	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*
KWD10	S	*	*	*	*	*	*	*	E	W	A	G	D	*	*	A	*	K	*	*	*	K	*

Fig. 3. Comparison of the predicted amino acid sequences of the BoCV S glycoprotein specified by different strains. Amino acids that are different in at least one strain are shown. Light-gray boxes contain aa sites known for being RBCV-specific (Chouljenko et al., 1998), dark boxes identify virulent-specific strains (Chouljenko et al., 1998), and clear boxes contain Korean isolates of aa changes. Amino acid 351-403 is the S1A immunoreactive domain; aa 517-621 is the S1B immunoreactive domain; aa 452-593 is the hypervariable region; aa 955-992 is the hydrophobic region; aa 993-1032 is the heptad repeat sequence; and aa 1312-1325 is the carboxy-terminal anchor sequence.

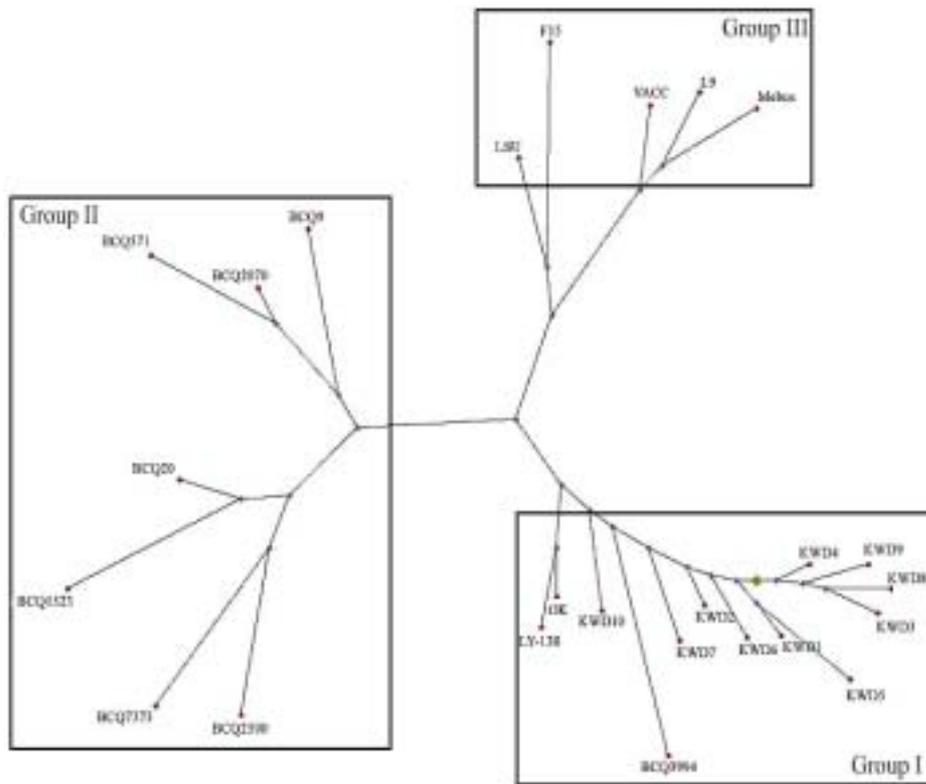


Fig. 4. Phylogenetic tree of the hypervariable region of respiratory (RBCV), enteric (EBCV), calf diarrhea (CD), winter dysentery (WD), and avirulent strains using Clustal method. KWD1-KWD10: Korean WD isolates; the CD strains including Mebus, BCQ 2070, BCQ571, BCQ20, BCQ9, and BCQ1523; the WD strains including BCQ 7373 and BCQ2590; the RBCV strains including BCQ3994, LSU and OK; EBCV strains including LY-138 and F15. The deduced aa sequences are assembled and analyzed on the Amino Acid Basic module (DNAsis MAX, Alameda, CA).

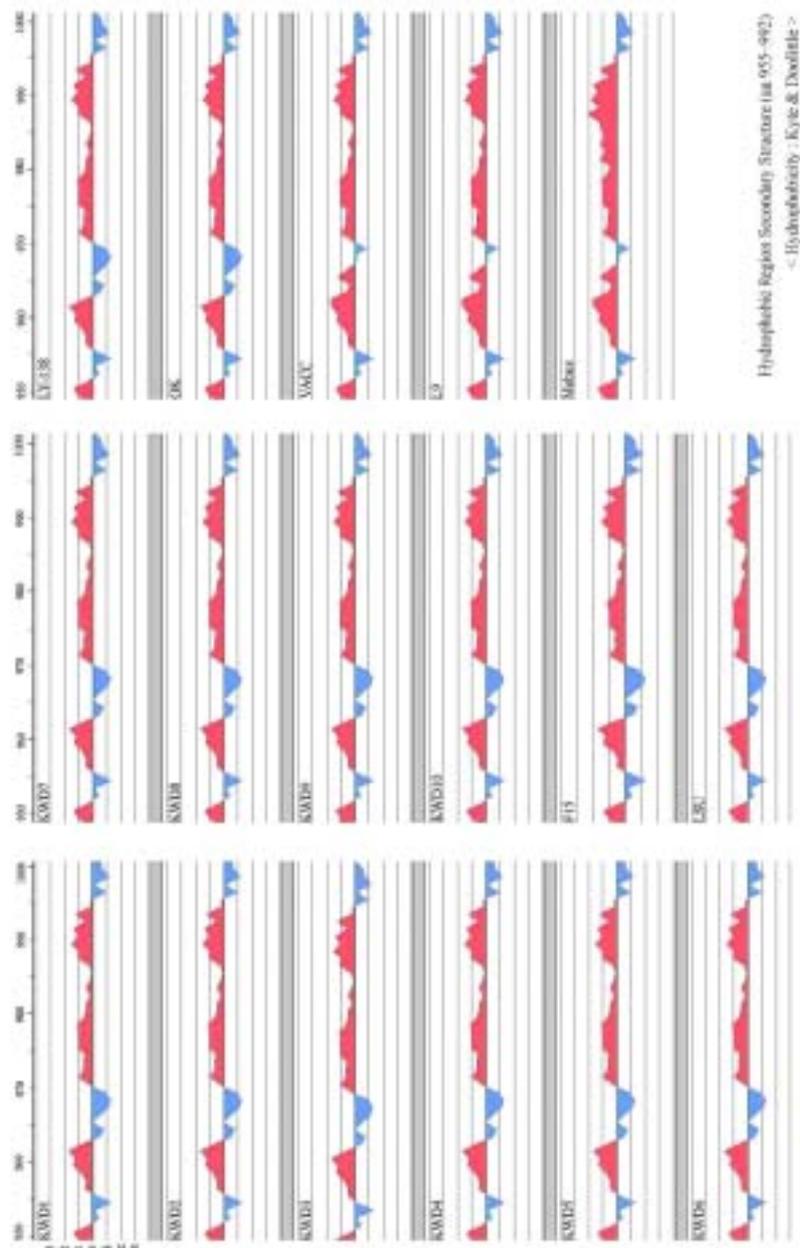


Fig. 5. Hydrophilicity profile of the first hydrophobic region in the S2 subunit of 10 Korean winter dysentery isolates (KWD1 to KWD10), respiratory strains (LSU and OK), enteric strains (LY-138 and F15) and avirulent strains (VACC, L9 and Mebus).

4. 고 찰

거리상에 차이가 있는 지역이나 국가에서 발생하는 바이러스는 변형된 항원성이나 병원성에 차이가 있을 수 있다. 각각 다른 소 코로나바이러스는 특히 S gene에 다양한 정도의 핵산 및 아미노산의 치환이 발생한다. 따라서 이러한 S gene의 유전자 치환은 항원성과 병원성에 변화를 줄 수 있다. 더욱이 소화기형, 호흡기형, 강독주 및 약독주 사이에 존재하는 유전적 차이는 S gene에서 관찰된다. 본 연구진의 조경오 교수는 미국에서 호흡기형, 소화기형, 송아지 설사형, 동절기 적리형 바이러스와의 유전적 차이를 밝혀냈다. 본 연구에서도 국내 소 동절기 적리 코로나바이러스가 외국의 보고주와 비교하였을 때 상당한 유전적 차이를 S gene에서 관찰할 수 있었다. 이러한 유전적 차이는 국내 분리주의 병원성, 항원성 혹은 생물학적 성상이 다르다는 것을 의미한다.

가. 국내 보고주와 외국 보고주간의 계통학적 분석

국내 분리주는 계통 분석에 의해서 호흡기형 OK 및 소화기형 LY-139 strain과 매우 가까운 위치에 존재하였다. 이러한 결과는 국내 소 동절기 적리 바이러스들이 유전적으로 소화기형뿐만 아니라 호흡기형 소 코로나바이러스와 유사하다는 것을 의미한다. 일반적으로 hypervariable region의 염기서열은 매우 다양하여서, 각기 다른 바이러스주들에서 다양한 정도의 핵산의 결손이나 치환이 관찰된다. 국내 분리주와 외국 보고주간의 hypervariable region에 대한 계통 분석을 실시한 결과 국내 분리주는 강독형 호흡기형인 OK 및 BCQ3994 strain과 강독형 소화기형인 LY-139 strain과 같은 cluster를 형성하였다. 바로 위에서 기술한 외국 보고주를 제외하고는, 캐나다 분리주는 같은 cluster에, 미국에서 분리한 주는 또 다른 cluster를 형성하였다. 이러한 결과를 모두 종합하여 볼 때, 국내 분리주는 소화기형 및 호흡기형의 유전적 성격을 가지고 있고, 외국 보고주와 지역별 차이에 의해서 독특한 유전적 진화를 하였다는 것을 알 수 있다.

본 연구진의 조경오 교수는 미국에서 비육우의 소화기 및 호흡기에서 동시에 소 코로나바이러스를 분리하였으며, 이들 바이러스는 유전적으로 매우 가까웠으나 30년 전에 분리한 약독주인 Mebus strain과는 매우 차이가 있는 것을 보고하였다. 이러한 결과를 바탕으로 소 코로나바이러스는 시간이 경과함에 따라서 소화기 친화성에서 소화기와 호흡기 친화형으로 진화된 것으로 추측하였다. 본 연구에서도 국내 분리 소 동절기 적리 바이러스는 예전에 분리한 Mebus strain과는 계통적으로 상당한 차이가 있고, 또한 소화기형과 호흡기형 바이러스와 유사하여 국내 분리주도 소화기 및 호흡기 친화성을 가지는 바이러스로 진화된 것으로 추측하였다. 따라서 이러한 결과는 조경오 교수와 그 동료들이 가정한 소 코로나바이러스의 진화에 대한 가설을 뒷받침하고 있다. 이러한 결과는 또한 조경오 교수와 그 동료들에 의한 연구, 즉 호흡기에서 분리한 소 코로나바이러스를 접종한 무균 소에서 호흡기뿐만 아니라 소화기에서도 바이러스의 배출이 관찰된다는 결과에 의해서 증명할 수 있다. 더욱이 이동 후 도착 당일 소 코로나바이러스의 호흡기 배출이 관찰된 소가 4일 후부터는 설사분변에서 바이러스의 배출이 관찰되는 것은 이러한 가설을 입증한다할 수 있다. 따라서 국내 분리 소 동절기 적리 바이러스도 인공 접종 실험을 통하여 과연 소화기 및 호흡기에 친화성이 있는가를 차후 실험을 통하여 규명하여야 할 것이다.

나. 국내 분리주와 외국 보고주간의 hypervariable region의 아미노산 치환의 비교

소 코로나바이러스 S gene 내의 hypervariable은 S 단백질에 대해 제작된 여러 단클론 항체와 비교하였을 때 다양한 항원성이 있음이 보고되었다. 따라서 이 부위에서 관찰된 호흡기형 소 코로나바이러스 특히 아미노산 부위 (aa 510, aa 531, aa 543, aa 578)는 소화기형 등 다른 소 코로나바이러스와 감별할 수 있는 부위라고 보고 되었다. 하지만 본 연구에 의하며 설사를 주 증상으로 하는 국내 소 동절기 적리 바이러스 gene 내에도 aa 510, aa 543, aa 578은 호흡기형 바이러스와 동일하였다. 또한 본 연구진의 조경오 교수와

그 동료들은 미국의 비육우에서 소화기 및 호흡기에서 분리된 바이러스에서도 이와 똑같은 결과를 보고하였다. 더욱이 aa 531은 송아지 설사형인 BCQ1523에서도 호흡기형과 동일하였다. 이러한 아미노산 변화가 단지 호흡기형뿐만 아니라 동절기 적리형, 송아지 설사형에서도 모두 관찰되어, 이러한 아미노산 부위들은 호흡기형 특이 아미노산 치환이라고 볼 수 없었다.

S1 subunit의 aa 13번과 aa 744는 소화기형 소 코로나바이러스인 F15와 LY strain에서만 관찰되어, 소화기형 특이 아미노산 부위라고 보고 되었다. 하지만 본 연구진의 분석에 따르면 이러한 아미노산 서열은 국내 분리주뿐만 아니라 호흡기형 및 송아지형 소 코로나바이러스에서도 관찰되었다. 특히 aa 744는 거의 대부분의 소 코로나바이러스에서 동일하였다. 따라서 aa 13번과 aa 744는 소화기형 F소 코로나바이러스인 F15와 LY strain 특이 염기서열이 아니라는 것을 알 수 있었다.

S1B immunoreactive epitope의 단 한개의 핵산 염기서열 치환(nt 1583, aa 528; C->T)이 있는 소 코로나바이러스는 숙주의 면역학적 감시에서 도피할 수 있다는 보고가 있다. 국내 분리주의 S1B immunoreactive epitope에서 nt 1583에서 보인 염기서열 치환은 관찰되지 않았지만, 그 외에 aa 531, aa 543, aa 578, aa 617에서 염기서열 치환이 관찰되었다. Mebus strain에 비해서 국내 분리주에서는 특히 aa 617 (T-<I)의 치환이 발생하였는데, 이 부위는 Mebus strain에 비해서 높은 친수성기로 변환되게 되었다. 따라서 국내 분리주들의 aa 617번은 S1B immunoreactive epitope의 변화를 일으켜, 변화된 병원성을 일으킬 수 있을 것으로 추측된다.

다. 국내 분리주와 외국 보고주간의 수용체 결합부위 및 S1A

immunoreactive region의 비교

S1A subunit의 N-terminal region은 바이러스의 수용체 결합부위로 알려져 있으며, 실제로 이 부위의 변화는 코로나바이러스의 세포 친화성을 바꾼다. 국내 분리주에서도 이 부위에서 15개의 아미노산 치환이 관찰되었는데, 이러한 아미노산 치환은 국내 분리주가 외국의 보고주와는 다른 수용체 결

합능력이나 병원성을 보일 수 있는 증거라고 추측된다. 따라서 국내 분리주들에 대한 이러한 실험이 장차 필요할 것으로 사료된다.

소화기형인 Mebus strain에 대한 단클론 항체는 각기 다른 종류의 동물이거나 사람에서 분리한 코로나바이러스와 cross-reaction하는데, 아마 이 단클론 항체는 S1A epitope와 반응할 것이다. 국내 분리주는 물론 외국에서 보고된 소화기형, 호흡기형, 동절기 적리형 소 코로나바이러스의 S1A epitope는 잘 보존되어 있었다. 단지 국내 분리주의 aa 365에서 단일 아미노산 치환이 Mebus strain과 비교하였을 때 관찰되었는데, 이 부위의 치환은 심한 소수성기의 증가를 보였다. 따라서 이러한 치환은 S1A immunoreactive domain의 구조를 변형시킬 수 있어서 기존에 보고된 단클론 항체와 결합하지 않을 수 있을 것이다.

라. S 글라이코단백질 절단부위 주위의 아미노산 차이의 비교

소 코로나바이러스 S 글라이코단백질은 숙주의 단백분해효소에 의해서 aa 763- 768 (KRRSRR) 부위에서 S1과 S2 단백질로 절단이 된다. 본 연구에서 국내 분리주들 모두는 이 부위가 기존의 보고주와 비교하였을 때 잘 보존되어 있었다. 그렇지만 국내 분리주는 이 절단부위의 바로 위 아미노산의 치환 (aa 769; A->S)이 발생하였다. 이러한 치환은 오직 호흡기형 코로나바이러스인 LSU와 OK strain에서 관찰되어 호흡기형 특히 아미노산 서열이라고 보고되었다. 비록 인플루엔자 type C와 센다이 바이러스의 절단부위의 변화가 이들 바이러스의 절단능력에 영향을 줄 수 있다고 하지만, 소 코로나바이러스에서는 이러한 치환이 이 바이러스의 절단능, 바이러스 증식능, CPE 형성에 전혀 영향을 주지 않는다고 보고 되었다. 또한 본 연구진의 조경오 교수가 미국에서 보고한 바와 같이, 미국분리주인 소화기형 및 호흡기형 모두에서 이러한 치환이 발생하였다는 점을 감안하면, 따라서 이러한 국내 분리주에서 관찰된 aa 769의 치환은 호흡기 친화형 치환이라고 볼 수 없다.

마. 국내 분리주와 외국 보고주간의 S2 subunit 부위의 염기서열 비교

코로나바이러스의 S 글라이코단백질의 절단에 의한 S1과 S2 subunit 중에서 S2 subunit의 염기서열은 가장 보존이 잘되어 있다. 국내 분리주의 Mebus strain과의 비교에서도 S2 subunit는 S1 subunit에 비해서 그 염기서열이 잘 보존되어 있었다. 이 중에서 흥미 있는 변화는 S2 subunit의 첫 번째 소수성 영역에서 관찰되었다. 이 영역에서 4개의 아미노산 치환(aa 959, aa 965, aa 984, aa 988)이 발생하였는데, 이러한 치환이 높은 친수성 변화를 유발하였다. 더욱이 호흡기형이나 소화기형을 막론하고 강독주 소 코로나바이러스도 약독주에 비해서 이 영역에서 높은 친수성 치환이 있었다. 소 코로나바이러스의 이 영역은 세포의 융합을 일으키는 부위로 알려져 있어서, 이러한 친수성 변화는 아마 이 바이러스의 세포 융합능이나 병원성에 영향을 미칠 것이다.

바. 국내 분리주와 외국 보고주간의 병원성 특이 염기서열의 비교

소 코로나바이러스의 병원성에 관련될 것으로 추정되는 아미노산 염기서열 10개(6개는 S1 subunit, 4개는 S2 subunit)가 보고 되었다. 본 연구에서 국내 분리주 아미노산 염기서열을 외국에서 보고 된 약독주와 강독주를 대상으로 비교한 결과, 국내 분리주의 7개 아미노산 부위는 강독주와 동일하였다. 이러한 결과는 Chouljenko et al (1998)이 보고한 결과와 일치하였다. 따라서 이러한 아미노산 염기서열이 모두 강독주에서만 관찰된 것으로 미루어 보아, 이러한 아미노산 변화가 S 글라이코단백질의 구조나 기능을 변화시켜서 병원성에 영향을 미쳤을 것으로 추정된다.

제 3절. 국내 성우에서 분리한 소 동절기 적리

코로나바이러스의 송아지에 대한 병원성

Pathogenicity of Winter Dysentery (WD) Bovine Coronavirus to Calves Isolated from Fecal Samples of WD-Affected Cattle

소 동절기 적리 코로나바이러스는 성우에 전염성이 강한 수양성에서 혈변에 이르는 중증의 설사와 유우에서는 심한 산유량 감소를 유발한다. 최근에 들어서 소 동절기 적리에서 분리한 코로나바이러스를 실험적으로 성우에 접종하였을 때, 소 동절기 적리를 성공적으로 재현하였다. 하지만 소 동절기 적리 코로나바이러스의 인공접종에 의한 소에서의 자세한 병리학적 연구는 전세계적으로 없다. 더욱이 성우에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스의 송아지에 대한 감수성은 전혀 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스의 송아지에 대한 감수성 및 그 병원성을 규명하기 위해서, 초유를 급여하지 않는 송아지 6마리에 국내 분리주를 구강(40 ml) 및 비강(10 ml)으로 인공접종한 후, 1일령(1두), 3일령(2두), 5일령(1두), 8일령(2두) 때 각각 안락사 시킨 후 각각의 장기를 채취하여 병리학적으로 관찰하였다. 분변 내 바이러스의 배출기간을 확인하기 위하여 각각의 송아지를 안락사 하기 전까지 매일 분변을 채취하여, 소 코로나바이러스에 특이적인 primer pairs를 이용하여 RT-PCR과 nested PCR과 indirect antigen-capture ELISA를 수행하였다. 또한 소 코로나바이러스에 대한 항체의 생성여부를 확인하기 위하여 접종 전과 안락사 당시에 혈액을 채취하여 indirect antigen-capture ELISA로 소 코로나바이러스에 대한 혈중 항체가를 측정하였다. 설사는 접종 익일인 1일령부터 모든 접종 송아지에서 관찰되었으며, 감염 2일령부터는 분비성 설사를 하였다. 바이러스도 감염 1일령부터 RT-PCR에 의해 검출되었으며, 바이러스 배출 기간은 모든 송아지

에서 안락사 때까지였다. 각각의 바이러스 접종 실험우의 육안적 소견은 소장의 팽대와 장벽의 위축이 특징이었는데, 접종 시간이 지날수록 장벽의 위축은 그 정도가 심하여졌다. 또한 접종 3일령 이후부터는 결장의 충혈과 경도의 출혈도 바이러스 접종 송아지에서 관찰되었다. 소 동절기 적리 바이러스에 감염된 소장의 특징적인 병리조직학적 소견은 용모 상피세포의 탈락 및 괴사, 용모의 위축 및 융합, 음와의 증식, 용모 대 음와 길이의 감소, 고유층의 림프구 침윤이었다. 대장의 특징적인 병리학적 소견은 음와 상피세포의 탈락, 음와의 융합, 고유층의 림프구 및 대식세포의 침윤, 충혈 혹은 출혈이었다. 이러한 기준을 감염된 송아지에 적용하면, 감염초기에는 주로 상부 소장에 더욱 심하였으며, 감염시간이 지날수록 병변의 정도는 점점 하강하여 감염 후기인 5일령과 8일령에서는 대장의 병변이 소장의 병변에 비해서 그 정도가 조금 높았다. 혈중 항체기도 접종 전에는 관찰되지 않다가 감염초기부터 점점 상승하기 시작하여 감염 8일령에서는 최고치를 나타내었다. 이상의 결과 국내 분리 소 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지의 소장과 대장에 병변을 유발하여 바이러스의 배출과 설사를 일으킨다고 결론지을 수 있다. 본 연구의 이러한 결과는 차후 소 동절기 적리와 송아지 설사의 방역 및 역학을 규명하는데 있어서 중요한 자료로서 사용될 수 있을 것이다.

1. 서 설

소 코로나바이러스는 *코로나바이러스과*에 속하며, 송아지 설사, 성우의 동절기 적리, 비육의 호흡기 질환을 일으키거나 관련되어 있다고 한다. 전염성이 강하여 집단으로 발생하는 소 동절기 적리는 특징적으로 겨울철에 성우 집단에서 수양성에서 혈변에 이르는 심한 설사와 유우에서는 심각한 우유 생산량을 감소시킨다. 소 동절기 적리의 원인체는 그동안 *Campylobacter jejuni*를 포함하여 여러 가지 원인체가 거론되었지만, 80년대 후반에 들어서야 소 코로나바이러스가 원인으로 잠정적인 결론을 내렸다. 이러한 결론을 내린 이유는 오직 소 코로나바이러스만이 동절기 적리가 발생한 성우의 설사분변에서 지속적으로 검출되었기 때문이다. 하지만 동절기 적리가 발생한 성우의 설사분변에서 분리한 바이러스에 의한 소 동절기 적리 재현 실험은 그동안 계속적으로 성공 못하였으며, 2001년 Traven 등에 의해서 처음으로 성공할 수 있었다.

소 코로나바이러스에 의한 송아지 설사의 병원성에 대한 연구는 1970년대 후반에 보고되었다. 하지만 소 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 병리학적인 연구는 전혀 수행되지 않았다. 단지 Traven et al (2001)에 의해서 소 동절기 적리 코로나바이러스가 성우에서도 설사를 일으키며, 원인 바이러스의 설사분변을 통한 배출 등을 보고한 것 뿐이다. 뿐만 아니라 소 동절기 적리 코로나바이러스의 송아지에 대한 병원성과 그 역학관계에 대해서는 전혀 보고되지 않는 실정이다.

본 연구에서는 국내에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스가 송아지에 병원성을 가지고 있는지 알아보기 위해서, 송아지에 국내 분리주를 접종하여 분변 내 바이러스의 배출을 소 코로나바이러스에 특이적인 primer pairs와 항체를 이용하여 RT-PCR, nested PCR, indirect antigen-capture ELISA를 수행하였으며, 혈중 항체를 측정하기 위하여 소 코로나바이러스에 특이적인 항체를 이용하여 indirect antigen-capture ELISA를 하였고, 병변의 정도를 측정하기 위하여 병리학적인 검사를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 바이러스

송아지에 접종할 소 동절기 적리 바이러스는 2003년 동절기 적리가 발생한 성우의 설사분변에서 분리한 소 동절기 적리 분리주인 KWD5를 사용하였다. KWD5는 면역전자현미경, 면역형광항체법, RT-PCR 및 spike glycoprotein gene의 염기서열 분석을 통하여 소 동절기 적리 바이러스로 확인되었다.

나. 공시동물 및 실험설계

초유를 급여하지 않은 2일령-5일령 Holstein 송아지 8두를 본 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 송아지는 매일 송아지용 대용유로 인공급여 하였으며, 체온을 매일 측정하였다. 실내 사육 온도는 20℃가 되도록 조정하였으며, 설사 등의 임상증상을 매일 측정하였다.

6두의 송아지에 KWD5 소 동절기 적리 바이러스가 증식한 HRT-18G 세포 상층액 40 ml와 10 ml를 구강과 비강을 통해서 각각 접종하였다. 감염된 송아지는 1일째(1두), 3일째(2두), 5일째(1두), 8일째(2두)에 lumpun의 정맥 내 치사용량을 주입하여 안락사 시킨 후, 부검을 통하여 육안적인 병변을 확인하였다.

음성대조군으로 1두의 송아지에는 mock-infected HRT-18G 세포 상층액을 구강과 비강에 각각 40 ml와 10 ml씩 접종하여, 접종 2일째 때 안락사 시킨 후 실험에 사용하였다. 나머지 1두는 접종된 바이러스의 감염에 의한 분변 내 배설과 접종 바이러스의 직접적인 배설에 의한 것인가를 확인하기 위하여 chloroform으로 불활화 시킨 KWD5 코로나바이러스 HRT-18G 세포 배양액을 구강과 비강에 40 ml와 10 ml를 각각 접종한 후, 접종 2일째 때 안락사 시킨 후 실험에 사용하였다.

분변 내 바이러스 배출을 확인하기 위하여 실험에 사용한 모든 송아지의 분변을 접종 전과 안락사 시킬 때까지 매일 채취하여, -70℃에 사용 때까지 보관하였다. 소 코로나바이러스의 혈청 내 항체를 측정하기 위하여 바이러

스 접종 전과 안락사 시키기 전에 채혈하여 혈청을 분리한 후, -70℃에 사용 때까지 보관하였다.

다. 소 동절기 적리 코로나바이러스 검출을 위한 ELISA 기법

분변 내 소 동절기 적리 코로나바이러스의 배출을 측정하기 위하여 indirect antigen-capture ELISA를 사용하였다. 즉 96-well flat-bottom microtiter plates에 소 코로나바이러스의 nucleocapside, spike 및 hemagglutinin/esterase 단백질에 대한 특이 단클론 항체를 각각 8000씩 희석하여 100 μ l을 각 컬럼의 모든 well에 분주한 후에 15시간 동안 4℃ 냉장고에서 정치하였다. 그 후, 단클론 항체의 비특이 반응을 극소화시키기 위해서 5% nonfat, dry milk를 각 well에 200 μ l씩 분주한후, 상온에서 2시간 작용시킨다. 여기에 분리된 동절기 적리 원인바이러스를 각각 컬럼의 a, b, e, f well에 100 μ l씩 분주하고, 바이러스가 포함되지 않은 정상 배양액인 EMEM은 각 컬럼의 c, d, g, h well에 분주한다. 분주가 끝나면, 상온에서 1시간 PBS pH 7.4로 10배 희석한 분변 상층액을 plate의 각 well의 밑에 흡착시켰다. 이 반응이 끝난 후에 소에서 제작한 소 코로나바이러스에 대한 단클론 항체를 각각의 컬럼 4개의 well에 100 μ l씩 분주하였다. 첫 번째 컬럼의 4개 well과 2번째 컬럼의 4개 well은 각각 양성 및 음성대조로 사용한다. 상온에서 1시간 정치 후에, 각 well에 horseradish peroxidase가 부착된 소 IgG 항체에 대한 염소에서 제작된 항혈청을 4000배 희석하여 분주하고 1시간 정치하였다. 상기의 각 단계사이에는 각각의 well을 PBST로 3회간 각각 10분씩 세척한다. 항원의 검출을 위해서 발색제로는 최종농도가 0.03%인 과산화수소수가 포함된 ABTS 100 μ l을 각각의 well에 분주하였다. 15분간 정치한 후에 414 nm의 파장에서 흡광도를 측정한 후, 이들 결과를 자동으로 판독할 수 있는 컴퓨터에서 흡광도가 양성 단클론 항체가 들어있는 well의 흡광도 수치에서 음성 항체가 들어있는 well의 흡광도의 수치가 평균 0.03 이상일 때는 양성으로 판정하였다.

라. 바이러스 RNA 추출

분변 내 바이러스 RNA의 추출을 다음과 같이 수행하였다. 분변을 PBS로 5배 희석한 후에 4°C 3000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 분변 상층액 200 μ l에 500 μ l의 Solution D (4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM Sodium citrate, pH7, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)와 50 μ l 2 M sodium acetate (pH4.0)을 넣고 강하게 vortex하였다. 여기에 500 μ l의 water saturated phenol (pH4.5)와 100 μ l의 chloroform과 isoamylalcohol(49:1)을 넣고 강하게 vortex를 한 후에 얼음 속에 15분간 정치하였다. 이들 혼합액은 4°C 15000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액 700 μ l을 새 에펜돌프 튜브에 옮긴 후 여기에 Rnaid kit (BIO 101사)내의 binding solution 700 μ l와 matrix solution 15 μ l을 넣고 강하게 vortex하였다. 상온에서 10분간 정치하면서 가끔 위아래로 흔들어가면서 혼합액이 잘 섞이도록 하였다. 이들 혼합액을 4°C 10000 rpm에서 2분간 원심한 후, 상층액을 버렸다. 튜브 밑의 침전물은 kit내의 세척액으로 3회 원심 및 상층액 제거를 통해서 세척하였다. 세척이 끝나면 튜브밑의 침전물에 50 μ l의 DEPC 처리 멸균증류수를 넣고 잘 혼합한 후 50°C에서 10분간 방치하여 matrix에 결합한 바이러스 RNA가 분리되도록 하였다. 분리가 끝나면, 상온에서 3분간 15000 rpm에서 원심분리하여 matrix를 침전시키고, 상층액만 조심히 깨끗한 에펜돌프 튜브로 옮겨서 사용 때까지 -70°C에 보관하였다.

마. 소 동절기 적리 코로나바이러스의 검출을 위한 RT-PCR 및 nested PCR용 primer 제작

소 코로나바이러스의 유전자 중에서 nucleocapside 단백질에 대한 유전자가 보존성이 높다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에 사용할 primer쌍들은 GeneBank에 보고된 소 코로나바이러스주중에서 Mebus 주를 검색하여 사용하였다.

설계된 primr쌍들은 다음과 같다. RT-PCR용 primer쌍은 upstream primer가 5'-GCAATCCAGTAGTAGAGCGT-3'(21-40)이고

downstream primer가 5'-CTTA GTGGCATCCGGTCCAA-3'(731-750)이다. Nested PCR용 primer쌍은 RT-PCR용 primer쌍의 내부에서 설계되었으며, 다음과 같다. Upstream primer는 5'-GCCG ATCAGTCCGACCAATG-3'(79-98)이고 downstream primer는 5'-AGAATGTCAGC CGGGGTAG-3' (467-485)이다.

바. RT-PCR 기법의 수행

본 실험에서는 동절기 적리의 원인체인 코로나바이러스의 검출을 위해서 기존의 RT-PCR 기법에 비해서 민감도는 같으나 간단히 수행할 수 있는 1 step RT-PCR 기법을 수행하였다. 즉 추출한 바이러스 RNA 5 μ l에 1 μ l의 DMSO를 넣어서 70°C에서 10분 반응시킨 후, 5분간 얼음위에서 반응을 정지시켰다. 여기에 44 μ l의 RT-PCR 혼합액을 넣고 잘 혼합시켰다. RT-PCR 혼합액은 5 μ l의 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin], 1 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l Upstream primer (50 pmol), 1 μ l downstream primer (50 pmol), 0.5 μ l의 AMV RT(Promega사), 0.5 μ l의 RNAsin (Promega사), 24.5 μ l의 증류수 그리고 0.5 μ l Taq polymerase (Promega사)로 구성되어 있다. PCR thermocycler 내에서 42°C 60분간 RT반응을 한 후에, 94°C에서 5분간 preheating 한다. PCR cycle은 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분의 cycle을 35회로서 최종적으로 72°C에서 7분간 반응시켜서 반응의 강도를 높인다. RT-PCR 산물은 ethidium bromide에 염색된 1.5% agarose gel에서 확인하였다.

사. Nested PCR 기법의 수행

동절기 적리 진단의 민감도와 특이성을 높이기 위해서 Nested PCR 기법을 확립하였다. 즉, RT-PCR 산물 5 μ l에 45 μ l의 PCR 혼합액을 잘 혼합한다. PCR 혼합액은 5 μ l의 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin], 1 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l

upstream primer (50 pmol), 1 μ l downstream primer (50 pmol), 36.5 μ l의 증류수 그리고 0.5 μ l Taq polymerase (Promega사)로 구성되어 있다. PCR thermocycler내에서 94°C에서 5분간 preheating 한후, PCR cycle은 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분의 cycle을 30회하고 최종적으로 72°C에서 7분간 반응시켜서 반응의 강도를 높인다. Nested PCR 산물은 ethidium bromide에 염색된 1.5% agarose gel에서 확인하였다.

아. 소 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 항체 검출을 위한 ELISA 기법

동절기 적리 원인체에 대한 항체의 유무를 검사하기 위해서 높은 민감도와 비특이 반응이 적게 발생하는 96-well flat-bottom microtiter plates에 소 코로나바이러스의 nucleocapside, spike 및 hemagglutinin/esterase 단백질에 대한 특이 단클론 항체를 각각 8000씩 희석하여 100 μ l을 각 컬럼의 모든 well에 분주한 후에 15시간 동안 4°C 냉장고에서 정치한다. 그 후, 단클론 항체의 비특이 반응을 극소화 시키기 위해서 5% nonfat, dry milk를 각 well에 200 μ l씩 분주한후, 상온에서 2시간 작용시킨다. 여기에 분리된 동절기 적리 원인바이러스를 각각 컬럼의 a, b, e, f well에 100 μ l씩 분주하고, 바이러스가 포함되지 않은 정상 배양액인 EMEM은 각 컬럼의 c, d, g, h well에 분주한다. 분주가 끝나면, 상온에서 1시간 바이러스를 plate의 각 well의 밑에 흡착시켰다. 이 동안에 각각의 실험용 송아지에서 채취한 혈청을 56°C에서 30분간 비동화 시킨후에, 이들 항체를 PBS(pH7.2)로 25배에서 2배씩 계단희석하였다. 희석한 혈청을 각각의 컬럼 4개의 well에 100 μ l씩 분주하였다. 첫 번째 컬럼의 4개 well과 2번째 컬럼의 4개 well은 각각 양성 및 음성대조로 사용한다. 상온에서 1시간 정치 후에, 각 well에 horseradish peroxidase가 부착된 소 IgG 항체에 대한 염소에서 제작된 항혈청을 4000배 희석하여 분주하고 1시간 정치하였다. 상기의 각 단계사이에는 각각의 well을 PBST로 3회간 각각 10분씩 세척한다. 항원의 검출을 위해서 발색제로는 최종농도가 0.03%인 과산화

수소수가 포함된 ABTS 100 μl 을 각각의 well에 분주하였다. 15분간 정치한 후에 414 nm의 파장에서 흡광도를 측정 한 후, 이들 결과를 자동으로 판독할 수 있는 컴퓨터에서 흡광도가 양성 단클론 항체가 들어있는 well의 흡광도 수치에서 음성 항체가 들어있는 well의 흡광도의 수치가 평균 0.03 이상일 때는 양성으로 판정하였다.

자. 병리조직학적 검사

실험 계획에 의해서 안락사 시킨 송아지는 부검을 실시하여 병변의 유무를 육안적으로 검사한 후 그 소견을 자세히 기록하였다. 육안검사가 끝나면 바로 소장 및 대장의 각 부분과 폐, 간, 비장 등의 중요장기를 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정시켰다. 고정된 장기 및 조직은 상법에 준하여 파라핀 봉입 후에 4 μm 로 세절하였다. 조직 절편은 Hematoxylin & Eosin 염색을 하고, 광학현미경으로 조직학적 검사를 수행하였다.

병리조직학적으로 병변의 등급을 바이러스 접종 송아지와 mock 접종 송아지의 비교에 의해서 책정하였다. 병변의 등급은 0, 1, 2, 3, 4로 나누었으며, 이러한 등급의 기준은 용모 대 음와 길이의 비율(villi/crypt ratio; V/C ratio), 용모 상피세포의 탈락, 음와의 증식이었다. 즉 정상인 등급 0은 V/C ratio가 6:1 이상이며, 용모상피세포의 탈락이나 음와의 증식이 관찰되지 않는 것이다. 등급 1의 병변은 V/C ratio가 5:1 이상이며, 상피세포의 탈락이 용모의 첨단부위에 있고, 음와의 증식이 경도인 경우이다. 등급 2의 병변은 V/C ratio가 4:1 이상이며 상피세포탈락이 용모의 중간부위이고 음와의 증식이 중등도인 경우이다. 등급 3의 병변은 V/C ratio가 3:1 이상이며, 상피세포의 탈락이 용모 하단의 중간부위이고, 음와의 증식이 심한 경우이다. 등급 4의 병변은 V/C ratio가 2:1 이상이며, 용모 상피세포의 탈락이 용모하단까지이고 음와의 증식이 현저한 경우이다. 소장 및 대장의 각 부위 병변의 정도를 상단, 중단, 하단으로 나누어서 관찰하였으며, 이러한 각 부위에서 10군데의 용모나 음와를 관찰하여 그 평균치로 하였다.

3. 결 과

가. 임상소견

국내 분리주인 소 동절기 적리 코로나바이러스를 접종한 송아지는 감염 1일째부터 묽은 설사를 모두 보였으며, 2일째에는 심한 수양성의 분출성 설사를 시작하였다. 감염 3일째에는 약간의 혈액이 섞인 설사가 시작하였고, 3일째부터는 심한 탈수가 관찰되기 시작하였다. 체온은 감염 1일째부터 약간씩 상승되다가 3일째부터는 41℃ 이상으로 지속되었다. 그 외의 특이한 임상소견은 관찰되지 않았다.

Mock 감염된 송아지와 chloroform으로 불활화 시킨 바이러스를 접종한 송아지에서는 어떤 특이한 임상소견도 관찰되지 않았다.

나. 육안적 소견

안락사 시킨 후 부검을 통하여 관찰된 특이한 육안적 소견은 오직 소장 및 대장에서만 관찰되었다. 소 동절기 적리 코로나바이러스 감염 후 1일째 된 송아지의 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장의 관강 내에서는 약간의 카탈성 삼출물외에는 어떤 특이한 소견도 관찰되지 않았다. 접종 2일째부터 소장 벽의 위축 및 충혈이 점점 심해지기 시작하여 접종 8일째에는 장벽이 심하게 위축되어 있었다. 대장의 병변도 시간의 경과에 따라 점점 충혈 및 출혈이 관찰되기 시작하였으며, 접종 8일째에는 약간의 출혈과 섬유소의 삼출이 관찰되었다.

다. 병리조직학적 소견

병리조직학적 소장 병변의 특징적 소견은 용모상피세포의 변성, 괴사, 탈락과 용모의 위축과 융합이었다. 이러한 상피세포의 괴사에 따른 음와 상피세포의 증식과 음와 길이의 증가가 수반되었다. 또한 용모 고유층에는 림프구의 침윤이 수반되어 있었다. 대장 병변의 특징적 소견은 음와 상피세포의 증식, 융합, 변성 및 괴사, 출혈, 림프구성 세포의 고유층 침윤이었다. 이러한 병변의 특징적인 소견을 기준으로 하여서 병변의 등급을 만들어 mock 감염

된 송아지를 기준으로 바이러스가 감염된 송아지의 병변을 비교한 결과 Table 2와 Figure 3에서 나타난 것과 같이 특징적인 병변의 변화를 확인할 수 있었다. 즉 바이러스 감염 1일째에 안락사 시킨 송아지는 소장과 대장 전반에 걸쳐서 등급 1의 병변이 관찰되었다. 하지만 접종 후 시간이 경과할수록 십이지장의 병변이 심화되었고, 이러한 심화의 정도가 공장, 회장으로 확산되어 가는 경향을 관찰할 수 있었다. 접종 8일째에는 십이지장은 등급 4에 해당되는 현저한 병변이 관찰 되었으며, 공장과 회장도 등급 3 이상의 심한 병변이 관찰되었다. 맹장, 결장, 직장의 대장에서는 접종 3일째까지 경미한 병변만 있었는데, 접종 5일째부터 맹장을 시작으로 하여서 병변이 심화되기 시작하였고, 접종 시간이 경과할수록 결장과 직장으로 확산되어 갔다.

비강 점막의 상피세포에서도 특징적인 병변이 관찰되었다. 즉 비강 상피세포의 변성 및 괴사에 따른 탈락이 감염 초기에 관찰되었으며, 감염 8일경에는 상피세포의 증식도 관찰되었다. 점막 밑 조직에는 림프구의 침윤이 관찰되었는데, 이러한 병변은 접종 후 시간이 경과할수록 심화되는 경향이 있었다. 장간막 림프절에서는 림프소절의 증식을 동반한 피질의 증식이 특징적으로 관찰되었다. 그 외의 장기나 조직에서는 어떤 특징적인 변화도 관찰되지 않았다.

라. 분변 내 바이러스 배출

분변 내 바이러스 배출기간을 Table 1에 제시하였다. 분변 내 바이러스의 배출은 indirect ELISA기법으로 측정된 결과 설사 개시 다음날부터 관찰되었다. 좀더 민감도가 높은 RT-PCR이나 nested PCR로 적용한 결과 바이러스의 배출은 감염 1일 째부터 관찰이 되기 시작하였다. Mock 감염된 혹은 chloroform-inactivated 바이러스를 접종한 송아지에서는 분변 내 바이러스 검출이 어떠한 기법에 의해서도 검출되지 않았다(Table 1).

마. 혈중 항체가 변화

소 동절기 적리 코로나바이러스 국내 분리주를 접종한 송아지의 혈액에서는 혈청역가가 상당히 높게 나왔다(Table 1). 감염 1일째 부검한 송아지는

혈청 역가가 3,200인 반면에 접종 시간이 경과함에 따라서 접종 8일째에는 51,200까지 상승하였다(Table 1). 그러나 mock 감염된 혹은 chloroform-inactivated 바이러스를 접종한 송아지에서는 혈청가가 검출되지 않았다(Table 1).

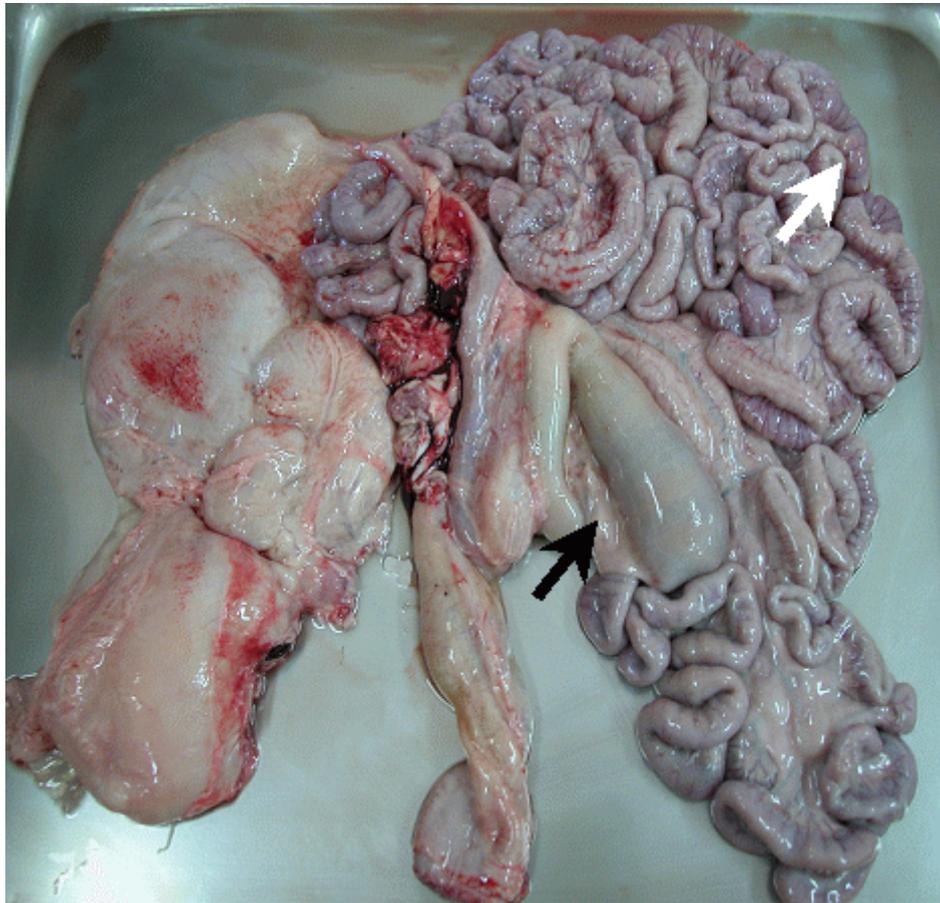


Fig 1. Intestine; 11 day-old calf; Inoculated with KWD5 strain of winter dysentery bovine coronavirus at 3 day-old and sanctificated at 8 day post-inoculation. Small intestine shows mild atrophy (white arrow). Large intestine is moderately dilated (black arrow).

Table 1. Occurrence of diarrhea, fecal virus shedding and IgG winter dysentery bovine coronavirus (WD BCV) antibody titers in serum of calves inoculated with WD BCV

Calf No. ^a	Inoculum ^b (Days old)	Inoculation route	Euthanasia (PID) ^c	Diarrhea onset PID (Duration) ^d	Fecal samples			IgG BCV antibody titers in serum	
					ELISA Onset PID (Duration)	RT-PCR Onset PID (Duration)	Nested PCR Onset PID (Duration)	At inoculation	At termination of exp.
1 (Cols-D)	KWD5 (2)	Oronasal	1	1 (1)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	≤ 25	3,200
2 (Cols-D)	KWD5 (3)	Oronasal	3	1 (3)	2 (2)	1 (3)	1 (3)	≤ 25	12,800
3 (Cols-D)	KWD5 (2)	Oronasal	5	1 (5)	2 (4)	1 (5)	1 (5)	≤ 25	12,800
4 (Cols-D)	KWD5 (2)	Oronasal	Dead at PID 5	1 (5)	3 (3)	2 (4)	1 (5)	≤ 25	25,600
5 (Cols-D)	KWD5 (3)	Oronasal	Dead at PID 8	1 (8)	3 (6)	2 (7)	1 (8)	≤ 25	25,600
6 (Cols-D)	KWD5 (3)	Oronasal	Dead at PID 8	1 (8)	2 (7)	1 (8)	1 (8)	≤ 25	51,200
7 (Cols-D)	Mock-infected HRT-18G cells (4)	Oronasal	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	≤ 25	≤ 25
8 (Cols-D)	Chloroform- inactivated KWD5 (2)	Oronasal	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	≤ 25	≤ 25

^aCols-D: colostrum deprived calf.

^bKWD5: winter dysentery strain of BCV isolated in Korea.

^cPID: post-inoculation day., ^dDuration in days.

Table 2. Summary of histopathological findings and severity of lesions in small & large intestine of neonatal calves after oral inoculation with BoCV.

Calf No.	Duodenum			Jejunum			Ileum			Cecum	Colon			Rectum		
	upper	middle	lower	upper	middle	lower	upper	middle	lower	middle	upper	middle	lower	upper	middle	lower
I (1 DPI)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
II (3 DPI)	2	2	2	2	2	1.5	1.5	15	1.5	1	1	1	1	1	1	1
III (5 DPI ①)	2.5	2.5	2	2	2	2.8	2.8	2.8	2	1	1	1	1	1	1	1
IV (5 DPI ②)	2.8	2.5	2.8	2.5	3	3	2	2	2	1.5	1.5	1	1	1	1	1
V (8 DPI ①)	4	4	4	3.5	3.5	3	3	3	3	2	2.5	2.5	3	3	3	3
VI (8 DPI ②)	4	4	4	3	3.5	3	3	3	3	2.5	3	3	2.5	3	3	3

All calves were 1 day of age at oral inoculation.

Score is designated based on Villi/crypt(V/C) ratio as follows: 0 = ($6:1 \leq V/C$), 1 = ($5:1 \leq V/C$), 2 = ($4:1 \leq V/C$), 3 = ($3:1 \leq V/C$), 4 = ($2:1 \leq V/C$) and desquamation grade as follows: 0 = non desquamation, 1 = tip of villi, 2 = upper middle of villi, 3 = lower middle of villi, 4= lower villi and crypt hyperplasia grade as follows : 0 = non hyperplasia, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = marked, 4= severe.

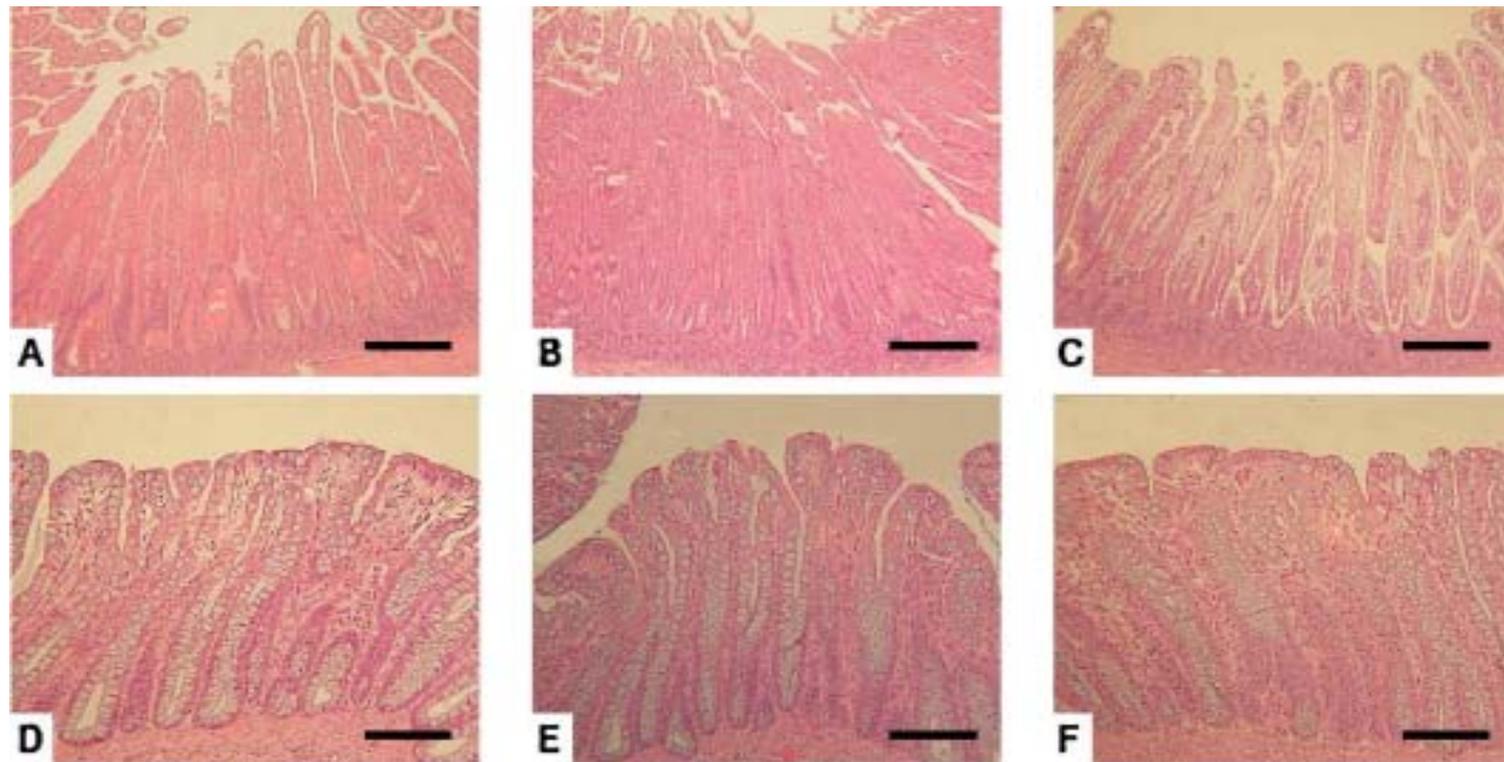


Fig 2. Intestine; 6 day-old calf; Inoculated with mock-infected HRT-18G cells at 4 day-old and sanctificated at 2 day post-inoculation. There are no significant lesions throughout the duodenum to rectum. A; duodenum. B; jejunum.C; ileum. D; cecum. E; colon. F; rectum. H&E stain. Bar = 480 μ m.

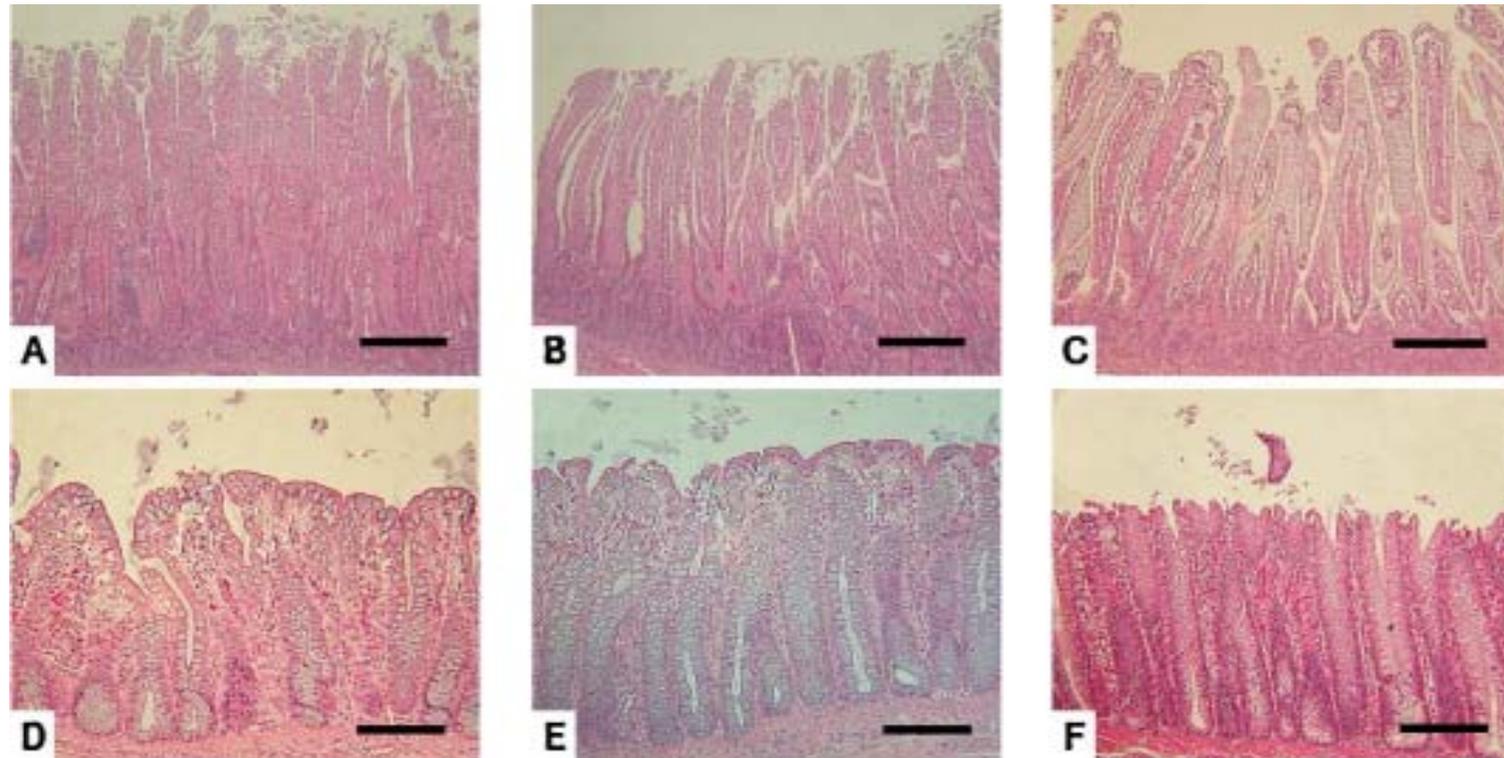


Fig 3. Intestine; 3 day-old calf; Inoculated with KWD5 strain of winter dysentery bovine coronavirus at 2 day-old and sanctificated at 1 day post-inoculation. Marked desquamation of villi epithelial cells are observed in duodenum (A) and jejunum (B). Cecum to rectum reveal mild degeneration and necrosis of crypt epithelial cells. A; duodenum. B; jejunum. C; ileum. D; cecum. E; colon. F; rectum. H&E stain. Bar = 480 μ m.

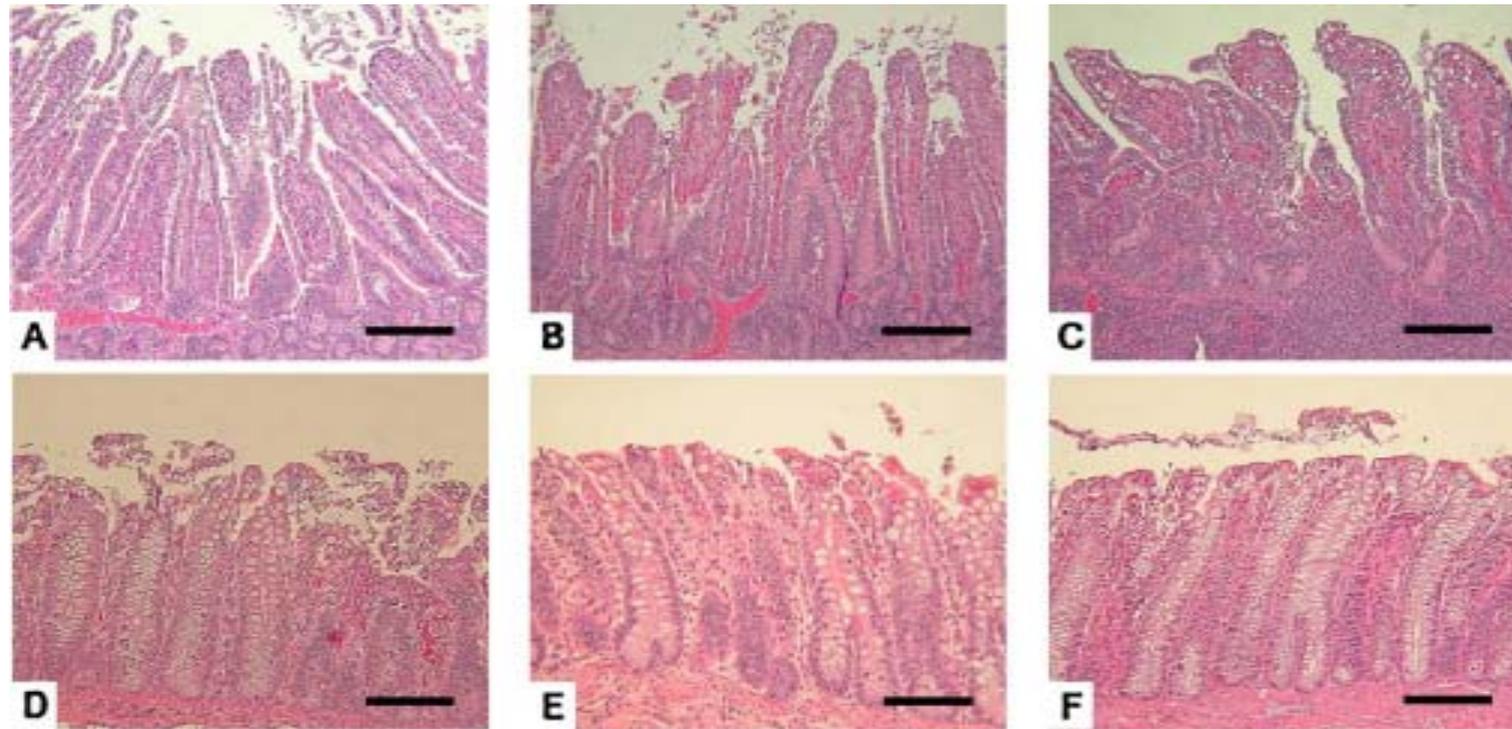


Fig 3. Intestine; 6 day-old calf; Inoculated with KWD5 strain of winter dysentery bovine coronavirus at 3 day-old and sanctificated at 3 day post-inoculation. Marked desquamation of villi epithelial cells and crypt hyperplasia are observed in duodenum (A), jejunum (B) and ileum (C). Cecum (D) and rectum (F) reveal moderate degeneration and necrosis of crypt epithelial cells and hyperplasia of basal reserve cells. A; duodenum. B; jejunum. C; ileum. D; cecum. E; colon. F; rectum. H&E stain. Bar = 480 μ m.

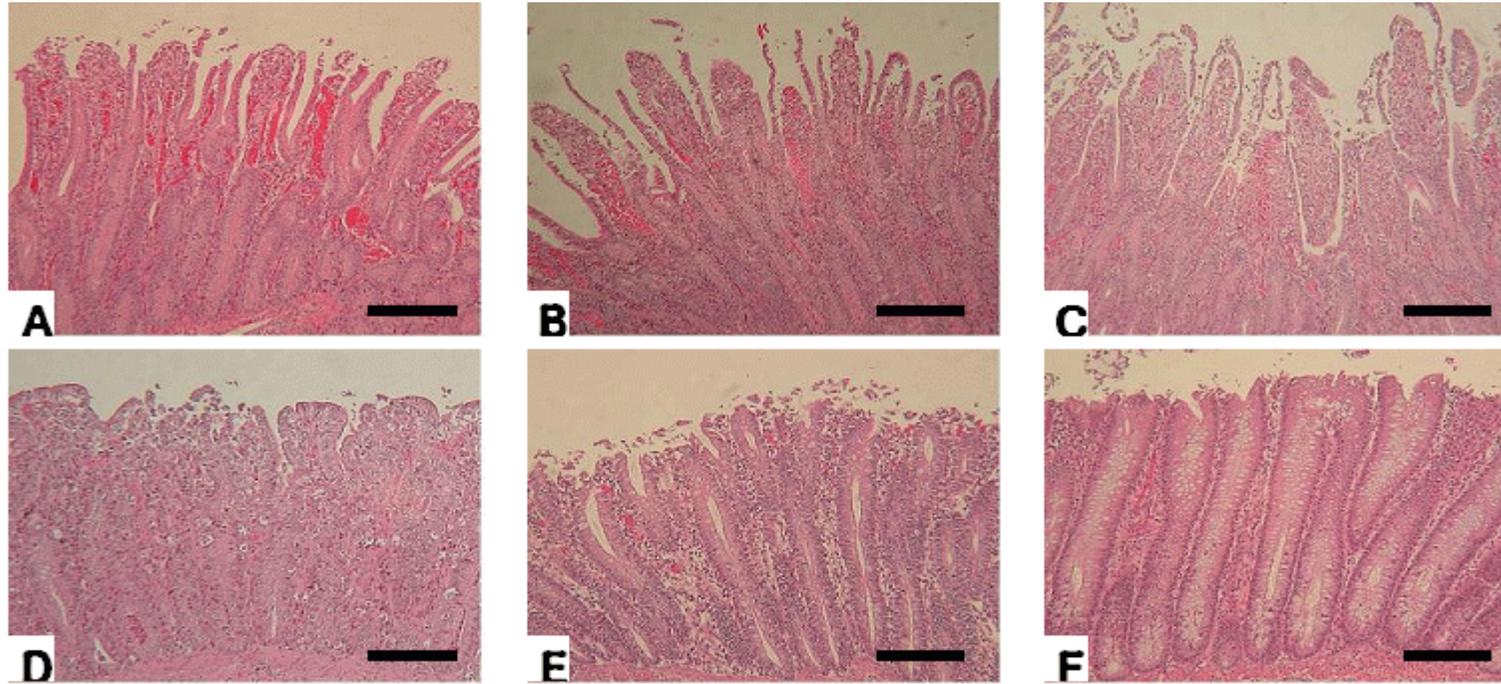


Fig 4. Intestine; 7 day-old calf; Inoculated with KWD5 strain of winter dysentery bovine coronavirus at 2 day-old and sanctificated at 5 day post-inoculation. Severe hyperplasia of crypt epithelial cells with marked desquamation of villi epithelial cells aare observed in duodenum (A), jejunum (B) and ileum (C). Cecum (D) to rectum (F) reveal severe degeneration and necrosis of crypt epithelial cells and hyperplasia of basal reserve cells. Cecum and colon exhibit lymphoid cell infiltration and crypt fusion. A; duodenum. B; jejunum. C; ileum. D; cecum. E; colon. F; rectum. H&E stain. Bar = 480 μ m.

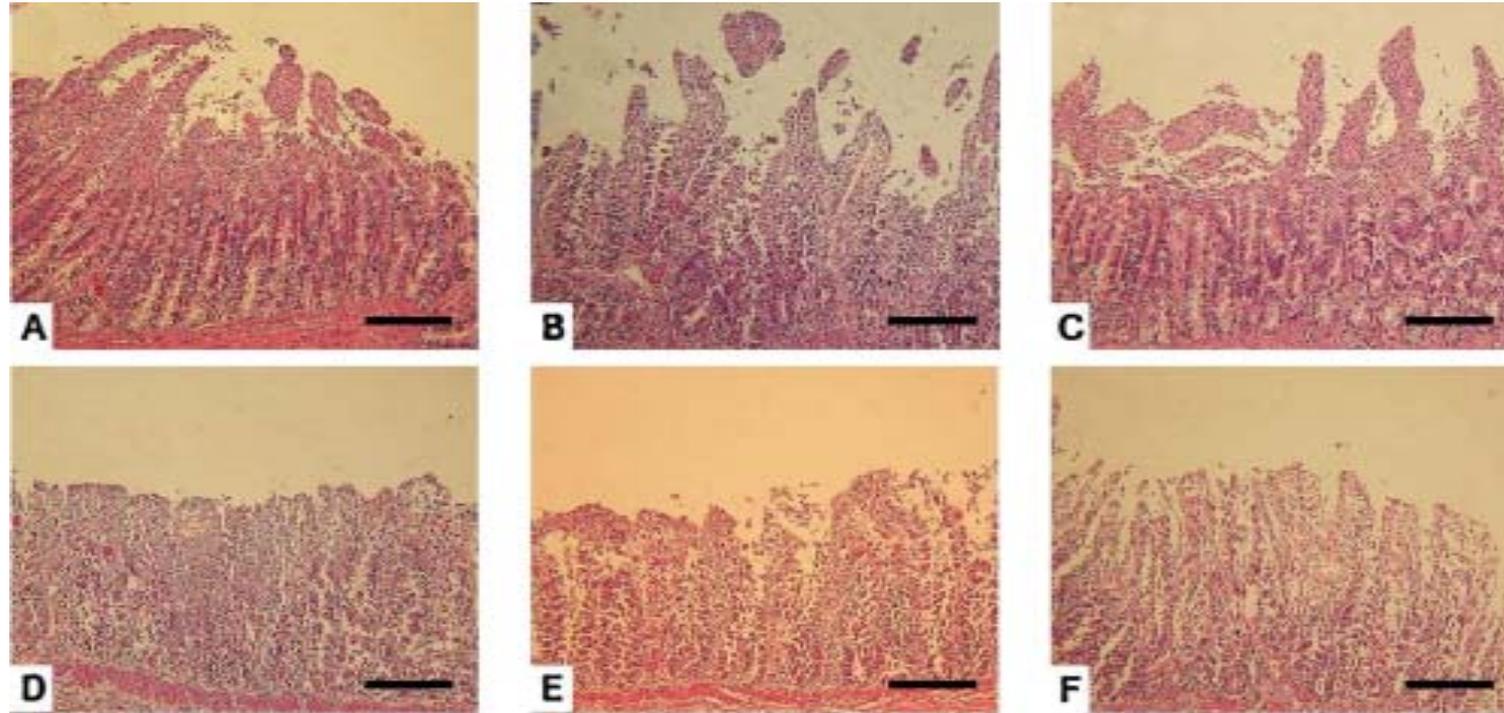


Fig 5. Intestine; 11 day-old calf; Inoculated with KWD5 strain of winter dysentery bovine coronavirus at 3 day-old and sanctificated at 8 day post-inoculation. Severe hyperplasia of crypt epithelial cells with marked desquamation of villi epithelial cells are observed in duodenum (A), jejunum (B) and ileum (C). Cecum (D) to rectum (F) reveal severe degeneration and necrosis of crypt epithelial cells and hyperplasia of basal reserve cells. Cecum and colon exhibit lymphoid cell infiltration and crypt fusion. A; duodenum. B; jejunum. C; ileum. D; cecum. E; colon. F; rectum. H&E stain. Bar = 480 μ m.

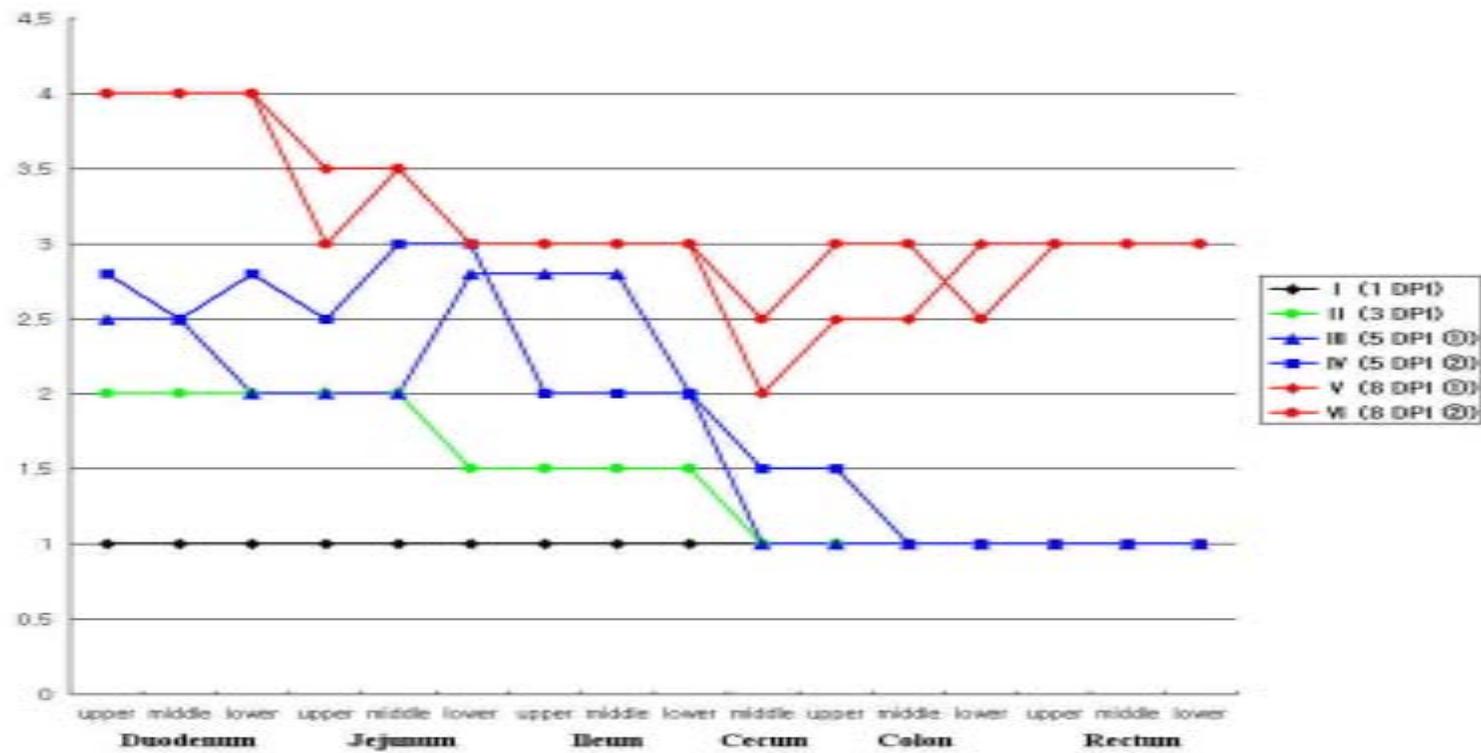


Fig 6. Diagram of severity of lesions in small & large intestine of neonatal calves after oral inoculation with bovine coronavirus.

4. 고 찰

소 동절기 적리 코로나바이러스는 성우에 수양성에서 혈변에 이르기까지 심한 설사와 유우에서는 이러한 설사 외에 심각한 유량감소가 동반한다. 한편 송아지에서도 소 코로나바이러스에 의한 심한 설사로 인하여 폐사가 발생할 정도로 그 발생이 여러 나라에서 보고 되고 있다. 하지만 소 동절기 적리 코로나바이러스와 송아지의 코로나바이러스 간의 상호 교차감염과 그 병원성에 대해서는 아직 규명되지 않았다. 따라서 이러한 점을 규명하기 위해서 본 연구에서는 송아지에 국내에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스를 인공접종 하여서, 교차감염 능력과 그 병원성에 대하여 연구하였다. 그 결과 국내에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지에 심각한 설사를 일으켰다. 뿐만 아니라 감염된 송아지는 설사분변을 통해서 바이러스를 지속적으로 배출하였으며, 소장과 대장에서도 특징적인 바이러스성 병변이 발생하였다. 이러한 결과를 종합하면, 성우에서 분리한 국내 소 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지에서도 교차감염 되고 높은 병원성이 있음을 알 수 있다.

본 연구에서 병변의 발생분포와 확산을 연구한 결과, 소 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지에서 십이지장을 시작으로 병변이 발생하고 점점 하부의 소장과 대장으로 확산되는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 소 동절기 적리 코로나바이러스는 소장보다는 결장을 비롯하여 대장에 심각한 병변을 유발하여 혈변 등의 심각한 설사를 유발한다고 보고 되었다. 반면에 송아지 코로나바이러스는 송아지의 십이지장을 시작하여 감염이 진행될수록 하부 소장과 대장으로 병변이 확산된다고 한다. 따라서 국내에서 분리한 소 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지에서 발생하는 소 코로나바이러스와 유사한 병변을 송아지에 일으키는 것으로 추정된다. 이러한 이유에 대해서는 아직 알려져 있지는 않지만, 아마 1) 소 동절기 적리 코로나바이러스와 송아지 설사 유발형 코로나바이러스를 포함하여 소 코로나바이러스는 소의 연령에 따라서 세포 친화부위가 달라지든가, 혹은 2) 국내 분리주인 소 동절기 적리 코로나바이러스는 외국의 동절기 적리 바이러스와는 달리 송아지에서는 송

아지 설사 코로나바이러스와 동일한 세포 친화성이 있을 것으로 추정된다.

제 4절. 국내 도축장 성우에서 채취한 혈청 내 소 코로나바이러스에 대한 항체가 조사

Seroprevalence of Bovine Coronavirus in Adult Dairy and Beef Cattle

소 코로나바이러스는 송아지 설사, 성우의 동절기 적리, 비육우의 이동에 따른 호흡기 감염을 일으킨다. 본 연구진들은 국내 분리 소 동절기 적리 코로나바이러스가 송아지에 인공접종을 하였을 경우에 소장과 대장에 병변을 일으켜 설사를 유발하며, 이러한 설사분변에 다수의 바이러스 배출이 일어나는 것을 규명하였다. 따라서 역으로 송아지에 설사를 일으키는 코로나바이러스도 성우에서 설사를 일으킬 수 있다는 것을 암시한다. 따라서 송아지가 백신이나 감염에 의해서 소 코로나바이러스에 대한 충분한 항체가 형성되어 있으면 성우가 되어서도 소 동절기 적리의 발생을 예방할 수 있다는 가설을 만들 수 있다. 이러한 상호관계를 규명하기 위한 기초조사로서 성우의 소 코로나바이러스에 대한 혈청가 검사는 그 의미가 있으나, 아직까지 국내 성우에 대한 소 코로나바이러스에 대한 혈청가 조사는 수행되어 있지 않다. 따라서 국내 성우의 소 코로나바이러스에 대한 혈청가 검사를 위해서 겨울(2월10일-23일), 봄(4월 22일-5월 1일), 여름(7월 13일-19일)에 걸쳐서 312두 분의 혈청을 전남, 전북, 광주에서 채취하여 소 코로나바이러스에 특이적인 항체를 이용한 indirect antigen-capture ELISA로 혈청가를 검사하였다. 겨울에 채취한 102두 분의 혈청에서는 혈청역가가 12,800이상이었고, 대부분(77.5%)은 혈청역가가 51,200이상이었다. 봄에 채취한 108두 분의 혈청에서는 혈청역가가 3,200 이상이 104두(96.3%)였으며, 51,200 이상의 혈청역가를 보이는 것은 51두(47.2%)을 차지하고 있었다. 그 외에 1,600에서 2두, 25 이하에서 2마리가 관찰되었다. 여름에 채취한 102두 분의 혈청에서는 3,200 이상이 94두(92.2%)였으며, 51,200 이상을 차지하는 혈청도 52두(51.0%)였다. 그 외에

1,600에서 2두, 800에서 2두, 400에서 2두, 25 미만에서 2두가 관찰되었다. 지역별로 보면 전남, 전북, 광주에서 특이한 혈청가의 차이는 없이 골고루 높은 항체가를 가지고 있음을 알 수 있었다. 품종간의 혈청역가 분포의 차이는 관찰되지 않았으나, 연령별로 살펴보면 3살보다는 4살에서 높은 혈청역가가 관찰되었으나 5살에서는 3살보다 낮은 혈청역가를 가지고 있는 것이 특징이었다. 이러한 결과를 종합적으로 볼 때, 국내 성우에서 소 코로나바이러스에 대한 상당히 높은 혈청가를 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 성우들이 소 코로나바이러스에 의한 송아지 장염이나 동절기 적리에 이환되었을 가능성이 상당히 높다는 것을 추측할 수 있었다.

1. 서 설

소 코로나바이러스는 *코로나비리데*에 속하며, 송아지 설사, 성우의 동절기 적리, 비육우의 호흡기 감염을 일으킨다. 전 세계적으로 소 코로나바이러스 감염증이 보고 되고 있으며, 이에 따른 막대한 피해도 알려져 있다. 특히 동절기 적리의 경우, 성우에서만 특징적으로 수양성에서 혈변에 이르기까지 심한 설사를 유발하며, 유우의 경우에는 막대한 유량감소를 동반한다.

지금까지 소 코로나바이러스에 관련된 송아지 설사, 동절기 적리, 비육우의 호흡기 감염에 대한 자세한 상호 관련성에 대해서는 보고 되지 않고 있다. 한편 소 코로나바이러스에 의한 호흡기 감염은 돼지 전염성 위장염 코로나바이러스가 변이되어 발생한 돼지 호흡기 코로나바이러스와 같은 어떤 유전적 차이가 있을 것으로 추정되고 연구되었지만 어떠한 특이적인 변이는 관찰되지 않았다. 더욱이 호흡기에서 분리한 소 코로나바이러스를 인공 접종하였을 경우에는 심한 설사가 발생한다는 점으로 미루어 보아, 아직까지 호흡기 단독 친화형 코로나바이러스는 없는 것으로 추정되고 있다.

소 동절기 적리의 경우 그 원인체가 여러 가지 거론되었지만, 설사분변에서 지속적으로 관찰되는 단일 원인체는 소 코로나바이러스였음이 1980년대에 들어서야 밝혀졌다. 하지만 소 코로나바이러스에 의한 소 동절기 적리의 재현 실험은 2001년에야 성공되었을 정도로 아직 소 동절기 적리에 대한 많은 부분이 규명되지 않고 있는 실정이다. 특히 소 동절기 적리, 송아지 설사 유발형 소 코로나바이러스, 호흡기에서 분리한 소 코로나바이러스간의 연령별 상호 질병 유발 가능성에 대해서는 전 세계적으로 전혀 알려져 있지 않다. 본 연구팀은 최소한 동절기 적리 코로나바이러스가 송아지에 설사를 유발하는가 여부를 국내 분리주인 소 동절기 적리 코로나바이러스를 송아지에 접종한 결과 심한 설사를 유발하는 것을 규명하였다. 따라서 이러한 사실은 송아지 설사 유발형 소 코로나바이러스도 역으로 성우에 감염되었을 때 소 동절기 적리를 유발할 수 있다는 점을 암시한다. 그렇다면 왜 송아지와 성우에서 소 코로나바이러스가 감염되어 독특한 유형의 설사를 유발하는 것인

가? 이에 대한 대답은 송아지와 성우에서의 소 코로나바이러스에 대한 항체가
의 차이에 있지 않을까?

이러한 관점에서 본 연구는 국내 성우의 소 코로나바이러스에 대한 혈청
가 검사를 시도하였다. 국내에서는 전국적으로 소 동절기 적리가 만연화 되
어서 막대한 경제적 피해가 발생하고 있음을 본 연구진에 의해서 밝혀졌다.
특히 국내에서 발생하고 있는 소 동절기 적리 코로나바이러스는 유전학적으로
외국에서 분리·보고 된 바이러스와 상당한 차이가 있음을 본 연구팀은 보
고하였다. 하지만 국내에서는 아직까지 성우의 소 코로나바이러스에 대한 혈
청가를 조사한 연구는 전혀 없다. 따라서 본 연구진은 도축장에서 계절별로
무작위 채취한 혈액을 소 코로나바이러스에 특이적인 항체를 이용하여
indirect antigen-capture ELISA를 수행하여 국내 성우의 소 코로나바이러스
에 대한 항체가 검사를 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 혈액 재료

광주광역시 소재하는 모 도축장에서 전남 10개 군·시, 전북 4 군·시, 광주광역시 소재의 67개 농장 288두의 도축우 혈액을 2004년 늦 겨울(2월10일-23일), 봄(4월 22일-5월 1일), 여름(7월 13일-19일)에 걸쳐서 채취하였다 (Table 1). Table 1에는 포함되어 있지 않지만, 연령과 지역이 불분명한 혈액도 총 24개였다. 따라서 본 연구에 공시된 혈액은 총 312두분이다.

나. 소 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 항체 검출을 위한 ELISA

기법

도축장에서 계절별로 채취한 성우 혈액 내 소 동절기 적리 코로나바이러스에 대한 항체의 유무를 검사하기 위해서 높은 민감도와 비특이 반응이 적게 발생하는 96-well flat-bottom microtiter plates에 소 코로나바이러스의 nucleocapside, spike 및 hemagglutinin/esterase 단백질에 대한 특이 단클론 항체를 각각 8000씩 희석하여 100 ul을 각 컬럼의 모든 well에 분주한 후에 15시간 동안 4℃ 냉장고에서 정치한다. 그후, 단클론 항체의 비특이 반응을 극소화 시키기 위해서 5% nonfat, dry milk를 각 well에 200 ul씩 분주한후, 상온에서 2시간 작용시킨다. 여기에 분리된 동절기 적리 원인바이러스를 각각 컬럼의 a, b, e, f well에 100 ul씩 분주하고, 바이러스가 포함되지 않은 정상 배양액인 EMEM은 각 컬럼의 c, d, g, h well에 분주한다. 분주가 끝나면, 상온에서 1시간 바이러스를 plate의 각 well의 밑에 흡착시켰다. 이 동안에 각각의 실험용 송아지에서 채취한 혈청을 56℃에서 30분간 비동화 시킨 후에, 이들 항체를 PBS(pH7.2)로 25배에서 2배씩 계단희석하였다. 희석한 혈청을 각각의 컬럼 4개의 well에 100 μ l씩 분주하였다. 첫 번째 컬럼의 4개 well과 2번째 컬럼의 4개 well은 각각 양성 및 음성대조로 사용한다. 상온에서 1시간 정치 후에, 각 well에 horseradish peroxidase가 부착된 소 IgG 항체에 대한 염소에서 제작된 항혈청을 4000배 희석하여 분주하고 1시간 정치

하였다. 상기의 각 단계사이에는 각각의 well을 PBST로 3회간 각각 10분씩 세척한다. 항원의 검출을 위해서 발색제로는 최종농도가 0.03%인 과산화수소가 포함된 ABTS 100 μ l을 각각의 well에 분주하였다. 15분간 정치한 후에 414 nm의 파장에서 흡광도를 측정 한 후, 이들 결과를 자동으로 관독할 수 있는 컴퓨터에서 흡광도가 양성 단클론 항체가 들어있는 well의 흡광도 수치에서 음성 항체가 들어있는 well의 흡광도의 수치가 평균 0.1 이상일 때는 양성으로 판정하였다. 항체가를 검사하기 위한 96 well plate의 염색상을 Fig 1에서 보여 주고 있다.

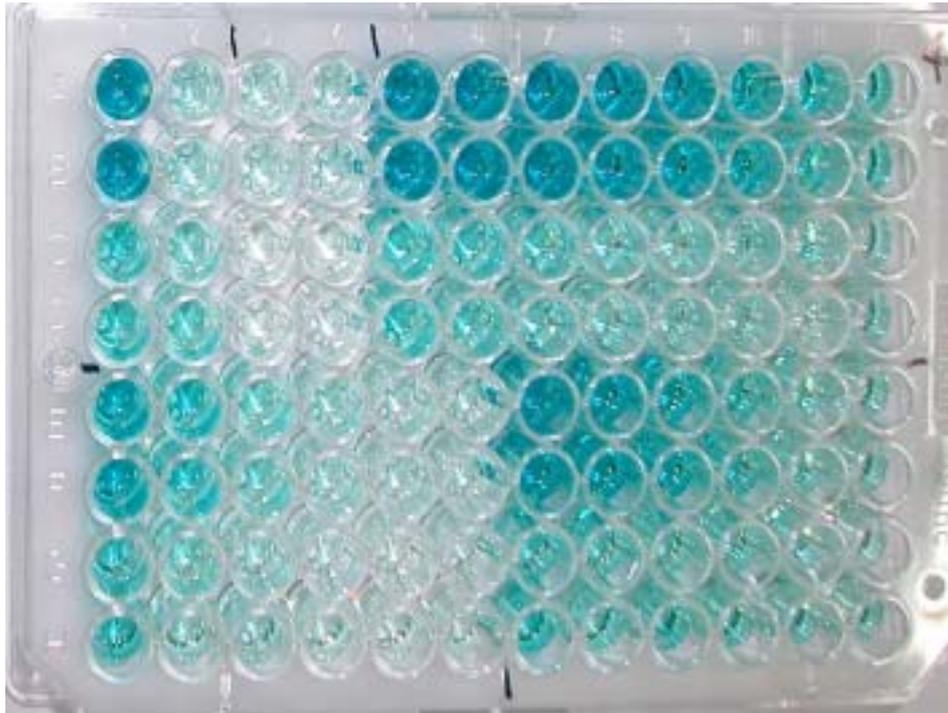


Fig 1. Indirect antigen-capture ELISA for the detection of antibody titer of bovine coronavirus. Column No. 1 and well no. a-d are used for the positive control. Column No. 2 and well no. a-d are used for the negative control. Each sample needs 4 wells.

Table 1. For the evaluation of antibody titer of bovine coronavirus in Korea, blood specimens are sampled from the farms of different counties, and different aged and breed cows.

Districts	County	Number of samples	Number of Farms	Age			Sex		Breed			
				3 year- old	4 year-old	5 year-old	Fem ale	Ma le	Holstei n	Hanwo o	Mongre al	Herefor d
Jeonnam	Damyang	86	20	22	45	19	83	3	32	54	0	0
	Naju	43	5	13	18	12	42	1	30	13	0	0
	Gokseong	28	5	7	13	8	27	1	10	18	0	0
	Jangseong	18	9	6	10	2	16	2	3	15	0	0
	Boseong	5	1	1	4	0	5	0	1	4	0	0
	Hampyeong	5	2	2	1	2	5	0	3	2	0	0
	Haenam	2	1	2	0	0	0	2	0	0	0	2
	Gwangyang	2	1	0	2	0	2	0	0	2	0	0
	Yeonggwang	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
	Goheung	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
Jeonbuk	Jeongeup	37	5	5	9	23	36	1	31	6	0	0
	Sunchang	24	8	4	16	4	23	1	9	15	0	0
	Namwon	17	4	4	8	5	17	0	7	9	1	0
	Gochang	4	1	1	0	3	4	0	3	1	0	0
Gwangju	15	3	3	7	4	14	1	6	8	0	0	

3. 결 과

가. 계절별 소 코로나바이러스에 대한 항체가 변동

전남, 전북, 광주 지역의 성우에서 계절별로 소 코로나바이러스에 대한 항체를 조사하였다(Fig. 2). 그 결과 high titer인 51,200 이상의 항체를 보이는 것은 겨울철에 79두(77.5%)로 봄(51두; 47.2%)과 여름(52두; 51%)에 비해서 압도적으로 많다는 것을 알 수 있었다. 그 외의 25,600이하는 거의 비슷한 비율을 계절별로 나타내었다.

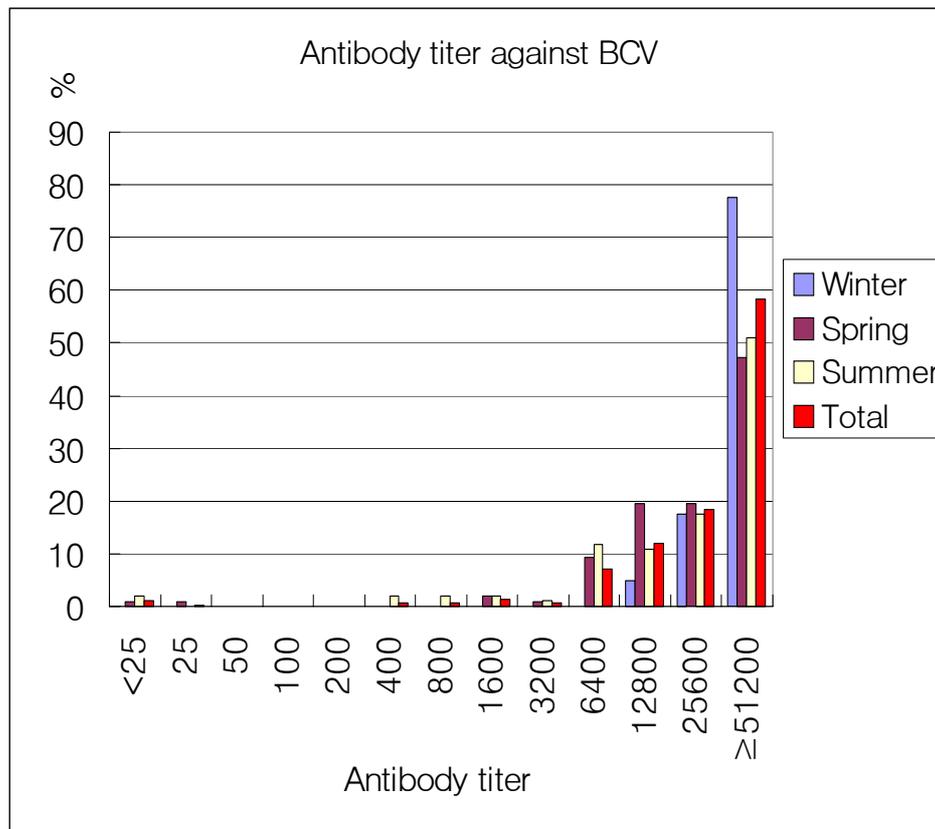


Fig 2. Seasonal distribution of antibody titer for the bovine coronavirus.

나. 연령별 소 코로나바이러스에 대한 항체가 변동

연령별 소 코로나바이러스에 대한 항체가의 변동을 Fig. 3에 나타내었다. 겨울철에 채취한 혈액에서는 3세부터 5세까지 소 코로나바이러스에 대한 항체가 51,200 이상은 3세령 78.6%, 4세령 79.4%, 5세령 70%였다. 따라서 겨울철의 소 코로나바이러스에 대한 항체가는 51,200 이상이 압도적으로 많다는 것을 알 수 있다.

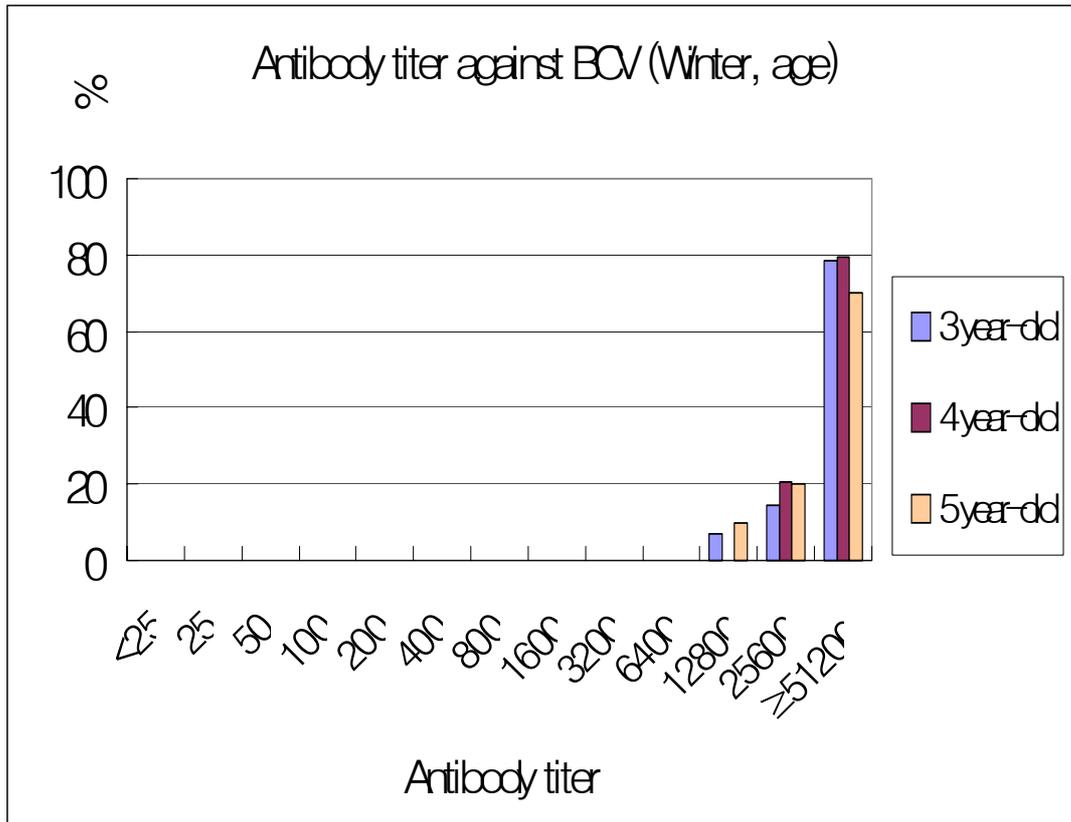


Fig 3. Age distribution of antibody titer for the bovine coronavirus in the blood specimens sampled in winter season.

봄철에 채취한 혈액에서는 3세부터 5세까지 소 코로나바이러스에 대한 항체가 51,200 이상은 3세령 52.6%, 4세령 50.0%, 5세령 40.5%로 겨울철에 비해서 감소하는 추세였으며, 25,600이하의 혈청가는 겨울철에 비해서 증가하는 추세였다(Fig 4).

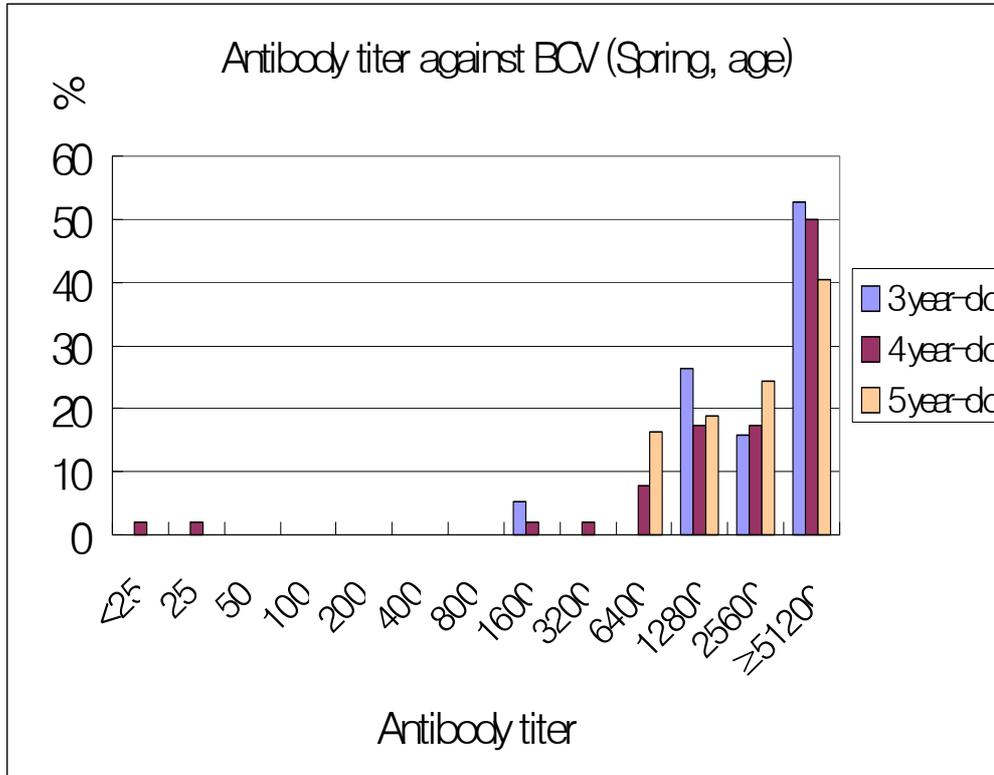


Fig 4. Age distribution of antibody titer for the bovine coronavirus in the blood specimens sampled in spring season.

여름철에 채취한 혈액에서는 3세부터 5세까지 소 코로나바이러스에 대한 항체가 51,200 이상은 3세령 45.9%, 4세령 52.0%, 5세령 60.0%로 겨울철에 비해서는 감소하는 추세였으나 봄철의 혈청가와는 유사하였다. 겨울철과 봄철에 비교하여 특이한 사항은 25,600이하의 혈청가 분포가 폭넓게 형성되어 있다는 것이다(Fig 5).

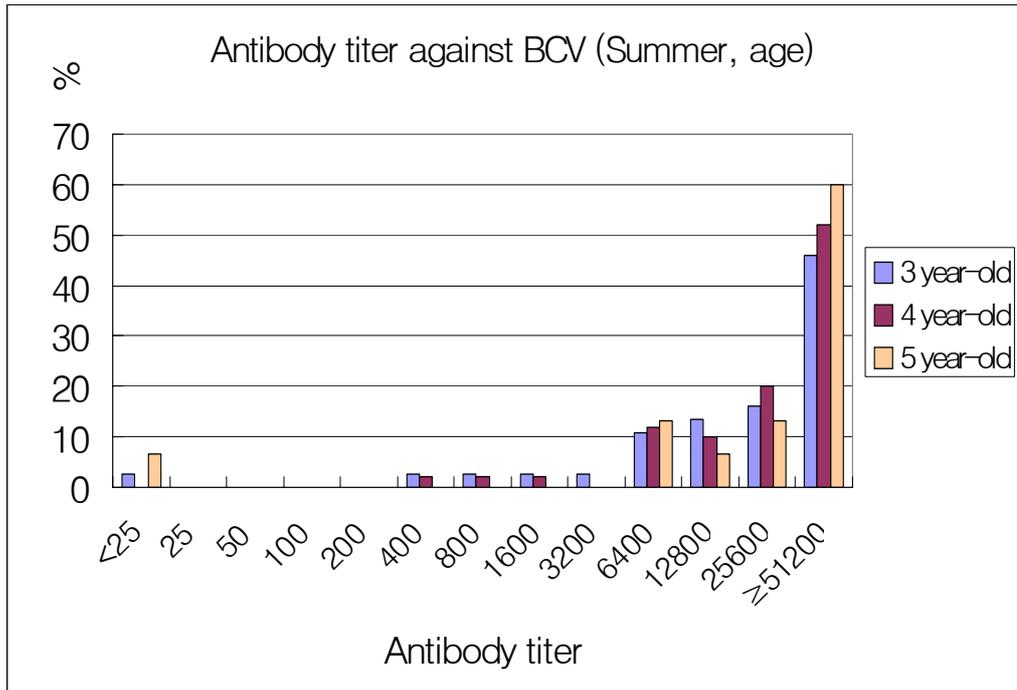


Fig 5. Age distribution of antibody titer for the bovine coronavirus in the blood specimens sampled in summer season.

이러한 혈액 재료들을 계절별과는 관계없이 연령별로 분석한 결과를 Fig 6에 제시하였다. Fig 6에서 나타난 바와 같이 고혈청가인 51,200이상의 혈청가는 3세령에서 54.3%, 4세령에서 58.1%, 5세령에서 54.9%였다. 또한 25,600의 혈청가는 3세령에서 15.7%, 4세령에서 19.1%, 5세령에서 20.7%로 나타났다. 12,800의 혈청가는 3세령에서 15.7%, 4세령에서 10.3%, 5세령에서 13.4%였다. 따라서 12,800에서 51,200 이상의 혈청가를 보이는 소들을 전부 합하면, 3세령에서 85.5%였고, 4세령에서 87.5%였으며, 5세령에서는 89.0%로서, 3세령 이상의 소들은 소 코로나바이러스에 대해서 전부 높은 혈청가를 가지고 있음을 알 수 있다.

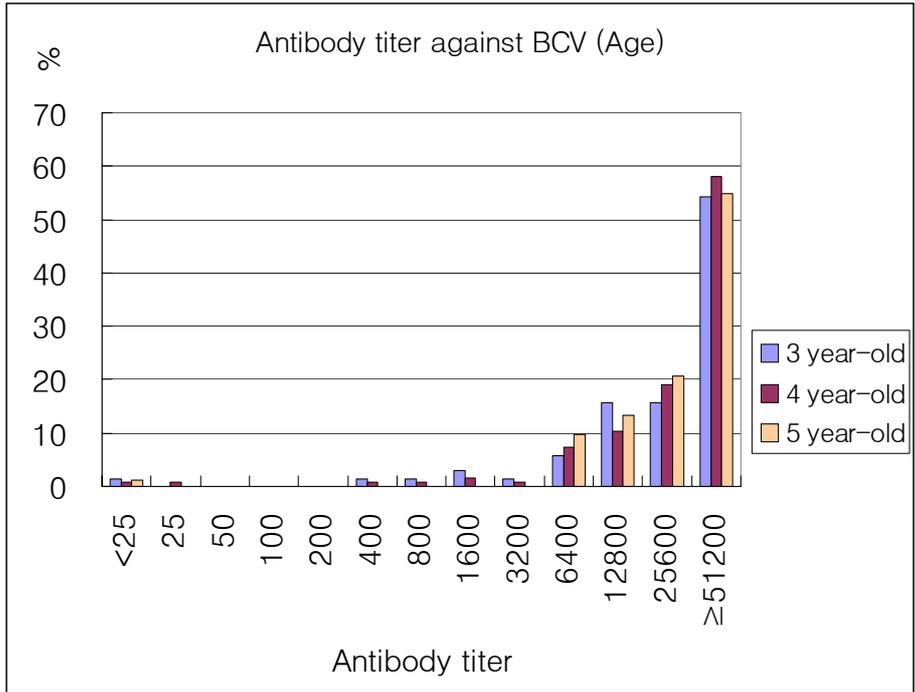


Fig 6. Total age distribution of antibody titer for the bovine coronavirus in the blood specimens sampled in winter, spring, and summer seasons.

다. 지역별 소 코로나바이러스에 대한 항체가 변동

본 연구에 사용된 혈액은 전남 191두, 전북 82두, 광주 15두에서 채취한 것이다. 이러한 혈액들의 소 코로나바이러스에 대한 항체가를 조사한 결과 51,200 이상의 혈청가를 보이는 것은 전남 94.6%(104두), 전북 61.0%(50두), 광주 53.3%(8두)였다(Fig 7). 또한 3,200부터 51,200이상까지 합한 것을 계산하면, 전남 94.8%, 전북 98.8%, 광주 93.3%였다. 따라서 전북이 전남이나 광주에 비해서 높은 항체가를 가지고 있지만, 그 비율에서 본다면 세 도·광역시는 모두 높은 항체가가 분포하고 있음을 알 수 있다(Fig 7).

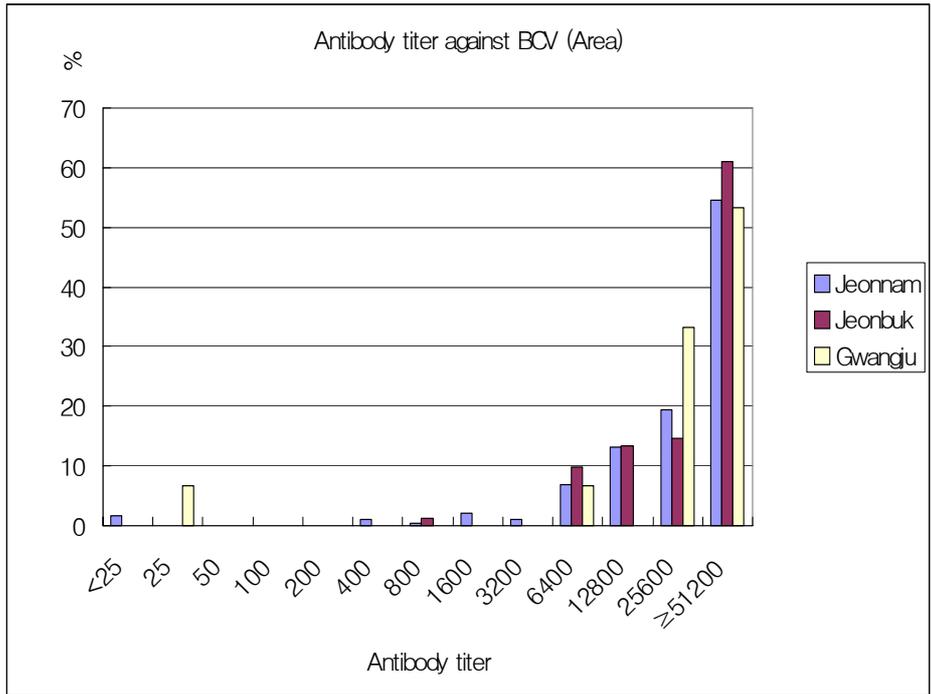


Fig 7. Comparison of antibody titer of bovine coronavirus among Jeonnam, Jeonbuk, and Gwangju.

전남, 전북, 광주의 각 군 및 시별로 소 코로나바이러스에 대한 항체를 조사한 결과를 Fig 8에 보여주고 있다. 이 그림에서는 각 군 및 시별로 10개 이상의 혈액을 본 연구에 제공된 곳만 분석에 사용하였다. 각 지역별로 비교한 결과, 51,200 이상의 항체를 가장 많이 보유하고 있는 순서로 전북 순창(66.7%), 전북 정읍(59.5%), 전남 나주(58.1%), 전남 담양(55.8%), 광주(53.3%), 전북 남원(52.9%), 전남 장성(50.0%), 전남 곡성(46.4%)이었다(Fig 8). 6,400부터 521,200 이상의 혈청가를 보이는 성우의 비율을 보더라도 순위의 변동은 없었다. 도·광역시 별 항체의 차이는 그리 높지 않았지만, 각 지역별로 보면 고혈청가의 분포 비율은 전북 순창과 전남 곡성 사이에 20.3%가 차이가 날 정도로 매우 높은 차이가 있음을 알 수 있었다(Fig 8).

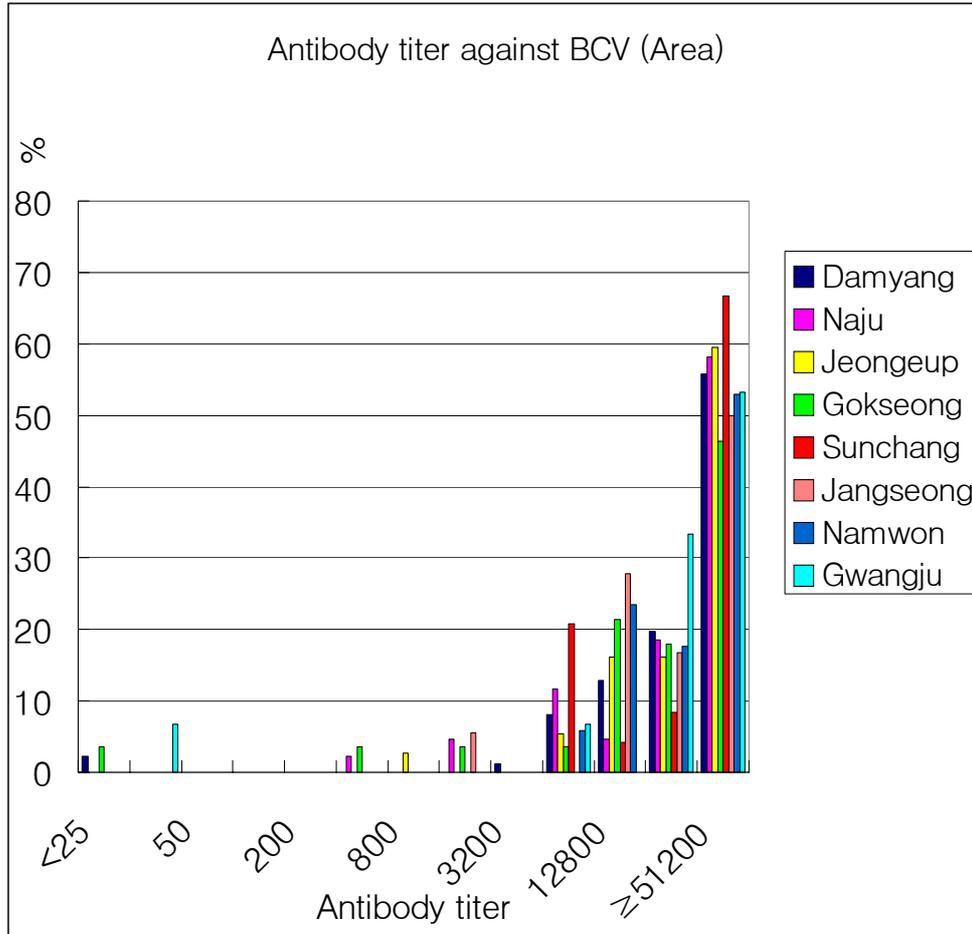


Fig 8. Regional distribution of antibody titer of bovine coronavirus in each county. In this evaluation, only counties giving over the 10 samples are counted.

라. 품종별 소 코로나바이러스에 대한 항체가 변동

계절에 상관없이 품종간의 소 코로나바이러스에 대한 항체가를 조사한 결과 51,200 이상의 역가에서는 한우가 더 높았으나 전반적인 상황으로는 그리 큰 차이는 관찰할 수 없었다(Fig 9).

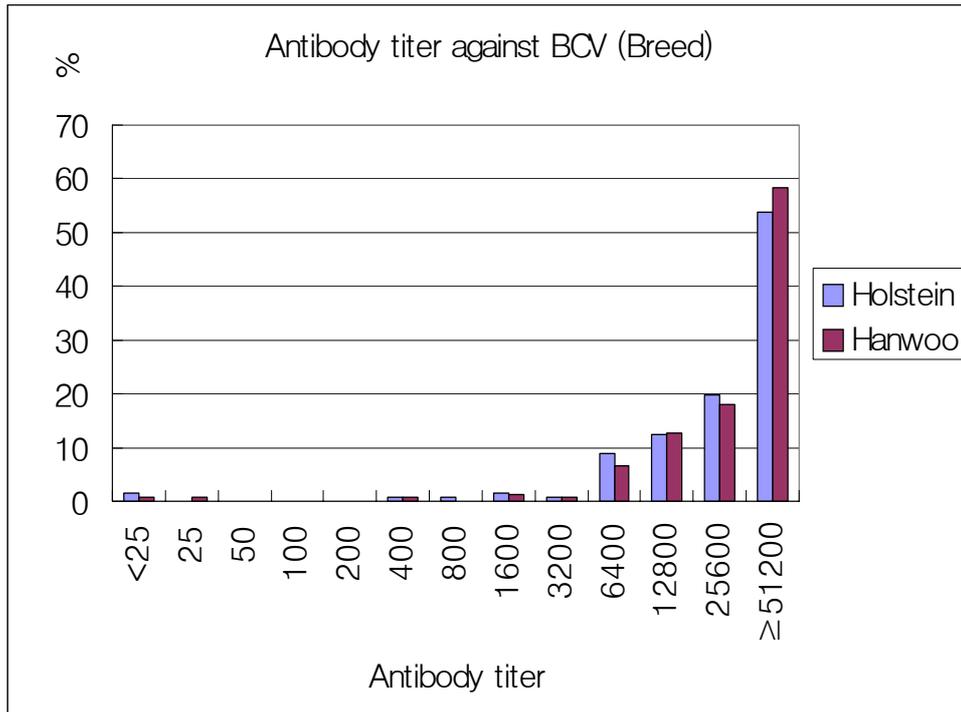


Fig 9. Comparison of antibody titer of bovine coronavirus between dairy (Holstein) and beef (Hanwoo) cattle.

유우인 Holstein의 계절별 소 코로나바이러스에 대한 항체가를 Fig 10에 보여주고 있다. 소 코로나바이러스에 대한 항체가 중에서 51,200 이상의 역가는 겨울철에 71.1%, 봄 46.2%, 여름은 47.8%로 조사되었다. 이 결과 유우인 Holstein은 겨울철에 비교적 높은 항체가를 가지고 있는 소들이 많이 있음을 알 수 있다.

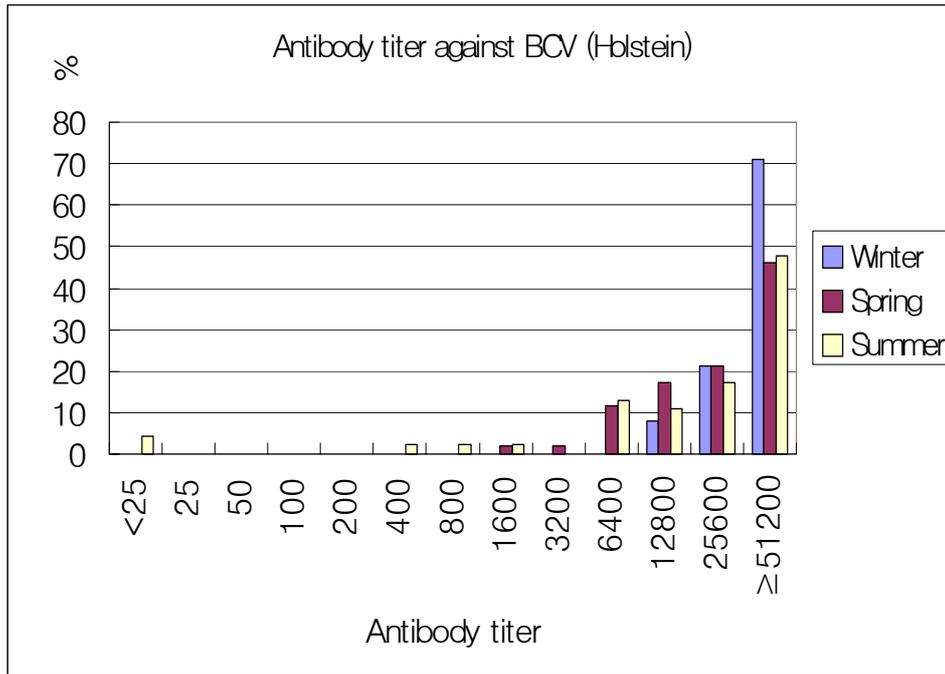


Fig 10. Seasonal distribution of antibody titer of bovine coronavirus in dairy (Holstein) cattle.

육우인 한우의 계절별 소 코로나바이러스에 대한 항체가를 Fig 11에 보여주고 있다. 소 코로나바이러스에 대한 항체가 중에서 51,200 이상의 역가는 겨울철에 79.5%, 봄 48.2%, 여름은 53.7%로 조사되었다. 이 결과 육우인 한우는 겨울철에 비교적 높은 항체가를 가지고 있는 소들이 많이 있음을 알 수 있다.

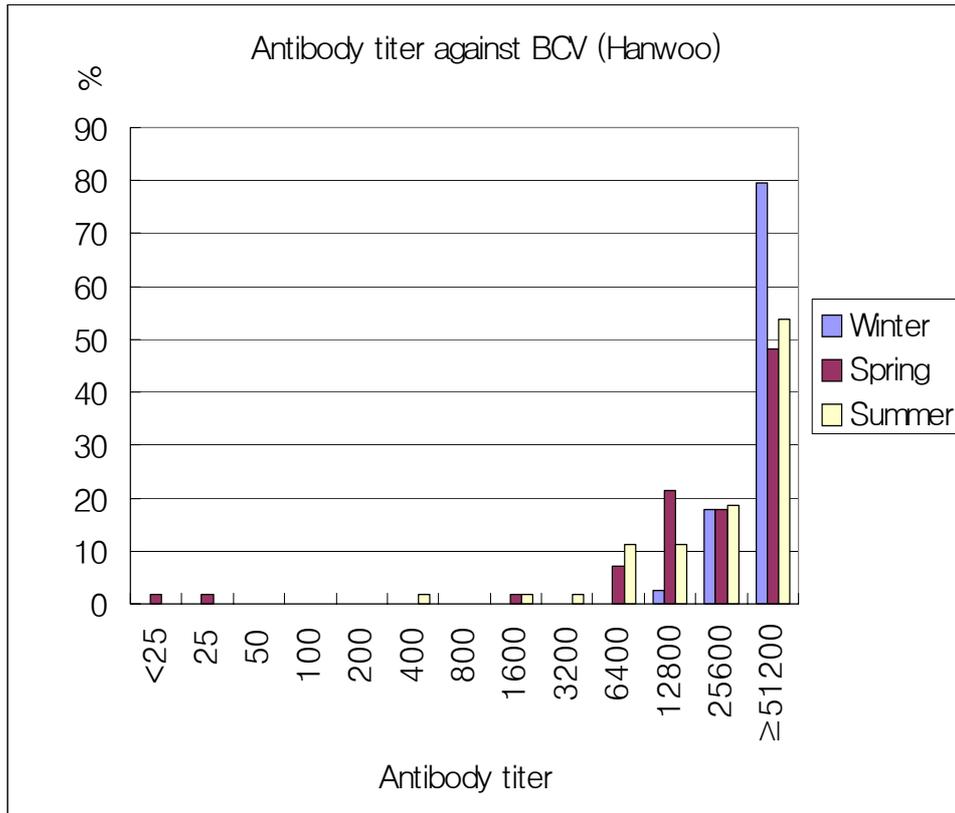


Fig 11. Seasonal distribution of antibody titer of bovine coronavirus in beef (Hanwoo) cattle.

계절별 한우와 홀스타인 품종간의 항체가의 비교를 Fig 12-14에 제시하였다. 한우나 홀스타인 모두 겨울, 봄, 여름에 있어서 소 코로나바이러스에 대한 51,200 이상의 항체는 매우 높았으며, 한우와 홀스타인간의 계절별 항체의 차이는 없는 것으로 조사되었다.

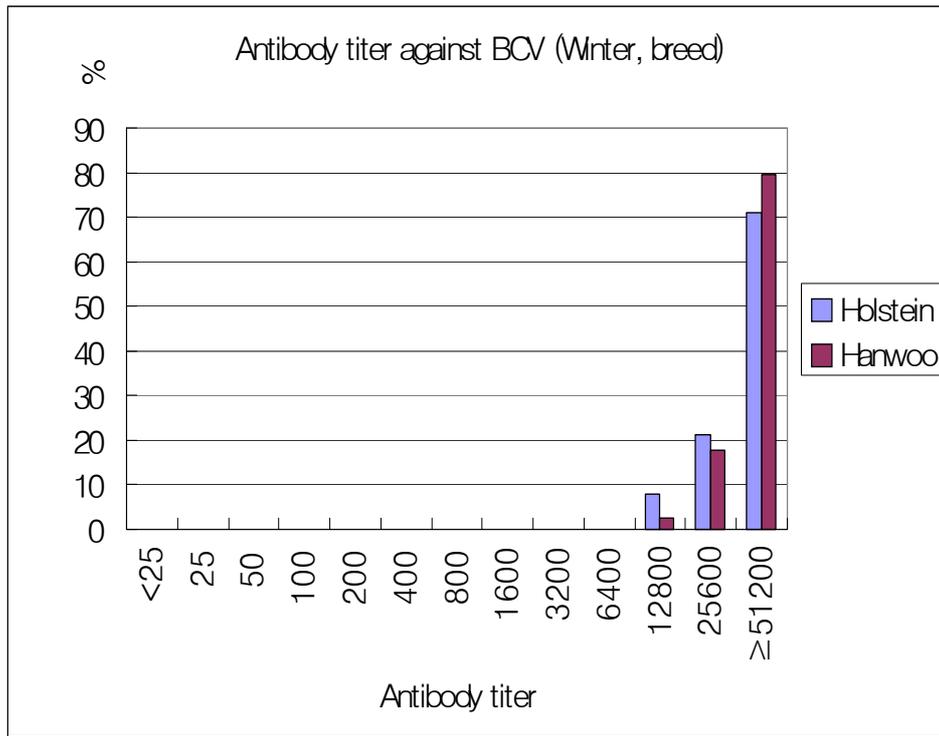


Fig 12. Comparison of antibody titer of bovine coronavirus in winter season between beef (Hanwoo) and dairy (Holstein) cattle.

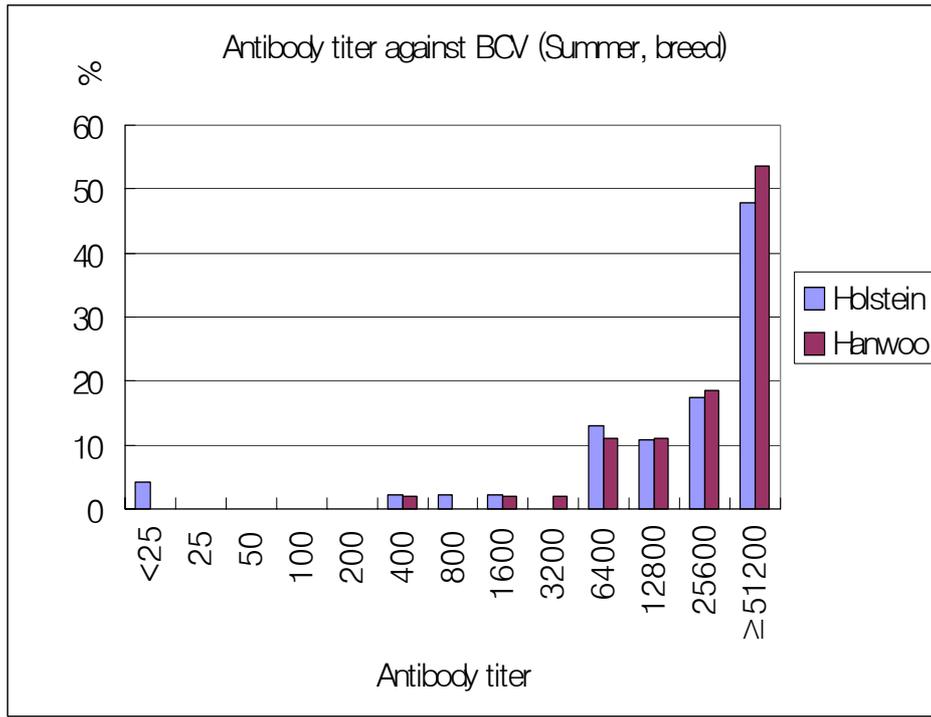


Fig 13. Comparison of antibody titer of bovine coronavirus in spring season between beef (Hanwoo) and dairy (Holstein) cattle.

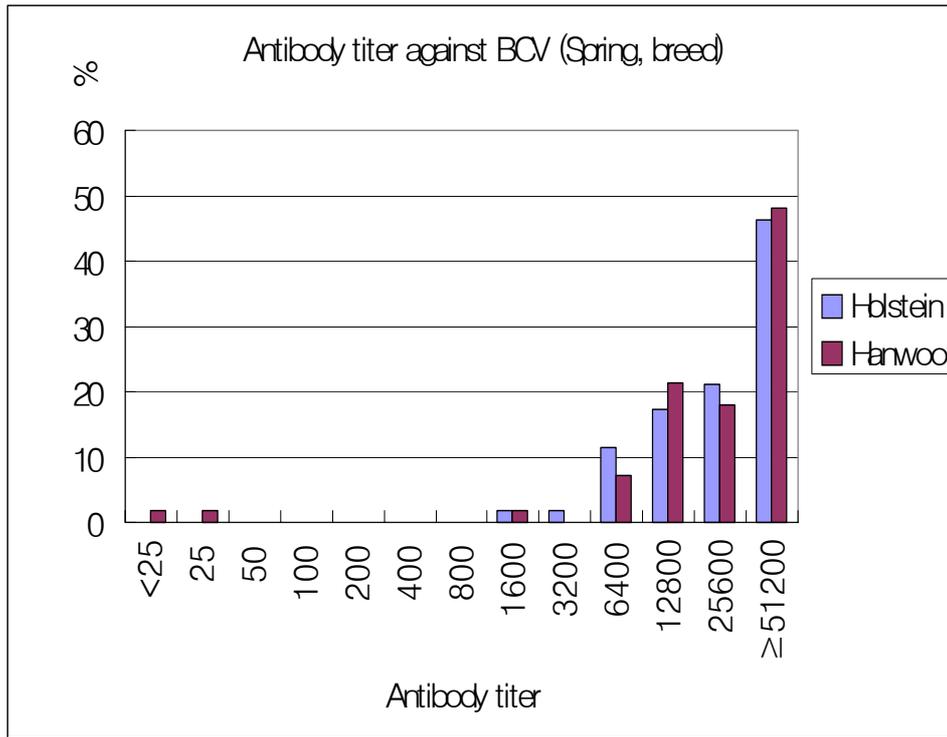


Fig 14. Comparison of antibody titer of bovine coronavirus in summer season between beef (Hanwoo) and dairy (Holstein) cattle.

4. 고 찰

본 연구를 통해서 국내 성우에서 소 코로나바이러스에 대한 혈청 역가의 정도를 어느 정도 파악할 수 있게 되었다. 본 연구의 결과는 차후 소 코로나바이러스에 대한 송아지 설사뿐만 아니라 성우에서 발생하고 있는 소 동절기 적리의 진단, 예방, 방역체계를 구축하는데 중요한 자료로 사용할 수 있을 것이다.

본 연구팀은 국내에서 최초로 소 동절기 적리의 역학과 그 원인체의 분리를 성공적으로 수행하였다. 이러한 결과 국내에서 소 동절기 적리가 전국적으로 만연하고 있다는 것을 규명한 것이었다. 또한 국내에서 만연하고 있다는 사실을 뒷받침할 수 있는 결과가 본 연구에 의해서도 확인할 수 있었다. 즉 본 연구에서 사용된 도축우들은 3세에서 5세 사이로서 대부분 1,600 이상의 항체가를 가지고 있었으며, high titer인 51,200이상의 역가를 가지고 있는 것이 대부분이었다. 결론적으로 국내에서는 성우에서 소 동절기 적리가 만연하고 있음을 본 연구에 의해서도 간접적으로 증명되었다 할 수 있다.

본 연구팀의 조경오 교수는 미국의 비육우에서 소 코로나바이러스에 대한 항체가를 조사한 결과, 혈청 역가가 1,600 이하인 비육우는 차후에 소 코로나바이러스가 감염되었을 때 설사가 발생할 가능성이 높다고 보고하였다. 본 연구에서 사용된 도축우들은 3세에서 5세 사이로서 대부분 1,600 이상의 항체가를 가지고 있다는 것은 이들 성우들은 차후에 소 동절기 적리가 발생하지 않을 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 차후의 연구에서는 3세령 미만의 성우들에 대한 조사를 실시하여 그 혈청역가를 검사하고 이러한 소들이 차후 소 동절기 적리가 발생할 수 있는가 여부를 규명하여야 할 것이다. 이러한 결과를 바탕으로 성우에서 소 코로나바이러스에 대한 백신 투여 여부를 결정할 수 있을 것이다.

본 연구를 통하여 소 코로나바이러스에 대한 성우의 혈청 역가의 분포를 알 수 있었다. 즉 늦 겨울에 채취한 혈액이 봄이나 여름에 채취한 혈액에 비해서 상대적으로 high titer를 가지고 있는 것들이 많았다. 이것이 의미하는

것은 아마도 소 동절기 적리가 늦가을에서 겨울에 걸쳐서 발생하여 늦겨울에 채취하였을 때는 혈청역가가 높아졌기 때문이며, 이러한 소들이 봄이나 여름이 되었을 때는 점진적으로 그 역가가 떨어졌기 때문으로 추정된다.

본 연구에서 계절별과는 달리 연령별 소 코로나바이러스에 대한 혈청 역가의 크나큰 차이는 없었다. 즉 본 연구에 공시된 소들은 전부 3세령 이상으로서 적어도 3번 이상 소 동절기 적리가 감염될 가능성이 있었다는 것을 의미한다. 본 결과를 통해서 3세령 이상의 소들에 대한 소 코로나바이러스 백신을 투여하지 않았도 된다는 것을 간접적으로 증명하는 것이다. 이러한 가설을 증명하기 위해서 high titer를 가지고 있는 3세령 이상의 성우에 소 동절기 적리 코로나바이러스를 접종하여 발병유무를 확인하는 연구를 수행하여야 할 것이다. 실제로 외국에서 소 동절기 적리 코로나바이러스의 성우에 대한 인공 재발 실험이 계속적으로 실패한 이유도 실험에 사용된 성우들이 높은 혈청 역가를 가지고 있었기 때문이라는 보고도 있다.

소 코로나바이러스에 대한 지역별 차이에 대한 연구결과 전북이 전남이나 광주에 비해서 소 코로나바이러스에 대한 높은 혈청 역가를 가지고 있는 소들이 많다는 것을 본 연구를 통해서 규명하였다. 하지만 전북과 전남 전체에 대한 혈청 역가의 차이는 그리 심하지 않았지만, 지역별 비교에서는 전북 순창과 전남 곡성 사이에서 20.3%의 high titer를 가지고 있는 소들의 수가 다를 정도로 그 정도가 심하였다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 각 지자체 맞춤형 진단, 예방, 방역사업을 실시하여야 할 것이다.

품종별 소 코로나바이러스에 대한 혈청 역가의 차이를 조사한 결과 유우인 Holstein과 육우인 한우의 품종간 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 소 코로나바이러스는 품종간의 친화성이 없이 국내 전 우군에 걸쳐서 발생하고 있음을 알 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표의 달성도

본 연구를 수행한 결과 국내에서 발생하고 있는 동절기 적리의 발생 실태와 역학적 조사를 비롯하여 원인체 바이러스의 분리 및 동정, 신속 정확한 진단법 개발, 원인체의 인공감염 실험에 의한 기병론 규명 및 분자생물학적인 기법들을 이용한 원인 바이러스 유전자의 염기서열 분석 등을 성공적으로 수행하였다. 동절기 적리는 다자란 젖소나 비육우에서 급성의 심한 혈액성 및 수양성 설사를 특징으로 하며, 급격한 산유량의 감소 및 체중의 저하와 심한 침울 및 빈혈을 수반하였다. 한번 발생하면, 진 우군에 걸쳐서 폭발적으로 발생하며, 심하게는 이환된 소가 폐사까지 이른 경우도 발생하였다. 또한 전파력이 매우 강하여서 인근의 농장까지 순식간에 전파될 수도 있어서, 경제적으로 매우 심각한 피해를 일으켰다. 본 연구진의 연구에 의한면 국내에서도 이미 동절기 적리가 축산 선진외국의 경우와 마찬가지로 만연되어 심각한 문제를 야기하고 있다는 것을 알 수 있었다. 1, 2차년도에 동절기 적리의 국내 발생현황을 역학적으로 연구하기 위해 전국적으로 동절기 적리가 발생한 것으로 추정되는 농장의 소에서 설사분변을 채취하여 원인 바이러스의 검출과 분리를 시도하였다. 동절기 적리가 발생한 소의 설사분변내에는 일반적으로 다수의 바이러스가 포함되어 있어서 이를 먼저 면역전자현미경으로 검출하였다. 동절기 적리의 원인체는 어린 송아지에서 설사를 유발시키는 코로나바이러스와 형태학적으로 유사하지만 송아지에서 발생하고 있는 코로나바이러스 분리배양용 세포주에서는 자라지 않거나 아주 늦게 자란다는 차이가 있었다. 따라서, 동절기 적리 바이러스를 분리 배양하기 위해 사람의 직장선암종 유래의 세포주인 HRT-18 세포주를 사용하였다. 이러한, 연구를 통해서 국내에서 발생하고 있는 동절기 적리의 정확한 발생현황과 바이러스의 분리를 성공적으로 수행하여 현재 약 10종의 바이러스 국내 분

리주를 확보하였다. 이러한 역학조사 및 바이러스의 분리·동정 결과를 바탕으로 2차년도에는 동절기 적리의 신속 정확한 진단법을 개발하였다.

동절기 적리는 한번 발생시 폭발적으로 발생하고 인근 농장까지 순식간에 전파한다는 특징 때문에 신속한 진단법의 개발이 절실하였다. 또한, 동절기 적리의 초기나 후기에는 바이러스 양이 극소수여서 일반적인 진단법으로는 진단이 어려웠다. 또한, 설사가 끝난 회복기의 소에서도 바이러스가 배출이 되기 때문에 이에 의한 타 농장으로의 전파가 문제가 된다. 본 연구에서는 수백개의 설사분변 재료를 동시에 신속하게 진단할 수 있는 기법으로서 Indirect antigen-capture ELISA를 개발하였다. 이 기법에 사용되는 재료는 저가로서 또한 간단히 수행할 수 있다는 장점이 있어서 실제 동절기 적리를 진단하는데 유용하게 사용할 수 있을 것으로 전망된다.

동절기 적리의 초기나 회복기에는 바이러스의 수가 극소수로 존재하여서 일반적인 진단법으로는 정확하게 진단할 수 없는 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 분자생물학적 기법인 Reverse transcript PCR (RT-PCR)과 Nested PCR 기법을 수립하였다. 실험 결과 일반적으로 바이러스를 검출하기 위해서 RT-PCR 단독의 진단으로는 상술한 Indirect antigen-capture ELISA보다 바이러스 검출의 감도가 높지만, 초기나 회복기의 감염까지는 정확히 진단할 수 없음을 알 수 있었다. 따라서, 감도를 더욱 높여 초기나 회복기 감염시의 극소수의 바이러스까지 진단할 수 있는 Nested PCR 기법을 개발하였다.

동절기 적리가 발생할 수 있는 농장을 선별할 수 있으면, 바로 예방대책을 수립할 수 있기 때문에 이러한 기법의 개발은 아주 중요하다 할 수 있다. 동절기 적리는 일반적으로 늦가을에서 시작하여 초봄까지 기온이 낮은 계절에 발생하는 특징이 있으며, 특히 농장내 소의 혈액내에서 동절기 적리의 원인체에 대한 항체가 없으면 발생한다. 따라서, 기온이 낮아지기 전에 농장별 소의 혈중 동절기 적리 원인체에 대한 항체가의 검사를 수행하여, 동절기 적리의 발생을 예측할 수 있는 기법을 개발하였다. 이러한 기법으로는 항체 검출용 ELISA가 있는데, 이는 다수의 혈액 재료를 동시에 신속하게 진단할 수

있는 장점이 있었다.

동절기 적리 코로나바이러스에 대한 분자생물학적 연구는 세계적으로 많이 되어 있지 않다. 최근 소수의 보고에 의하면, 동절기 적리 코로나바이러스는 송아지 코로나바이러스와 일부의 유전자에서 유사성이 높다고 보고 되어 있지만, 이에 대해서도 국제적으로 논란이 많이 되고 있다. 따라서, 국내에서 발생하고 있는 동절기 적리 코로나바이러스의 유전자에 대한 정확한 염기서열 분석은 단지 원인체의 규명에 의한 예방대책의 수립등에 의한 경제적인 제고뿐만 아니라, 학문적으로 크게 공헌 할 것이다. 이와같은 관점에서 국내 발생중인 동절기 적리의 원인체인 코로나바이러스의 특성을 규명하기 위하여 분리된 바이러스의 유전자 염기서열을 검사하였다. 코로나바이러스는 일반적으로 스파이크 단백질을 코드화 하는 S 유전자에 변이성이 강하여, 병원성에 영향을 가장 많이 준다것을 알수 있었다. 따라서 동절기 적리 바이러스의 S 유전자의 염기서열을 검사한 후, 기존의 송아지에서 발생하고 있는 코로나바이러스의 S 유전자와 비교검사하여 병원성과 비교 검토 하였다.

3차년도에서는 동절기적리의 국내 분리주를 이용한 인공감염 실험을 통한 기병론의 규명을 통해 이 질병의 진행과정이나 숙주의 면역기능 등을 정확히 파악할 수 있었으며 이와같은 결과는 예방대책의 수립이나 치료대책의 확립에 기여할 수 있어서 의미하는 바가 아주 클것으로 사료된다.

2. 관련분야에의 기여도

본 연구를 성공적으로 수행한 결과 동절기 적리를 효과적으로 방제할 수 있는 효율적인 시스템구축이 가능할 것이다. 동절기 적리 진단방법을 개발함으로써 기존 기법의 단점인 검사재료수의 한계성, 낮은 민감도 및 특이성 및 기타 복잡성, 장시간의 진단소요시간 등을 극복할 수 있을 것이다. 이러한 진단기법을 각 연구소나 시험소에 현지 보급화로 조기 방역체계를 확립할 수 있을것이며. 이러한 원천기술은 타 전염성 질병의 현장 진단 기술에 응용함으로써 동물질병의 진단, 치료 개발분야에 첨단기술의 파급으로 진단 및

치료약 개발의 활성화가 기대된다. 또한 바이러스의 유전자 분석기법의 확립으로 유용한 백신주의 선택이 가능하며 이러한 기술은 국내 유용미생물 유전자원 확보에 응용될 수 있을것으로 사료된다. 또한 동절기 적리의 조기 진단체계의 확립, 예방대책의 확립 및 방역대책을 확립하여 육류와 우유의 고급화 및 생산성을 향상 시킴으로써 막대한 경제적 효과를 얻을 수 있을 것이다. 또한, 감염증에 따른 치료비 손실 및 인력낭비 등을 절감할 수 있을 것이다. 본 연구결과 신속 정확한 진단법 및 예방기법을 확립함으로써 치료제 사용 경비절감, 인력낭비 절감, 폐사율 감소, 사료효율 향상, 성장촉진 및 우유와 고기 생산량 증가 등으로 농가의 수익증대에 크게 이바지 할 것이다. 또한 위생적이고 건강한 우유 및 우육의 공급으로 식품의 안정성을 제고하여 소비를 획기적으로 늘릴 수 있는 기회가 될 수 있을것이다. 학문적으로도 동절기 적리에 대한 백신의 국내개발을 할 수 있는 중요한 자료가 될 수 있으며, 동절기 적리 바이러스의 유전자에 대한 분자생물학적 연구로 야외 병원성 동절기 적리 바이러스와 병원성이 낮아서 백신으로 사용할 수 있는 바이러스의 구별이 가능하게 되며, 이에따른 장차 백신의 사용시 잔류백신 바이러스의 역학적인 연구가 가능할것으로 예상된다. 상기와 같은 성과에 힘입어 국내 축산업의 생산성 향상과 경쟁력 제고로 우유 및 우육을 수출산업으로서 지속적인 성장을 가능하게 할 수 있을것으로 기대된다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

1. 활용방안

본 연구에서 개발한 바이러스 검출용 antigen-capture ELISA, 1 step RT-PCR 및 Nested PCR과 항체 검출용 ELISA 기법들을 각 연구소, 시험소 및 기업의 진단기관에 전수하여 동절기 적리의 진단에 활용토록 할 수 있을것이다. 특히 다수의 검체를 진단할 수 있는 antigen-capture ELISA 및 항체 검출용 ELISA의 생산 기법을 민간 기업에 기술 이전하여 진단키트를 생산·보급하게 한다. 본 연구에서 개발된 자료들은 백신 제조시 중요한 데이터로써 민간 기업에 이전하여 백신을 개발·생산할 수 있을것으로 사료된다.

본 연구에서 수행된 동절기 적리의 원인체 분리와 동정 및 역학조사 그리고 진단법 개발등의 결과를 양축농가에 보급하는 것은 물론 동물약품 및 사료를 판매하는 일선 임상 수의사에 대한 진단법 및 기술정보를 제공하며, 양축농가의 방역에 관한 기술적 지원을 해야할 것이다. 본 연구에서 수행된 지역별, 연령별 및 생산단계별 동절기 적리 바이러스 감염 실태에 대한 역학적 연구 분석결과는 동절기 적리의 근절 및 예방대책 수립의 기초자료로 활용할 수 있을것이다. 이와같은 연구를 수행하는 과정에서 개발된 기술들은 돼지, 닭 등 다른 가축 질병의 진단 및 예방에 적극 활용될 수 있을것으로 사료된다.

2. 산업화 추진방안

동절기 적리의 국내 발생역학조사와 분자생물학적 기법을 활용한 진단법 개발, 분리 바이러스주의 분자유전학적 특성 규명 및 원인바이러스 생체내 기병론등의 연구방법 및 결과를 관련 학계, 연구소, 산업계와 협의하여 개발된 기술을 적극 활용할 수 있도록 할 예정이다. 역학조사를 통하여 얻어진 동절기 적리의 국내 발병현황을 축산농가에 적극 홍보하여 이 질병의 근절을 도모할 것이다. 본 연구를 통해 개발된 바이러스 검출용 antigen-capture ELISA와 항체 검출용 ELISA의 진단기트 생산기술을 산업화할 수 있도록 한다. 또한 동절기 적리 바이러스 백신 생산의 중요한 자료로서 산업화 하도록 한다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

1. 외국분리주와 국내분리주간의 유전자 비교 결과

국내 분리주와 소 코로나바이러스 prototype인 Mebus strain 간의 핵산 염기서열을 비교한 결과, 총 77개와 52개의 핵산의 치환이 S1 및 S2 subunits에서 각각 관찰되었다. 이러한 핵산 염기서열의 치환은 최대 2.1%의 상동성 차이를 보였으며, 이러한 치환은 유전자 전체에 걸쳐서 무작위로 분포하고 있었다. 국내 분리주와 Mebus strain 간의 frameshift, deletion, insertion, nonsense mutations은 관찰되지 않았다. 또한 이러한 핵산의 치환은 총 46개와 22개의 아미노산 치환을 S1 및 S2 subunits에 일으켰다. 국내 분리주와 그 외 외국 보고주와의 핵산 염기서열 분석에서 가장 가까운 상동성을 보이는 것은 호흡기형 코로나바이러스인 LSU strain (96.6%)이었으며, 가장 동떨어진 것은 prototype인 Mebus strain (93.4%)이었다. 이러한 분석결과 강독주인 국내 소 동절기 적리 코로나바이러스는 30여년 전에 분리된 약독주인 L9 strain, Vaccine strain, Mebus strain과 진화론적으로 상당한 차이가 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 아미노산 치환을 기본으로 외국 보고주와 국내 분리주간의 계통분석을 실시한 결과, 국내 분리주 상호간에 높은 상동성이 관찰되었고, 국내 분리주와 외국 보고주 사이에서는 강독주인 호흡기형 OK strain과 소화기형인 LY-138이 국내주와 매우 가까운 사이에 있었다.

S1 subunit의 N terminal region (aa 1-330)은 마우스 간염 바이러스의 수용체 결합 도메인으로 알려져있다. 이 부위에서 국내 분리주는 Mebus strain과 비교하였을 때 총 15개의 아미노산 치환이 발생하였다. S1A immunoreactive domain은 aa 351-403 사이에 있는데, 이 부위에서 국내 분리주는 Mebus strain, 강독형 호흡기 및 소화기형 주들과 비교하여서 1개의 아미노산 치환(aa 365; S->F)이 관찰되었다. 이 부위의 아미노산 치환은 총 전하의 차이 없이 소수성기의 상당히 높은 변화를 일으켰다. S1B

immunoreactive domain은 aa 517-621 사이에 있으며, 이 부위에서는 총 4개의 아미노산 치환이 Mebus strain과 비교 시 관찰되었다.

소 코로나바이러스는 aa 456-592 사이에 hypervariable region이 존재하는데, 이 부위는 S1B immunoreactive domain과 중첩되어 있다. 이 부위를 Mebus strain과 비교하였을 때 총 11개의 아미노산 치환이 관찰되었는데, 특히 aa 531, aa 543, aa 578은 S1B immunoreactive domain과 중첩된 부위였다. 이 부위에서 아미노산 염기서열의 최대 차이를 보이는 바이러스주는 KWD7과 Mebus strain 사이(7.8%)이었다. 특징적으로 이 부위를 계통 분석한 결과, 국내 분리주는 호흡기형 OK strain 및 BCQ3994 strain 그리고 소화기형 LY-138과 같은 cluster 내에 속해 있었으며, 캐나다 분리주인 송아지 설사주인 BCQ 및 소 동질기 적리 분리주는 다른 cluster 내에 속해있었고, 미국 분리주인 호흡기형 LSU strain, 프랑스 소화기형 분리주인 F15, 약독주인 Vaccine strain, L9 strain, Mebus strain은 또다른 cluster을 형성하였다.

국내 분리주 모두에서 외국 보고주와는 다른 아미노산 염기서열이 aa 149와 617에서 관찰되었다. aa 149 (N->S)는 전하나 소수성기에 차이를 일으키지 않았지만, aa 617 (T->I) 치환은 소수성기를 증가시켰다.

소 코로나바이러스는 aa 763에서 시작하는 KRRSRR 염기서열이 있는데, 이 부위가 cleavage site이며, 결국 aa 768과 aa 769 사이에서 cleavage가 일어난다. 숙주세포의 trypsin-like enzyme은 이 부위를 절단하여서 결국 S1과 S2 subunit로 만든다. 이 효소 절단부위인 KRRSRR은 국내 분리주 모두에서 보존되어 있었다. 흥미롭게도 효소 절단부위의 바로 위 부분인 aa 769가 Ala에서 Ser로 치환되어 있었는데, 실은 이 부위가 Ser인 경우 호흡기형 소 코로나바이러스라고는 보고가 있었기 때문이다.

2. 외국 보고주와 국내분리주와의 유전자 S2 subunit의

비교 결과

국내 분리주와 Mebus strainrks의 첫 번째 hydrophobic (aa 955-992) 및 heptad repeat (aa 993-1032) region을 비교한 결과 총 4개(aa 959, aa 965, aa 984, aa 988)와 총 2개(aa 1026, aa 1030)의 아미노산 치환이 관찰되었다. 국내 분리주의 첫 번째 hydrophobic region의 이러한 아미노산 치환은 높은 친수성기로 변환을 일으켰다. 더욱이 국내주는 물론이고 강독주인 호흡기형 LSU 및 OK strain과 소화기형인 LY 및 F15 strain도 약독주인 Mebus나 Vaccine strain과 비교하였을 때, 이 부위에서 높은 친수성기를 보였다.

Leucine zipper motif는 aa 1273-1294에 존재하며, 이 부위는 F15주 (V->L) 외에는 국내 분리주는 물론 외국 보고주에서도 보존되어 있었다. Anchor sequence (KWPWYVWL, aa 1305-1312)도 국내 분리주는 물론 외국 보고주에서도 보존되어 있었다. 두 번째 hydrophobic region (aa 1312-1328)은 transmembrane domain이며 소화기형인 LY strain (aa 1316; F->L)외에는 국내 분리주와 외국 보고주에서 잘 보존되어 있었다. Cysteine-rich hydrophilic C-terminus인 35개의 아미노산 서열도 약독주들과 비교하였을 때 단지 한 개의 아미노산 치환(aa 1341; I->K)이 국내 분리주와 외국의 강독주에서 관찰되었다.

3. 외국 및 국내 강독주 관련 특이 염기서열의 분석 결과

국내 분리주와 지금까지 보고된 모든 외국 보고주와의 강독주 관련 특이 염기서열을 비교·분석하였다. 강독주 특이 염기서열은 총 7개가 보고되었는데, 이 중에서 aa 33, aa 40, aa 278, aa 470, aa 1241, aa 1341이 약독주와 비교하였을 때 국내 분리주는 물론 모든 강독주에서 보존되어 있었다. 하지만 나머지 강독주 관련 특이 서열인 aa 965는 오직 KWD9을 제외한 모든 강독주에서 보존되어 있었다.

제 7 장 참고문헌

1. Abraham, S., Kienzle, T.E., Lapps, W., Brian, D.A., 1990. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology*. 176, 296-301.
2. Akashi, H., Inaba, Y., Miura, Y., Tokuhisa, S., Sato, K. and Satoda, K. 1980. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. *Vet. Microbiol.* 5: 265-276.
3. Akashi, H., Inaba, Y., Miura, Y., Sato, K., Tokuhisa, M., Asagi, M. and Hayashi, Y. 1981. Propagation of the Kakegawa strain of bovine coronavirus in suckling mice, rats and hamsters. *Arch. Virol.* 67: 367-370.
4. Alenius, S., Niskanen, R., Juntti, N. and Larsson, B. 1991. Bovine coronavirus as the causative agent of winter dysentery: serological evidence. *Acta. Vet. Scand.* 32: 163-170.
5. Ballesteros, M.L., Sanchez, C.M., Enjuanes, L., 1997. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology* 227, 378-388.
6. Benfield DA, Saif LJ. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J Clin Microbiol* 1990;28:1454-1457.
7. Boireau, P., Cruciere, C., Laporte, J., 1990. Nucleotide sequence of the glycoprotein S gene of bovine enteric coronavirus and comparison with

the S proteins of two mouse hepatitis virus strains. *J. Gen. Virol.* 71, 487-492.

8. Bridger JC, Woode GN, Meyling A. Isolation of coronaviruses from neonatal calf diarrhea in Great Britain and Denmark. *Vet Microbiol* 1978 ;3:101-113.

9. Britton, P., 1991. Coronavirus motif. *Nature* 353, 394. Cavanagh,D.,1995. The coronavirus surface glycoprotein. In: S.G. Siddell (Eds.). *The coronaviridae*, Plenum Press. NY, pp 73-113.

10. Brodersen BW, Kelling CL. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. *Am J Vet Res* 1998;59, 1423-1430.

11. Bryson DG, McFerran JB, Ball HJ, et al. Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves. Epidemiological, clinical and microbiological findings. *Vet Rec* 1978;103:485-489.

12. Campbell, S.G. and Cookingham, C.A. 1978. The enigma of winter dysentery. *Cornell. Vet.* 68: 423-441.

13. Cho, K.O., Halbur, P.G., Bruna, J.D., Sorden, S.D., Yoon, K.J., Janke, B.H., Chang, K.O., Saif, L.J., 2000. Detection and isolation of coronavirus from feces of three herds of feedlot cattle during outbreaks of winter dysentery-like disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 1191-1194.

14. Cho, K.O., Hasoksuz, M., Nielsen, P.R., Chang, K.O., Lathrop, S., Saif, L.J., 2001a. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and Nested PCR for their detection. *Arch. Virol.* 146, 2401-2419.
15. Cho, K.O., Hoet, A., Lorech, S.C., Wittum, T.E., Saif, L.J., 2001b. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1436-1441.
16. Chouljenko, V.N., Kousoulas, K.G., Lin, X., Storz, J., 1998. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. *Virus Genes.* 17, 33-42.
17. Clark MA. Bovine coronavirus. *Br Vet J* 1993;149:51-70. Dyer RM. The bovine respiratory disease complex: infectious agents. *Compend Contin Ed* 1981;3:S374-S382.
18. De Vries, A.A.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., De Groot, R.J., 1997. The genome organization of the Nidovirales: Similarities and differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Semin. Virol.* 8, 33-47.
19. Durham, P.J.K., Hassard, L.E., Armstrong, K.R. and Naylor, J.M. 1989. Coronavirus associated diarrhea (winter dysentery) in adult cattle. *Can. Vet. J.* 30: 825-827.

20. Espinasse, J., Viso, M., Laval, A., Savey, M. and Layec, C.L. 1982. Winter dysentery: A coronavirus-like agent in the feces of beef and dairy cattle with diarrhea. *Vet. Rec.* 110: 385.
21. Fazakerley, J.K., Parker, S.E., Bloom, F., Buchmeier, M.J., 1992. The V5A13.1 envelope glycoprotein deletion mutant of mouse hepatitis virus type-4 is neuroattenuated by its reduced rate of spread in the central nervous system. *Virology.* 187, 178-188.
22. Fleetwood, A.J., Edwards, S., Foxell, P.W. and Thorns, C.J. 1989. Winter dysentery in adult dairy cattle. *Vet. Rec.* 125: 553-554.
23. Frank GH. Bacteria as etiologic agents in bovine respiratory disease. In *Bovine Respiratory Disease-A Symposium*. College Station, Texas A&M University Press, 19-84.
24. Fukutomi T, Tsunemitsu H, Akashi H. Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Arch Virol* 1999;144:997-1006.
25. Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J., 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology.* 279, 371-374.
26. Gelinas, A.M., Boutin, M., Sasseville, A.M.J., Dea, S., 2001. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. *Virus Res.* 76, 43-57.

27. Hasoksuz, M., Sreevatsan, S., Cho, K.O., Hoet, A.E., Saif, L.J., 2002. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus Research* 84, 101-109.
28. Hasoksuz MH, Lathrop SL, Gadfield KL, et al. Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses. *Am J Vet Res* 1999;60:1227-1233.
29. Hingley, S.T., Gombold, J.L., Lavi, E., Weiss, S.R., 1994. MHV-A59 fusion mutants are attenuated and display altered hepatotropism. *Virology*. 200, 1-10.
30. Horner GW, Hunter R, Kirbrid CA. A coronavirus-like agent present in feces of cows with diarrhea. *N Z Vet J* 1975;33:98.
31. Hsu, M.C., Scheid, A., Choppin, P.W., 1987. Protease activation mutants of Sendai viruses: sequence analysis of the mRNA of the fusion protein (F) gene and direct identification of the cleavage-activation site. *Virology* 156, 84-90.
32. Jactel, B., Espinasse, J., Viso, M. and aliergue, H. 1990. An epidemiological study of winter dysentery in fifteen herds in France. *Vet. Res. Communi.* 14: 367-379.
33. Jones, F.S. 1933. Infectious diarrhea (winter scours) of cattle. *Cornell Vet.* 23: 117-122.

34. Jung, J.H., Kim, G.Y., Yoon, S.S., Park, S.J., Kim, Y.J., Sung, C.M., Shin, S.S., Koh, H.B., Lee, C.Y., Park, N.Y., Kang, M.I., Cho, K.O., 2004. Detection and Isolation of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2004. *J. Vet. Med. Sci.* (submitted).
35. Kahrs, R.F., Scott, F.W. and Hillman, R.B. 1973. Epidemiologic observations of bovine winter dysentery. *Bovine Pract.* 8: 36-39.
36. Krempf, C., Schultze, B., Laude, H., Herrler, G., 1997. Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.* 71, 3285-3287.
37. Lai, M.M.C., Cavanagh, D., 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 48, 1100.
38. Langpap TJ, Bergeland ME, Reed DE. Coronaviral enteritis of young calves: Virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. *Am J Vet Res* 1979;34:145-150.
39. Langpap TJ, Bergeland ME, Reed DE. Coronaviral enteritis of young calves: virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. *Am J Vet Res* 1979;40:1476-1478.
40. Lathrop SL, Wittum TE, Brock KV, et al. Association between infection of the respiratory tract attributable to bovine coronavirus and health and growth performance of cattle in feedlots. *Am J Vet Res*

2000;61:9:1062-1066.

41. Lathrop, S.L., Wittum, T.E., Loerch, S.C., Perino, L.J. and Saif, L.J. 2000. Association between infection of the respiratory tract attributable to bovine coronavirus and health and growth performance of cattle in feedlots. *Am. J. Vet. Res.* 61: 1057-1061.

42. Lathrop SL, Wittum TE, Loerch SC, et al. Antibody titers against bovine coronavirus and shedding of the virus via the respiratory tract in feedlot cattle. *Am J Vet Res* 2000;61:9:1057-1061.

43. Laude, H., Talbot, P.J., Levy, G.A., 1995. Corona and related virus: Functional domains in the spike protein of transmissible gastroenteritis virus. Plenum Press, New York. 299-394.

44. Lee, J.Y., Kim, Y.Y., Shin, G.C., Na, B.K., Lee, J.S., Lee, H.D., Kim J.H., Kim W.J., Kin J., Kang, C. Cho H.W., 2003. Molecular characterization of two genotypes of mumps virus circulated in Korea during 1998-2001. *Virus Res.* 97, 111-116.

45. Luo, Z., Weiss, S., 1998. Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein. *Virology.* 244, 483-494.

46. Luytjes, W., Bredenbeek, P.J., Noten, A.F., Horzinek, M.C., Spaan, W.J., 1988. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 166, 415-422.

47. MacPherson, L.W. 1957. Bovine virus enteritis (winter dysentery). *Can. J. Comp. Med.* 57: 184-192.
48. Martin SW, Nagy E, Shewen PE. The association of titers to bovine coronavirus with treatment for bovine respiratory disease and weight gain in feedlot calves. *Can J Vet Res* 1998;62: 257-261.
49. Martin SW. Analysis and causal interpretation of biologic data. A seroepidemiologic study of respiratory disease. Fourth International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. *Vet Med* 1985;57: 46-54.
50. McNulty MS, Bryson DG, Allan GM, et al. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Vet Microbiol* 1984;9:425-434.
51. Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, et al. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a corona-like agent. *Vet Pathol* 1973;10:45-64.
52. Meng, X.G., Halbur, P.G., Lum, M.A., 1995a. Phylogenetic analysis of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Implication for the existence of two genotypes of PRRSV in U. S. A. and Europe. *Arch. Virol.* 140, 745-755.
53. Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Morozov, I., 1995b Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 76, 3181-3188.
54. Mounir, S., Talbot, P.J., 1993. Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks

two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Virology*. 192, 355-360.

55. Rasschaert, D., Duarte, M., Laude, H., 1990. Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J. Gen. Virol.* 71, 2599-2607.

56. Rekik, M.R.,Dea, S., 1994. Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. *Arch. Virol.* 135, 319-331.

57. Reynolds DJ, Debney TG, Hall GA, et al. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. *Arch Virol* 1985;85:71-83.

58. Roberts, S.J. 1957. Winter dysentery in dairy cattle. *Cornell Vet.* 47: 372-388.

59. Rollinson, D.H.L. 1948. Infectious diarrhea of dairy cows. *Vet. Rec.* 60: 191-192.

60. Rosenquist BD. Viruses as etiologic agents of bovine respiratory disease. In *Bovine Respiratory Disease-A Symposium*. College Station, Texas A&M University Press, 1984.

61. Rott, R., Orlich, M., Klenk, H.D., Wang, M.L., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1984. Studies on the adaptation of influenza viruses to MDCK cells. *EMBO J.* 3, 3329-3332.

62. Saif, L.J., 1993. Coronavirus immunogens. *Vet. Microbiol.* 37, 285-297.
63. Saif, L.J., Brock, K.V., Redman, D.R., Kohler, E.M., 1991. Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet. Rec.* 128, 447-449.
64. Saif LJ, Redman DR, Moorhead PD, et al. Experimentally induced coronavirus infections in calves: Viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am J Vet Res* 1986;47: 1426-1432.
65. Saif LJ. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? *Cornell Vet* 1990;80: 303-311.
66. Saif, L.J., Redman, D.R., Brock, K.V., Kohler, E.M. and Heckert, R.A. 1988. Winter dysentery in adult dairy cattle: detection of coronavirus in the faeces. *Vet. Rec.* 123: 300-301.
67. Saif, L.J., Bohl, E.H., Kohler, E.M. and Hughes, J.H. 1977. Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agent) of swine. *Am. J. Vet. Res.* 38: 13-20.
68. Schultze, B., Gross, H.J., Brossmer, R., Herrler, G., 1991. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J. Virol.* 65 , 6232-6237.
69. Schultze, B., Herrler, G., 1994, Recognition of N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid by bovine coronavirus and

hemagglutinating encephalomyelitis virus. In: H. Laude and J.F. Vautherot, Editors, Coronaviruses, Plenum press. NY, pp 299-304.

70. Scott, F.W., Kahrs, R.F. and Campbell S.G. 1973. Etiologic studies on bovine winter dysentery. *Bovine Pract.* 8: 40-43.

71. Sharpee RL, Mebus CA, Bass EP. Characterization of a calf diarrhea coronavirus. *Am J Vet Res* 1976;37:1031-1041.

72. Silva MR, O'Reilly KL, Lin X, et al. Sensitivity comparison for detection of respiratory bovine coronaviruses in nasal samples from feedlot cattle by ELISA and isolation with the G clone of HRT-18 cells. *J Vet Diagn Invest* 1999;11:15-19.

73. Smith DR, Fedorka-Cray PJ, Mohan R, et al. Epidemiology of winter dysentery in dairy cattle: assessment of herd-level causative agents and risk factors. *Am J Vet Res* 1998;59:994-1001.

74. Smith DR, Tsunemitsu H, Heckert RA, et al. Evaluation of two antigen-capture ELISAs using polyclonal or monoclonal antibodies for the detection of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest* 1995;8:99-105.

75. Spaan, W., Cavanagh, D., Horzinek, M.C.,1988. Coronaviruses: structure and genome expression. *J. Gen. Virol.* 69, 2939-2952.

76. Stair EL, Rhodes MB, White RG, Mebus CA. Neonatal calf diarrhea: purification and electron microscopy of a coronavirus-like agent. *Am J Vet Res* 1972;33:1147-1156.

77. Steinhauer, D.A., Holland, J.J., 1986. Direct method for quantitation of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA. *J. Virol.* 57, 219-228.
78. Storz, J., Purdy, W., Lin, X., Burrell, M., Truax, R.E., Briggs, R.E., Frank, G.H., Loan, R.W., 2000. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytocidal viruses, and *Pasteurella* spp. from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216, 1539-1604.
79. Storz J, Purdy CW, Lin ZQ, et al. Market-stressed cattle of a shipping fever epizootic in a Texas feedlot have a high infection rate with respiratory bovine coronaviruses. *Proceedings from the 31th Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioners* 1998;31:224.
80. Storz J, Stine L, Liem A, et al. Coronavirus isolation from nasal swabs samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *J Am Vet Med Assoc* 1996;208:1452-1454.
81. Straub OC. Viral respiratory infections of cattle. *Bovine Practitioner* 1995;29:66-70.
82. Takahashi E, Inaba Y, Sato K, et al. Epizootic diarrhea of adult cattle associated with a coronavirus-like agent. *Vet Microbiol* 1980; 5:151-154.
83. Thomson RG. Pathology and pathogenesis of the common disease of the respiratory tract of cattle. *Can Vet J* 1974;15:249-251.

84. Traven, M., Naslund, K., Linde, N., Linde, B., Silvan, A., Fossum, C., Hedlund, K.O. and Sarsson, B. 2001. Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV comparison with BCV infection in milk-fed calves. *Vet. Microbiol.* 81: 127-151.
85. Traven, M., Silvan, A. and Larsson, B. 1995. Experimental infection with bovine coronavirus (BCV) in lactating cows; clinical disease, viral excretion, interferon- γ , and antibody response. *Bovine Pract.* 29: 64-65.
86. Tsunemitsu H, Saif LJ. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Arch Virol* 1995;140:1303-1311.
87. Tsunemitsu H, Yonemichi H, Hirai T, et al. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. *J Vet Med Sci* 1991;53:433-437.
88. Van Kruiningen, J.J., Castellano, V.P., Koopmans, M. and Harris, L.L. 1992. A serologic investigation for coronavirus and Breda virus antibody in winter dysentery of dairy cattle in the northeastern United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 450-452.
89. Van Kruiningen, J.J., Castellano, V.P., Torres, A. and Sharpee, L.L. 1991. Serologic evidence of coronavirus infection in New York and New England dairy cattle with winter dysentery. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 293-296.
90. Van Kruiningen, J.J., Khairallah, L.H., Sasseville, V.G., Wyand, M.S.

and Post, J.E. 1987. Calfhood coronavirus enterocolitis: a clue to the etiology of winter dysentery. *Vet. Pathol.* 24: 564-567.

91. Van Kruningen, J.J., Heistand, L. and Hill, D.L. 1985. Winter dysentery in dairy cattle: recent findings. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 7: S591-S599.

92. Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., 2000. *Virus Taxonomy*. Academic press, San Diago, CA, p.827.

93. Vautherot, J.F., Madelaine, M.F., Boireau, P., Laporte, J., 1992. Bovine coronavirus peplomer glycoproteins: detailed antigenic analyses of S1, S2 and HE. *J. Gen. Virol.* 73, 1725-1737.

94. Wesley, R.D., Woods, R.D., Cheung, A.K., 1991. Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 65, 3369-3373.

95. Wilde, J., Eiden, J. and Yolken, R. 1990. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1300-1307.

96. Yoo, D., Parker, M.D., Babiuk, L.A., 1990. Analysis of the S spike (peplomer) glycoprotein of bovine coronavirus synthesized in insect cells. *Virology.* 179, 121-128.

97. Yoo, D., Parker, M.D., Babiuk, L.A., 1991a. The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. *Virology*. 180, 395-399.
98. Yoo, D., Parker, M.D., Song, J., Cox, G.J., Deregt, D., Babiuk, L.A., 1991b. Structural analysis of the conformational domains involved in neutralization of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses. *Virology*. 183, 91-98.
99. Yoo, D., Deregt, D., 2001. A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8(2), 297-302.
100. Zhang X, Herbst W, Kousoulas KG, et al. Comparison of the S genes and the biological properties of respiratory and enteropathogenic bovine coronaviruses. *Arch Virol* 1994;134: 421-426.
101. Zhang, X., Kousoulas, K.G., Storz, J., 1991. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent strains of bovine coronaviruses. *Virology*. 183, 397-404.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.