

## 송아지 Rotavirus感染症 調査

安載文, 朴在明, 郭鶴求, 金鴻起

충청북도 가축위생시험소재천지소

### Studies on the Prevalence of Bovine Rotavirus Infection

**Jae-Moon Ahn, Jae-Myung Park, Hak-Ku Kwak, Hong-Ki Kim**

Jechon Branch of Choongbuk Veterinary Service Laboratory

#### Abstract

To determine the prevalence of bovine rotavirus infection in Chungbuk area, fecal specimens were collected from calves with diarrhea and tested using ELISA. The positive rates were 53.8%(1 to 30days old), 19.0%(31 to 60days old), and 3.2%(over 60days old). Electrophoretic migration patterns of genomic RNA from field isolates were similar to that of NCDV strain, prototype of bovine rotavirus. Bovine rotavirus field isolate showed characteristic morphology of rotavirus particle with 80nm in diameter, using EM.

Key Words : bovine rotavirus, ELISA

## 緒 論

Rotavirus는 Reoviridae에 속하는 二重螺旋形 RNA virus<sup>1)</sup>로서 많은 種類의 動物에서 新生畜의 泄瀉症 原因體로서 作用<sup>2, 3, 4)</sup>하며 治療上의 어려움으로 因한 經濟的 損失을 끼치고 있다.<sup>5)</sup> 송아지 Rotavirus는 自然界에 널리 分布되어 있으며 大部分 出生後 1週日以內에 심한 泄瀉를 일으킨다. Rotavirus 感染症에서는 細菌과 混合感染되는 例가 大部分인데 Rotavirus 單獨으로는 斃死를 일으키지 않으나 腸管에 1次病原體로서 侵入하여 泄瀉를 일으킴으로서 다른 細菌의 侵入이 용이하도록 한다.<sup>6)</sup>

最近 調査된 바에 따르면 우리나라 全體 송아지 泄瀉症의 69.2%가 Rotavirus에 依한 것으로 밝혀졌으며<sup>7)</sup> 이에 따른 農家의 被害가 增加하고 있는 實情이다. Rotavirus는 自然環境下에서 比較的 安定하여 잘 生存하기 때문에 家畜에서의 傳染은 糞便汚染物의 攝取에 의해서 쉽게 일어난다.<sup>1)</sup>

Rotavirus에 의한 胃腸炎은 주로 新生송아지 이거나 어린 家畜에서 多發하며 큰소에서는 無症狀感染되는 例가 많다. Rotavirus 侵入部位는 空腸과 回腸으로 制限되는데 주로 잘 分化되고 酵素活動이 왕성한 villi 끝에 있는 腸細胞에서 1次 增殖이 된다.<sup>1)</sup> virus增殖이 일어나면 그 細胞는 消化, 吸收機能을 잃게 되며 이때 滲透壓不均衡과 吸收機能障礙에 依한 泄瀉가 발생한다.<sup>1)</sup>

本 試驗에서는 송아지에서 發生되는 Rotavirus 感染症의 發生狀況을 調査하고 泄瀉便에서 virus를 分離함으로써 本病으로 因한 被害減少를 위한 豫防對策의 基礎資料로 삼고자 하였다.

## 材料 및 方法

供試動物：一般 養畜農家에서 飼育하고 있는 韓牛 및 乳牛 송아지를 對象으로 泄瀉症勢를 나타내어 소에서 直腸糞便을 採取하였다. 採取된

泄瀉便은 滅菌병에 넣어 -20℃ 冷藏庫에 保存하며 實驗에 使用하였다.

ELISA에 依한 Rotavirus 檢出：冷凍保存한 糞便을 溶解한 後 PBS(pH7.2)로 10倍 稀釋한 뒤 4,000rpm에서 20分동안 遠心分離하여 上清液을 0.45um 필터로 濾過하여 試驗材料로 使用하였다. Rotavirus의 共通抗原인 VP6에 特異적으로 反應하는 monoclonal antibody를 coating buffer(pH 9.6)로 1 : 2,000倍 稀釋하여 ELISA 용 96 well microplate에 100ul씩 넣어 37℃ 1時間 感作 시킨후 4℃에서 overnight하였다. microplate를 PBS-Tween20으로 3회 洗滌한 後 1% bovine serum albumin으로 37℃에서 2時間 反應시킴으로서 blocking시켰다. Blocking後 試驗材料를 각 well 100ul씩 분주하여 37℃ 1시간 感作시킨 다음 PBS-Tween 20으로 3회 洗滌하였다. 3회 洗滌後 Biotin이 부착된 polyclonal Ab로 37℃ 1시간 反應시킨 후 다음 3회 洗滌하고 Streptavidin-peroxidase conjugate로 37℃ 30分 反應시킨 後 다시 3회 洗滌하였다. ABTS (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)와 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 기질로 添加하여 室溫에서 15分 정도 發色시킨 다음 結果를 判讀하였다.

電氣泳凍法：ELISA에 의하여 陽性反應을 나타낸 試驗材料를 對象으로 virus의 RNA를 다음과 같은 方法으로 抽出하였다. 試驗材料에 同量의 飽和된 phenol을 添加하여 混合한뒤 遠心分離하여 protein이 除去된 上層液을 取하고 여기에 다시 同量의 phenol/chloroform(1 : 1)을 混合하여 遠心分離하였다. 遠心分離後 上層液에 3倍容量의 absolute ethanol을 添加하여 -20℃에서 overnight하여 RNA를 沈澱시켰다. 沈澱된 RNA는 遠心分離 後 ethanol은 버리고 공기중에서 乾燥한 뒤 50ul의 증류수로 溶解하여 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)을 사용하여 20mA에서 8시간 동안 電氣泳動을 實施하였다.

電子顯微鏡的 觀察：Rotavirus 粒子를 觀察하기 위하여 ELISA양성인 10% 분변재료를 3,

000rpm에서 30분간 遠心分離한 後 上層液을 100,000g에서 2時間동안 遠心한 다음 pellet를 증류수에 浮遊시켜 2% PTA(Phosphotungstic acid, pH7.0)로 染色하여 電子顯微鏡上에서 觀察하였다.

**結 果**

Table 1. Detection of bovine Rotavirus from calves with diarrhea by ELISA

Age (Days)	No. of tested	No. of positive	%
1-30	26	14	53.8
31-60	21	4	19.0
over 60	31	1	3.2
Total	78	19	24.3

송아지의 泄瀉便을 試驗材料로 使用하여 ELISA에 依한 Rotavirus 感染症을 調査한 結果 표1에서와 같이 1個月 未滿에서 53.8%의 높은 發生率을 보였고, 2個月 未滿은 19%, 2個月 以上은 3.2%로서 相對的으로 낮은 發生率을 나타내었다.

Table 2. Prevalence of Rotavirus infection by farms

Farms (heads)	No. of tested	No. of positive	%
1-5	22	4	18.1
6-10	25	4	16.0
11-20	20	5	25.0
over 20	11	6	54.5
Total	78	19	24.3

農場的 飼育規模別 Rotavirus 檢出率을 보면 표2와 같이 5頭 以下의 農場에서 發生率은 18.1%이고 10頭 以下의 農場에서는 16.0%, 20頭

以下의 農場에서는 25.0%이었으나 20頭 以上의 專業農家에서의 發生率은 54.5%로서 相對的으로 높았다.

Table 3. RNA analysis of fecal sample by PAGE

No. of tested	RNA genomic profiles	
	Rotavirus	Others
19	18	1

Rotavirus VP6에 대한 monoclonal antibody를 利用한 ELISA에 陽性反應을 나타낸 試料를 PAGE에 의한 電氣泳動을 實施한 結果 표3에서 보는 바와 같이 Rotavirus와 비슷한 11개의 segments로 나타나 Rotavirus 標準株인 NCDV strain과 比較해 볼 때 類似한 遺傳子 構造를 가지고 있음을 알 수있었다.(그림1) 즉 PAGE에 의한 電氣泳動結果 Rotavirus의 遺傳子は 1群에 4個, 2群에 2個, 3群에 3個, 4群에 2個로 總 11個의 band를 보였다.

ELISA에 陽性反應을 나타낸 試驗材料를 對象으로 電子顯微鏡으로 Rotavirus를 觀察한 結果 그림2와 같이 直徑은 80nm 程度이었으며 中心部는 直徑이 60nm정도로 形態는 Rotavirus와 같은 모양을 하고 있었다.

**考 察**

송아지 泄瀉症은 農場에서 흔히 發生되는 疾病으로서 송아지 斃死의 가장 많은 比率을 차지하고 있다. 이러한 泄瀉症의 原因으로는 바이러스 및 大腸菌을 비롯한 여러種類의 病原微生物의 作用과 이들 病原體에 依한 發病이 일어나도록 하는 송아지 個體 抵抗力의 減退 즉 初乳의 不충분한 攝取 또는 스트레스에 起因한 感受性 增加등의 相關關係에 依해서 發病된다.

우리나라에서 新生송아지 泄瀉의 原因體로 Rotavirus, 腸毒血性 E.coli 등이 主要한 原因體로 作用하고 있다.<sup>7)</sup> 本 調査에서 30日齡 以前까지의 Rotavirus 發生率은 53.8%로서 金等<sup>7)</sup>이 調

査한 糞便에서의 Rotavirus檢出率 69.2% 그리고 柳等<sup>8)</sup>이 Electropherotyping方法에 의해 調査한 Rotavirus 陽性率 75.5%보다는 낮은 發生率을 보였는데 이는 調査對象의 設定이나 調査方法의 差異에 따른 것으로 생각된다.

30日齡 未滿의 송아지에서 Rotavirus感染이 다른 日齡에 비해 2倍以上으로 相對적으로 높은 發生率을 보인 것은 Rotavirus가 주로 生後 5-10日齡에 感染을 일으킨다는 Acres等의 報告<sup>9)</sup> 및 生後 5-14日齡 송아지에서 높은 Rotavirus發生率을 보인 金等의 報告<sup>7)</sup>와 一致하였다.

初乳中에는 Rotavirus에 대한 抗體가 分泌되며 이들은 分娩後 급속히 減少된다.<sup>10)</sup> Mebus等<sup>11)</sup>과 Snodgrass와 Wells<sup>12)</sup>는 初乳로 부터 받은 受動免疫은 Rotavirus感染에 對한 防禦에 적절하지 못하다고 하였으며 Goto等<sup>2)</sup>은 新生송아지의 Rotavirus感染에 따른 障壁 損傷에 대한 防禦는 感染시 腸에 存在하는 中和抗體의 存在에 따른다고 하였으나 이 中和抗體는 分娩後 2日 以內에 初乳中에서 急激히 減少하는 것으로<sup>13)</sup> 알려졌다.

Rotavirus는 急速히 傳播되며 治療上의 어려움으로 因해 農家に 많은 被害를 주므로 이에 대한 對策樹立을 위하여 疫學的 調査 및 血清型分類를 包含한 病原體에 대한 研究가 계속되어야 한다고 생각된다.

Rotavirus는 生後 數日內의 송아지에 感染되어 짧은 期間中에 다른 個體로 傳播되며 成畜에 無症狀感染되어 疾病의 根絶을 어렵게 하므로<sup>2)</sup> 飼育規模가 큰 農場에서는 이 疾病이 계속적으로 發生되며 소 飼育農家가 密集된 地域에서도 Rotavirus感染症의 傳播가 쉽게 일어나는 것으로 생각된다. 飼育規模가 20頭 以上인 農家에서의 Rotavirus感染症 發生率이 54.5%로 相對적으로 높았으며 10頭 未滿에서는 發生率이 20% 未滿으로 相對적으로 낮은 成績을 보였는데 飼育規模가 큰 農場에서는 Rotavirus感染症 發生의 豫防 및 根絶을 위해서 畜舍의 定期的 消毒等

에 의한 衛生管理 및 豫防藥接種 등에 의한 免疫形成等を 위해 힘써야 할 것으로 생각된다.

Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 利用한 Rotavirus의 dsRNA에 대한 電氣泳動結果는 소 Rotavirus 標準株(NCDV)의 genomic profiles와 類似하게 11개의 segments를 가지고 있어 遺傳子構造가 같음이 確認되었다. 이 중 4번째 gene은 hemagglutination에 關與하며 9번째 gene은 neutralization에 關與하는 것으로 밝혀졌고 2개의 gene들은 subgrouping 등에 利用된다.<sup>8)</sup>

## 結 論

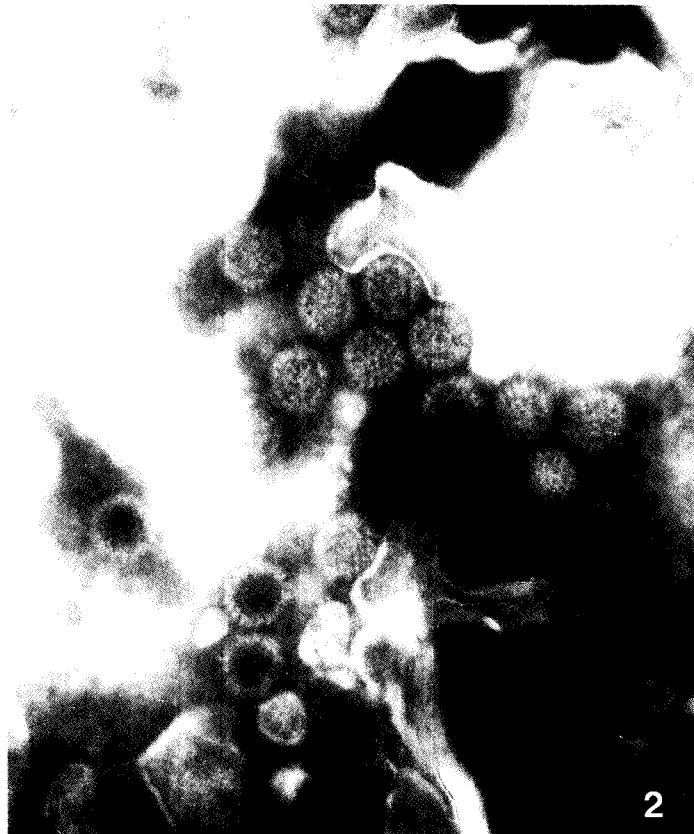
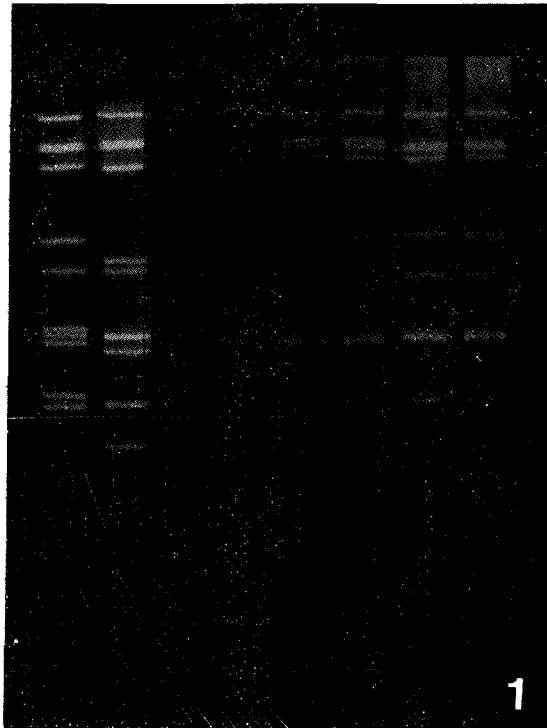
農場에서 發生되고 있는 송아지 泄瀉症에 대한 로타바이러스 感染症 調査를 實施한 結果 다음과 같은 成績을 얻었다.

1. 日齡에 따른 로타바이러스 感染症 調査結果 1個月 未滿에서 53.8%의 높은 發生率을 나타내었다.
2. 飼育規模에 따른 로타바이러스 感染症 發生率은 20頭 以上の 事業農家에서 54.5%로서 比較的 높았다.
3. 分離된 바이러스의 電氣泳動 結果 標準株인 NCDV와 類似한 遺傳子 分布를 보였다.
4. 로타바이러스에 대한 電子顯微鏡的 觀察結果 로타바이러스 固有의 形態를 나타내었다.

## Legends for figures

Photo.1. Genomic RNA Profiles from bovine rotavirus field isolates.  
(Lane 1 and 2 : Human rotavirus, Lane 3 through 8 : Bovine rotavirus)

Photo.2. Electron micrograph of negatively stained bovine rotavirus particles from fecal sample with diarrhea.



參考文獻

1. Saif LJ, Rosen BI, Kang SY, et al. 1988. Cell culture propagation of rotaviruses. *J. of Tiss. Culture Meth.* 11 : 147-156.
2. Goto Y, Kurogi H, Inaba Y, et al. 1986. Sequential isolation of rotavirus from individual calves. *Vet. Microbiol.* 11 : 177-184.
3. Offit PA, Clark HF, Plotkin SA. 1983. Response of mice to rotavirus of bovine or primate origin associated by radioimmunoassay, radioimmunoprecipitation, and plaque reduction neutralization. *Infect. and Immun.* 42(1) : 293-300.
4. Greenberg H, McAuliffe V, Valdesuso J, et al. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect. and Immun.* 39(1) : 91-99.
5. Killen HM, Dimmock VJ. 1982. Identification of a neutralization specific antigen of a calf rotavirus. *J.Gen.Virol.* 62 : 297-311.
6. Scherrer BJ, Cohen R, L'haridon, Feynerol C, et al. 1976. Identification of a rotavirus associated with neonatal calf diarrhea in France. *Butt. Off. Int. Epiz.* 35(1-2), 23-32.
7. 金斗, 柳榮銖, 柳漢相等. 1990. 韓牛 송아지의 哺乳期間中の 泄瀉發生에 關한 研究. *大韓獸醫學會誌.* 30(2) : 255-260.
8. 柳榮銖, 金斗熙, 安壽煥. 1989. 송아지에서의 Rotavirus 感染症. *農試論文集.* 31(3) : 6-10.
9. Acres SD, Saunders JR, Radostits OM. 1977. Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves : The prevalence of enterotoxigenic E.coli : Reo-like(rota) virus and other enteropathogens in cow-calf herds. *Can.Vet.J.* 18 : 113-121.
10. Myers LL, Snodgrass DR. 1982. Colostral and milk antibody titers in cows vaccinated with a modified live-rotavirus-coronavirus vaccine. *JAVMA.* 81 : 486-488.
11. Mebus CA, White RG, Bass EP, et al. 1973. Immunity to neonatal calf diarrhea virus. *JAVMA.* 163 : 880-883.
12. Snodgrass DR, Wells PW. 1978. Passive immunity in rotaviral infections. *JAVMA.* 173 : 565-568.
13. Woode GN, Jones J, Bridger J. 1975. Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhea virus. *Vet.Rec.* 97 : 148-149.
14. Thouless ME, G.M. Beards GM, Flewett TH. 1982. Serotyping and subgrouping of rotavirus strains by the ELISA test. *Arch. of Virol.* 73 : 219-230.
15. Conner ME, Gillespie JH, Schiff EI, et al. 1983. Detection of rotavirus in horses with and without diarrhea by electro-microscopy and Rotazyme test. *Cornell Vet.* 73 : 280-287.
16. Ihara T, Samejim T, Kuwahara H, et al. 1983. Isolation of new serotypes of bovine rotavirus. *Arch. of Virol.* 78 : 145-150.