

설사증 이환犬으로 부터 分離한 canine coronavirus의 性狀에 관한 研究

이병형 · 전무형 · 박종현* · 황의경* · 허 원**

충남대학교 수의과대학
가축위생연구소*
대성미생물연구소**
(1994년 7월 26일 접수)

Characterization of canine coronaviruses isolated from the dogs with diarrhea in Korea

Byung-hyung Lee, Moo-hyung Jun, Jong-hyeon Park*, Eui-kyung Hwang*, Won Huh**

*College of Veterinary Medicine, Chungnam National University,
Veterinary Research Institute*,
Daesung Microbiological Laboratory**
(Received July 26, 1994)*

Abstract : An attempt was made to isolate a causative viral agents from the fecal specimens of the diseased dogs with the gastroenteritis symptoms. Two coronavirus-like agents were isolated by serial dilution end point method and plaque assay. The isolates were characterized in terms of cytopathology, antigenicity, replication, physicochemical and morphological properties.

The results obtained through the experiment were as follows;

1. Among 7 fecal specimens collected from the dogs with enteric disease, 2(28.6%) coronavirus-like agents showing typical cytopathic effects of canine coronavirus were isolated, and designated as CCV D1 and CCV D2, respectively.
2. By the cross-neutralization test and indirect immunofluorescence antibody test, the isolates were antigenically indentified as the standard CCV. The viruses were replicated only in the cytoplasm of A-72 cells.
3. The isolates showed no haemagglutinating activity against the erythrocytes from 11 kinds of animals.
4. The electron microscopic observation for the isolates showed spherical and pleomorphic features, covered with club-shaped projections on the surface. The size of particles was ranged from 70 to 150nm.
5. In one-step growth curve for the isolates in A-72 cells, maximum titers of intracellular virus was $10^{4.6}$ TCID₅₀/0.1ml at 46 hrs postinoculation(pi) of CCV D1 and $10^{4.4}$ TCID₅₀/0.1ml at 34 hrs pi of CCV D2. The maximum titers of extracellular virus was $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1ml at 58 hrs pi of CCV D1 and $10^{5.8}$ TCID₅₀/0.1ml at 46 hrs pi of CCV D2.
6. In physicochemical property test, the isolates were very sensitive to chloroform and were found to be RNA virus. The viruses was stable at pH 3.0 for 1 hr and at 22°C for 5 hrs. However, infectivity titers reduced remarkably by treatment with 56°C for 10min.

서 론

Coronaviruses는 개, 돼지, 소, 고양이와 가금 등에서 장염과 호흡기질환을 일으키는 중요한 원인체로 숙주특이성을 가진다^{26,37,40}. 이 중 canine coronavirus(CCV)는 개의 전염성 장염을 일으키는 원인체로 1974년 Binn et al¹에 의해 독일에서 설사증에 이환된 군견에서 최초 분리 보고되었다. CCV는 Coronaviridae의 일반적인 특성을 가지고 있으며 형태적으로 envelope를 가진 다형 태성이지만 일반적으로 구형에 가까우며, 크기는 60-220nm(평균 100nm)로 다양하며 표면에 20nm정도의 표면돌기(club-shaped projection)가 있고, 3종의 구조단백을 보유한 single-stranded RNA virus이다^{1,3,26,32,36,40}. CCV의 성상에 대한 연구는 여러 학자들에 의해 보고된 바 있으며^{37,13}, 분리주에 따라 다소 차이가 있으나 일반적으로 ether, chloroform, 소독제 및 고온(56°C)처리에서 감수성이 있다. 그러나 pH 3.0 및 저온(20-22°C)처리, trypsin과 5-bromo-2'deoxyuridine(BUDR)처리에 대해 영향을 받지 않는다^{3,7,13,37,40}.

CCV는 유럽^{7,34,35}, 미국¹, 오스트레일리아³⁶ 등 세계 여러 나라에 발생되어 개에 피해를 준 바 있다. CCV의 항체양성율에 대해 Helfer-Baker et al¹⁵은 애완견에서 14.8-25%, 그리고 Miller et al²⁷은 26-30%의 분포율을 보고하였고, 일부 사육군에서는 87%에 달하는 경우도 있다고 하였다.

CCV에 감염된 개의 주요 증상은 침울, 식욕부진, 원기부족이 초기에 관찰되고 이어서 갑작스런 구토가 일어날 수 있고, 설사는 10일 이상 지속될 수 있고, 2-3주 후에 설사가 재발할 수도 있다. 변의 색은 황회색으로 혈액과 점액이 섞여 있으며 악취를 낸다. CCV감염증은 성견보다 자견에서 더욱 심한 증상을 나타내며 주요 폐사원인은 심한 탈수와 체중감소에 의한 쇼크와 허탈증이다^{1,20,31,42}, CCV에 기인한 위장염의 임상소견은 연령, 스트레스, 환경, 품종과 canine parvovirus, canine rotavirus, 세균, 기생충 등의 복합감염에 따라 다양한 형태로 나타난다^{1,15}. 위장염 이환견으로부터 바이러스 분리를 시도한 바 CCV는 canine parvovirus(CPV)와 공동감염 빈도가 높았다고 보고하였으며^{4,11}, Appel et al²과 Evermann et al^{11,12}은 CCV와 CPV는 높은 빈도로 중복감염되며 복합감염시 증증을 유발한다고 보고한 바 있다.

CCV와 CPV가 혼합감염되었을 때 CCV는 개의 장

점막표면 특히 소장 of 용모상피세포에 감염하여 세포를 위축 탈락시켜 장염을 유발하며 회복기에는 탈락된 용모상피세포를 보충하기위해 용모 밑부분의 세포들이 왕성하게 증식하여 윗부분으로 자라게 된다. 이때 증식성이 왕성한 세포에 친화성이 높은 CPV가 감염하여 용모상피세포의 괴사와 탈락이 급격히 진행됨으로 증종의 장염으로 발전된다고 보고된 바 있다^{4,11,21}.

동물의 coronaviruses의 숙주특이성과 항원성에 관해 여러 학자들이 연구한 바, 개는 돼지의 coronavirus인 transmissible gastroenteritis virus(TGEV)에 감염될 수 있으나 돼지는 CCV에 감수성이 없다고 보고한 바 있다^{7,23}. 또한 Pedersen et al²⁸, Woods et al⁴⁴과 Barlough et al⁶은 TGEV항혈청은 CCV와 feline infectious peritonitis virus(FIPV)를 중화시키고, FIPV항혈청은 CCV와 TGEV를 중화시키지만, CCV항혈청은 TGEV를 중화시키나 FIPV를 중화시키지 못한다고 보고하였다. 그러나 Hozinek et al¹⁷은 간접형광항체반응, immunoblotting 및 ELISA법을 이용한 교차반응시험에서는 CCV, TGEV 및 FIPV간에 교차반응이 있었다고 보고된 바 있으며 또한 Horsburgh et al¹⁶은 genomic RNA분석에서 CCV는 TGEV와 FIPV에 항원적으로 밀접한 관계가 있다고 보고했다.

한편 Fulker et al¹⁶은 CCV감염증을 예방하기 위해 생독백신과 사독백신을 개발하였으며^{10,43}, 최근에 Tennant et al³⁸이 수행한 CCV감염증의 기병론에 대한 연구를 계기로 하여 CCV의 병인기전 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

국내에서는 1993년 이 등⁴⁵이 최초로 서울, 경기 및 충청지역에 사육중인 241두의 개를 대상으로 CCV에 대한 중화항체 분포실태를 조사한 바, 48.9%가 항체양성임을 보고하였다. 그러나 국내에서는 설사증 이환견으로부터 CCV가 분리 동정된 바 없기 때문에 본 연구에서는 설사증에 이환된 자견의 분변으로부터 CCV의 분리를 시도하여, 분리된 CCV의 세포병원성, 항원성상, 증식성, 물리화학적 성상 및 형태를 구명하고자 일련의 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

분변가검물 : 서울에 위치한 동물병원에 내원한 설사증 이환견 7두에 대해 직장분변을 면봉으로 채취한 후

5ml의 Leibovitz's L-15 medium(L-15, Gibco lab, USA)이 든 스크립캡 시험관에 넣어 실험실로 급속 냉장수송하였다. 이 신선분변재료를 2,000×g 에 20분간 원심 후 상층액을 disposable filter (녹십자의료공업, A 25B, 0.2µm)로 여과하여 얻어진 여액을 -20℃에 저장한 후 공시하였다.

세포배양 및 바이러스 증식 : 바이러스 분리 및 증식을 위하여 고양이 신장세포주인 Crandell feline kidney (CRFK) cell과 canine tumor에서 유래된 A-72 cell (CRL-1542)을 공시하였다. 세포배양액은 L-15 medium에 우태아혈청(Gibco lab, USA)을 시험목적에 따라 2-10%되게 가하고, penicillin(100IU/ml), streptomycin sulfate(100µg/ml), kanamycin(12.5µg/ml) 및 fungizone(1.0µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

American type culture collection(ATCC)로부터 분양받은 표준바이러스 canine coronavirus 1-71(CCV 1-71, VR-809)와, 분리바이러스인 canine coronavirus D 1(CCV D1) 및 canine coronavirus D2(CCV D2)는 A-72 cell에 증식하였고, 그리고 대성미생물연구소(주)로부터 분양받은 canine parvovirus(CPV)는 CRFK cell에서 증식하였으며, infectious canine hepatitis virus (ICHV)는 A-72 cell에 증식시켰다.

항혈청 제조 : A-72 cell에서 증식한 $10^{6.0}$ TCID₅₀/0.1ml의 CCV 1-71, CCV D1, CCV D2와 CRFK cell에서 증식하여 돼지적혈구에 대해 1:1, 024 혈구응집가(HA)를 가진 CPV를 Freund's complete adjuvant (Gibco lab, USA)와 동량 혼합하여 토끼의 발바닥에 접종한 다음 2주 후에 Freund's incomplete adjuvant (Gibco lab, USA)와 동량 혼합한 항원을 배부 피하에 접종하였으며 2주 후에 Freund's complete adjuvant (Gibco lab, USA)와 동량 혼합한 항원을 토끼의 발바닥에 재접종하고 난 후 1주째에 채혈하여 얻어진 혈청을 공시하였다.

분변가검물로 부터 CCV분리 : 한계희석법¹⁶을 응용하여 다음과 같이 수행하였다. 저장중인 분변재료(1.0ml)를 A-72 cell의 monolayer가 형성된 culture flask (Costar, 75cm²)에 접종하여 3-4일간 배양한 후 cytopathic effects(CPE)을 보인 세포를 3회 동결 용해한 다음 2,000×g에 20분간 원심하여 얻은 상층액을 10진 단계 희석한 다음 A-72 cell이 배양된 24-well tissue culture plate(Costar co, USA)에 접종하여 5% CO₂배양기에서 5일간 배양하였다. 이때 CPE를 나타내는 최고 희석배수에 대한 well의 상층액을 채취하여 프라크 채취를 실시하였다. 프라크 채취는 Mochizuki et al²⁸ 및 Tuchiya et al⁴¹의 방법에 준하였다. 즉 A-72 cell의

monolayer가 형성된 60mm petridish에 바이러스 200µl를 접종하고 37℃에서 1시간 흡착하였다. 그후 남은 접종액을 제거하고 L-15 medium에 2% 우태아혈청, 항생제 및 1%의 purified agar(Sigma co, USA)를 가하여 만든 배지를 붓고 굳힌 다음 5% CO₂배양기에서 72-96시간 배양한 후 형성된 plaque를 현미경으로 식별하고 파스터피펫으로 채취하여 A-72 cell이 배양된 culture flask에 접종하여 대량 증식시켰다.

교차증화시험 : Barlough et al⁵과 Mochizuki et al²⁸의 방법을 응용하여 3항에서 기술한 rabbit anti-CCV 1-71, CCV D1 및 CCV D2 혈청 그리고 rabbit anti-CPV 혈청을 56℃에서 30분 동안 비등화한 후 각각의 혈청을 96-well tissue culture palte(Costar co, USA)에서 L-15 medium으로 2진 희석한 다음 200 TCID₅₀/0.1ml역가의 CCV 1-71주, CCV D1와 CCV D2를 각각 동량(50µl)으로 혼합하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 100µl의 A-72 cell($1 \times 10^{5.0}$ cell/ml)를 넣고 5일 동안 CPE를 관찰하여 CPE형성을 저지하는 최종 희석배수의 역수를 중화항체가로 산정하였다.

간접형광항체반응 : Kojima et al²²과 Keenan et al²¹의 방법을 응용하였다. 약술하면, 24-well tissue culture plate(Costar co, USA)에 cover glass를 넣고 1×10^6 /ml 농도의 A-72 cell와 CRFK cell을 넣고 배양하여 단층세포가 형성된 후 100 TCID₅₀/0.1ml역가의 CCV 1-71, CCV D1 및 CCV D2를 가하고 37℃에서 1시간 흡착하였다. 그 다음 여분의 접종액을 제거하고 L-15 medium (2% 우태아혈청)을 넣은 후 약 50%정도의 CPE가 관찰될 때 cover glass를 채취하여 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.0)로 세척한 후 methanol(50)과 acetone(50)혼합액으로 5-10분간 고정한 다음 40, 160 및 640배로 희석된 rabbit anti-CCV 1-71혈청으로 37℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 2차 항체로 goat anti-rabbit IgG FITC-conjugate(Cappel Co, USA)를 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하고 형광현미경으로 검정하였다.

혈구응집시험 : Carmichael et al⁹과 Macartney et al²⁴의 방법을 응용하여 다음과 같이 수행하였다. u-bottomed 96-well microplate (Costar co, USA)을 이용하여 $10^{6.0}$ TCID₅₀/0.1ml의 CCV 1-71, CCV D1, CCV D2 및 돼지적혈구에 대해 1:1,024 HA가 가진 CPV를 50µl씩 넣고 Sprensen buffer(pH6.9)로 2진 단계 희석한 후 0.7%의 적혈구부유액을 동량 가하고 4℃에서 2시간 반응시킨 후 혈구응집능을 관찰하였다.

Electron microscopy : Schnagel et al³⁶의 방법에 준하였다. A-72 cell에 증식된 바이러스를 3회 freeze-thaw-

ing한 다음 5,000×g로 30분 동안 냉장원심하여 cell debris를 제거한 후 상층액을 110,000×g로 60분 동안 초원심하여 얻어진 pellet를 1ml의 PBS에 용해시킨 다음 1% phosphotungstic acid로 negative staining하여 electron microscope(Hitachi 600, Japan)를 이용하여 관찰하고 사진재료로 제작하였다.

바이러스 증식성 조사 : Kojima et al²² 및 Burleson et al¹⁸의 방법을 응용하여 intracellular virus 및 extracellular virus 증식성을 조사하였다. 즉 culture flask(25cm²)에 단층배양된 A-72 cell에 CCV 1-71, CCV D1 및 CCV D 2주를 0.01 moi (multiplication of infectivity)되게 넣고 37℃에서 1시간 동안 잠작 후 PBS로 3번 닦아내고 L-15 medium(2% 우태아혈청)을 10ml씩 가하고 배양하였다. 배양 개시 후 4, 8, 12, 18, 24, 34, 46, 58 및 70시간에 상층액과 세포내에 존재하는 바이러스 역가를 측정하였다. 바이러스 역가는 TCID₅₀로 기술하였다³².

물리화학적 특성검사

1) Nucleic acid type : Hsiung¹⁸과 Martin²⁵의 방법에 준하였다. 즉 5-bromo-2'-deoxyuridine (BUDR)을 L-15 medium에 10⁻⁴µg/ml 되게 가한 후 이 배지로 A-72 cell을 배양하고 CCV 1-71, CCV D1, CCV D2 및 ICHV를 접종하고 5일간 증식시킨 뒤 바이러스 역가를 측정하였다.

2) Heat sensitivity : Evermann et al¹³과 Kai et al²⁰의 방법에 준하였다. 즉 1.0ml의 CCV 1-71, CCV D1 및 CCV D2을 22℃, 37℃ 및 56℃로 조정된 항온수조에서 각각 5시간, 3시간 및 10분씩 처리한 후 A-72 cell에서 바이러스 역가를 측정하였다.

3) Chloroform sensitivity : Binn et al⁷ 및 Martin et al²⁵의 방법을 이용하였다. 즉 1ml의 virus sample를 넣은 시험관에 50µl의 chloroform을 첨가하여 4℃에서 10분간 잘 흔든다음 1,000×g에 20분간 원심하여 얻은 상층액을 A-72 cell에 접종하여 바이러스 역가를 측정하였다.

4) Acid sensitivity : Binn et al⁷과 Martin et al²⁵의 방법을 응용하였다. L-15 medium에 0.2M sodium citrate-citric acid buffer(citric acid 4.2g/100ml, sodium citrate 5.9g/100ml)를 가하여 pH 3.0용액을 만들고 각 용액 20ml에 200µl의 virus sample을 가하고 22℃에서 60분간 반응시킨 후, 0.5M phosphate buffer(Na₂HPO₄ 18/100ml, KH₂PO₄ 6.8g/100ml)를 가하여 배지의 pH를 7.2로 다시 조정한 다음 A-72 cell에 접종하여 바이러스 역가를 측정하였다.

바이러스 분리 : 서울지역에 위치한 동물병원에 내원한 설사증 이환견 7두의 분변가검물에 대해 CCV의 분리를 시도한 바, 7건 중 2건은 A-72 cell에서 CCV의 전형적인 CPE를 나타냈으며(Fig 1), 나머지 5건은 CPE음성이었다. 또한 세포 배양액 중 1건은 돼지적혈구에 대해 혈구응집음이 인정되었으나 추가적인 동정은 하지 않았다(Table 1). CPE는 가검재료 접종 후 2-3일에 나타났으며 주요소견으로는 rounding-up, branching, arboreal syncytial formation 및 세포탈락이 관찰되었다. CPE 출현시간은 A-72 cell에서 계대회수가 10대 이하일 때 30-40시간, 10대 이상일 때 20-30시간으로 계대 회수가 높아질수록 CPE형성에 소요되는 시간이 짧아졌다. 분리주는 표준 CCV 1-71 양성 혈청으로 중화시켰을 때 CPE는 출현하지 않았다. 분리주는 CCV D1과 CCV D2로 명명하였다.

교차혈청반응시험 : 분리주 CCV D1 및 CCV D2주의 항원 성상을 혈청학적으로 구명하기 위해 토끼에 고도면역시켜 제조한 rabbit anti-CCV 1-71, CCV D1, CCV D2 및 CPV 혈청에 대해 CCV 1-71, CCV D1, CCV D2의 교차중화능력을 시험한 바 Table 2와 같은 결과를 얻었다. Rabbit anti-CCV 1-71 혈청에서 CCV 1-71은 128 그리고 CCV D1 및 CCV D2는 공히 중화가가 64이었으며, rabbit anti-CCV D1 혈청에서 CCV D1과 CCV 1-71은 512, CCV D2는 32의 중화항체가 나타났으며, rabbit anti-CCV D2 혈청에서는 CCV D2는 128, CCV 1-71, CCV D1은 공히 64를 나타냈으며, rabbit anti-CPV 혈청에 대해서는 공시한 CCV 모두가 음성이었고 표준 CPV와는 2,048의 혈구응집억제가를 나타내었다.

Table 1. Cytopathology of the cultured cells inoculated with the fecal specimens and haemagglutination test

Specimen No	Symptoms	Cytopathic effects	Haemagglutination ^{* *}
1	Bloody diarrhea	-	+
2	Diarrhea	-	-
3	Diarrhea	+ [*]	-
4	Diarrhea	-	-
5	Mild diarrhea	-	-
6	Diarrhea	-	-
7	Diarrhea, Vomiting	+	-

* Major changes in A-72 cells : rounding-up, branching and arboreal syncytia.

** The culture fluids were tested with porcine erythrocyte.

결 과

Table 2. Cross serum neutralization test of CCV isolates, and the reference viruses

Antisera	Antigens			
	CCV 1-71	CCV D1	CCV D2	CPV
CCV 1-71	128	64	64	N
CCV D1	512	512	32	N
CCV D2	64	64	128	N
CPV	N	N	N	NT

N : negative(<2)

NT : not tested

Table 3. Indirect immunofluorescence test with CCV 1-71, CCV D1, CCV D2 and CPV against CCV 1-71 rabbit antiserum

Antiserum	Viruses infected in the cultured cells			
	CCV 1-71	CCV D1	CCV D2	CPV
40	+	+	+	-
CCV 1-71 160	+	+	+	-
640	+	-	-	-

+ : positive fluorescence, - : negative fluorescence

Table 4. Haemagglutinating activity of CCV isolates and reference CCV 1-71 and CPV to various mammalian erythrocytes*

Species	CCV D1	CCV D2	CCV1-71	CPV
Porcine	-	-	-	1,024
Human	-	-	-	-
Horse	-	-	-	32
Sheep	-	-	-	8
Goat	-	-	-	-
Canine	-	-	-	-
Mouse	-	-	-	-
Guinea pig	-	-	-	-
Chicken	-	-	-	-
Rabbit	-	-	-	-
Rat	-	-	-	-

* Haemagglutinating activity was determined at 4°C for 2hrs.

CCV = canine coronavirus

CPV = canine parvovirus

간접형광항체시험 : 회석한 rabbit anti-CCV 1-71 항혈청을 이용하여 A-72 cell에 감염된 CCV 1-71, CCV D1, CCV D2 및 CPV에 대해 교차간접형광항체 시험을 실시한 바, CCV 1-71은 640배의 항혈청, CCV D1과 CCV D2는 각각 160배의 항혈청과 양성반응을 보

였고, 그리고 CPV에서는 음성이었다. 전 예에서 특이 형광은 세포질내에만 관찰되었다(Fig 2).

혈구응집능 시험 : 분리바이러스의 각종 동물적혈구에 대한 혈구응집능을 확인하기 위해 돼지, 사람, 말, 면양, 염소, 개, 마우스, 기니픽, 닭, 토끼 및 랫트의 적혈구와 혈구응집시험을 실시한 바, Table 4에 나타난 바와 같이 CPV는 돼지, 말, 면양의 적혈구에서 각각 1,024, 32 및 8의 혈구응집가를 보였으나, CCV 1-71, CCV D1, CCV D2는 전 예에서 혈구응집능이 인정되지 않았다.

Electron microscopy : 120,000 배율에서 관찰된 바이러스입자는 불규칙한 구형 또는 타원형으로 직경이 70-150nm로 다형태형성을 나타냈으며 virus envelope 주변에 club-shaped projection이 관찰되었다(Fig 3).

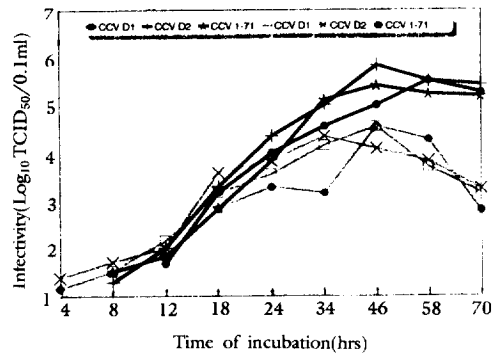


Fig 4. One-step growth curve of CCV isolates and reference canine coronavirus, CCV 1-71, in A-72 cell culture.

바이러스 증식성 조사 : A-72 cell에서 6대 계대한 CCV D1과 CCV D2에 대한 A-72 cell에 대한 증식능을 조사한 바 Fig 4와 같았다. 즉 extracellular virus는 CCV D1에서는 접종 후 8시간에는 바이러스 역가상승이 인정되지 않고, 12시간에 $10^{1.7}$ TCID₅₀/0.1ml의 역가를 나타냈다. CCV D2와 CCV 1-71에서는 접종 후 8시간에 역가가 상승하여 각각 $10^{1.3}$ TCID₅₀/0.1ml과 $10^{1.5}$ TCID₅₀/0.1ml로 나타났으며, 최고치는 CCV D1은 58시간에 $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1ml, 그리고 CCV D2와 CCV 1-71은 접종 후 46시간에 각각 $10^{5.8}$ TCID₅₀/0.1ml과 $10^{5.4}$ TCID₅₀/0.1ml로 나타났다. Intracellular virus는 CCV 1-71을 제외하고는 46시간까지 extracellular virus와 유사하게 증가하였으며, 46시간에는 CCV 1-71과 CCV D1은 각각 $10^{4.6}$ TCID₅₀/0.1ml 및 $10^{4.6}$ TCID₅₀/0.1ml에 달하였으며, CCV D2는 34시간에 $10^{4.4}$ TCID₅₀/0.1ml으로 최고 역가에 달했다.

물리화학적 특성검사

1) Nucleic acid type : DNA합성저해 물질인 5-bromo-2'-deoxyuridine(BUDR)을 처리했을 때, CCV 1-71과 CCV D1 및 CCV D2는 대조군에 비해 역가에 유의한 변동이 없었다. 그러나 DNA 바이러스인 canine infectious hepatitis virus(ICHV)는 대조군($10^{4.0}$ TCID₅₀/0.1ml)에 비해 역가가 현저히 저하되었다 (Table 5).

2) Heat sensitivity : 열처리 시험에서 CCV 1-71주와 CCV D1 및 CCV D2는 22℃에서 5시간 처리시 바이러스 역가의 변동이 대조군과 유의한 차이가 인정되지 않았으나, 37℃에서 3시간 처리시 CCV D1은 $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1ml에서 $10^{4.6}$ TCID₅₀/0.1ml으로 CCV D2는 $10^{5.8}$ TCID₅₀/0.1ml에서 $10^{4.7}$ TCID₅₀/0.1ml으로 약간의 역가손실이 인정되었고, 56℃에서 10분간 처리시는 $10^{1.0}$ TCID₅₀/0.1ml 이하의 역가를 나타내었다(Table 6).

Table 5. 5-bromo-2'-deoxyuridine sensitivity of CCV isolates and reference canine coronavirus, CCV 1-71

Viruses	BUDR	Control
ICHV	< 1.0	4.0*
CCV 1-71	5.4	5.5
CCV D1	5.7	5.7
CCV D2	5.8	5.7

* Numbers represent the titer of Log TCID₅₀/0.1ml
 ICHV = infectious canine hepatitis virus
 CCV = canine coronavirus

Table 6. Physicochemical properties of CCV isolates and reference canine coronavirus, CCV 1-71

Treatment	Virus titers*		
	CCV D1	CCV D2	CCV 1-71
Heat sensitivity			
22℃ 5 hours	5.4	5.6	5.4
37℃ 3 hours	4.6	4.7	4.3
56℃ 10 min	< 1.0	< 1.0	< 1.0
Control	5.5	5.8	5.5
pH sensitivity			
pH 7.2 22℃ 60 min	5.6	5.8	5.4
pH 3.0 22℃ 60 min	5.2	5.3	4.8
5% Chloroform sensitivity			
4℃ 10 min	< 1.0	< 1.0	< 1.0
Control	5.7	5.7	5.4

* Numbers represent the titers of Log TCID₅₀/0.1ml.

3) Chloroform 및 acid sensitivity : 5% chloroform에서 10분간 처리시 CCV 1-71과 분리주 CCV D1 및 CCV D2는 현저한 역가 감소가 있어 chloroform 처리 후 $10^{1.0}$ TCID₅₀/0.1ml 이하로 나타났다(Table 6). 분리주 CCV D1과 CCV D2 그리고 참조 CCV 1-71은 pH 7.2 및 pH 3.0에서 60분간 처리한 바, 역가 변동이 인정되지 않았다(Table 6).

고 찰

Canine coronavirus(CCV)는 1974년 Binn et al⁷이 장염에 이환된 개에서 처음 분리 보고한 바 있으며, 그 후 CCV감염증은 세계 각국에서 발생되어 개에서 많은 피해를 주고 있다. CCV감염증의 주요 임상조건은 장염에 의한 설사와 구토 증세이며, 역학적 및 임상적 유형이 canine parvovirus와 매우 유사하며 두 질병에 대한 비교연구가 여러 학자들에 의해 수행된 바 있다^{4, 11, 12}. 병인기전 상 CPV는 lymphatic tissue와 cryptic cell과 같이 분열이 왕성한 세포에서 잘 증식하며 CCV는 소장 용모상피세포에 감염하여 장염을 일으키는 차이가 있다⁸. 그러나 임상가들은 CPV가 CCV보다 병원성과 전파율이 높기 때문에 대개 CCV감염증을 CPV감염증으로 오진하는 경우가 추정된다. 국내에서는 4-5년전부터 기존 CPV감염증과 유형이 다른 장염이 유행한다는 사실이 지적된 바 있었고, 1993년 이 등⁴⁵이 서울, 경기, 충청지역에 위치한 동물병원에 내원한 개를 대상으로 CCV 항체 분포조사를 실시하여 48.9%의 항체양성을 보고하고, 국내에서도 CCV가 광범위하게 분포되어 있을 가능성이 있음을 시사하였다. 이와 관련하여 국내 CCV감염증의 원인체를 분리하여 성상을 구명하고 본 병 진단과 예방에 관한 기초자료를 얻고자 본 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 서울지역에 위치한 동물병원에 내원한 설사증 이환견 7두의 설사분변 중 2두가 A-72 cell에서 CCV의 전형적인 CPE를 나타내었고, 분리된 2주에 대해 세포병원성, 항원성상, 물리화학적 성상에 대해 일련의 시험을 수행하였다.

분변 가검재료로 부터 CCV의 분리율은 다양하게 보고된 바 있다. 즉 Schnagel et al³⁶은 41.3%, Rosetto et al³⁵은 12.5%을, 그리고 Evermann et al¹¹은 1983-1986사이에 미국의 Missouri지역에서 24%, Washington지역에서 35%, Tennessee에서 23% 그리고 Canada의 British Columbia에서 40%라고 보고했다. 본 연구에서는 대상으로 한 분변가검재료의 수가 적어서 외

국의 성적과 직접 비교는 곤란하지만 7건 중 2건에서 CCV가 분리되어 28.6%의 분리율을 보여 국내 장염 이환결에서도 CCV의 감염율이 높고 이로 인한 피해를 클 것이라 사료된다.

한계회석법과 plaque 분리법을 이용한 CCV D1과 CCV D2주의 항원성과 다른 바이러스 혼입여부를 확인하기 위해 표준 CCV 1-71, 표준 CPV 및 분리주를 토끼에 고도면역시켜 항혈청을 제조하고 교차중화시험, 혈구응집반응 및 간접형광항체법을 실시하였다. 그 결과 CCV D1은 CCV 1-71과 CCV D2와 교차반응을 하고 CCV D2는 CCV 1-71과 CCV D1과 교차반응을 하여 분리주들간에 공통항원성이 인정되었다. 또한 분리주의 항혈청이 CPV와 교차반응을 전혀 나타내지 않은 사실은 분리주내에 CPV가 혼재해 있지 않다는 것을 입증하는 것이라 사료되었다.

CCV 감염세포에 대한 교차간접형광항체 시험결과 (Fig 1), Kojima et al²² 과 Keenan et al²¹이 보고한 바와 같이 분리주는 표준주와 같이 증식이 주로 세포질내에서 이루어짐을 알 수 있으며 아울러 CPV 토끼 항혈청과는 음성이고 CCV 1-71 토끼 항혈청과 특이하게 반응함을 알 수 있었다. 이상의 교차중화시험 및 간접형광항체시험 결과 분리주는 혈청학적으로 CCV임을 확인할 수 있었다.

Sidell et al³⁷은 Coronaviridae을 항원성상에 따라 4 Groups으로 분류했으며, Group 1에는 CCV, FIPV, feline enteric coronavirus(FECV), TGEV, human respiratory coronavirus(HCV 229E), Group 2에는 HCV OC43, mouse hepatitis coronavirus(MHV), rabbit coronavirus(RCV), bovine coronavirus(BCV), porcine hemagglutinating encephalomyelitis(HEV), Group 3에는 avian infectious bronchitis(IVB), 그리고 Group 4에 turkey coronavirus(TCV)가 속한다고 기술하였고, McIntoch et al²⁶은 4 group 중 group 1에 속하는 바이러스들은 혈구응집소인 E3가 결핍되어 혈구응집을 일으키지 못한다고 기술하였다. 본 연구에서 분리주의 혈구응집능을 시험한 바 표준바이러스인 CCV 1-71과 분리 바이러스인 CCV D1과 CCV D2는 공시한 11종의 동물 적혈구와 혈구응집을 일으키지 않아 CCV는 혈구 응집능이 없다고 한 연구자들의 성적과 일치하였다.

Schnagel 및 Holmes³⁶은 분변에서 분리한 CCV의 모양이 다양하지만 구형에 가까우며 크기는 80-250nm이고 바이러스 입자의 주변에 표면돌기를 가진다고 보고하였다. 본 시험에서 바이러스입자는 다형태성이지만 구형에 가까우며, 크기는 70-150nm이고 주변에 표면

돌기를 가지고 있는 coronavirus-like particle로 인정되었다(Fig 3).

Pensaert et al³⁰은 TEGV를 primary pig kidney cell에 접종해서 one-step growth curve를 측정할 바 6시간의 잠복기를 나타냈다고 보고하였고, Sturmman과 Takemoto³⁸는 MCV를 transformed murine cell에 증식시 6시간의 잠복기를 가진다고 기술하였다. 본 시험에서 A-72 cell에 감염시킨 CCV D1은 8시간에 CCV 1-71과 CCV D2는 12시간에 역가상승을 나타냈다. 또한 Kojima et al²²은 CRFK cell에 50 TCID₅₀/cell과 1 TCID₅₀/cell을 접종하여 24시간과 48시간에 최고역가인 10^{4.2} TCID₅₀/0.1ml와 10^{5.3} TCID₅₀/0.1ml 였다고 보고하였다. 본 시험에서 A-72 cell에서 0.01moi을 접종하여 CCV D1과 CCV D2에서 각각 58시간에 10^{5.5} TCID₅₀/0.1ml과 46시간에 10^{5.8} TCID₅₀/0.1ml의 역가를 나타내어 Kojima 등²²의 일본주와 증식성에 유의한 차이가 인정되지 않았다(Fig 4).

물리화학적 특성감사에서 Binn et al⁷ 및 Evermann et al¹⁵은 CCV는 pH 3.0의 실온에서 3시간 처리시 안정하며 DNA합성저해 물질인 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUDR)에 안정하지만 chloroform에는 바이러스 감염력이 현저히 감소한다고 보고하였고, Timoney et al⁴⁰은 coronavirus는 ether와 chloroform에 감수성이 있으며 56℃에서 빠르게 불활화된다고 보고하였다. 본 시험에서 CCV 1-71과 CCV D1, CCV D2는 BU DR을 처리했을 때 증식능이 대조군에 비해 유의한 변동이 인정되지 않았으나, 지질용매인 chloroform을 처리했을 때 CCV 1-71, CCV D1 및 CCV D2는 공히 감염가가 현저히 감소하여 envelope를 소유한 바이러스입이 입증되었다. 열처리 시험에서 22℃, 5시간 처리에는 안정하였으나, 37℃, 3시간 처리에는 불안정하여 역가 손실이 입증되었으며, 56℃, 10분에서는 감염력이 완전히 소실하여 CCV는 열에 불안전함이 입증되었다. 또한 분리주는 pH 3.0에서 역가 손실이 없고 안정하여 선인들이 보고한 성적과 일치하였다.

이상의 실험결과와 분리주 CCV D1과 CCV D2는 전형적인 CCV의 특성의 가진 것으로 확인되었으며, 국내 사육견에서 발생하는 장염의 원인체 중 CCV가 중요한 역할을 한다는 사실이 입증되었다. CCV의 특성상 국내 사육견에서 CCV 감염증에 기인한 피해가 증가할 가능성이 높기 때문에 분리주를 이용한 진단법과 백신의 개발에 대한 연구가 수행되어야 한다고 사료된다.

결 론

설사증에 이환된 자견의 분변으로부터 canine coronavirus(CCV)의 분리를 시도하여 2주의 CCV를 분리하였고, 분리한 CCV의 세포병원성, 항원성상, 증식성, 물리화학적 성상 및 형태를 구명하고자 일련의 시험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 7두의 설사증 이환견으로부터 수집한 분변가검물로부터 세포병원성상이 CCV와 일치하는 CCV D1과 CCV D2주를 분리하였다.

2. 표준 CCV 1-71주와 항혈청을 이용한 교차중화시험 및 간접형광항체시험 결과 분리주 CCV D1과 CCV D2는 CCV 1-71과 항원성이 차이가 없었고, 형광항체반응에서 분리주는 A-72 cell의 세포질에서만 증식함을 확인하였다.

3. 분리주 CCV D1 및 CCV D2의 11종의 동물적혈

구에 대한 혈구응집능을 시험한 바 각종 동물적혈구에 대한 혈구응집능이 인정되지 않았다.

4. 전자현미경검사에서 바이러스입자는 70-150nm의 크기의 구형에 가까운 다형태성을 나타내었고 표면에는 club-shaped projection이 관찰되었다.

5. CCV D1과 CCV D2의 증식능을 A-72 cell에서 측정한 바 intracellular virus는 접종 후 46시간과 34시간에 최고에 달하여 $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1ml과 $10^{4.4}$ TCID₅₀/0.1ml로 나타났으며, extracellular virus는 접종 후 58시간과 46시간에 최고에 달하여 $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1ml과 $10^{5.8}$ TCID₅₀/0.1ml의 역가를 보였다.

6. 물리화학적 성상검사에서 분리주는 chloroform처리시 불안정하였으며, pH 3.0 · 1시간 및 22℃·5시간 처리에 안정하였다. 그러나 37℃·3시간 처리시 역가가 다소 소실되었고 56℃·10분에 감염력은 완전히 소실하였으며, RNA 핵산을 가진 바이러스입이 입증되었다.

Legends for figures

Fig 1. Cytopathic effects of the canine coronavirus isolates in A-72 cell cultures at 20 hrs postinoculation.

A : Uninfected cell monolayer : B : Rounding-up, branchial syncytial formation and detachment of monolayer after infection with CCV isolates. × 100.

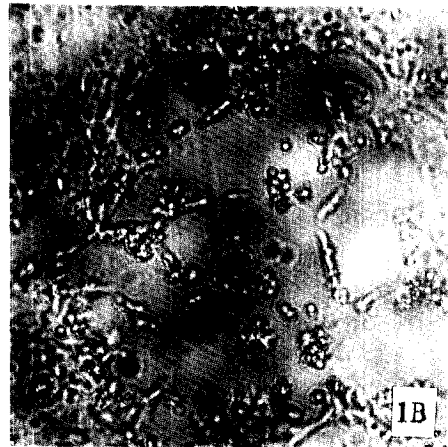
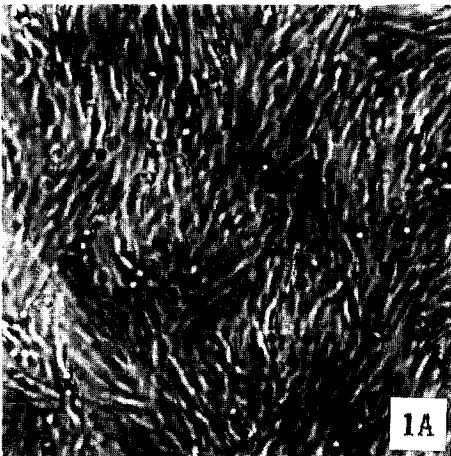
Fig 2. Immunofluorescent patterns of A-72 cells infected with a CCV isolate.

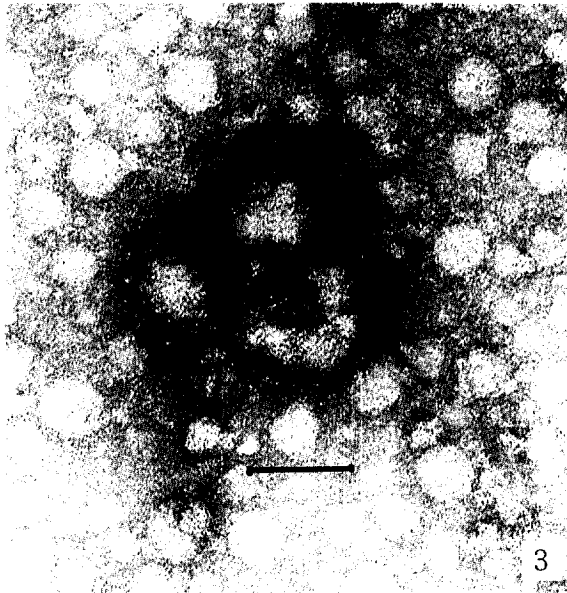
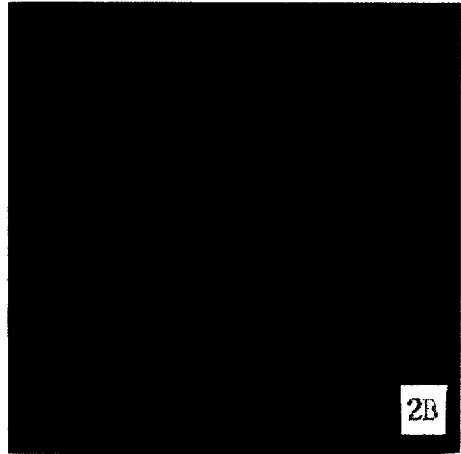
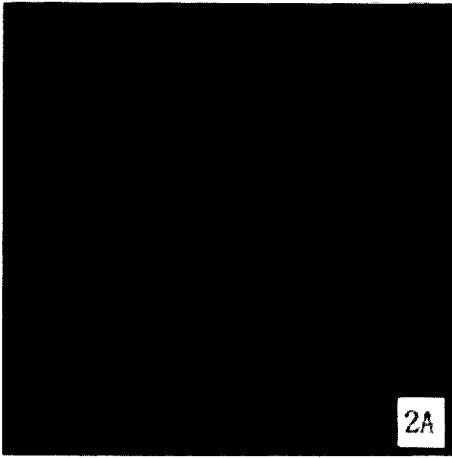
A : Infected cells at 48 hrs, ×200. B : Uninfected control × 200.

CCV-infected A-72 cells were reacted with rabbit anti-CCV 1-71 serum and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG. Specific fluorescence was detected only in cytoplasm.

Fig 3. Three CCV-like particles showing spherical and pleomorphic features, accompanied with club-shaped projection on the surface were seen. CCV D1 particles in the culture was concentrated with ultracentrifugation and negatively stained with phosphotungstic acid. ×120,000.

Bar represents 100nm.





참 고 문 헌

1. Appel MJG, Cooper BJ, Greisen H, et al. Status report : canine viral enteritis. *JAVMA* 1978; 173(11): 1516-1518.
2. Appel MJ, Cooper BJ, Greisen H, et al. Canine viral enteritis 1 : Status report on corona and parvovirus like Viral enteritis. *Cornell Vet* 1979; 69(3): 122-123.
3. Appel MJG. Canine coronavirus. In: Appel MJ, ed. *Virus disease of carnivores* Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987; 115-122.
4. Appel MJG. Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection?. *Vet Med* 1988; 360-366.
5. Barlough JE, Jacobson RH, Scott FW. Macrotiter assay for coronavirus-neutralizing activity in cats using a canine continuous cell line (A-72). *Lab Anim Sci* 1983; 33(6): 567-570.
6. Barlough JE, Stoddart CA, Sorresso GP, et al. Experimental inoculation of cats with canine coronavirus and subsequent challenge with feline infectious peritonitis virus. *Lab Anim Sci* 1984; 34(6): 592-366.
7. Binn LN, Eddy GA, Lazar EC, Keenan KP, et al.

- Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. In *proceedings*, 78th Ann. meeting. US Anim Health Assoc, ranoke, Va. 1974(1975); 359-366.
8. Burleson FG, Chambers TH, Wiedbrank DL. Viral replication a ; one-step growth curve. : *Virology ; A laboratory manual*New York : Academic Press, 1992; 100-106.
 9. Carmichael LE, Jubert JC, Pollock RVH. Haemagglutination by canine parvovirus; Serologic study and diagnostic application. *Am J Vet Res* 1980; 4(5): 784-791.
 10. Edwards BG, Fulker RH, Acree WM. Evaluating a canine coronavirus vaccine through antigen extinction and challenge studies. *Vet Med* 1985; 29-33.
 11. Evermann JF, Eugster AK, Solozano RF, et al. Update on canine coronavirus infections and interactions with other enteric pathogens of the dog. *Comp Anim Pract Med* 1979; 19(2): 6-12.
 12. Evermann JF, Foreyt W, Maag-Miller, et al. Acute hemorrhagic enteritis associated with canine coronavirus and parvovirus infection in coyote population. *JAVMA* 1980; 177(9): 784-786.
 13. Evermann JF, Baumgartenger L, Ott RL, et al. Characterization of a feline infectious peritonitis virus isolate. *Vet Pathol* 1981; 18: 256-265.
 14. Fulker RH, Edwards BG, Acree WM, et al. Safty studies on a killed canine coronavirus vaccine administered simultaneously with modified live viral antigen vaccine. *canine Pract* 1986; 13(1): 18-27.
 15. Helfer-Backer C, Evermann IF, Mckeirnan AI, et al. Serologic studies on the incidence of canine enteritis viruses. *Canine Pract* 1980; 7(3): 37-42.
 16. Horsburgh BC, Brierley I, David T, et al. Analisis of a 9.6 kb sequence from the 3' end of canine coronavirus genomic RNA. *J Gen Virol* 1992; 73: 2849-2862.
 17. Horzinek MC, Lutz H, Pedersen NC. Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline, and canine coronaviruses. *Infect Immuni* 1982; 37: 1148 -1155.
 18. Hsiung GD. Diagnostic virology. Hsiung, G.S. 3rd ed: *Yale Univ Press* 1982; 17.
 19. Jolik WK. The nature, isolation and measurement of animal virus. *Principles of animal virology*. New York : Appleton-century-crofos, 1980; 3.
 20. Kai K, Kaneda Y, Goto N, et al. Isolation and charcterization of a new and high titers strain of FIPV. *Jpn J Vet Sci* 1987; 49(6): 1105-1111.
 21. Keenan KP, Jervis HR, Marchiwicki RH, et al. Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus. Studies by virologic, histologic, histochemical and immunoflorescent techniques. *Am J Vet Res* 1976; 37: 247-256.
 22. Kojima A, Takada H, Okaniwa A. Multiplication of CCV in CRFK cells. *Jpn J Vet Sci* 1986; 48(6): 1063-1070.
 23. Larson OJ, Morehouse LG. Transmissible gastroenteritis in neonatal dogs; experimental intestinal infection with transmissible gastroenteritis virus. *Am J Vet Res* 1979; 40: 477-486.
 24. Macartney L, McCandlish AP, Thompson H, et al. Canine parvovirus enteritis 2 : pathogenesis. *Vet Rec* 1984; 115: 453-460.
 25. Martin HT. Technical methods for the isolation and identification of mammalian, poultry and fish viruses of veterinary interest. *Veterinary center* 1980; 34-35.
 26. McIntoch K. Coronaviruses. Knipe DM, Feilds BN, ed. *Virology*. 2th ed , New York : Raven Press 1990; 857-863.
 27. Miller J, Evermann J, Ott R. Immunoflorescence tests for canine coronavirus and parvovirus. *West Vet* 1980; 18: 14-19.
 28. Mochizuki M, Sugiura R, Akuzawa M. Micro-neutralization test with canine coronavirus for detection of coronavirus antibodies in dogs and cats. *Jpn A Vet Sci* 1987; 49(3): 543-565.
 29. Pedersen NC, Ward J, Mengeling WL. Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species. *Arch Virol* 1978; 58: 45-53.
 30. Pensaert MB, Burnstein T, Haelterman EO. Cell culture-adapted SH strain of transmissible gastroenteritis virus of pigs : in vivo and in vitro studies. *Am J Vet Res* 1970; 31(4): 771-783.
 31. Pollock RVH, Carmichael LE. Canine viral interi-

- tis: Recent developments. *Mod Vet Prac* 1979; 60: 375-380.
32. Pollock RVH, Carmichael LB. Canine viral enteritis. Mills LE, ed. *Infectious disease of the dog and cat*. Philadelphia : W.B. Saunders, 1990; 268-273.
 33. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-497.
 34. Rimmelzwann GF, Groen J, Egvering H, et al. The use of enzyme-linked immunosorbent assay system for serology and antigen detection in parvovirus, coronavirus and rotavirus infections in dogs in the Netherlands. *Vet Microbiol* 1991; 26: 25-40.
 35. Roseto A, Lema F, Cavalieri F, et al. Electron microscopy detection and characterization of viral particle in dogs stool. *Arch Virol* 1980; 66: 89-93.
 36. Schnagel RD, Holmes IH. Coronavirus-like particle in stools from dogs, from some country areas of Australia. *Vet Res* 1978; 102: 528-529.
 37. Siddell S, Wege H, Meulen VT. The biology of coronavirus : review article. *J Gen Virol* 1983; 64: 761-776.
 38. Sturmann LS, Takemoto. : Enhanced growth of a murine coronavirus in transformed mouse cells. *Infect Immun* 1973; 6: 501-507.
 39. Tennant BJ, Gaskell RM, Kelly DF, et al. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res Vet Sci* 1991; 51: 11-18.
 40. Timoney JF, Gillispis JF. The coronavirus. timoney JF, Gillispis JF, Scotte FW, et al ed. *Hagan and Brunner's Microbiology and infectious disease of domestic animals*. 8th ed. Ithaca and London : Comstock Pub Ass 1988; 115-122.
 41. uchiya K, Kasaoka T, Azetaka M, et al. Plaque assay for canine coronavirus in CRFK cells. *Jpn J Vet Sci* 1987; 49(3): 571-573.
 42. Vandenberghe J, Ducatelle R, Debouch P. Coronavirus infection in a litter of pups. *Vet Quart* 1980; 2(3): 136-141.
 43. Wilson RB, Holladay JA, Cave JS. A neurologic syndrome associated with use of a canine coronavirus-parvovirus vaccine in dogs. 1986; 8(2): 117-124.
 44. Woods RD. Studies of enteric coronaviruses in a feline cell line. *Vet microbial* 1982; 7: 427-435.
 45. 이병형, 전무형, 허원. 국내사육견에 대한 canine coronavirus 항체분포조사. 한국수의공중보건학회지 1993; 17(3): 295-300.