

Dexamethasone 전처리후 *Listeria monocytogenes*를 인공감염시킨 랫드의 조직절편내 균체항원 동정

서 정 향·김 순 복
경상대학교 수의학과
(1991. 8. 23 접수)

Immunohistochemical identification of *Listeria monocytogenes* antigen in tissue sections of experimentally infected rats after pretreatment with dexamethasone

Jung-hyang Sur, Soon-bok Kim
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
(Received Aug 23, 1991)

Abstract : *Listeria monocytogenes* antigens were detected with the avidinbiotinperoxidase complex(ABPC) method in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from experimentally infected rats, mice and guinea pigs.

The anti-*Listeria monocytogenes* serum used as first antibody was prepared by immunizing rabbits with *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a.

Rats, mice and guinea pigs that had been given inoculation of *L. monocytogenes*(serotype 4b, Scott A strain) via intraperitoneally allotted to 3 groups.

Rats were pretreated with the dexamethasone(DM-rats) for 7 consecutive days, mice and guinea pigs were inoculated intraperitoneally with *L. monocytogenes*.

At necropsy white necrotic foci of the liver, spleen and kidney were seen in mice and DM-rats, whereas not in guinea pigs.

Organisms stained by the ABPC method were identified as pleomorphic dark brown staining structures in the livers, spleens and kidneys of mice and DM-rats. They were present in high numbers in center and peripheral regions of necrobiotic and necrotic foci of the liver and spleen as well as in glomerulus of the renal cortex. and liable tool for confirmative diagnosis of these bacterial diseases.

Key words : avidin-biotin complex. *L. monocytogenes*. immunohistochemical diagnosis

서 론

*L. monocytogenes*는 동물 및 사람에서 리스테리아병을 일으키는 원인균으로서 1962년 Murray 등이 토끼와 기니픽에서 발생을 처음 보고한¹ 이래 면양, 산양, 소, 말, 돼지, 개, 고양이, 사람 등에서 유산, 패혈증 또는 화농성 뇌염의 증후를 나타내는 급성 감염병으로 전세계적인 발생을 보이고 있다.²

국내에서는 1986년 경상대학교 부속농장에서 사육중이던 재래산양에서 처음 보고되었으며³ 우유나 유제품을 통한 사람에 감염 가능성이 있어 인수공통전염병으로서도 중요하다고 하겠다.^{4~6}

리스테리아병은 준임상형, 무증후성 및 만성보균자형으로 다양하게 나타나며 가축에서 이 질병은 수막뇌염, 유산을 수반하는 자궁질환 및 패혈증의 3가지 유형으로 구분되는데² 뇌염이나 유산을 일으키는 다른 유사한 질

병들과의 임상병리학적 감별이 쉽지 않으며, 원인균의 분리동정 또한 많은 시일을 요할 뿐만 아니라 흔히 다른 질병으로 오인하여 시료 채취나 배지선택의 잘못으로 균 분리에 실패하는 예가 많다.

1970년 Sternberger 등⁷은 Spirochetes속 *Treponema pallidum*을 슬라이드에 도말하여 peroxidase-antiperoxidase(P-AP)법을 이용한 세균성항원 증명에 성공한 이래, 세균성⁸⁻¹⁸ 및 바이러스성 질병의¹⁹⁻²⁵ 진단을 위한 면역조직화학적 진단법의 개발이 최근 활발하게 이루어지고 있다.

본 실험은 리스테리아병의 면역조직화학적 진단법을 개발하기 위하여 마우스, 기니픽 및 dexamethasone(DM)을 처리하여 면역기능을 저하시킨^{6, 17, 26-29} 랫드에 *L. monocytogenes* 균액을 인공집종하고 이들 각종 장기의 파라핀 포매 조직절편내에서 avidin-biotin-peroxidase complex(ABPC)를 이용한 균체항원동정을 시도하였다.

재료 및 방법

공시균주 : 경상대학교 수의공중보건학교실로부터 분양받은 *Listeria monocytogenes* Scott A se-4b(Canada Health and Welfare)를 0.6% yeast extract가 첨가된 tryptic soy broth(Difco) 5ml에 접종하여 35°C에서 24시간동안 2회 증균배양^{4, 8} 하였으며 그 부유액을 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 2회 원심세척한후 멸균된 0.85% 생리식염수에 부유시켜 집종균액으로 사용하였다.

실험동물 및 접종방법

랫드 : A, B, C의 3개군으로 각각 구분한 뒤 체중 g 당 DM 0.05mg을 매일 1회씩 1주간 복용주사하여 면역기능을 저하시킨 A군과 무처리 건강 B군으로 각각 10수씩 구분배치하고, 3~8주령에는 집종균액을 0.5ml(2×10^6 cells/ml), 12주령 이상된 랫드에는 1ml씩 각각 복용주사하였다. C군 4수는 0.85% 멸균생리식염수 1ml씩을 복용주사하여 대조군으로서 관찰하였다.

마우스 : 1~2개월령의 건강한 마우스 20수에 2×10^6 *L. monocytogenes* se-4b 집종균액 0.5ml씩 복용주사 하였다.

기니픽 : 2~3개월령의 건강한 기니픽 8두에 집종균액 2×10^8 *L. monocytogenes* 1ml씩을 복용 및 점안접종하였다.

조직절편제작 및 일반염색 : 폐사직후의 랫드와 마우스로부터 절취한 뇌, 폐장, 심장, 비장, 간장, 소장, 신장 및 장간막 임파절을 10% 중성포르마린에 12~24시간 고정시킨 뒤 병리조직학적 소견을 관찰하기 위하여 일반적인 방법에 따라 용해점 56°C인 parplast에 포매하여 3~6μm 두께로 연속절편하여 hematoxylin & eosin(H & E)와 gram염색을 실시하였다.

ABPC 면역염색^{9, 16, 24, 25, 30-34} : 전술한 일반염색에서 균

체가 확인된 슬라이드의 연속절편을 먼저 탈파라핀하여 tris-buffer saline(TBS; pH 7.6)에 수세후 3% 과산화수소 증류수용액에 5분간 전처리 하였으며 TBS에 5분간 2회에 걸쳐 수세한 뒤 비특이 배경염색을 줄이기 위해서 1:5로 희석한 정상산양혈청(Dakopatts)으로 20분간 wet chamber 내에서 전처리 하였다.

1차항체는 스페인 Barcelona 대학의 Domingo 박사로부터 분양받은 토끼항 *L. monocytogenes* se-1/2a 혈청을 TBS에 1:1000~1:3000으로 희석하여 60분간 반응시킨 후 5분간 3회 TBS로 수세하였다. 그리고 2차 항체로서 biotinylated 항토끼 IgG(Vector Lab)를 TBS로 1:160으로 희석하여 30분간 반응시킨후 5분간 3회 수세하였다. 이어서 3차 항체로서 VECTASTAIN ABC reagent(Vector Lab)를 TBS로 희석하여 30분간 반응시킨 다음 5분간 3회 수세후, 0.5% 과산화수소 TBS(0.05M/L, pH 7.6)용액에 0.005% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma)를 희석하여 5~15분간 발색시켰으며 이때 광학현미경으로 관찰하면서 적당한 발색 정도를 선택하여 슬라이드를 수세하였고 일부는 헤마톡실린으로 대조염색하여 마운팅을 하였다. 면역염색은 실온에서 수분증발을 방지하기 위해서 wet chamber 내에서 반응시켰고 1차항체 무처리군과 정상토끼혈청을 1:1000으로 희석하여 1차 항체대신 반응시킨 토끼혈청 처리군의 2개군을 대조로서 관찰하였다.

결 과

임상증상 : DM 전처리후 면역기능을 억제시켜 리스테리아 균액을 접종한 A군에서 12주령 이상의 랫드 4마리 중 3마리가 72시간이내 폐사하였고 2주, 3주, 8주령의 랫드에서, 균액접종 2일째부터 침울, 식욕부진, 운동실조 등과 같은 일반적인 임상증상을 보이다 일주일 이내 정상으로 회복되었다. DM으로 처리하지 않은 B군의 랫드는 접종 2일째 침울 및 식욕부진외의 증상은 볼 수 없었고 이들은 일주일이내 모두 자연회복되었다. 그리고 대조 C군에서는 아무런 증상을 관찰할 수 없었다.

마우스는 리스테리아 균액접종 20마리 전군에서 거친은 피로, 침울, 식욕절멸 및 운동실조의 증상이 지속되다 24시간이내 17수가 폐사하였고 이중 3수는 48시간 이내 폐사하였다.

기니픽의 복강집종균은 접종 2일째부터 4두중 3두에서 침울, 의기소침 및 운동실조를 보이다 1주일이내 모두 회복되었으며, 개체에 따라서는 전혀 임상증상을 나타내지 않는 예도 있었다. 그러나 점안접종군은 접종 2일째부터 침울, 식욕부진의 증상과 더불어 농성분비물의 유출, 결막충혈, 안검종창 등의 심한 결막염을 일으켰으며 이러한 증상들은 접종 1주일째부터 서서히 완화되기 시

작하여 2주체는 모두 자연회복되었다.

병리해부학적 소견 : 복강접종 마우스 및 DM을 처리한 12주령 이상된 랫드의 간장에서 회백색을 띄는 직경 1~2mm 원형 또는 부정형의 괴사소가 산재해 있었고, 폐장의 충혈과 부종이 관찰되었으며 장은 전반적으로 창백하였다. 기니피크는 복강내 복수가 증만되어 있었고, 장은 마우스 및 랫드와 마찬가지로 창백하였다. 점안접종군에서는 결막염 및 농성분비물의 유출 등을 관찰할 수 있었다.

병리조직학적 소견 : DM으로 처리한 12주령 이상된 랫드와 마우스의 간장에서 소엽내 다발성의 한국성 괴사소가 관찰되었으며 괴사조직 주위에는 호중구 및 대식구의 침윤이 현저하였다(Fig 1). 비장은 적수내에서 괴사소가 관찰되었고, 신장은 사구체상피세포의 괴사병소에서 균체가 확인되었다. 그러나 균액만을 집종한 랫드와 기니피크의 간장 및 비장에서는 핵붕괴 및 염색세포 등이 일부 관찰되었지만 균체는 확인되지 않았다.

H & E 염색상은 푸른색의 균괴가 간장의 여러군데에서 산재해 있었고, 균체주위는 핵붕괴, 호중구 및 소수의 대식세포들을 관찰할 수 있었다(Fig 1). 비장은 주로 적수내 괴사소에서 균체가 확인되었고(Fig 2), 신장 또한 신사구체상피세포내에서 정색으로 염색되는 단간균 형태의 균체를 확인할 수 있었다(Fig 3).

H & E 염색에서 병소와 균체가 확인된 부위의 연속절편에서 Gram염색을 실시한 결과 간장, 비장 및 신장의 괴사소에서 구형 또는 단간균 형태의 Gram양성균이 집단 또는 산재성으로 관찰되었다.

면역조직화학적 소견 : 파라핀절편에서 균체항원을 검출하기 위해 ABPC염색을 실시한 결과, 간장의 괴사병소 주위에서 집단 또는 산재성으로 갈색색소의 침착을 보이는 양성반응이 관찰되었으며(Fig 4), 이는 *L. monocytogenes* 균체항원과 항체결합에 의한 특이적인 면역반응임을 인정할 수 있었고, 간세포의 세포질내에서도 균체항원이 검출되었다. 비장의 적수와 신장의 신사구체내에서도 특이 양성반응이 관찰되었으며 이들 장기에서 관찰된 균체항원에 대한 양성반응의 발현부위는 H & E염색과 Gram염색의 결과와 일치하였다(Fig 5, 6). 대조군에 대한 ABPC염색은 1차항체 무처리군 및 정상토끼혈청처리군 모두에서 특이 양성반응을 일으키지 않았다.

실험동물별 균체항원은 DM 처리 랫드의 4수중 3수에서 그리고 마우스에서는 전예에서 증명되었으며 DM 무처리 랫드나 DM처리 12주령 미만의 랫드에서는 임상증상 회복후 2~6일째 도살하여 검사하였으나 항원을 증명할 수 없었다(Table 1, 2). 그리고 기니피크에는 전예에서 양성반응을 관찰할 수 없었다.

1차항체의 희석배수를 1000, 2000, 3000배로 각각 희

Table 1. Demonstration of *L. monocytogenes* antigens in tissue sections of experimentally infected rats with the avidin-biotin-peroxidase complex (ABPC)

Groups	No. of rats tested	Age (wks)	Inoculum 2×10^9 (cells/ml)	DM-treated (DM/dose)*	Results
A	2	<2	0.5ml	DM(0.05ml)	-
	2	<3	1.0ml	DM(0.05ml)	-
	2	<8	1.0ml	DM(0.10ml)	-
	4	≥ 12	1.0ml	DM(0.10ml)	3**
B	2	<2	0.5ml	NT	-
	2	<3	1.0ml	NT	-
	2	<8	1.0ml	NT	-
	4	≥ 12	1.0ml	NT	-

* : Dexamethasone(0.05mg/100 g of body weight/day) was injected intraperitoneally for 1 week before *Listeria* inoculation.

** : No. of rats detecting bacterial antigens.

Abbreviation ; NT = not treated.

Table 2. Demonstration of *L. monocytogenes* antigens in tissue sections of experimentally infected mice and guinea pigs with the avidin-biotin-peroxidase complex (ABPC)

Animals	Inoculation route	No. of heads tested	Age (wks)	Inoculum $2 \times 10^6-8$ (cells/ml)	Results
Mice	IP	20	≥ 3	0.5ml	20**
Guinea pigs	IP	4	≥ 12	1.0ml	-
	CI	4	≥ 12	1.0ml	-

* : No. of mice detecting bacterial antigens.

Abbreviations ; IP = Intraperitoneal, CI = Conjunctival instillation.

석하여 반응시킨 결과 냉동실에서 곧바로 꺼낸 신선한 면역혈청은 2000~3000배의 희석배율에서 뚜렷한 반응을 보였고, 장기간 냉장보관한 면역혈청은 1000배 이하에서도 미약한 반응을 보였다. 이러한 것으로 미루어 볼 때 극소량씩 소분하여 냉동보관한 면역혈청을 사용하는 것이 실험결과에 있어 중요한 요소라고 생각된다. DAB 발색용액의 적합한 반응온도는 세균 및 바이러스 항원증명에서 28℃~30℃가 가장 적합한 것으로 생각되었다.

내인성 비특이 peroxidase 반응을 줄이기 위해 일반적으로 사용하는 0.3% 과산화수소 메타놀용액 대신 본 실험에서 사용한 3% 과산화수소 증류수용액으로 처리한 결과 비특이반응을 더욱 줄일 수 있었다. 또한 본 시험에서 사용한 TBS(0.05M buffer)는 phosphate-buffer saline(PBS)에 비해 pH 조정이 간편하고 발색이 빨리 진행되며 사용하기 편리하였다.

고 찰

파라핀 조직절편에서 ABPC법에 의한 *L. monocytogenes* 균체항원 증명법의 개발은 이 병의 신속한 진단은 물론 병리발생기전의 연구를 위한 수단으로 활용될 수 있을 것이다. 이 실험의 복강접종 랫드와 마우스에서 면역조직화학적으로 균체항원을 검출하기 위해 각종 장기의 조직에 대해 ABPC법을 적용해본 결과 양성반응세포는 간장, 비장 및 신장에서 관찰되었다.

균체항원에 대한 양성반응의 형태는 다양한 크기의 균체집괴 부위에서 배경염색과는 대조적으로 특이적인 갈색색소의 침착을 보이는 *L. monocytogenes*의 균체항원을 저배율의 광학현미경으로 관찰이 가능했으며 항원검출율은 간장에서 가장 높았고 다음 비장, 신장순 이었다. 그리고 이 실험에서 사용한 항토끼 *L. monocytogenes* se-1/2a는 *L. monocytogenes* 혈청형간의 교차반응이외에 다른 세균들과는 교차반응이³¹없기 때문에 조직절편내의 면역조직화학적 균체항원동정만으로 확진할 수 있는 진단수단으로 활용 가치가 높은 것을 생각된다.

Barow와 Mcgorum³⁵은 리스테리아병 자연발생 면양의 삼차신경, 간장, 비장, 신장 등에서 indirect immunoperoxidase(IP)법으로 균체항원동정을 시도하였으나 장기선택 및 여러가지 단점으로 균체항원동정에 실패하였다.

그 이후 Domingo 등³¹은 PAP법을 이용한 인공감염 마우스의 간장 및 비장에서 균체항원을 증명하였고 역시 동일한 방법으로 Reetz 등³⁶은 간장, 비장 및 신장피질의 세뇨관상피세포에서 균체항원이 증명된다고 보고하였으며 본 실험에서는 마우스 및 면역기능을 저하시킨 랫드의 간장, 비장 이외에 신장의 신사구체에서 균체양성반응이 관찰되었다. 리스테리아병의 자연감염은 결막, 비점막 또는 구강점막을 통해 침입한후 삼차신경을 따라

뇌조직으로 파급되며^{2,35}, 자연발생예에서는 이러한 체내 전파경로에 따라 검사장기의 선택이 달라져야할 것으로 생각된다.

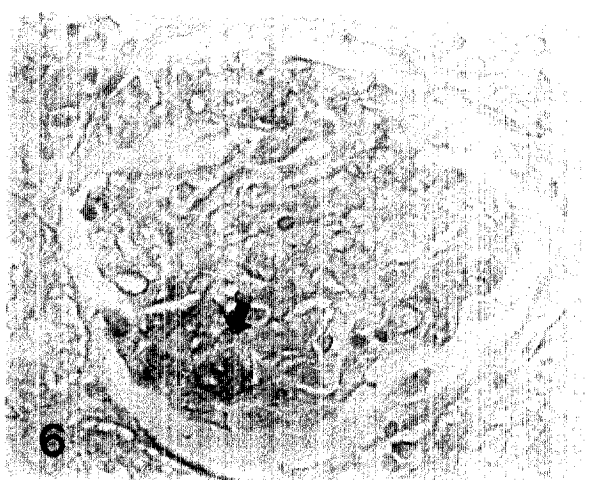
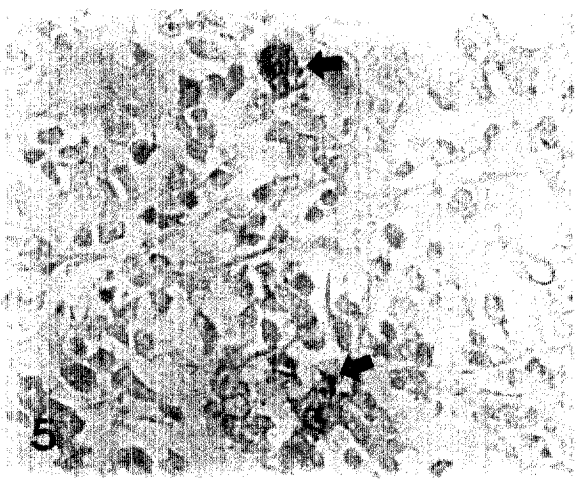
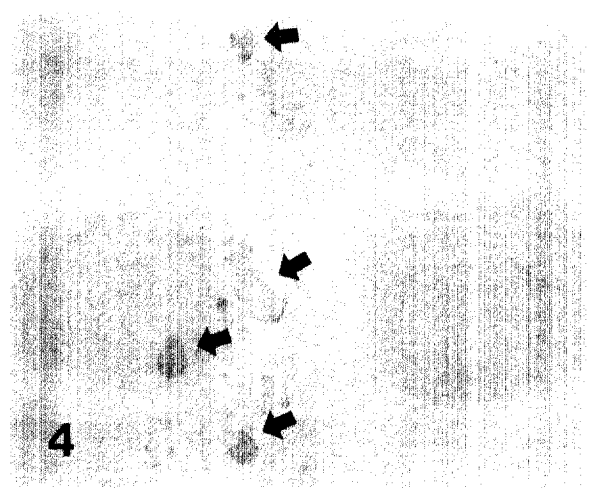
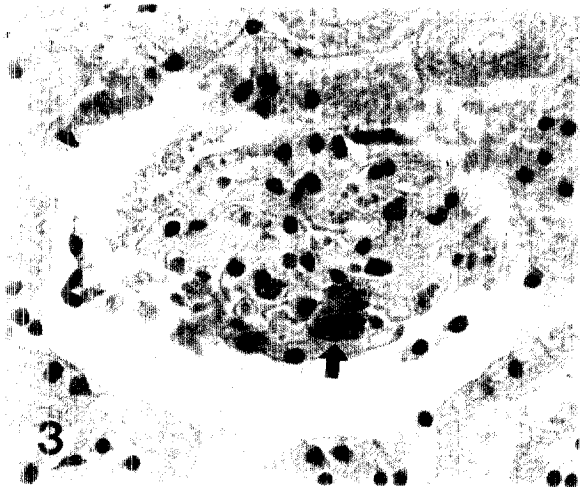
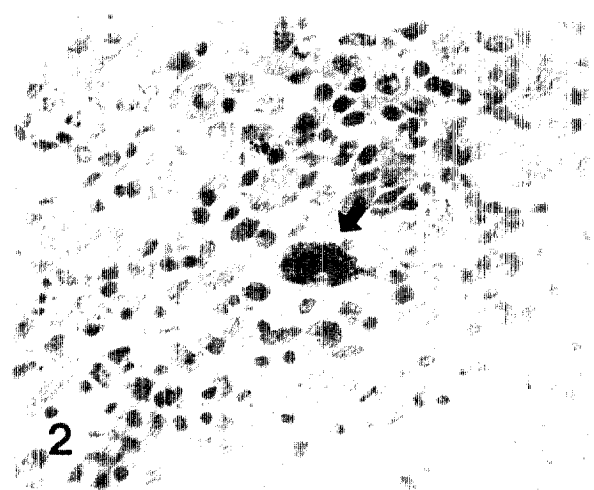
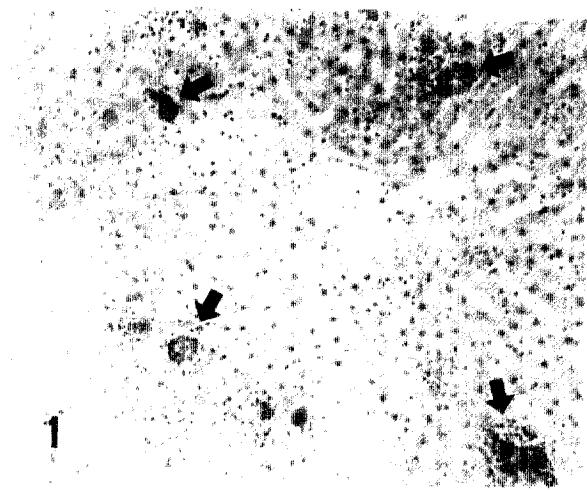
본 실험에 공시한 실험동물 마우스, 기니픽 및 면역기능을 저하시킨 랫드중 *L. monocytogenes*에 가장 감수성이 높은 동물은 마우스였고 다음으로 면역기능을 저하시킨 12주령 이상된 랫드로 나타났으며 기니픽은 점안 및 복강접종 전에에서 침울, 식용부진 및 눈에서 농성분비물 유출 등의 일반적인 임상증상 이외에는 균체항원을 관찰할 수 없었다. 동물별 폐사시간은 접종 20수 전예의 마우스에서 48시간 이내 폐사하였으며 면역기능을 저하시킨 랫드는 균액을 복강접종한 4수중 3수가 3일째 폐사하였고 나머지 1수는 자연회복되었다. 따라서 이 질병의 실험동물 모델로서는 지금까지 알려진 마우스 이외에도 DM처리 12주령 이상의 랫드 역시 이용가능성이 높은 것으로 생각되었다.

면역조직화학적 방법은 원인체의 분리동정이 까다로운 세균이나 바이러스성 질병의 진단법으로 최근 활발히 개발되고 있다. 포르마린 고정, 파라핀 조직절편에서의 균체항원 동정은 이 질병이 인수공통전염병이라는 점을 감안 한다면 세균학적 진단과정에서 있을 수 있는 실험자의 감염우려를 배제할 수 있으며 항원검출부 및 주위에 출현하는 세포의 정확한 형태학적 특징을 관찰할 수 있고 파라핀 포매조직은 영구보존이 가능하여 언제든지 실험에 사용할 수 있는 장점이 있다. 그러나 포르마린 고정시에는 12~24시간 이내에서 항원성이 가장 좋다고 알려지고 있으며 고정시간이 경과할수록 항원보존성이 저하되며, 파라핀 포매후에 조직을 보존하는 것이 좋다고 보고되고 있다.^{31,37~40}

*L. monocytogenes*는 기회감염균으로써 외부에서 가해지는 스트레스, 기후불량, 분만, 밀집사육 및 저질의 사일리지 등과 같은 인자들에 의해 병을 일으키는 것으로 알려지고 있다. 본 실험의 랫드 인공접종 감염에서 건강개체에서는 무증상 경과하였으나 면역기능억제제^{6,27}인 DM을 처리한 랫드에서 인공감염을 일으킨 것은 이러한 사실을 뒷받침하는 결과로 생각된다. 이상과 같은 성적들을 미루어 볼 때 토끼항 *L. monocytogenes* se-1/2a고도면역혈청을 이용한 ABPC법은 포르마린고정, 파라핀 절편조직내 리스테리아 균체항원 검출에 높은 특이성을 나타냄으로써 야외에서 리스테리아병의 진단을 위한 수단으로 널리 활용될 수 있을 것이며 이외의 다른 세균성질병 연구에도 상당한 응용가치가 있을 것으로 기대된다.

결 론

L. monocytogenes 균체항원을 동정하기 위하여 마우스 및 DM을 전처리하여 면역기능을 저하시킨 랫드에 리스테



리아 배양균액 (*L monocytogenes* se-4b)을 복강접종하여 인공감염된 조직에 ABPC법을 적용하였다.

일반적인 방법에 따라 파라핀절편을 제작하여 1차 항체로서 토끼항 *L monocytogenes* 1/2a 혈청으로 반응시킨 다음 biotinylated 항토끼 IgG와 avidin-biotin-peroxidase complex(ABPC reagent)로 각각 처리하였다.

양성반응은 간장, 비장 및 신장에서 관찰되었으며 균체항원은 주로 이들 장기의 괴사병소내에서 관찰되었다.

이상의 결과에서 ABPC법은 *L monocytogenes* 균체항원 동정에 있어 높은 특이성을 보였으며 앞으로 리스테리아 병의 진단에 중요한 수단으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Legends for figures

- Fig 1. Necrotic foci contain many bacteria(arrows) in the liver of rat. Hematoxylin & Eosin, $\times 100$.
- Fig 2. Gram-positive coccobacillary organisms(arrow) in the red pulp of the spleen. Gram stain, $\times 400$.
- Fig 3. Bacteria clump(arrow) in the glomerulus. Hematoxylin & Eosin, $\times 400$.
- Fig 4. Avidin-biotin-peroxidase complex(ABPC)-stained. Strong positive reactions for *Listeria monocytogenes* antigens(arrows) in the liver. $\times 200$.
- Fig 5. ABPC-stained paraffin section. Positive reaction(arrows) in the red pulp of the spleen. $\times 400$.
- Fig 6. ABPC-stained paraffin section. Bacteria showing a strong immunoperoxidase reaction(arrow) in the glomerulus. $\times 400$.

참 고 문 헌

- Murray EGD, Wedd RA, Swann MBA. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leukocytes caused by a hitherto undescribed bacillus bacterium monocytogenes. *J Pathol Bacteriol* 1926;29 : 407~439.
- Gillespie JH, Timoney JF, Scott FW, et al. The genus *Listeria* in : 7th ed. Hagan and Bruner's infectious disease of domestic animals. *Cornell Univ Press* 1981 ; 221~225.
- 여상건, 김순복, 최상용. 한국 재래산양에서 발생한 리스테리아병. *대한수의학회지* 1987;27(2):207~213.
- Doyle MP, Schoeni JL. Selection-enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. *Appl Environ Microbiol* 1986;51(5):1127~1129.
- Fraser JA, Sperber WH. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environment samples by esculin hydrolysis. *J food Prot* 1988;51(10) : 762~765.
- Irene VW, Bryner JH, Van Der Maaten MJ, et al. Effect of dexamethasone on shedding of *Listeria monocytogenes* in dairy cattle. *Am J Vet Res* 1989;50(12) : 2009~2013.
- Stemberger LA, Hardy PH, JR. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry : preparation and properties of soluble antigen antibody complex(horseradise peroxidase-peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970;18 (5):315~333.
- Doser AR, Lin BC. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. *Am J Vet Res* 1988;49(10) : 1719~1721.
- Haritani M, Narita M, Murata H, et al. Immunoperoxidase evaluation of pneumonia lesions induced by *Pasteurella multocida* in calves. *Am J Vet Res* 1989;50(12) : 2162~2167.
- Hill AC. Demonstration of Mycoplasmas in tissue by the immunoperoxidase technique. *J Infect Dis* 1978;137(2) : 152~154.
- Marco A. Immunocytochemical Detection of *Listeria monocytogenes* in tissue with the Peroxidase-antiperoxidase technique. *Vet Pathol* 1988;25 : 385~387.
- Matsui N, Agawa H, Hashimoto N, et al. Immunohistochemical study on acid-fast bacteria infections of domestic animals by using anti-BCG serum. *J Jpn Vet Assoc* 1989 42 : 703~708.
- 문운경, 조희택, 김순복. Peroxidase-antiperoxidase(PAP) 복합체법을 이용한 돼지콜레라의 면역조직화학적 진단. *대한수의학회지* 1990;30(2) : 215~221.
- 노환국, 서정향, 김순복. Indirect immunoperoxidase법을 이용한 조직내 뉴캐슬병 바이러스 항원동정. *대한수의학회지* 1990;30(3) : 309~315.

15. Romos JA, Domingo M, Dominguez L, et al. Immunohistological diagnosis of avian listeriosis. *Avian Pathology* 1988; 17 : 277~233.
16. Scanziani E, Sironi G, Mandelli G. Immunoperoxidase study on *Leptospiroal nephritis* of swine. *Vet Pathol* 1989; 26 : 442~444.
17. Stipkovits L. Studies on the efficacy of baytril in chicks after experimental infection with *Mycobacterium gallisepticum* and *E. coli*. *Vet Med Rev* 1988; 59 : 103~107.
18. Wood RL, Anderson TD. Peroxidase-antiperoxidase and immunogold labeling of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella choleraesuis* var *kunzendorf* in tissues of experimentally infected swine. *Am J Vet Res* 1990; 51 (4) : 619~624.
19. Ducatelle R, Coussement W, Hoorens J. Demonstration of canine distemper viral antigen in paraffin sections, using an unlabeled antibody-enzyme method. *Am J Vet Res* 1980; 40(11) : 1860~1862.
20. Ducatele, R Coussement W, Hoorens J. Immunoperoxidase study of Aujeszky's disease in pigs. *Jpn J Sci* 1982; 32 : 294~302.
21. Haziroglu R, Haritani M, Narita M. Demonstration of Akbane virus antigen in experimentally infected mice using immunoperoxidase method *Jpn J Sci* 1987; 49(1) : 133~135.
22. Kim SB, Sur JH, Moon UG. Avidin-biotin complex for immunohistochemical diagnosis of Aujeszky's disease and hog cholera. *Korean J Vet Res* 1990; 30(4) : 435~440.
23. Kure K, Lyman WD, Weidenheim KM, et al. Cellular localization of an HIV-1 antigen in subacute AIDS encephalitis using an improved double-labeling immunohistochemical method. *Am J Pathol* 1990; 136(5) : 1085~1092.
24. Matsuoka T, Kurihara T, Konosu Y, et al. Demonstration of Aujeszky's disease virus antigen in naturally infected cattle by immunoperoxidase. *Jpn J Sci*. 1987; 49(3) : 725~727.
25. Rakich PM, Prasse KW, Lukert PD, et al. Immunohistochemical detection of canine adenovirus in paraffin sections of liver. *Vet Pathol* 1986; 23 : 478~484.
26. Golnazarian CA, Donnelly CW, Pintauro SJ, et al. Comparison of infections dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C57B1/6J mice. *J Food Port* 1989; 52(10)696~701.
27. 이호원, 김순복. 면역기능억제 돼지에서 관찰된 악독화 돼지콜레라 바이러스 접종후의 병리학적 변화. 경상대학교 대학원 논문집 1986; 1~29.
28. Merkal Rs, Miller JM, Hintz Am, et al. Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. *Am J Vet Res* 1982; 43(4) : 676~678.
29. Selbitz HJ, Steinbach G, Meyer H. Quantitative bakteriologische untersuchung an experimentell infizierten Labortieren. *Arch Exper Vet Med* 1986; 40(4) 575~586.
30. Bjerkas I, Landsverk T. Identification of *Toxoplasma gondii* and encephalitozoon cuniculi by immunoperoxidase technique and electron microscopy in stored formalin-fixed, paraffin-embedded tissue *Acta Vet Scand* 1986; 27 : 11~22.
31. Domingo M, Ramos JA, Dominguez L, et al. Demonstration of *Listeria monocytogenes* with the PAP technique in formaline fixed and paraffin embedded tissues of experimentally infected mice. *J Vet Med B* 1986; 33 : 537~542.
32. Lindsa DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res* 1989; 50(11) : 1981~1983.
33. Miller RT, Groothuis Cl. Improved Avidin-Biotin immunoperoxidase method for terminal deoxyribonucleotidyl transferase and immunophenotypic characterization of blood cells. *Am J Clin Pathol* 1990; 93(5)670~674.
34. Swanson PE, Hagen KA, Wick MR, et al Avidin-biotin-peroxidase(ABPAP) complex. *Am J Clin Pathol* 1987; 88(2) : 162~176.
35. Barlow RM, McGorum B. Oavian listerial encephalitis : analysis, hypothesis and synthesis. *Vet Res* 1985; 116 : 233~236.
36. Reetz VJ, Schilow WF. Anwendung der peroxidase-antiperoxidase-technik zum lichtmikroskopischen nachwes von *Listeria monocytogenes* in leber, milz und nieren experimentell infizierter mause. *Mh Vet Med* 1988; 43 : 802~804.
37. Kobayshi M, Kotani S, Fujishita M, et al. Immunohistochemical identification of *Trichosporon beigei* in histologic section by immunoperoxidase method. *Am J Clin Pathol* 1988; 89(1) : 100~105.
38. Muramoto LM, Marshall E, Kadin. Improved de-

- tection of lymphoid cell surface antigens in tissues fixed in periodate-lysine-paraformaldehyde(PLP). *Am J Clin Pathol* 1987;88(5) : 589~595.
39. Swanson PE. Foundation of immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 1988;90(3) : 333~339.
40. Swoveland PT, Johnson KP. Enhancement of fluorescent antibody staining of viral antigens in formalin-fixed tissues by trypsin digestion. *J Inf Dis* 1979;140(5)758~764.
-