

돼지 유행성 설사(Porcine Epidemic Diarrhea)의 진단을 위한 면역조직 화학적 기법의 응용

박 남 용 · 조 경 오

전남대학교 수의과대학 병리학교실
(1994년 8월 16일 접수)

Application of immunohistochemical technique for diagnosis of porcine epidemic diarrhea

Nam-yong Park, Kyoung-oh Cho

Department of Pathology, College of Veterinary Medicine,
Chonnam National University

(Received Aug 16, 1994)

Abstract : Immunohistochemical study on the intestinal tissues obtained from the 21 pigs of the 14 farms in Korea in which the clinical and epidemiological features had indicated the possible outbreaks of porcine epidemic diarrhea(PED) was performed using the indirect immunofluorescence test and/or the immunoperoxidase method in order to detect PED viral antigens in the infected cells of the intestines, and histopathological features were described as well.

By immunohistochemical analysis, PED viral antigens were detected in the epithelial cells covering the small intestinal villi and recognized slightly in the cells lining the colonic surface epithelium as well. Occasional fluorescence was also seen in a few intestinal crypt epithelium.

On light microscopy, the piglets with PED showed marked villous atrophy and fusion, and severe enterocyte degeneration and desquamation. On the other hand, the older pigs more than 4 week old age was mild villous atrophy and fusion, severe villous epithelial cell proliferation, and moderate mononuclear cell infiltration.

Key words : porcine epidemic diarrhea, PED, swine, immunohistochemistry

서 론

오늘날 우리나라에서 지금까지 돼지의 바이러스성 설사질환으로 가장 중요한 것은 전염성 위장염(transmissible gastroenteritis)과 로타바이러스 감염증

(rotavirus infection)이었고 실제 임상적으로 크게 문제가 되었었다^{12,19,22}. 그러나 최근 돼지의 모든 연령에서 설사를 주증으로 하는 새로운 바이러스성 질병이 약 3년 전부터 발생하여 국내 양돈업계에 커다란 파문을 일으키고 있었다. 이 질병은 임상증상과 발병상황이 유

립^{22,29}과 가까운 일본^{9,31}에서 발병하여 심한 피해를 끼쳤던 돼지 유행성 설사(porcine epidemic diarrhea, 이하 PED로 약칭)질환으로 생각되었으나, 국내에서는 최근 까지 정확한 진단이나 바이러스의 분리동정을 하지 못했었다.

그러나 본교실과 농업진흥청 가축위생 연구소에서는 근래에 PED바이러스를 분리했으며 이에 따른 진단기법을 확립해 가고 있다^{33,34}.

PED는 돼지 전염성 위장염과 유사하지만 전혀 새로운 질병으로 1971년 영국에서 육성돈과 비육돈에서 보고^{1,14}되었으나 원인체가 밝혀지지 않아 막연히 유행성 바이러스성 설사(epidemic viral diarrhea)라 명명하였으며, 또한 이와 유사한 질병이 1970년대 유럽에서 크게 발생하였다. 그 후 1976년 유럽에서 또다시 포유자돈을 포함한 모든 일령의 돼지에서 전염성 위장염과 비슷한 급성 설사증이 보고되었으나²⁹, 돼지 전염성 위장염 바이러스와는 다른 병원체로 확인되었고, 질병의 원인체가 장에 병원성이 있기 때문에 이를 유행성 바이러스성 설사 2형(epidemic viral diarrhea type II)이라고 명명하였다. 그러나 1970년대 초에 유럽에서 발생했던 유행성 바이러스성 설사(나중에 I형이라 명명)와 유행성 바이러스성 설사 II형간의 차이점은 II형이 단지 어린 포유 자돈에서 발병한다는 점이었다. 유행성 바이러스성 설사 II형이 발생한 중례에서 1978년 코로나바이러스 양 병원체를 확인하였고 이 병원체를 실험적으로 접종한 결과 자돈뿐만 아니라 육성돈에서도 설사가 발생되었다^{3,20}. 최근에는 유행성 바이러스성 설사 I형과 II형의 병원체가 동일한 코로나바이러스임이 밝혀져 드디어 이들 병명을 돼지 유행성과 설사(porcine epidemic diarrhea)로 통일하기에 이르렀다²³. 지금까지 알려진 PED바이러스의 형태는 돌기(projection)를 포함하여 평균 130 nm이나 그 크기는 95-190nm로 다양하게 외형상 코로나바이러스과의 전염성 위장염 바이러스와 매우 유사하다¹⁹. PED바이러스의 증식은 세포질내에서 이루어지며 세포질막에서 분아됨으로써 바이러스의 조합이 이루어진다. 그리고 5-iod-2'-deoxyuridine의 첨가시 PED바이러스 증식이 영향을 받지 않아 이 바이러스의 핵산은 RNA로 밝혀졌다¹⁰. 또한 PED바이러스는 에테르와 클로로포름 처리에 불활화되고 sucrose density는 1.18g/ml이며 4℃에서는 pH 5.0과 9.0사이에서 안정하고, 37℃에서는 pH 6.5와 7.5 사이에서 안정하며, 배양된 바이러스는 60℃에서 30분간 가열하여야 감염력을 상실한다^{10,19}.

PED는 모든 연령에 걸쳐 100%의 발병률을 보이며 어린 자돈에서는 50%이상의 폐사율을 야기하는 질병

으로서 급성의 심한 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하 등의 임상증상을 보이나 자돈에서의 느린 전파와 낮은 폐사율을 제외하고는 돼지 전염성 위장염과 그 증상에서 매우 유사하다^{12,13,19}. 또한 병리조직학적 소견도 소장 용모의 위축과 융합 그리고 용모 상피세포의 공포화와 탈락등으로 이러한 병변 역시 돼지 전염성 위장염과 매우 유사하다^{15,17,24}.

PED는 돼지 전염성 위장염과 그 원인체의 외형 및 증상 그리고 병리 조직학적 소견이 매우 유사하므로^{11,16} 이를 진단하기 위해서는 직접면역형광항체법이 유용한 방법으로 알려져 있으나 일단 폐사된 돼지에 대한 진단적 가치는 높지 못하다. 한편 Schulz²⁵는 자연 발생한 PED로 추정됨에도 불구하고 음성 반응을 보이는 것은 혈청학적 조사가 병행되어야 한다고 보고하였다. 그러나 면역형광항체법의 표본은 영구보존이 불가능하며 주로 신선한 동결절편을 필요로 할 뿐 아니라 배경이 암시야 상태이므로 형광반응을 보이는 물질과 주변과의 관계를 살펴볼 수 없는 등 단점이 많아 조직병리영역에서는 부분적으로만 적용되고 있는 실정이다^{4,32}. 따라서 이를 보완하고자 형광색소나 rhodamine과 같은 형광색소 이외에도 horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, muramidase, 또는 glucose oxidase와 같은 효소를 항체에 표지할 수 있게 됨에 따라 면역효소법이 개발되었으며^{11,14} 이를 이용, 통상의 파라핀절편에서도 적용이 가능케됨에 따라 특히 조직병리에서의 적용범위가 점차 확대되고 있다^{26,4}. 최근 광범위하게 사용되고 있는 면역과산화 효소법은 면역형광법과는 달리 파라핀절편의 적용은 물론 대조염색까지 하여 헤마톡실린과 에오신 염색 소견과 비교할 수 있고 회고적 연구(retrospective study)에서도 가능하다는 장점을 가지고 있다⁴. 따라서 저자들은 PED의 진단을 위하여 PED바이러스가 감염되었다고 추정되는 돼지 장조직(냉동보관 및 포르말린으로 고정된)을 대상으로 간접면역형광항체법과 간접면역과산화효법을 적용, 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 : 실험재료는 1991년 3월부터 1992년 8월까지 전남대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 PED로 의심되는 14개 농장 21마리의 돼지중 14개 농장 21마리의 포르말린 고정 장조직과 같은 14개 농장중 냉동보관된 6개 농장 10마리의 돼지 장 절편을 재료로 하였다. 이들 재료로 사용된 돼지의 연령별 분포는

Table 1. The age and number of the pigs from the 14 farms(A-N)

Farms: (14)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Age	7	35	37	5	3	50	10	33	3	5	2	2	34	4
	50			13		130		120			280		65	80
Heads (21)	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	2

Age: Days

초산 모돈이 1마리, 비육돈이 3마리, 육성돈이 3마리, 이유자돈이 5마리, 포유자돈이 9마리였다(Table 1).

면역형광항체법과 면역과산화효소법에 사용된 음성 대조군 절편은 설사병력이 없는 무증상의 40일령의 송아지 결장을 사용하였고, 양성대조군 절편은 PED바이러스를 실험집중환 포유자돈의 장절편을 사용하였다.

실험방법

광학현미경적 관찰 : 포르말린에 고정된 소장 및 대장의 각 부위별 조직을 통상적으로 파라핀에 포매 시킨 후 약 4 μm 두께로 절편을 만든 후 헤마톡실린과 에오신(H & E) 염색을 하였다.

간접면역형광항체법 : 냉동보관중인 장조직을 약 5 μm 정도로 냉동절편 한 후 아세톤에 5분간 고정하였고, 10mM phosphate buffered saline(PBS pH 7.5)으로 5분간씩 3번 수세하였다. 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 10배 희석한 정상 송아지 혈청(Sigma Co)을 40℃에서 15분간 작용시킨 후 5분간씩 3번 PBS로 씻어낸 후 1차 항체로는 50배 희석한 porcine anti-PED virus hyperimmune serum을 40℃에서 60분간 작용시킨 다음 PBS로 5분간씩 3번 수세하였다. 이차항체는 100배 희석한 FITC-labelled goat anti-porcine antibody(Biomedica Co)를 40℃에서 40분간 작용시켰으며 5분간씩 3번 PBS로 씻은 후 글리세린으로 봉입하여 형광현미경(Olympus Co)으로 검경하였다.

간접면역과산화효소법 : 약 4μm 두께의 장조직절편을 xylene과 histoclear가 1:3으로 혼합된 dewaxing agent(Biomedica Co)와 각급 알콜을 거쳐 증류수에서 합수시켰고, periodic acid가 혼합된 endoblockin agent(Biomedica Co)를 40℃에서 15분간 처리하여 조직내의 내인성 peroxidase를 억제시켰으며 주성분이 tris buffer인 1X automation bufer(Biomedica Co)로 10회 세척하였다. 또한 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 10배 희석한 정상 송아지 혈청(Sigma Co)을 40℃에서

15분간 작용시킨 후 1X automation buffer로 10회 세척하였고, 1차 항체로는 50배 희석한 porcine anti-PED virus hyperimmune serum을 40℃에서 60분간 작용시킨 후 1X automation buffer로 10회 세척하였다. 이차항체는 horseradish conjugated goat anti-porcine secondary antibody(Biomedica Co)를 40℃에서 50분간 작용시킨 후 1X automation buffer로 10회 세척하였다. peroxidase의 민감성을 높이기 위해 peroxidase enhancer(Biomedica Co)에 1번 세척하였으며 chromogen으로는 3-amino-9-ethylcarbazole(Biomedica Co)을 10분씩 2번 염색한 후 1X automation buffer로 10회 세척하였다. 대조염색으로 헤마톡실린 액으로 1분간 염색한 후 1X automation buffer로 10회 세척하였고 글리세린으로 봉입후 검경하였다.

결 과

광학현미경적 관찰 : 면역조직화학적 염색에서 양성 반응을 보이는 어린 포유자돈의 소장염모는 전반적으로 심하게 위축되었고 융합되었으며 특히 공장과 회장이 더욱 심하였다. 또한 점막 고유층내에는 림프구등 단핵세포들이 중등도로 침윤되었으며 충·출혈도 관찰되었다. 장염모상피세포는 공포화되었으며 침단부쪽은 대부분 탈락되었다. 장염모상피세포의 증식은 관찰되지 않았다. 대장부위에서는 어떠한 소견도 관찰되지 않았다.

면역조직화학적 염색에서 양성반응을 보이는 육성돈, 비육돈, 그리고 모돈은 어린자돈에 비하여 소장염모의 위축 및 융합은 심하지 않았다(Fig 1). 그리고 염모상피세포의 공포화와 탈락은 육성돈에서 모돈으로 연령이 증가할 수록 그 정도는 약하였지만 염모의 부종과 그리고 림프구등 단핵세포의 침윤은 심하였다(Fig

3). 또한 입방형의 음모상피세포의 증식이 소장 전체에 걸쳐서 관찰되었으며(Fig 2), 장음와에서는 세포분열상이 정상돈에 비해서 증가되어 있었다. 양성반응을 보이는 농장중 한개 농장의 육성돈 돼지에서 발란티디움(balantidium)이 결장에서 관찰되었고, 또한 양성반응을 보이는 두개 농장의 육성돈 돼지의 결장에서 장음와의 확장과 장음와내에서 호중구등 염증세포 침윤이 관찰되었다. 그러나 대부분의 결장에서는 점막유충내에 약간의 림프구등 단핵세포의 침윤외에는 별다른 소견이 관찰되지 않았다(Fig 4).

간접면역형광항체법 : 6개 농장 10마리의 돼지중 4개 농장 7마리의 돼지에서 주로 소장점막의 음모상피세포에서만 형광항체 양성반응이 관찰되었으며, 양성반응의 정도는 공장에서 가장 뚜렷하였고, 연령별로는 포유자돈과 이유자돈에서 강하게 나타났으며(Fig 8), 육성돈과 비육돈에서는 그 반응이 약하게 관찰되었다(Fig 7). 결장에서도 약간의 반응이 포유자돈에서 관찰되었다(Table 2).

Table 2. Sequential immunoperoxidase and immunofluorescence test results of the intestinal tissues obtained from the 9 pigs of the 5 farms recognized the positive reaction against PED virus

Farms	Age (days)	Results of each region of the intestine			
		Duodenum	Jejunum	Ileum	colon
D*	5	++	+++	++	+
	13	+	++	++	+
E	3	++ (++)	+++ (++)	+++ (++)	+ (+)
	50	+ (+)	++ (++)	++ (+)	+ (-)
F	130	- (-)	+ (+)	+ (+)	- (-)
	35	+ (+)	++ (+)	++ (+)	+ (+)
M	60	+ (-)	++ (+)	+ (-)	- (-)
	7	+ (+)	+++ (++)	+++ (+++)	+ (+)
N	120	+ (-)	++ (+)	+ (+)	+ (-)

* : performed with immunoperoxidase test only
 () : immunofluorescence test reaction
 + : 1-29% of epithelial cells which were positive reaction
 ++ : 30-50% of epithelial cells which were positive reaction
 +++ : 60-100% of epithelial cells which were positive reaction

음성대조군의 장절편에서는 어떠한 양성반응도 관찰되지 않았다. 양성 대조군에서는 소장의 점막 음모상피세포 세포질내에서 강한 양성반응이 관찰되었으며 음와의 상피세포 세포질내에서도 양성반응이 관찰되었다. 또한 소장의 관강내로 탈락된 점막상피세포의 세포질내에서도 강한 양성반응이 관찰되었다. 대장의 결장 점막 상피세포 세포질내에서도 양성 반응이 관찰되었다.

간접면역과산화효소법 : 14개 농장 21마리의 돼지중 5개농장 9마리의 돼지에서 양성반응이 관찰되었으며, 면역형광염색에서 양성을 보이는 3개의 농장도 포함되었다. 발색성은 소장의 음모상피세포에서 주로 관찰되었고 장음와의 상피세포에서도 약간 보였으며, 연령별로는 어린자돈에서 그 반응이 뚜렷하였고, 부위별로는 소장중 공장과 회장에서 강하게 보였으며, 관강내의 탈락된 상피세포에서도 강한 양성반응을 관찰하였다(Fig 6). 또한 대장의 결장에서도 양성반응이 상피세포 세포질내에서 관찰되었다(Table 2, Fig 5).

음성대조군의 장절편에서는 PED바이러스에 대한 어떠한 양성반응도 관찰되지 않았다. 양성 대조군에서는 소장의 점막음모상피세포의 세포질내에서 강한 양성반응이 보였고 음와의 상피세포 세포질내에서도 관찰되었다. 또한 소장의 관강내로 탈락된 점막상피에서도 강한 양성반응이 관찰되었다. 대장의 결장 점막 상피세포 세포질내에서 양성반응이 관찰되었다.

고 찰

처음 양돈장에 PED가 발생하면 100%의 발병률과 50% 이상의 폐사율을 야기하기 때문에 오늘날 양돈업계에서는 무서운 질병으로 간주되어 크게 주목을 받고 있는 돼지 질병중의 하나이며 국내에서도 이미 수년전부터 발생했을 것으로 추정하고 있었다. 관련 연구기관에서도 돼지 전염성 위장염 증상과 유사하나 그 발병연령과 전과양상이 다른 유형의 질병 발생을 접한 바 있어 이 질병의 확인이 시급한 실정이었다.

본 연구에서 PED가 발생된 것으로 규명된 4개 농장의 돼지들은 돼지 전염성 위장염과 돼지 로타바이러스 감염증의 백신을 철저히 하였음에도 불구하고 모든 연령에 걸쳐서 거의 설사가 발생하고 폐사율은 어린 자돈에서만 20%이상이며 연령이 증가할 수록 감소하였는데 이러한 피해는 같은 양돈장에서 몇 년간에 걸쳐서 계속 반복되었다. 이와같이 국내에서 발생한 PED의 발병률과 폐사율등의 증상이 외국에서 발생한 전형적

인 PED의 발병과 다소 상이한데, Pensactr¹⁹는 PED가 발병시 돈군의 PED 바이러스에 대한 항체 보유 상태에 따라 그 증상이 다양하게 나타나고 또한 PED가 전 지역에 걸쳐서 발생되고 있는 나라에서는 급성의 심한 PED의 발생이 드물다고 한 점으로 미루어보아 이미 국내 양돈장에 PED가 상당한 수준 감염노출되어 있다고 할 수 있으며 따라서 양돈장별 항체 보유수준의 차이가 큰 때문으로 사료된다.

PED는 폐지 전염성 위장염과 병원체, 임상증상 및 병리조직학적 병변이 매우 유사하므로 이를 감별진단하는 것이 중요하다. 이에 대해 Debouck et al⁷은 직접면역형광항체법이 가장 민감하고 빠르며 유용한 진단 방법이라고 하였고, 제왕절개해서 얻은 자돈에 PED 바이러스를 실험 접종하면 형광항체 양성반응이 소장의 용모상피세포뿐만 아니라 광학현미경적으로는 거의 정상인 결장의 상피세포에서도 그 반응이 인정되는 것이 전염성 위장염과는 다르다고 하였다. 또한 설사가 시작된지 6시간 이내에는 공장과 회장의 용모상피세포의 90-100%에서 형광항체 양성반응이 나타나고 강한 반응이 탈락된 용모상피세포와 관강내에서도 볼 수 있다고 하였다^{5,7}. 그러나 설사가 시작한 지 12-45시간 사이에서는 반응이 급격히 떨어지기 시작하며, 24-36시간 사이에서는 단지 1-10%의 장용모 상피세포에서만 형광항체 양성반응을 확인할 수 있었으나 결장의 말기에는 용모상피세포의 90-100%에서 형광항체 양성반응이 나타났다고 하였다⁷. 본 연구에서도 형광항체 양성반응이 용모상피세포뿐만 아니라 결장의 상피세포에서도 관찰되어 Debouck의 실험결과와 일치하였으나, 대부분의 경우 형광항체 양성반응을 보이는 용모상피세포의 수가 적고 정도가 약한 것은 제왕절개에 의해 얻은 실험 접종 자돈은 모체이행항체가 없기 때문에 면역형광항체 반응이 큰 반면에 본 연구에서 실험된 돼지들은 어느 정도 모체 이행항체를 가지고 있었기 때문에 감염 바이러스의 증식이 억제되어 장내 병변 형성이 충분히 이루어지지 않았을 것으로 추정된다. 또한 Zepezauer et al³⁰은 전염성 위장염은 공장과 회장 용모 상피세포내에서 미만성 혹은 조잡한(coarsely) 과립성 세포질내 면역형광항체 반응이 관찰되는 반면 PED 발병시에는 공장 용모상피세포 세포질내에서 미세한 과립성 형광항체 반응이 관찰된다고 하였으며, 본 연구에서도 일치되는 성적을 얻었다.

한편 본 연구에서 포르말린 고정 장 조직을 가지고 간접면역과산화효소법을 수행한 결과 소장의 용모상피세포뿐만 아니라 결장의 점막상피세포에서도 양성 반응의 강한 발생성이 관찰되었고, 소장의 탈락된 용모상피세

포내에서도 뚜렷한 양성반응이 나타났다. 본 연구에서 항체의 희석비율을 다르게 하여 간접면역형광항체법과 간접면역과산화효소법의 민감도를 비교하진 못하였지만 같은 희석비율에서 관찰하여 본 결과 간접면역과산화효소법이 간접면역형광항체법보다 뚜렷한 양성반응을 보였다.

장점막의 광학현미경적 소견상 육성돈의 장 용모 상피세포에서 공포화가 관찰되었는데, Ducatille et al⁶은 일반적인 바이러스성 장염에서 보이는 것과 같이 PED 바이러스의 증식은 장 용모상피세포에 손상을 일으켜 여러가지 효소의 활동성을 저하시키며 특히 지방의 대사에 관계되는 효소가 영향을 받아 지방을 다른 조직으로 운반시키지 못하거나 혹은 대사하지 못하기 때문에 지방과립이 발생한 것이라고 한다. 또한 입방화된 장 용모상피세포의 증식은 다른 바이러스 감염말기의 회복기에서 발견되는데^{18,23,27,28} 이러한 입방화된 용모상피세포에서는 PED바이러스가 전자현미경적으로도 관찰되지 않는다고 했다^{8,21}.

Debouck et al⁶은 제왕절개하여 얻은 신생자돈에 PED 바이러스를 실험접종하면 정상 소장 용모 길이가 700-900 μ m에 비해 200-300 μ m로 위축된다고 하였으며, 한편 음와의 용모의 비율이 6.5에서 8.0이 정상인데 반하여 실험접종돈은 2.3에 불과한다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 어린 자돈의 경우 정확한 길이는 측정하지 못하였지만 아주 심한 소장용모의 상대적인 위축을 확인할 수 있는데 비해 육성돈, 비육돈, 그리고 모돈에서는 약간의 위축만 관찰되었다.

결 론

PED의 발생이 의심되는 14개 농장 21마리의 돼지를 대상으로 면역조직화학적 연구 및 광학현미경적 관찰을 수행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 간접 면역 과산화 효소법을 수행한 결과 14개 농장 21마리의 돼지중 5개 농장 9마리에서 양성반응을 보였고, 간접 면역 형광 항체법을 수행한 결과 6개 농장 10마리의 돼지중 4개 농장 7마리의 돼지에서 양성반응을 관찰하였다.

2) 간접면역과산화효소법과 간접면역형광항체법을 수행한 결과 소장 용모 상피세포에서 양성 반응을 관찰하였고, 음와의 상피세포에서도 약간의 양성반응을 볼 수 있었으며, 부위별로는 공장과 회장에서 그 반응이 가장 뚜렷하였고, 결장에서도 약간의 반응을 관찰할 수 있었다.

3) 간접면역과산화효소법과 간접면역형광항체법의 민감도를 비교하기 위하여 1차항체 및 2차항체의 희석 비율을 동일하게 해 본 결과 간접면역과산화효소법이 그 민감도가 높은 것을 확인할 수 있었다.

4) 광학현미경적 소견상 포유자돈의 소장은 심하게 위축 및 융합되었으며, 점막 고유층에서는 중등도의 충출혈이 보였고, 용모 상피세포는 심하게 탈락된 것이

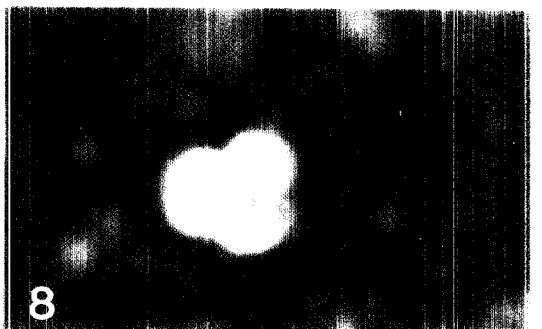
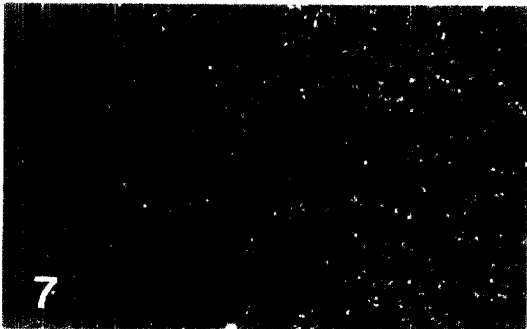
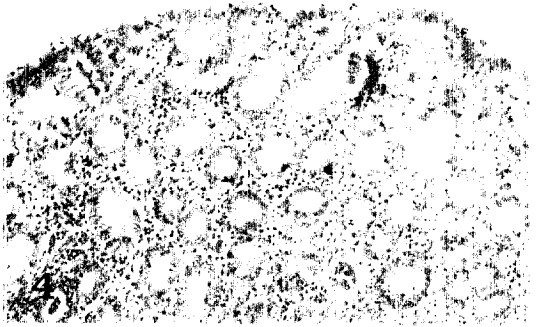
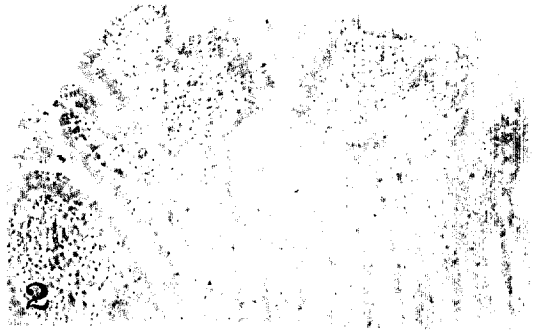
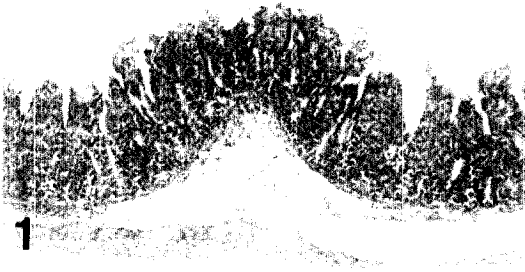
관찰되었다. 용모 상피세포의 증식이나 점막 고유층에 림프구등 단핵세포의 침윤은 심하지 않은 반면 육성돈, 비육돈, 그리고 모든의 장에서는 어린 자돈에서와 같은 용모의 위축이나 융합은 심하지 않았으나, 입방형의 용모 상피세포의 증식이나 점막 고유층에 림프구등 단핵세포의 침윤은 더욱 현저하였다.

Legends for figures

- Fig 1. Duodenum: Mild villous atrophy, fusion and moderate mononuclear cell infiltration in lamina propria; Finisher. H & E stain, X50.
- Fig 2. Jejunum: Marked cuboidal cell hyperplasia covering the villi; Grower. H & E stain, X50.
- Fig 3. Ileum: Moderate villous atrophy, fusion and moderate edema in lamina propria; Grower. H & E stain, X100.
- Fig 4. Colon: Slight mononuclear cell infiltration in lamina propria; Grower. H & E stain, X50.
- Fig 5. Colon: Weak positive reaction which was limited in the lining epithelium; Grower. Immunoperoxidase stain, X400.
- Fig 6. Jejunum; Marked positive reaction which was limited in the intracytoplasm of the cells in the lining epithelium; Finisher. Immunoperoxidase stain, X400.
- Fig 7. Jejunum: Weak positive reaction in the lining epithelium; Grower. Cryostat section, Immunofluorescence stain, X100.
- Fig 8. Ileum: Marked positive reaction which is limited in the lining epithelium; Piglet. Cryostat section, Immunofluorescence stain X1000.

참고 문헌

1. Avrameas S, Uriel J. Methode De Marquage d'antigenes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *CR Acad Sci* 1966; 262: 2543.
2. Bulter DG, Gall DG, Kelly MH, et al. Transmissible gastroenteritis Mechanisms responsible for diarrhea in an acute viral enteritis in piglets. *J Clin Invest* 1974; 53: 1335-1342.
3. Chasey D, Cartwright SF. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea. *Res Vet Sci* 1978; 25: 255-256.
4. Taylor CR. Immunoperoxidase Techniques. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102: 113-120.
5. Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus CV 777. *Am J Vet Res* 1980; 41: 219-223.
6. Debouck P, Pensaert M, Coussement W. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. *Vet Microbiol* 1981; 53: 157-165.
7. Debouck P, Calle aut P, Pensaert M. The diagnosis of coronavirus-like agent(CVLA) diarrhea in suckling pigs. *Curr Top Ver Med Anim Sci* 1981; 13: 59-61.
8. Ducatelle R, Coussement W, Debouck P, et al. Pathology of experimental CV 777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron Microscopic Study. *Vet pathol* 1982; 19: 57-66.
9. Hiroyoshi K, Tetsuo N, Togo S, et al. passage in piglets of a coronavirus associated with porcine ep-



- idemic diarrhea. *Jpn J Vet Sci* 1988; 41: 169-173.
10. Hofmann M, Wyler R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *Vet Bull(suppl)* 1989; 59: 129.
 11. Hofmann M, Wyler R. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PDEV). *Vet Bull suppl* 1989; 59: 838.
 12. Hooper BE, Haelterman EO. Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. *J Am Vet Med Assoc* 1966; 149: 1580-1586.
 13. Hooper BE, Haelterman EO. Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. *J Am Vet Med Assoc* 1969; 33: 29-36.
 14. Nakane PK, Pierce BG Jr. Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 1966; 14: 929.
 15. Okinawa A, Maeda M. Histopathology of Transmissible gastroenteritis in experimentally infected new born piglets. II. Lesions in organs other than digestive tract and pathologic features of TGE. *Nat Inst Anim Health Q* 1966; 6: 64-72.
 16. Oldham J. Pig farming(suppl) 1972; 72-73.
 17. Pensaert M, Haelterman EO, Burnstein T. Transmissible gastroenteritis of swine: virus-intestinal cell interactions. Immunofluorescence, histopathology and virus production in the small intestine through the course of the infection. *Arch Ges Virusforsch* 1970a; 31: 321-334.
 18. Pensaert M, Haelterman EO, Hinsman EJ. Transmissible gastroenteritis of swine: virus-intestinal cell interactions. II. Electron microscopy of the epithelium in isolated jejunal loops. *Arch Ges Virusforsch* 1970b; 31: 335-351.
 19. Pensaert MB. Porcine epidemic diarrhea. Disease of swine 7th edo Iowa State Uni pres 1992; 293-298.
 20. Pearson GR, McNulty MS. Pathological changes in the small intestine of neonata pigs infected with a pig reovirus-like agent(rotavirus). *J Comp Pathol* 1977; 87: 363-375.
 21. Pensaert MB, Debouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 1978; 28: 243-247.
 22. Pensaert M, Callebaut P, Debouck P. Porcine epidemic diarrhea(PED) caused by a coronavirus: Present knowledge, *Proc 7th Int Congr Pig Vet Soc Mexico City*. 1982; 52.
 23. Pomeroy KA, Patel BL, Larsen CT, et al. Combined immunofluorescence and transmission electron microscopic studies of sequential intestinal samples from turkey embryos and poults infected with turkey enteritis coronavirus. *Am J Vet Res* 1978; 39: 1348-1354.
 24. Pospischil A, Hess RG, Bachmann PA. Light microscopy and ultrahistology of intestinal changes in pigs infected with enzootic diarrhoea virus (EVD): Comparison with transmissible gastroenteritis(TGE) virus and Porcine rotavirus infections. *Zentralbl Veterinaermed* 1981; 28: 564-577.
 25. Schulz G. Diagnosis of epizootic viral diarrhea in swine. *Vet Bull(suppl)* 1988; 58: 328.
 26. Taylor CR. Hodgkin's disease and the Lymphomas. An Res Rev. Eden Press, Montreal(Canada) 1976.
 27. Thake DC. Jejunal epithelium in transmissible gastroenteritis of swine. *Am J Pathol* 1968; 53: 149-168.
 28. Theil KW, Bohl EH, Cross RF, et al. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 1978; 39: 213-220.
 29. Wood EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea. *Vet Rec* 1977; 100: 243-244.
 30. Zepezauer V, Helbing H, Nitzschke B, et al. Experiences in field testing of the direct immunofluorescence test for detecting transmissible gastroenteritis virus and epizootic diarrhoea and rotavirus antigen in conventional and intensive pig production units. *Arch experi Vet* 1987; 41(6): 880-884.
 31. 日高秀造, 子豚の 下痢の 變遷. *J Clin Vet Med* 1989; 7: 40-47.
 32. 정상우, 신종희, 최찬. Immunohistochemistry에 있어서 Peroxidase-Antiperoxidase법과 Biotin-Avidin System법의 비교검토. 대한병리학회지 1983;

17(4): 412-146.

33. 권창희, 권병준, 정태성 등. 돼지 유행성설사 바이러스의 국내분리주 작성에 관한 연구. 대한수의학회지 1993; 33(2): 249-254.

34. 박남용, 조경오, 조성수 등. 돼지 유행성설사 바이러스의 분리동정. 대한수의학회지 1993; 29(6): 360-365.