

Aujeszky's disease virus 국내분리주 접종자돈의 병리발생에 관한 연구

II. 면역조직화학 및 *in situ* hybridization 기법을 이용한 항원과 핵산 검출

조우영 · 조성환* · 박최규** · 김재훈** · 현방훈** · 윤용덕** · 권창희**

충청북도 농축산사업소 가축위생과 · 충남대학교 수의과대학*
수의과학연구소**
(1996년 4월 3일 접수)

Studies on the pathogenesis of Korean isolate of Aujeszky's disease virus in experimentally infected piglets II. Immunohistochemistry and detection of viral nucleic acids by *in situ* hybridization

Woo-young Cho, Sung-whan Cho*, Choi-gui Park**, Jae-hoon Kim**
Bang-hoon Hyun**, Yong-dhuk Yoon**, Chang-hee Kweon**

*Veterinary Service Laboratory, Chungbuk Office of Agriculture and Livestock
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University*
National Veterinary Research Institute***

(Received Apr 3, 1996)

Abstract : This study was conducted to elucidate the distribution of Aujeszky's disease viral nucleic acids and antigens in the central nervous system (CNS) of piglets. The first Korean isolate of Aujeszky's disease virus (ADV) that isolated from naturally infected piglets in Yang San, was inoculated into 32 day old piglets with $10^{5.9}$ TCID₅₀/ml through intranasal or intramuscular route. These piglets were sacrificed at every 24hrs for 8 days. The immunohistochemistry (IHC) was conducted to detect the viral antigens in paraffin-embedded tissue sections using avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method. The viral nucleic acids were detected by *in situ* hybridization (ISH) using ADV specific DNA probe labeled with digoxigenin.

The ADV antigens were detected in reticuloendothelial cells of spleen, lymph nodes and tonsil, alveolar walls, leptomeningeal vascular walls, inflammatory foci of each organ, and nerve cells.

The viral nucleic acids were detected in the spinal trigeminal nucleus and its tracts of the pons and medulla oblongata by the ISH technique.

The pathways of AD viruses in CNS were determined by IHC and ISH. In the intranasally inoculated group, the viruses in nasal mucosa moved to medulla oblongata and pons through the trigeminal nerve. In case of intramuscularly inoculated group, viruses moved to brain via lymphoid organs or spinal nerves from sciatic nerves.

Key words : Aujeszky's disease, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, pathogenesis.

서 론

오제스키병은 Herpesviridae의 subfamily alpha herpesvirinae에 속하는 Aujeszky's disease virus (ADV)의 감염에 의해 발병되는 동물의 전염병으로 돼지¹⁻³를 비롯한 가축과 실험동물⁴ 및 야생동물 등⁵에 감염함으로써 숙주영역이 매우 광범위하다. 근래 세계적으로 양돈산업이 발전하여 기업화되고 국제간에 교역이 증대함에 따라 질병 전파속도가 빨라 현재는 불과 몇 나라를 제외하고는 세계 거의 대부분의 지역에서 발생되고 있다^{2,6}. 우리나라에서는 1987년 6월 경남 양산지역 양돈장에서 처음 발생⁷된 이래 충남 및 경기지역⁷에서도 발생되었고 점차 전국적으로 만연되는 추세에 있어 효능 높은 진단법의 개발과 응용이 요망되고 있다.

오제스키병의 진단에는 일반적으로 많이 이용되고 있는 병리학적 검사⁸, 실험동물 접종시험⁹, 혈청중화시험¹⁰, 바이러스분리동정법⁷ 및 형광항체시험¹¹을 비롯하여, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)¹², radioimmunoassay test¹³, agar-gel immunodiffusion test¹⁴, radial immunodiffusion enzyme assay¹⁵, latex agglutination test¹⁶, skin test¹⁷, immunogold-silver method¹⁸, dot-immunoassay¹⁹, immunoperoxidase test²⁰ 및 *in situ* hybridization^{21,22} 등이 보고된 바 있다. 이들 시험방법 중 면역조직화학법은 조직절편내에서 원인체 항원을 직접 검출하는 방법으로서 원인체 분리동정 없이 단시간 내에 확진이 가능하여 오늘날 각종 질병의 진단법으로 개발되어 사용되고 있다. Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)법은 1981년에 Hsu와 Raine²³에 의해 소개되었으며 뛰어난 민감성과 항원부위와 대조적으로 배경 염색성이 적으며 높은 항체 희석배수에서도 특이적이라고 보고하였다.

김 등²⁴은 ABC법의 주요优点是 peroxidase-anti-peroxidase (PAP)법에 비하여 광범위하게 적용할 수 있으며 어떤 biotinylated substances도 ABC법에 의하여 검출이 가능하다고 하였다.

최근 바이러스성 질병의 진단에 있어 *in situ* hybridization (ISH)기법은 높은 감수성과 특이성을 보이는 신속한 진단수단으로 알려지고 있으며 원인 바이러스의 분리동정을 거치지 않고 조직절편상의 감염세포내에서 바이러스 핵산을 동정하는 방법으로서, 바이러스가 복제되고 있는 급성 감염기 뿐만 아니라 잠복감염 상태에서도 검출이 가능하며 또한 바이러스에 감염된 세포가 조직절편내 단 한 개만 존재하더라도 검출이 가능하고 조직 형태학적 구조를 그대로 유지하면서 바이러스 존재부위를 확인할 수 있는 장점을 가지고 있어 오늘날 조직절편내 핵산검출법으로 연구되고 있다^{21,22,25,26}.

ISH probe labeling은 표지물질에 따라 방사선 동위원소(³²P, ³⁵S, ¹²⁵I)를 표지하는 방법과 비방사성 물질(biotin, digoxigenin 등)을 표지하는 방법으로 대별할 수 있다^{27,28}. Zeph *et al*²⁹은 방사성물질 표지 probe와 3종의 비방사성 표지 probe를 비교 실험한 결과 방사성물질 표지 probe는 비방사성 표지 probe에 비해 민감도는 높으나 위양성 반응이 많으며, 결론적으로 사용의 용이함과 안정성, 보존성, 신속성, 특이성, 경비 등을 고려해 볼 때 비방사성 probe가 방사성 probe보다 우수하였다고 보고한 바 있다. 이 외에도 많은 연구자들이^{26,29,30} 이와같은 이유로 낮은 민감도에도 불구하고 비방사성 probe를 선호하고 있다. 따라서 비방사성 probe를 이용한 ISH는 통상적으로 처리된 조직이나 세포학적 조직표본에서 세균이나 곰팡이성 병원체뿐만 아니라 바이러스를 검출하는데 병리조직실�험실에서 채택되고 있다^{31,32}.

오제스키병의 자연감염시 바이러스의 일차 증식부위는 비인두와 편도의 상피세포이다^{22,33}. Pol *et al*³⁴은 구비강상피세포 기질에는 많은 혈관과 삼차신경가지, 후각신경(olfactory nerve) 및 자율신경이 존재하므로 이들을 경유하여 바이러스가 중추신경계로 침범할 수 있다고 기술하였으며, McFerran과 Dow³⁵는 실험적으로 돼지에 ADV를 비강에 접종시 바이러스가 상부호흡기도에서 뇌로의 전달은 48시간 내지 72시간에 일어났으며, 바이러

상의 중추신경으로의 전염경로는 비강에서 olfactory nerve를 경유하여 후구(olfactory bulb)와 설인신경에 의해 연수의 고립로핵 (nucleus solitarius)으로 이동하거나 또 다른 경로는 삼차신경에 의해 뇌교 및 연수에 전파된다고 하였다. 김 등²² 은 동위원소 α -³²P로 표시한 DNA probe를 사용하여 ADV 인공감염 랫드의 조직절편에서 ISH를 실시한 결과 연수 및 교뇌의 신경세포 및 편도선 상피세포에서 주로 양성반응이 관찰되었다고 하였다.

ADV는 다른 alpha herpesvirinae와 같이 double-stranded DNA로 구성되었고 그 크기는 약 150 Kb이며 20종 이상의 구조단백질을 가지고 있으며 이중 5~6종의 당단백질이 바이러스입자내에 부착되어 있고, 직경은 110~150nm, 분자량은 $68\sim 70 \times 10^6$ daltons, 비중은 1.278g/cm³로 보고되어 있다^{36,37}. ADV에 존재하는 당단백질 성분은 바이러스감염, 항체형성 및 병원성과 이를 이용한 백신 가능성 등으로 중요시되고 있는 만큼 정확한 유전자 부위의 선택은 원인 바이러스를 검출하는데 특이적일 수 있다^{38,39}.

본 연구에서는 국내에서 오제스키병 최초 발생지인 경남 양산에서 자연발생된 돼지에서 분리한 바이러스주를 돼지의 비강 및 근육접종한 다음, 면역조직화학 및 ISH 기법을 이용하여 시간경과에 따른 조직내 바이러스 항원 및 핵산을 관찰함으로써 오제스키병의 병리발생을 구명하고자 일련의 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 일반 농가에서 사육된 외견상 건강한 32일령 랜드레이스 자돈 20두를 접종전에 혈청중화시험법¹⁰으로 오제스키병 항체음성임을 확인한 후 실험에 공시하였다. 실험동물은 외부로 격리된 장소에서 자유로이 물과 사료를 공급하였다.

세포주 및 바이러스 : 바이러스 분리 및 증식을 위해서 돼지 신장세포주인 porcine kidney cell line(PK-15)을 사용하였다. 세포배양액은 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco, USA)에 우태아 혈청(Gibco, USA)을 실험에 따라 5~10%되게 가하고 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin sulfate(100mg/ml)를 첨가하여 사용하였다. 접종용 ADV는 이 등²이 경남 양산에서 이환자돈으로부터 분리한 양산주(YS strain)로 PK-15 cell line에 3대 계대증식시켜 10^{5.9} tissue culture infective dose

50(TCID₅₀)/ml로 측정된 바이러스를 사용하였다.

실험계획 : 자돈 20두를 비강접종군 10두, 근육접종군 8두, 대조군 2두씩을 암·수 구분 없이 배치하고 비강접종군은 공시 바이러스 2 ml를 1회용 주사기를 사용하여 양쪽 비강에 각 1 ml씩 주입하였으며, 근육접종군은 공시 바이러스 2 ml를 양쪽 대퇴부 안쪽 중앙부인 내전근(adductor muscle)에 각 1 ml씩 접종하였다. 대조군은 2두 중 1두는 양쪽 비강에 EMEM을 각 1 ml씩 주입하였고 나머지 1두는 양쪽 내전근에 EMEM을 각 1 ml씩 접종하였다(Table 1). 비강 및 근육접종군은 공히 24시간 간격으로 매일 1두씩 외견상 증상이 심한 자돈을 선별하여 도살하고, 폐사돈은 폐사즉시 부검하였으며 대조군은 8일째에 도살한 후 각각의 실질장기를 채취하였다.

Table 1. Experimental design of virus inoculation

Inoculation routes	Inoculum	Virus titers	Vol of inoculum(ml)	No of piglets
IN	ADvirus*	10 ^{5.9} TCID ₅₀ /ml	2.0	10
IM	"	"	"	8
IN(control)	EMEM**	-	-	1
IM(control)	"	-	-	1
Total				20

IN:Intranasal * Aujeszky's disease

IM:Intramuscular ** Eagle's minimum essential medium

면역조직화학법 : 조직내 ADV 항원을 검출하기 위하여 각 실질장기를 10% 중성포르말린용액에 고정한 후 수의 과학연구소에서 분양받은 ADV monoclonal antibody(MoAb)와 avidin-biotin complex kit(Vector Lab, USA)를 이용하여 면역염색을 실시하였다. 파라핀포매된 조직은 3~4 μ m로 절편하여 organosilane으로 처리한 Probe on plus slides(Fisher Biotech, USA)상에 부착한 후 xylene으로 탈 파라핀 시킨다음 100% 알코올에서 탈파라핀액을 제거하였고 흡수과정을 거친 후 중류수로 5분간 세척하였다. 배경염색을 유발하는 조직내 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 신신하게 제조한 0.3% H₂O₂를 포함한 메칠알코올에 30분간 반응시킨 후 0.01M phosphate buffered saline(PBS)에 10분씩 2회 수세하였다. 이어서 조직과 항혈청사이의 비특이반응을 억제시키기 위해 희석한 normal goat serum으로 20분간 반응시킨 다음 여분의 혈청을 여과지로 흡착 후 1차 항체인 ADV MoAb를 1 : 200 으로 희석하여 60분간 반응시킨 후 PBS로 10분간 수세하였다. 2차 항체처리하는 희석한

biotinylated anti-mouse IgG로 30분간 반응시킨 다음, PBS로 10분간 수세하였다. 그후 ABC reagent로 30분간 반응시킨 후 PBS로 10분간 수세하였으며, DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) substrate(Vector Lab, USA) 용액에 2~7분간 발색시킨 후 증류수로 5분간 수세하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시한 후 수세, 탈수, 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

DNA probe의 작성 : ADV 국내분리주(YS strain)의 구조단백질 gp 50 및 gp 63의 염기서열 (1045-2149)에 해당하는 1.2Kb의 DNA 단편을 수의과학연구소로부터 분양받았으며, 이 1.2 Kb의 DNA 단편을 PTZ 19 R plasmid (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)에 삽입하였고, DH5 α competent cell(Gibco BRL, USA)에 형질전환시킨 다음, LB(Luria Bertani) broth에 접종하여 37 $^{\circ}$ C shaking incubator에서 하룻밤 배양한 후 균체를 수확하였다. 수확한 균체로부터 plasmid DNA를 정제한 다음 Kpn I 제한효소로 처리한 다음 전기영동으로 1.2 Kb의 해당 밴드를 확인하였다. 밴드에 해당하는 겔에서 정제한 DNA는 spectrophotometer로 핵산량을 측정한 다음, -20 $^{\circ}$ C에 보관하여 사용하였다^{30,40}.

DNA probe의 표지는 추출 정제한 1.2 Kb DNA 단편을 Dig-DNA labeling and detection kit(Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)를 이용하여 표지하였다. 즉, 정제한 DNA 단편 1 μ g에 해당하는 용량 5 μ l를 미세시험관에 분주하여 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하고 즉시 얼음에 넣어 식힌 다음 hexanucleotide mixture 2 μ l와 dNTP labeling mixture 2 μ l 그리고 멸균 증류수를 가하여 용량을 19 μ l로 맞추었다. 1 μ l의 Klenow enzyme을 가한 후 수초동안 원심하였고 37 $^{\circ}$ C에서 20시간 배양하여 반응시킨 다음, 20 μ l의 EDTA용액(0.2mM, pH 8.0)을 가하여 반응을 정지시켰다. 표지된 DNA는 LiCl과 에탄올로 침전 수거한 후 소량의 멸균 증류수에 용해하였고 spectrophotometer로 정량한 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용하였다.

DNA probe의 특이성 검사 : 작성된 probe의 ADV에 대한 특이성을 조사하고자 3종의 바이러스 즉, porcine parvovirus(PPV), hog cholera virus(HCV) 및 Japanese encephalitis virus(JEV)를 공시하여 윤 등³⁰의 방법에 준하여 slot blot hybridization을 실시하였다. 즉, 4종의 바이러스를 2 \times SSC(standard sodium citrate)로 10²에서 10⁶으로 단계 희석한 다음, 동량의 1M NaOH와 2M NaCl을 가하여 10분간 실온에서 정치시킨 다음, 20 \times SSC에 미리 적신

NC(nitrocellulose) membrane에 microfiltration units(Bio-Rad, USA)를 사용하여 접종하였다. 접종한 NC membrane을 1M Tris-HCl(pH 7.0)과 2M NaCl에 3분동안 중화시킨 다음, gel dryer(Hoffer Sci, USA)로 80 $^{\circ}$ C에서 2시간 처리하여 DNA를 흡착시켰다. 흡착시킨 NC membrane과 hybridization buffer(5 \times SSC ; 1% blocking solution ; 0.1% N-lauroylsarcosine ; 0.02% sodium dodecyl sulfate) 20ml를 밀봉 유리관에 넣고 hybridizer(Techne Inc, USA)를 사용하여 68 $^{\circ}$ C에서 1시간 전처리하였고 ADV probe를 함유(50ng/ml)하는 hybridization buffer 10ml와 함께 68 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다. hybridization이 끝난 membrane을 buffer 1(maleic acid 0.1M ; NaCl 0.15 M, pH 7.5 adjusted with concentrated NaOH)로 1~2분간 간단히 세척한 후 100ml의 buffer 2(1% blocking solution ; Boehringer Mannheim, Germany)에 30분간 정치하였다. buffer 2로 150mU/ml(1:5000)가 되도록 희석한 anti-digoxigenin alkaline phosphate conjugate 용액 20ml와 membrane을 30분간 실온에서 반응시켰다. buffer 1로 세척하여 unbounded antibody conjugate를 제거한 다음, buffer 3(Tris-HCl, 100mM ; NaCl, 100mM ; MgCl₂, 50mM ; pH 9.5 at 20 $^{\circ}$ C)에 20분동안 정치시켰고 color substrate(45 μ l NBT solution ; 35 μ l X-phosphate in 10ml buffer 3)에 정치하여 발색을 관찰하였다.

In situ hybridization : 해당 파라핀포매조직을 3~4 μ m로 절편하여 Probe on plus slides상에 부착한 다음 Micorbe staining system (Fisher Sci)을 이용하여 ISH를 실시하였다. 먼저 조직 슬라이드를 70 $^{\circ}$ C 배양기에서 30분간 열처리하여 파라핀을 용해한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 xy-lene액으로 탈 파라핀시킨 다음, 100% 알코올로 실온에서 10분간 탈파라핀액을 제거하였고 함유과정을 거친 후 5mM MgCl₂함유 PBS로 실온에서 5분간 2회 세척하였다. 이어서 0.2M HCl에서 10분간, PBS로 5분간 2회, 0.01M Triton X-100을 함유한 PBS 용액에서 2분간 처리하였고 배양기를 30 $^{\circ}$ C로 조정한 후 PBS로 5분간 세척하였다. 이어서 probe의 침투를 용이하게 할 목적으로 단백효소 전 처리는 P buffer(50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH 7.6) 용액으로 42 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리하였고, 단백효소 처리는 proteinase K(Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)가 함유(0.1mg/ml)된 P buffer로 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 작용시켰고, 효소반응 억제제를 위하여 0.2% glycine을 함유한 PBS로 실온에서 10분간 세척한 다음, PBS로 5분간 세척하였다. 조직내 효소를 감소시킬 목적으로 20%(v/v) aqueous acetic

acid로 4℃에서 15초간 처리한 후 PBS로 실온에서 5분간 세척하였다. 후고정은 4% paraformaldehyde로 실온에서 5분간 고정된 후 PBS로 10분간 세척하였고 이어서 70%, 90%, 100% 알코올에서 각 5분씩 탈수하였다. 비특이적인 융합방지를 위하여 prehybridization(1)용액으로 42℃에서 15분간 융합전 배양을 한 후 융합과정에 들어갔다. 융합 과정은 hybridization 용액(2)을 조직 슬라이드에 가하고 커버슬립을 덮고 밀봉한 후 100℃에서 18분간 처리한 다음, 즉시 얼음에 넣어 식힌 후 42℃ 습상에 넣어 하룻밤 배양 하였고, 45% formamide가 함유된 6 x SSC로 15분씩 2회, 실온에서 2 x SSC로 5분씩 2회, 50℃에서 0.2 x SSC로 15분씩 2회 세척하였다. DNA 검출과정은 buffer 1(0.1M Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.9)로 실온에서 1분간 세척하였고, 조직내 단백질 배양을 위하여 buffer 1에 0.5% blocking reagent(Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)를 함유한 용액(buffer 2)으로 30분간 작용시킨 다음, buffer 1로 1분간 세척하였다. 항체처리는 antibody conjugate (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)를 buffer 2로 500 : 1로 희석하여 실온에서 30분간 작용시킨 후 buffer 1로 15분씩 2회 세척하였다. 안정화를 위하여 buffer 3(100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl, pH 9.5)으로 2분간 작용시킨 후 발색액 (3)을 가하여 습상에서 하룻밤 발색시킨 다음 발색정지를 위하여 buffer 4(100mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.1)로 5분간 작용시켰다. 대조 염색은 hematoxylin으로 2분간 염색한 다음 유수로 1분간, 증류수로 5분간 세척후 crystal mount(Biomedica Corp, USA)로 wet mounting하였고, 60℃의 oven에서 건조시킨 다음 검경하였다.

(1) prehybridization buffer :

20× SSC ; 300µl, formamide ; 450µl
50× Denhardt's sol ; 100µl, salmon sperm ; 10 ng/ml
distilled water(DW) to 1000µl

(2) hybridization buffer :

20× SSC ; 300µl, formamide ; 450µl
50× Denhardt's sol ; 100µl, 50% dextran sol ; 100µl
probe DNA ; 100ng/100µl , DW to 1000µl

(3) 발색액 : 337.5µg/ml NBT, 175µg/ml X-phosphate(BCIP) in buffer 3

결 과

면역조직화학적 소견 :

(비강점종군)

2일째 : 감염후 2일에는 비점막상피세포의 변성과 입방화가 관찰되었던 상피세포의 핵 또는 세포질에서 암갈색의 양성반응이 나타났다.

3일째 : 비강의 비점막상피세포와 점막고유층까지 양성반응이 확대되어 있었으며 일부 고유층 내부로 침윤한 호중구에서도 간간이 양성반응이 관찰되었다. 폐장에서는 피사성 세기관지염이 관찰되었던 세기관지고유층내에 침윤한 단핵구의 세포질과 소상피사가 있었던 폐포벽 주위에 침윤되어 있는 폐포대식세포, 림프구의 핵 또는 세포질내에서 강한 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig 1). 일부에서는 피사병변을 나타내어 종창되어 있는 혈관내피세포와 소수 붕괴되고 있는 호중구에서 양성반응이 나타났다. 편도에서는 림프소절내 림프구의 붕괴가 진행되고 있는 주변의 림프아세포의 세포질과 부피질영역에 증식되어 있는 세망내피세포의 핵 또는 세포질내에서 양성반응이 관찰되었다. 곳에 따라서는 편도음와상피세포의 세포질에서도 양성반응이 나타나고 있었다(Fig 2). 비강에서는 혈관내피세포 및 적수에 분포한 세망내피세포에서도 양성반응이 관찰되었다.

4~5일째 : 폐장은 섬유소성 피사병변이 더욱 확대되어 있었고 면역염색 양성반응도 더욱 광범위하게 관찰되었다. 혈관내피세포, 기관지상피와 고유층내 단핵세포, 폐포벽에 침윤된 대식세포 및 증식된 섬유아세포 등에서 양성반응이 현저하게 나타났으며, 일부의 폐포강에서는 탈락된 폐포상피세포의 핵 및 세포질과 침윤된 폐포탐식세포의 세포질에서도 양성반응을 관찰할 수 있었다. 간장에서는 portal triad 부위에 분포하고 있는 혈관벽에서 뚜렷한 양성반응이 관찰되었고, 동양모세혈관의 내피세포와 소상피사소 주위의 간세포 핵과 Kupffer cell에서도 양성반응이 관찰되었으며 간문맥에서의 피사소에서도 양성반응이 확산된 모습이 관찰되었다. 삼차신경절에서는 신경절세포와 간질내에 침윤된 단핵구 계통의 세포에서 중등도의 양성반응이 관찰되었고, 삼차신경에서는 신경섬유에서 경미한 양성반응이 관찰되었다. 중추신경계에서는 피사병변이 있거나 염증반응이 관찰되는 부위에서 양성반응이 관찰되었다. 뇌간, 대뇌의 측두엽, 소뇌 및 척수에서는 변성과정에 있는 신경세포와 신경교세포의 핵 또는 세포질에서 중등도의 양성반응이 관찰되었다(Fig 3). 소뇌 및 대뇌의 지주막하강에 위치한

혈관과 혈관 주위에서 양성반응이 관찰되었다. 중뇌와 연수에서는 삼차신경척수핵 부위의 변성, 위축되어 있는 신경세포의 핵 또는 세포질에서 양성반응이 관찰되었고, 일부 신경세포의 돌기 또는 신경섬유에서도 미약한 양성반응이 관찰되었다.

6~7일째 : 중추신경계에서는 양성반응이 상당히 진전되어 있었다. 대뇌 및 소뇌의 연막혈관과 뇌막에 침윤된 림프구를 포함한 단핵구 계통에서 강한 양성반응이 관찰되었고, 일부 비화농성뇌막염이 뇌실질로 침윤해 들어가고 있는 부위에서도 양성반응이 관찰되어 병변의 확산과 오케스키병바이러스 항원의 검출이 대체로 일치하였다. 소뇌의 Purkinje 세포의 과립세포층에 소상괴사소가 관찰되었던 부위와 분자층, Purkinje 세포층, 과립세포층 및 혈관 주위에서 양성반응이 관찰되었다. 뇌염병변이 진행되어 있는 부위의 단핵세포와 소교세포증을 나타내고 있는 림프구 또는 단핵구에서도 양성반응이 관찰되었다(Fig 4). 척수에서는 회백질에 괴사된 신경세포와 신경교세포, 혈관주위 단핵구 및 경미한 뇌막염 소견을 나타내는 부위에서 양성반응이 관찰되었다.

8일째 : 뇌교 부근 제4뇌실의 맥락막층에 다량 침윤되어 있는 림프구에서 양성반응이 관찰되었고, 신장피질의 간질조직에 침윤되어 있는 림프구에서도 강한 양성반응이 관찰되었다.

(근육접종군)

2일째 : 비장의 배중심 주변의 림프아세포와 적비수내에 증식된 세망내피계 세포 및 소상괴사소 주변의 단핵세포에서 암갈색의 양성반응을 관찰할 수 있었다.

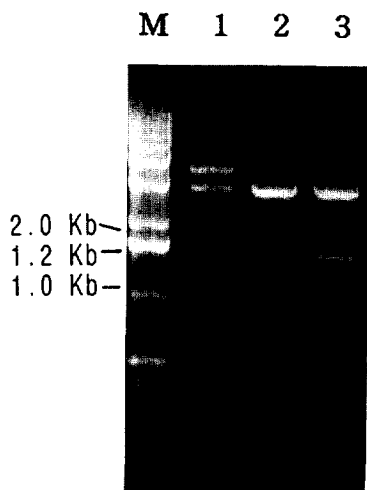
3일째 : 중추신경계의 뇌교와 중뇌에서는 삼차신경척수핵의 괴사된 신경세포와 주변의 신경교세포에서 양성반응을 관찰할 수 있었다. 일부 신경섬유에서는 섬유질의 주행 방향에 따라 경미하지만 양성반응을 관찰할 수 있었다.

4일째 : 폐장의 괴사된 폐포벽 주위의 폐포대식구와 폐포상피세포에서 양성반응이 관찰되었다. 일부 소엽의 변성, 괴사된 혈관벽과 종창된 혈관내피세포에서도 반응이 있었으며, 폐포강에 탈락 붕괴된 폐포상피세포와 호중구에서도 양성반응을 확인할 수 있었다. 악하림프절에서는 피막하동, 소주주위동, 수질동에 분포하고 있는 세망내피계 세포와 침윤된 대식세포의 핵과 세포질에서 양성반응이 관찰되었다. 또한 섬유소가 동반된 피

사소의 주변에 침윤되어 있는 대식세포와 부피질 영역에 증식되어 있는 세망내피계 세포에서도 양성반응이 관찰되었다. 중추신경계의 뇌교, 중뇌 및 연수에서는 비화농성 뇌염 소견이 있는 부위의 림프구와 신경교세포에서 양성반응이 관찰되었다. 기타 장기로는 간장내 분맥혈관 주위와 동양모세혈관의 내피세포 및 근육접종 부위의 변성, 괴사되는 혈관벽에서도 양성반응이 관찰되었다.

5~6일째 : 중추신경계에서는 뇌의 전반에 걸쳐 양성반응이 관찰되었다. 대뇌와 소뇌의 지주막하 혈관과 침윤된 림프구 및 단핵구에서 양성반응이 나타났으며, 각각의 뇌에서 변성 과정에 있거나 핵내봉입체를 함유하고 있는 신경세포와 성상세포의 핵 또는 세포질내에서 중등도의 양성반응이 관찰되었다. 뇌실질에 분포하고 있는 혈관 주위에 심하게 침윤되어 있는 단핵구 계통의 세포와 뇌신경섬유의 괴사부위에 모여 있는 성상세포, 탐식세포의 세포질내에서도 강한 양성반응을 관찰할 수 있었다. 척수의 경수와 요수에서는 복각에 위치한 괴사된 신경세포 주변의 신경교세포에서도 양성반응이 관찰되었다. 일부 뇌연화가 진행되어 있는 부위에 괴사되는 신경세포와 대식세포에서 양성반응이 관찰되었으며, 병변이 더욱 진행된 위관선원형세포침윤이 있는 혈관주위 단핵세포와 소교세포층 부위에서도 관찰할 수 있었다(Fig 5). 좌골신경에서는 신경섬유 사이 간질에 침윤되어 있는 단핵구의 세포질 내에서 양성반응이 관찰되었다(Fig 6).

ISH 기법을 이용한 조직내 핵산 검출 : 조작한 DNA probe의 특이성을 검사하기 위하여 클론된 DNA를 plasmid에 삽입한 후 DH 5a competent cell에 형질전환시킨 다음 배양서포로부터 plasmid를 재분리하고 클론된 해당 DNA를 정제한 후 효소 처리하여 한천젤전기영동한 결과 Lane 3에서 보는 바와 같이 1.2Kb DNA insert(PK12)를 확인할 수 있었으며(Text-fig 1), 4종의 바이러스(HCV, PPV, JEV, ADV)의 핵산을 노출시킨 다음, digoxigenin-labeled ADV-DNA(PK 12)로 slot blot hybridization한 결과 Text-fig 2와 같이 ADV에 대해서만 특이적으로 반응하였다. digoxigenin이 표지된 ADV-DNA probe를 이용하여 중추신경계, 삼차신경절 및 삼차신경에 대하여 ISH기법으로 핵산을 검출하였던 바, 뇌교와 연수에서는 명확한 양성반응을 관찰할 수 있었으나, 삼차신경절과 삼차신경에서는 뚜렷한 반응상을 관찰할 수 없었다. 비강접종군에서는 뇌교의 삼차신경중뇌핵



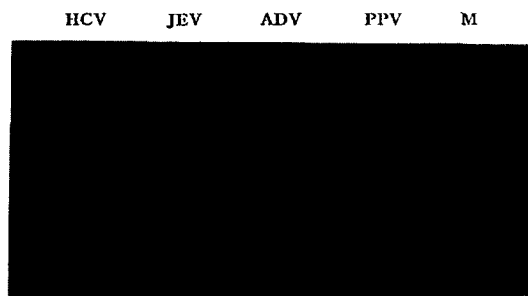
Text-fig 1. The 1.2 Kb DNA insert of cloned Aujeszky's disease viral gp50 and gp63 by restriction endonuclease and its electrophoretic pattern in 1% agarose gel. Lane M : standard DNA marker (1Kb ladder). Lane 3 : plasmid with 1.2 Kb insert. Lane 1, 2 : other DNA inserts.

부위의 신경로, 삼차신경척수핵의 신경세포 및 신경섬유 다발과 일부 슬기핵에서 양성반응을 관찰할 수 있었다 (Fig 7). 연수부위에서는 삼차신경척수핵의 신경세포 및 신경섬유다발에서 과립상의 강한 양성반응이 관찰되었다. 근육집중군에서도 비강집중군과 유사하게 관찰되어 연수 및 뇌교의 삼차신경척수로와 삼차신경척수핵에서 과립상의 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig 8).

고 찰

오제스키병의 전파는 접촉과 경구감염이 주요 감염경로이며 감염돈이나 만성감염돈이 전파에 중요한 역할^{1,6}을 하며, 비인두상피세포는 바이러스의 표적세포이며 복제가 최초로 시작되는 부위라고 보고하였고^{34,41}, 실험적으로 비강내 접종이 임상증상을 일으키는데 가장 중요한 경로인 것으로 판명되었다고 하였다⁴².

본 실험에서는 선인들의 연구에서 나타난 바와 같이 주 감염경로인 비강내 접종경로와 아울러 국내 분리주에 대한 근육내 접종실험 예가 없는 점을 감안하여 근육내 접종경로를 택하였고, 자연감염상태 수준의 바이러스 역가⁴³인 $10^{5.9}$ TCID₅₀/ml를 접종역가로 하여 실험에 공시함으로써 바이러스주의 돼지에 대한 병원성 및 병리



Text-fig 2. Specificity of ADV-DNA probe labeled with digoxigenin by slot blot hybridization using nucleic acids from HCV, JEV, ADV, PPV infected cells and control pk-15(M) cells, respectively.

발생을 구명하고자 하였다.

면역조직화학적 소견에 관해서 Ducatelle *et al*²⁰은 돼지의 자연발생예에서 immunoperoxidase법으로 검사하였던 바 소뇌, 편도, 구강 및 비강점막, 타액선, 폐장, 간장, 췌장, 비장 및 부신에서 양성반응 세포를 관찰하였고 항원은 주로 피사 주변부에 많이 존재하였으나 microglial nodule, 위관성원형세포침윤 및 뇌막 단핵세포침윤이된 조직에서는 바이러스 항원이 일반적으로 없었다고 보고하였다. 김 등²⁴은 국내분리주의 비강집중돈에서 ABC법으로 검사한 바 항원은 집중후 7일째 편도, 비장, 대뇌 및 buffy coats에서 관찰되었고 주로 감염된 장기의 림프구 및 대식구에서 인정할 수 있었다고 보고하였다. Belák *et al*⁴⁴은 비강집중돈에서 PAP법으로 항원검출을 시도한 바 비점막, 편도, 폐장, 후구, 삼차신경절, 소뇌 및 대뇌에서 항원이 관찰되었으나 간장과 비장에서는 관찰되지 않았다고 하였다. 진 등⁸은 국내분리주의 비강집중돈에 대한 검사결과 편도선에서는 crypt 상피세포와 비장의 세막내피세포에서 주로 양성반응이 관찰되었고, 뇌에서는 neuron 및 혈관내피세포에서 관찰된 것으로 보아 국내분리 오제스키병 바이러스는 편도선에서 일차 증식한 후 신경계로 침입한다고 기술하였다.

본 실험에서는 선구자들의 연구결과와 대체로 일치하였으나 Belák *et al*⁴⁴이 간장과 비장에서는 양성반응을 관찰할 수 없었고, Ducatelle *et al*²⁰은 microglial nodules, 원형세포침윤 및 뇌막 단핵세포침윤된 조직에는 항원검출이 일반적으로 관찰되지 않았다고 한 연구결과와는

차이가 있었다.

근육접종군의 경우 ADV의 분포 및 중추신경계로의 이동경로는 접종부인 내전근에 분포하고 있는 좌골신경 가지를 따라 척수를 경유하여 뇌로 전파되는 양상을 나타내리라고 예상하였으나 본 실험에서는 비교적 다른 결과를 나타내었다. 즉, 접종 2일에는 림프장기인 비장의 림프아세포, 세망내피계 세포 및 단핵세포에서 양성반응이 먼저 관찰되었고, 뇌에서는 접종 후 3일부터 뇌교와 중뇌에서 양성반응이 관찰되었으나 척수에서는 관찰되지 않았다. 접종후 4일부터는 악하림프절의 세망내피계와 침윤된 대식세포에서 양성반응이 관찰되었고 중추신경계에서는 뇌교, 중뇌 및 연수 등으로 양성반응이 확산되는 양상을 나타내었으며, 접종 후 5-6일에는 뇌의 전반에 걸쳐 양성반응이 관찰되었고 좌골신경과 척수에서도 양성반응을 관찰할 수 있었다. 따라서 근육접종군의 경우는 접종부의 혈관이나 림프관 등을 거쳐 비장 및 림프절로 전파한 후 림프장기에 분포한 말초신경을 경유하여 중추신경계로 전파될 뿐만 아니라 점차 시간이 경과할수록 접종부의 좌골신경을 경유하여 척수 및 뇌로 확대되는 두가지 전파경로를 취하는 것으로 사료된다.

ISH법을 이용한 조직내 핵산검출조건에 관해서 오제스키병 잠복감염에 대한 통상적인 조직절편 검사에서 면역조직화학법으로는 capsid antigen이 종종 결여되는 경우에도 ISH 기법은 조직절편내에서 미량의 바이러스 입자를 검출하는데 민감하고 특이성이 있는 방법이며 잠복감염된 바이러스를 검출하는데 적합한 진단법⁴⁵이라고 기술하였다. Gravit와 Manos⁴⁶는 radioactive probe는 높은 민감도의 잇점은 있으나 취급과 처분하는데 특별한 배려와 실험실 감시가 요청되며 장기간 저장이 불가능하고 빈번한 합성이 요구되는 반면 nonradioactive probe는 안정성과 장기간의 보존이 가능하다고 기술하였다. 본 실험에서는 국내에서 오제스키병 최초 발생지인 경남 양산에서 자연발생된 돼지에서 분리한 YS strain의 유전자중 gp 50 및 gp 63(염기서열 1045-2149)에 해당하는 1.2Kb의 DNA 부위를 digoxigenin으로 표지한 nonradioactive ADV-DNA probe로 통상적으로 파라핀포매된 조직절편내에서 오제스키병바이러스 핵산을 확인하였다.

Pol et al²⁴은 비점막 배양조직에 접종한 후 24시간에 바이러스 항원 및 핵산이 상피세포 및 기저세포(stromal cell)의 핵 내 세포질에서, Bel á k et al⁴⁴은 바이러스 핵산은 비점막, 편도, 기관지점막, 폐장, 삼차신경절 및

CNS의 각기 다른 부위에서 검출하였다고 하였으며, 면역염색시 항원 검출부위와 다소 상이한 결과는 바이러스 분포가 고르지 않거나 ISH기법은 검출표적이 바이러스 핵산인 반면 면역염색은 바이러스 항원이기 때문이라고 보고하였다.

본 실험에서는 주로 중추신경계와 일부 뇌신경에 국한해서 ISH기법으로 조직내 ADV-DNA를 검출한 바 뇌교와 연수에서 명확한 양성반응을 관찰할 수 있었으며 이는 면역조직화학법에서의 항원부위와 일치하는 소견이었다.

국내에서의 ISH기법을 응용한 연구보고는 수편에 불과하며 probe의 조작 및 검출과정이 까다로운 점이 많아 금후 더욱 간편하면서 민감도에서나 취급이 안전한 non-radioactive probe를 개발할 것이 요망된다. 또한 오제스키병의 진단을 위해서 중추신경계에서는 주로 뇌간에 해당하는 뇌교, 중뇌 및 연수부위와 중추신경계를 제외한 실질장기에서는 편도, 폐장, 악하림프절 및 비장부위를 선정하여 검사하면 진단 효율이 높을 것으로 사료된다.

결론

오제스키병 바이러스의 국내분리주(YS strain)를 $10^{5.9}$ TCID₅₀/ml 농도로 조정하여 32일령 자돈에 비강 및 근육접종한 후 경시적으로 면역조직화학법(ABC kit)으로 바이러스 항원의 분포를 파악하고 국내분리주로 조작한 digoxigenin-labeled DNA probe를 이용하여 *in situ hybridization*법으로 조직내 바이러스 핵산을 검출하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

면역조직화학법으로 검사한 바 ADV 항원은 비장, 림프절 및 편도의 망상내피세포, 폐포벽, 연막혈관벽, 신경세포 및 각 장기의 염증병소에서 관찰되었다.

*In situ hybridization*법으로 조직내 핵산을 검출한 바 중추신경계의 뇌교 및 연수의 삼차신경척수핵의 신경세포 및 삼차신경 척수로에서 주로 관찰되었다.

면역조직화학 및 *in situ hybridization*법을 병행하여 실험한 결과 오제스키병 바이러스의 분포 및 중추신경계에로의 이동경로는 비강으로 주입된 바이러스는 비강점막에 분포되어 있는 삼차신경가지를 따라 중추신경계로 흡수되어 연수 및 뇌교로 이동하며, 근육접종군에서는 림프장기 또는 좌골신경가지를 따라 척수신경을 경유하여 뇌로 이동함을 확인할 수 있었다.

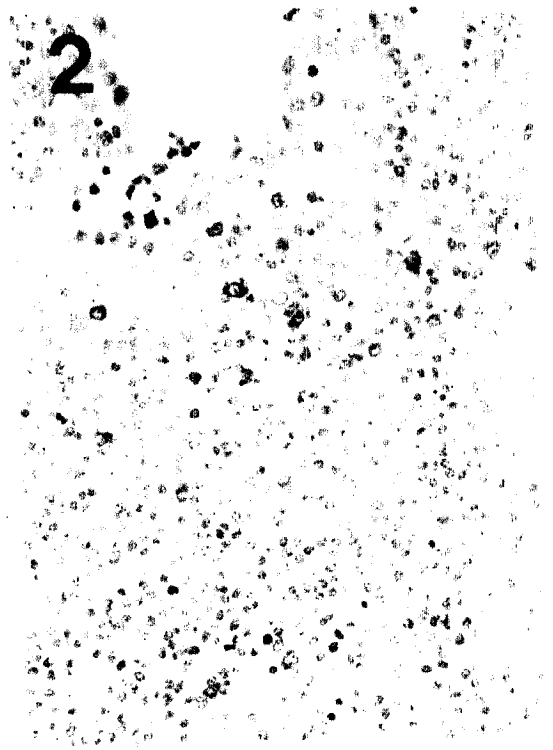
Legends for figures

Immunohistochemical findings

- Fig 1. Lung of the ADV infected piglet(IN), day 3 postinoculation(PI), showing positive reaction of viral antigens in mononuclear cells and alveolar macrophages. ABC stain, $\times 100$.
- Fig 2. Tonsil of the ADV infected piglet(IN), day 3 PI, showing positive reaction of viral antigens in crypt epithelia and mononuclear cells. ABC stain, $\times 200$.
- Fig 3. Midbrain of the ADV infected piglet(IN), day 5 PI, showing moderate positive reaction of viral antigens in degenerated neurons(arrow). ABC stain, $\times 400$.
- Fig 4. Thalamus of ADV infected piglet(IN), day 7 PI, showing positive reaction of viral antigens in glial foci(arrow). ABC stain, $\times 400$.
- Fig 5. Spinal cord of the ADV infected piglet(IM), day 6 PI, showing strong positive reaction of viral antigens in perivascular cuffing area(arrow). ABC stain, $\times 400$.
- Fig 6. Sciatic nerve of the ADV infected piglet(IM), day 6 PI, showing positive reaction of viral antigens in infiltrated lymphocytes(arrow). ABC stain, $\times 400$.

Localization of ADV-DNA in the piglet brains

- Fig 7. Localization of ADV-DNA in the nucleus tract of the mesencephalic nerve trigemini by *in situ* hybridization with digoxigenin-labeled DNA probe. $\times 40$.
- Fig 8. Localization of ADV-DNA in the spinal nucleus tract of the medulla oblongata. $\times 40$.

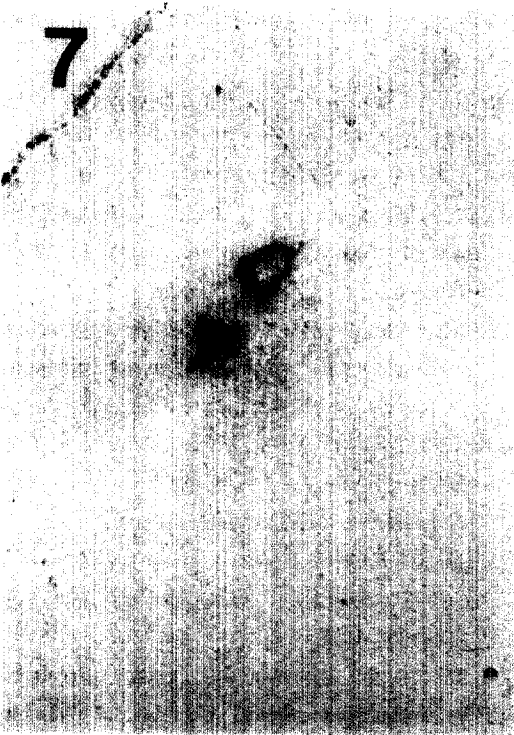
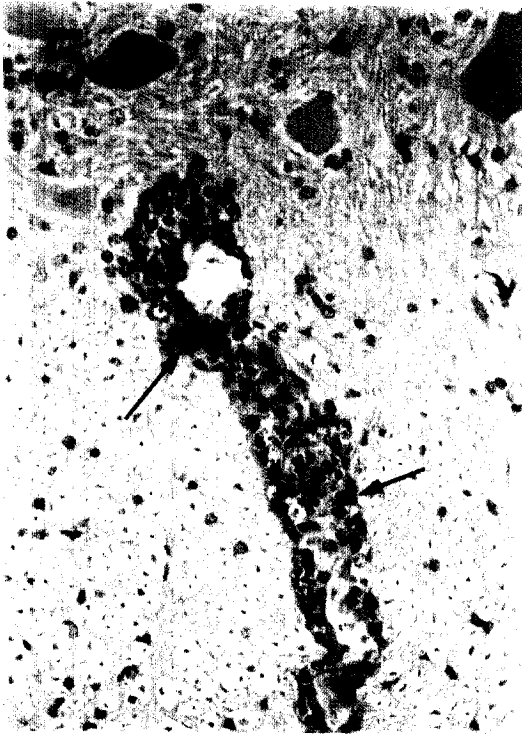


3



4





참 고 문 헌

1. Beran GW, Davies EB, Arambulo PV, *et al.* Persistence of pseudorabies virus in infected swine. *J Am Vet Med Assoc*, 176 : 998-1000, 1980.
2. 이중복, 안수환, 김병환 등. 돼지 오제스키병에 관한 연구: 1. 감염자돈으로부터 원인체의 분리 및 동정. *대한수의학회지*, 28 : 99-103, 1988.
3. 조우영, 조성환. 국내분리 Aujeszky's disease virus의 실험적 감염자돈의 병리조직학적 관찰. *대한수의학회지*, 30 : 93-102, 1990.
4. McFerran JB, Dow C. Experimental Aujeszky's disease (pseudorabies) in rats. *Br Vet J*, 126 : 173-179, 1970.
5. Trainer DO, Karstad L. Experimental pseudorabies in some wild North American mammals. *Zoo Res*, 2 : 135-151, 1963.
6. Baskerville A, McFerran JB, Dow C. Aujeszky's disease in pigs. *Vet Bull*, 43 : 465-475, 1973.
7. 전무형, 조성환, 안수환 등. 이환자돈으로부터 오제스키병 바이러스 분리와 생물학적 성상. *대한수의학회지*, 24 : 163-171, 1988.
8. 진영화, 강문일, 권영방 등. 오제스키병 바이러스 접종돈의 병리조건과 감염조직내 바이러스 검출에 관한 연구. *농시논문집(가축위생편)*, 31 : 30-37, 1989.
9. Maes RK, Kanitz CL, Gustafson DP. Pseudorabies virus infections in wild and laboratory rats. *Am J Vet Res*, 40 : 393-396, 1979.
10. Hill HT, Crandell RA, Kanitz CL, *et al.* Recommended minimum standards for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies. *Proc Annu Meet, Am Assoc Vet Lab Diagn*, 20 : 375-390, 1977.
11. Allan GM, McNulty MS, McCracken RM, *et al.* Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by immunofluorescence. *Res Vet Sci*, 36 : 235-239, 1984.
12. Shibata I, Hamano A, Hirai H, *et al.* Detection of antibodies to Aujeszky's disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay in pigs. *Jpn J Vet Sci*, 50 : 828-831, 1988.
13. Kelling CL, Staudinger WL, Rhodes MB. Indirect solid-phase microradio-immunoassay for detection of pseudorabies virus antibody in swine sera. *Am J Vet Res*, 39 : 1955-1957, 1978.
14. 조효권, 전무형. Agar-gel immunodiffusion test를 이용한 돼지 혈청중 Aujeszky's disease virus 항체검출에 관한 연구. *대한수의학회지*, 30 : 297-307, 1990.
15. Joo HS, Molitor TW, Leman AD. Radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *Am J Vet Res*, 45 : 2096-2098, 1984.
16. Schoenbaum NA, Beran GW, Murphy DP. A study comparing the immunologic responses of swine to pseudorabies viral antigens based on the ELISA, serum virus neutralization and latex agglutination test. *J Vet Kiagn Invest*, 2 : 29-34, 1990.
17. Smith PC, Mengeling WL. A skin test for pseudorabies virus infection in swine. *Can J Comp Med*, 41 : 364-368, 1977.
18. Kim SB. Immunohistochemistry for detection of Aujeszky's disease virus antigens : Immunogold-silver method in tissue sections. *Kor J Vet Sci*, 28 : 365-369, 1988.
19. 전무형, 조용성, 장경수. Dot-immunoassay를 이용한 Aujeszky's disease virus 항원 및 항체 검출. *대한수의학회지*, 34 : 529-536, 1994.
20. Ducatelle R, Coussement W, Hoorens J. Immunoperoxidase study of Aujeszky's disease in pigs. *Res Vet Sci*, 32 : 294-302, 1982.
21. Brown TM, Osorio FA, Rock DL. Detection of latent pseudorabies virus in swine using *in situ* hybridization. *Vet Microbi*, 24 : 273-280, 1990.
22. 김순복, 서정향, 문운경. In situ hybridization 조직화학법을 이용한 오제스키병 바이러스 동정. *대한수의학회지*, 34 : 327-333, 1994.
23. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 29 : 1349-1353, 1981.
24. Kim SB, Sur JH, Moon UG. Avidin-biotin complex for immunohistochemical diagnosis of Aujeszky's disease and hog cholera. *Kor J Vet Sci*, 30 : 435-440, 1990.

25. Walbooners JMM, Melchers WG, Mullink H, *et al.* Sensitivity of *in situ* detection with biotinylated probes of human papilloma virus type 16 DNA in frozen sections of squamous cell carcinomas of the cervix. *Am J Pathol*, 587-594, 1988.
26. Arnold N, Seibl R, Kessler C, *et al.* Nonradioactive *in situ* hybridization with digoxigenin labeled DNA probes. *Biotechnic & Histochemistry*, 67:59-67, 1992.
27. Matthews JA, Krica LJ. Analytical strategies for the use of DNA probes. *Analytical Biochem*, 169 : 1-25, 1988.
28. Tenover FC. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious disease. *Clin Microbi*, 1 : 82-101, 1988.
29. Zeph LR, Lin X, Stotzky G. Comparison of three non-radioactive and a radioactive DNA probe for the detection of target DNA by DNA hybridization. *Curr Microbi*, 22 : 79-84, 1991.
30. Yoon YD, Park CK, Joo YS, *et al.* Slot blot hybridization 기법을 이용한 돼지 파코바이러스 감염증 진단에 관한 연구. 농업논문집, 36 : 607-615, 1994.
31. Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, *et al.* Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology*, 126 : 32-50, 1983.
32. Pollice M, Yang HL. Use of nonradioactive DNA probes for the detection of infectious bacteria. *Clin Lab Med*, 5 : 463, 1985.
33. Sabó A, Rajcáni J, Bláskovic D. Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease. III. The distribution of virulent virus in piglets after intranasal infection. *Acta Virol*, 13: 407-414, 1969.
34. Pol JMA, Quint WGV, Kok GL, *et al.* Pseudorabies virus infections in explants of porcine nasal mucosa. *Res Vet Sci*, 50 : 45-53, 1991.
35. McFerran JB, Dow C. The distribution of the virus of Aujeszky's disease(pseudorabies virus) in experimentally infected swine. *Am J Vet Res*, 26 Res, 26 : 631-635, 1965.
36. Buxton A, Fraser G. *Animal microbiology*. Blackwell scientific publications Oxford London Edinburgh Melbourne, 2 : 737-773, 1977.
37. 권창희, 송재영, 김병한 등. Pseudorabies virus의 gp 50과 gp 63 유전자 클로닝에 관한 연구. 대한수의학회지, 32 : 311-318, 1991.
38. Petrovskis EA, Timmins JG, Gierman TM, *et al.* Deletions in vaccine strains of pseudorabies virus and their effect on synthesis of glycoprotein gp 63. *J Virol*, 60 : 1166-1169, 1986.
39. Petrovskis EA, Timmins JG, Armentrout MA, *et al.* DNA sequence of the gene for pseudorabies virus gp 50 and glycoprotein without N-linked glycosylation. *J Virol*, 59 : 216-223, 1986.
40. Keller GK, Manak MM. *DNA probes*. Macmillan publishers Ltd United Kingdom, 1-23, 1989.
41. Sabó A, Rajcáni J. Latent pseudorabies virus infection in pigs. *Acta Virol*, 20 : 208-214, 1976.
42. Saunders JR, Gustafson DP. *Serological and experimental studies of pseudorabies in swine*. Proc 68th Ann Meeting US Livestock Saint Assoc, 256-257
43. 박정우, 전무형, 안수환. 국내분리 Aujeszky's disease virus의 실험적 감염 자돈에 대한 바이러스학적 연구. 대한수의학회지, 30 : 177-186, 1990.
44. Belák K, Funa K, Kelly R, *et al.* Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by improved *in situ* hybridization using biotinylated probes on paraffin-embedded tissue sections. *J Vet Med*, 36 : 10-20, 1989.
45. Maitland NJ, Cox MF, Lynas C, *et al.* Nucleic acid probes in the study of latent viral disease. *J Oral Pathol*, 16 : 199, 1987.
46. Gravitt PE, Manos MM. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. *Lab Anim Sci*, 43 : 5-10, 1993.