

In situ hybridization에 의한 돼지 유행성 설사증의 국내발생 역추적 진단

박 남 용 · 이 석 윤

전남대학교 수의과대학
(1997년 9월 20일 접수)

Retrospective study of porcine epidemic diarrhea in Korea by *in situ* hybridization

Nam-yong Park, Seok-yun Lee

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received Sep 20, 1997)

Abstract : In this presented study, we established a method for diagnosis of porcine epidemic diarrhea(PED) by *in situ* hybridization(ISH), which made distinct progress in diagnostic pathology. We also carried out the retrospective diagnosis through ISH to assume the exact time of the first outbreak and incidence of PED in Korea.

The outbreak of PED in Korea reported in 1992. However, since the end of 1980's, some researches of pig-industry have already suspected the outbreak of PED, not transmissible gastroenteritis(TGE). In this experiment, we performed the ISH using 80 formalin-fixed and paraffin-embedded tissues of porcine intestine which were requests for pathological diagnosis from 63 farms whose primary sign was diarrhea from 1984 to 1991.

We prepared biotinylated cDNA probe(492base pairs) for ISH by nick translation method and carried out the ISH, using Microprobe™ capillary action system(Fisher Biotech^R).

We detected PED virus in intestinal mucosa of 2 cases in 1992, 1 case in 1988, and 1 case in 1987.

As a result, we assume that the outbreak of PED in Korea have already started since 1987.

Key words : porcine epidemic diarrhea, PED, *in situ* hybridization, retrospective study.

서 론

코로나바이러스(coronavirus)에 속하는 돼지 유행성 설사바이러스에 의해 발생하는 돼지 유행성 설사증(porcine epidemic diarrhea; PED)은 영국과 벨지움에서 최초로 그 발생이 보고되었으며^{1,2}, 국내에서는 박 등에 의해 1992년 처음으로 확진된^{3,4} 후, 최근까지 계속 발생하여 양돈농가에 심한 경제적 피해를 끼치고 있다⁵. 이미 1980년대 말부터 1991년까지 전염성 위장염(transmissible gastroenteritis; TGE)과 임상증상 및 병리조직학적 소견은 비슷하나 새로운 돼지 바이러스성 설사질환이 발생되어 이를 PED로 의심한 사람들이 있었다⁵.

PED는 급성 전염성 질환으로써 심한 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하가 있으며 모든 돼지의 연령에서 100%에 육박하는 발병이 있는데 어린 자돈에서는 50% 이상의 폐사율이 있다^{1,2,5}. 또한 계절에 관계없이 발생하며 돼지출하시 PED 바이러스에 오염된 운송트럭, 출입하는 사람 등을 통해서 다른 농장으로 전파된다고 한다¹.

PED는 TGE와 임상증상, 부검소견, 병리조직학적 소견이 매우 유사하여⁶⁻¹⁰ 감별진단에 많은 어려움이 있다. 이를 구분하기 위해서는 면역형광항체법이나 면역효소법 등이 주로 사용되는데 면역형광항체법은 신선한 조직을 필요로 하는 단점이 있고 면역효소법은 검출하려는 항원이 변성되기 쉽고 항원·항체간의 교차반응으로 비특이적 염색상을 나타낼 문제점이 있다^{1,4,11}.

분자생물학의 급속한 발전과 함께 새로운 진단기법들이 의학 및 수의학 영역에 적용되어 유전자 수준까지 접근할 수 있게 되면서 부터 진단병리학 분야도 획기적인 발전을 가져오게 되었다¹²⁻¹⁴. 조직내 ISH 기법은 다른 여러가지 nucleic acid hybridization 방법과는 다르게 세포나 조직의 형태학적 구조가 잘 보존된 상태하에서 바이러스 genome을 직접 확인할 수 있어서 특이성이 아주 높은 검사방법이다¹⁵⁻¹⁷. 또한 포르말린 고정, 파라핀포매 조직을 이용하여 조사할 수 있기 때문에 조직이나 세포내에 바이러스분포를 알 수 있어 정성·정량적 분석을 할 수 있을 뿐만 아니라^{18,19} 보존된 파라핀 조직을 통해서 역추적 진단이 가능하다.

본 실험은 국내에서 1992년 박 등에 의해 발생이 확인된 후³ 해마다 엄청난 경제적 피해를 끼친 PED⁵는 이미

그 이전부터 발생해왔을 것으로 피상적으로만 추정하였다. 1984년부터 1991년 사이에 설사를 주요 증상으로 했던 63농가 80마리의 돼지 장 조직을 시료로 사용하여, 본 실험실에서 개발한 ISH 기법에 의한 PED 진단법으로 역추적 진단을 실시하여 국내에서의 PED가 최초 유입되어 발생된 시기를 밝힐 목적으로 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 : 1984년부터 1991년까지 전남대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 가검물중 설사를 주요 증상으로 했던 63농가 80마리의 돼지를 이용하였다(Table 1).

Table 1. Histopathological diagnosis of enteritis cases from 1984 to 1991

Year	PED*	TGE*	Rota	<i>Clostridium</i> spp	<i>E coli</i>	Total
1991	2	6	5	1	8	22
1990	2	3	2		8	15
1989		1			11	12
1988	1	4	1		7	13
1987		1	1	5	1	8
1986		2			2	4
1985		1				1
1984		5				1
Total	5	23	9	6	37	80

PED* : porcine epidemic diarrhea suspected,
TGE : transmissible gastroenteritis.

1) *In situ* hybridization : ISH 전과정은 본 실험실에서 개발되어 PED 진단에 이용되고 있는 방법²⁷에 준하여 실시하였다.

2) *In situ* hybridization을 위한 조직처리 : 10% 중성 포르말린에 고정된 장 조직 및 기존의 파라핀 포매된 조직을 5~6 μ m의 절편을 만든 후 ProbeOn™ Plus slide(Fisher biotech^R)에 부착하여 *in situ* hybridization 실험에 사용하였다.

3) PEDV-cDNA probe의 제작 및 biotin 표지 : 본 실험실에서 PED의 진단에 사용중인 PEDV-cDNA probe를 이용하였으며, 이는 plasmic DNA vector인 pUC19(269Kb, Apr)에 삽입되어 있는 PEDV cDNA 절편(492bp)을 충남대학교 수의과대학 김철중 교수로부터 분양받아 Brin-

boim & Doly, Ish-Horowica & Bruke²⁰의 alkali lysis 방법을 응용하여 분리 및 정제과정을 통하여 준비된 것이다.

PEDV-cDNA fragment의 표지는 biotin-14-dATP와 bioN-ickTM labeling system(BRL, USA)을 이용한 nick translation 방법을 통하여 biotin을 표지하였으며, 표지된 probe는 hybridization cocktail(Americo^R)과 Brigati diluent(Research Genetics)에 최종 200ng/ml이 되도록 희석하여 ISH에 사용하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

4) *In situ* Hybridization 과정 : 모세관 현상에 의하여 두 개의 ProbeOnTM Plus slide 사이로 시약을 빨아들이고, 흡수성이 좋은 화장지를 이용하여 시약을 제거시키는 Micro ProbeTM capillary action system(Fisher Biotech^R) 방법으로 1~2시간 내에 ISH의 전과정을 수행하였다(Table 2).

Table 2. Procedure for *In situ* Hybridization

Reagent	CVC LE	Time	TEMP
Auto Dewaxing	5	2 min	110℃
Auto Alcohol	3	1 wash	RT
Auto Alcohol	3	1 wash	RT
Pepsin	1	2 min	110℃
Prehybe Plus(Probe Enhancer)	1	3 min	110℃
Probe	1	1 min	110℃
Cooling	1	15~30sec	RT
Probe	1	2 min	105℃
Cooling	1	15~30sec	RT
Probe	1	0.5 min	105℃
Cooling	1	1 min	RT
Probe	1	0.5 min	95℃
Cooling	1	2 min	RT
Probe	1	0.5 min	85℃
Cooling	1	3 min	RT
Probe	1	0.5 min	85℃
Cooling	1	4 min	RT
Posthybe Wash(2X SSC)	4	5 sec	RT
Auto Bloker	1	2 min	50℃
Posthybe Wah(2X SSC)	4	5 sec	RT
STREP-AP Detection system	1	10 min	50℃
Probe Lock(Chromogen)	1	1 wash	RT
STABLE FAST TR/NP	1	10 min	50℃
STABLE FAST TR/NP	1	10 min	50℃
Auto Wahs	1	1 wash	RT
Auto Wash	1	1 wash	RT
Auto Hematoxylin	1	1 min	RT
Distilled water wash	2	1 wash	RT
1X Immuno/DNA buffer	1	1 wash	RT
Distilled water wash	2	1 wash	RT

우선 ProbeOnTM Plus slide 위에 부착된 파라핀을 제거시키는 방법으로 HistochoiceTM clearing Agent 1X(Amresco^R)를 사용하여 110℃에서 2분간 반응하는 과정을 5회 반복하고 100% ethanol로 3번씩 수세, 2회 반복하였다.

파라핀이 제거된 조직절편내로 Probe 투과성의 증진과 핵산이 잘 노출되도록 하기 위해 단백분해효소인 Pepsin(Research Gentic) 용액에 110℃, 2분간 반응시켰다.

조직절편내 target viral RNA와 DNA probe의 denature를 위해 Prehybe Plus(Research Genetics)에 110℃ 3분간 반응시킨 다음, biotinylated cDNA Probe를 첨가하여 110℃에서 1분간 반응시키고, 15~30초간 cooling, 105℃ 2분 반응 15~30초 cooling, 105℃ 30초 반응 1분 cooling, 95℃ 30초 반응 2분 cooling, 85℃ 30초 반응 3분 cooling, 85℃ 30초 반응 4분 cooling 시켰고, 비특이적으로 결합한 probe를 제거할 목적으로 Posthybe Wash(2X SSC, Research Genetics)로 5초간 4회 세척후 Auto Blocker(Research Genetics)로 2회 세척하여 내인성 peroxidase를 억제시켰다.

검출과정으로서 Streptoavidin alkaline phosphatase detection system(Research Genetics)을 이용하여 5℃에서 10분간 반응시켜 조직의 target 바이러스 RNA와 hybridization이 된 probe의 biotin과 결합되도록 하였다.

발색반응을 실시하기 전에 Probe Lock(Chromogen Enhancer, Research Genetics)을 사용하여 alkaline-phosphatase의 역할을 증가시켰고 발색제는 적색을 나타내는 Stable Fast TR salt/Naphthol Phosphate(Researche Genetics)를 이용하여 50℃에서 10분씩 2회 반응시켰다. 조직염색과정중의 모든 시약을 제거하기 위하여 Auto Wash(Research Genetics)로 2회 세척하고 대비염색으로서 Auto hematoxylin(Research Genetics)을 이용하였다. 그후 증류수로 2번 세척한 후 1X Immuno/DNA buffer로 1회 세척하였으며, 다시 증류수에 2번 세척하여 조직이 건조되지 않도록 Crystal/Mount (BIOMEDA m-02)를 2~3방울 떨어뜨려 봉입하였다.

5) Control : 양성 대조군으로는 포유동물의 공통유전자에 해당되는부위에 상보적인 Alu I/II mix probe를 사용하였고, 음성 대조군으로는 면역조직화학법으로 TGE로 확진된 돼지의 장조직을 이용하였다.

결 과

돼지 유행성 설사증(porcine epidemic diarrhea; PED)의 국내 최초 발생시기를 조사하기 위해 본 연구에서는

PED 바이러스주로부터 biotin이 표지된 492bp의 cDNA probe를 작성하여 1984년부터 1991년 사이의 설사를 주 증상으로 했던 63농장 80건의 가검물의 파라핀 포매된 조직을 재료로 하여, 본 실험실에서 개발한 *in situ* hybridization(ISH) 기법에 의한 PED 진단법으로 실험하였다.

실험결과 소장에서 가장 특이성 있는 강한 적색의 양성반응을 확인하였는데 주로 장 용모상피세포의 세포질 부분에서 강한 반응을 관찰하였다(Fig 1, 2, 3). 양성 대조군은 포유동물의 공통유전자에 해당되는 부위에 상보적인 Alu I/II mix probe를 사용하여 돼지 림프절 세포의 핵에서 적색의 양성반응을 확인하였고(Fig 4), 음성 대조군은 본 실험실에서 면역조직화학법으로 전염성 위장염(transmissible gastroenteritis, TGE)으로 확진한 돼지의 장 조직을 이용하였다.

본 실험을 수행한 결과 1987년, 1988년, 1991년에 PED의 발병을 확인하였다. 원인체가 확인되지 않아 PED로 의심했던 case중 1991년에 2건, 1988년에 1건이 PED로 밝혀졌으며, 1987년에 TGE로 진단했던 1건이 PED로 확인되었다. 그리고 1990년에 PED로 의심했던 2건은 TGE로 확인되었다.

이로써 우리나라에서 최초 보고연도였던 1992년 이전인 1987년에 벌써 국내에 PED가 유입되어 발병하였음을 확인할 수 있었다.

고 찰

국내에서 1992년 PED 발생이 확인된 이후 현재까지 매년 PED 발생으로 자돈폐사에 의한 경제적 손실만 해도 수백억원 정도에 이르러 양돈업계에 심각한 피해를 주고 있는 질병이다. PED는 TGE와 감별진단이 어렵고 1980년대 말부터 1990년대 초까지 불명의 돼지 바이러스성 설사질환이 많이 발생하여 이를 PED로 의심한 사람들이 있었다⁵. 이에 국내 PED 최초 유입 및 발생을 확인하고 감별하기 위하여 ISH 기법으로 역추적 진단을 실시하였다.

최근 분자생물학적 기법이 눈부시게 발전함에 따라 수의학분야에도 그 응용범위가 확대되어 지금은 널리 이용되고 있으며, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 DNA 분석을 위한 Southern blotting, RNA를 분석하기 위한 Northern blotting과 같은 filter hybridization 기법이 바이러스성 질환을 진단하는 기법으로서 응용되어

소개되었다^{17,21}. 이러한 진단법은 민감도나 특이도가 기존의 혈청학적 진단기법에 비해 뛰어나기는 하지만 동물의 세포나 조직내에서의 바이러스 분포를 파악하는 것은 불가능하다. 그러나 1969년에 세포나 조직내에서 특이 유전자를 검출할 수 있는 ISH 기법이 개발되었으나 당시에는 방사선 동위원소인 ³²P를 표지한 probe를 사용하였고 실험과정도 복잡하여 1주일 이상 소요됨으로써 진단기법으로서의 실용가치가 떨어져 그 응용이 미진하였다²²⁻²⁴. 그러나 파라핀 절편에서 비방사선 물질인 biotin을 이용하여 probe에 표지하고, cytomegalovirus와 adenovirus의 genome를 검출함으로써 ISH를 진단기법으로서의 실용가능성을 크게 하였다²³. 또한 Camoy's액에 고정, 파라핀에 포매된 돼지의 생검조직으로부터 오제스키병(Aujeszky's disease)을 진단하는데 성공함으로써 ISH 기법이 바이러스 질환의 진단에 특이성 있는 검사방법임을 입증해주었다²⁵. 이 기법은 종양의 악성 정도를 파악할 수 있는 유전자 이태검사에 이용되고 mRNA를 검출하여 단백질 생성부위를 알 수 있다²⁶. 본 병리학 교실에서는 최초로 ISH 기법을 이용한 PED 진단법을 개발하였다²⁷.

현재 ISH에 사용되고 있는 probe는 cDNA probe, RNA probe(Riboprobe) 그리고 oligonucleotide probe(oligoprobe)의 세종류가 있는데 본 실험에서는 염기서열이 길어 특이성이 아주 높은 492base pairs cDNA probe를 이용하였다. RNA probe는 공기, 검체물, 시약 등에 RNase가 존재하므로 RNA 보관에 많은 주의가 필요하며 oligoprobe는 100bp 이하로 base pairs가 비교적 짧아서 민감도는 높으나 특이성이 떨어지기 때문에 비교적 사용이 제한된다^{21, 22, 24, 28}. Probe의 labeling은 동위원소, biotin, digoxigenin, bromodeoxyuridine 등을 이용하는데^{17, 21, 29}, 동위원소는 관리하는데 주위가 필요하고 폐기물의 처리 등 안정성 문제와 검사시간이 오래 걸린다는 문제점 때문에 이용이 제한되어 본 실험에서는 nick translation 방법으로 biotin을 probe에 labeling하였다^{12, 24}. 특히 본 실험실에서 개발하였던 ISH 기법은 기존의 방사선 동위원소를 이용하던 것과는 달리 비방사선 물질인 biotin을 표지한 probe를 사용하였기에 안정성은 물론 많은 시료의 처리가 필요한 실험실에서도 널리 이용될 것으로 사료된다. 파라핀 절편, 조직배양세포, 생검조직, 염색체 그리고 냉동조직 절편 등이 ISH의 시료로 사용되는데²¹ 본 실험에서는 기존의 10% 중성 포르말린에 고정, 파라핀 포매된 조직을 5~6 μ m 절편으로 사용하였다. 본 실험에 사용된 Pro-

beOn™ Plus slide는 표면이 poly-L lysine으로 특수처리된 것으로 실험과정중에 조직이 slide로부터 떨어지는 것을 방지하였다³⁰. 조직절편의 세포내 핵산을 노출하기 위한 단백질분해효소는 pepsin을 사용하였고²¹ streptavidin-alkaline phosphatase detection system을 이용하여 바이러스 RNA과 probe의 결합을 검출하였다. 발색제는 Stable Fast TR salt/Naphthol Phosphate를 사용하였으며, auto hematoxylin으로 대비염색하여 경검하였다.

본 연구에서는 국내에서의 PED 최초 발생보고³ 이전에 설사를 주증상으로 했던 가금물의 파라핀 포매된 조직을 재료로 하여 ISH를 실시하므로써 국내에 최초로 PED가 유입되어 발생된 시기를 추정하고자 하였다.

PED 진단법에는 바이러스 배양·분리동정법³, 전자현미경법이나 효소결합 면역흡착 검사법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 본편에서 PED 바이러스를 확인하는 방법⁶, 신선한 동결절편을 이용하는 면역형광항체법¹¹, 면역효소법^{4,11}, ISH법 등이 있다. 이 방법들중 면역효소법과 ISH법은 실험시간이 짧고 포르말린 고정 및 파라핀 포매된 절편을 이용할 수 있으므로 역추적진단이 가능하다. 면역효소법은 검출하려는 항원이 변성되기 쉽고 항원·항체간 교차반응으로 특이성이 떨어지므로 판독하여 확진하는데 다소 어려움이 있으나 ISH 기법은 세포속의 바이러스 유전자를 직접 검출하므로 특이성이 아주 높아 역추적진단하는데 가장 유용한 방법이라고 사료된다. PED는 TGE와 같은 coronavirus이며 자돈의 임상증상이 비슷하고, 병리조직학적 소견상 소장 용모의 위축과 탈락, 염주세포의 침윤 등 유사한 점이 많아 감별진단하는데 어려움이 있다⁶⁻¹⁰. 감별진단법은 두 바이러스 항원의 다름을 이용한 ELISA법^{1,11}과 직접면역 형광항체법^{4,6}이 있고, PED 바이러스 항체확인에 의한 혈청학적 진단법으로 ELISA법^{11,31,32}과 간접면역형광항체법⁴이 유용하게 이용된다. 이 시점에서 최근 본 병리학교실에서 최초로 개발되어 응용되고 있는 분자생물학적 기법인 ISH에 의한 PED 진단법²⁷은 두 바이러스의 유전자의 차이를 이용하여 감별진단하기 때문에 특

이성이 높고, 1~2시간 내에 실험이 가능하므로 가히 획기적이라 할 수 있겠다.

PED에 대한 ISH 실험결과 소장 용모 상피세포의 세포질 내에서 바이러스의 존재를 입증해주는 양성반응을 확인하였다. PED 바이러스의 증식은 다른 코로나바이러스와 같이 세포질내에서 이루어지며 세포질막에서 분아됨으로써 바이러스 조합이 이루어진다고 하였는데³³, 실험결과 바이러스 입자의 존재를 확인해주는 양성반응이 세포질내에서 있었다는 것이 위의 사실을 입증해준다.

본 실험에서 PED 바이러스를 1987년의 파라핀 포매된 돼지 장 조직에서 검출함으로써 지금까지 정식보고된 국내 최초 발생연도인 1992년 이전에도 이미 PED 바이러스가 유입되어 발생하였음을 확인할 수 있었다. PED와 TGE의 감별진단은 ISH 기법으로 명확하게 감별할 수 있다고 사료된다.

결론

In situ hybridization(ISH) 기법에 의한 돼지 유행성 설사증(porcine epidemic diarrhea; PED) 진단법을 이용하여 1984년부터 1991년 사이에 설사를 주요증상으로 했던 63개 농장 80마리의 돼지 장조직의 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 절편을 시료로 하여 역추적진단을 하였던 바 1987년, 1988년 및 1991년에 PED 발병을 확인하였다.

또한 1980년대 말부터 1991년까지 전염성 위장염(transmissible gastroenteritis; TGE)과 임상증상, 부검소견 및 병리조직학적 관찰이 유사하여 일부 양축가들에 의해 PED로 의심된 원인체 미확인의 돼지 바이러스성 설사질병을 PED로 확진할 수 있었고, ISH 기법에 의한 PED와 TGE의 감별진단 기법도 확립하였다.

이상의 실험결과, 지금까지 PED의 최초 발생연도라고 보고된 1992년 이전에도 이미 국내에 PED가 유입되어 발병했음을 확인할 수 있었고 국내 최초 발생시기는 1987년이다.

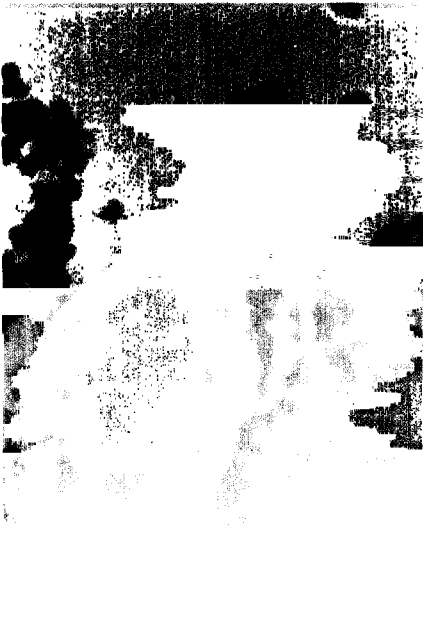
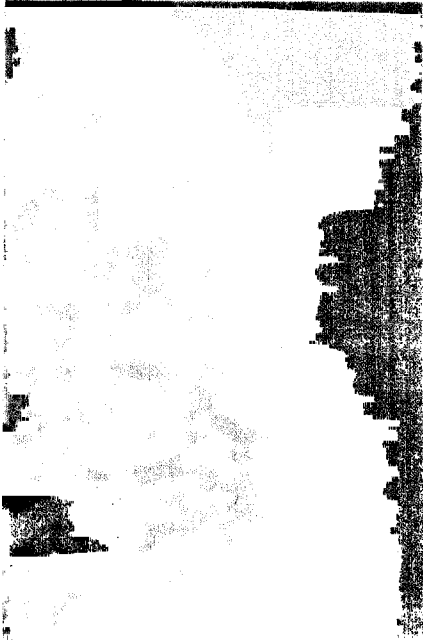
Legends for figures

Fig 1. Red positive signal in cytoplasm of epithelium of the intestinal epithelium. *in situ* hybridization. × 400.

Fig 2. Red positive signal indicated PED virus genome in intestinal epithelium. *in situ* hybridization. ×400.

Fig 3. Red positive signal indicated PED virus genome in intestinal epithelium. *in situ* hybridization ×200.

Fig 4. Positive control (red signal) by AluI/II probe. *in situ* hybridization. ×400.



참 고 문 헌

1. Pijpers A, Nieuwstatt AP, Terpstra C, *et al.* Porcine epidemic virus as a cause of persistent diarrhea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet Rec*, 132:129-131, 1993.
2. Pensaert MB, Porcine epidemic diarrhea. In : *Disease of swine*, 7th ed. Leman AD. Iowa State Univ. Press Ames Iowa, USA. 293-298. 1992.
3. 박남용, 조경오, 조성수 등. 돼지 유행성 설사바이러스의 분리동정. *대한수의사회지*, 29:360-365. 1993.
4. 박남용, 조경우. 돼지 유행성 설사(PED)의 진단을 위한 면역조직화학적 기법의 응용. *대한수의학회지*, 34:805, 1994.
5. 강영배, 권창희, 권병준 등. 돼지 유행성 설사(porcine epidemic diarrhea) : 발생피해, 병리진단 및 방역대책. *대한수의사회지*, 31:38-56, 1994.
6. Coussement W, Ducatelle R, DeBouck P, *et al.* Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet Pathol*, 19:46-56, 1982.
7. Horvath I, Mocsari E. Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of sucking pig affected with a transmissible gastroenteritis(TGE)-like disease. *Arch Virol*, 68:103-113, 1981.
8. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, *et al.* Porcine epidemic diarrhea. In : *Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals*, 8th ed. Cornell Univ. Press, New York, USA, 897-898, 1988.
9. Redman DR, Bohl EH, Cross RF. Intrafetal inoculation of swine with transmissible gastroenteritis virus. *Am J Vet Res*, 39:907-911, 1978.
10. Thake DC. Jejunal epithelium in transmissible gastroenteritis of swine. An electron microscopic and histochemical study. *Am J Pathol*, 53:149-168, 1968.
11. Callebaut P, Debouck P, Pensaert M. Enzyme-linked immuno-sorbent assay for the detection of the corona virus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. *Vet Microbiol*, 7:295-306, 1982.
12. Pringle JH, Primrose L, Kind CN, *et al.* *In situ* hybridization demonstration of poly-adenylated RNA sequences in formalin-fixed paraffin sections using a biotinylated oligonucleotide poly d(T)probe. *J Pathology*, 158:279-286, 1989.
13. Hankin RC, Lloyd RV. Detection of messenger RNA in routinely processed tissue sections with biotinylated oligonucleotide probes. *Am J C Pathol*, 92:166-171, 1989.
14. Hasegawa T, Matsumoto Y, Goitsuka R, *et al.* *In situ* hybridization for the detection of feline interleukin 1 α mRNA on the paraffin-embedded section using biotin-labeled probes. *J Vet Med Sci*, 53:451-456, 1991.
15. Hasse AT, *et al.* Measles virus nucleotide sequences: detection by hybridization *in situ*. *Science*, 212:672-674, 1981.
16. Erlich HA, Gelfand DH, Saiki RK. Specific DNA amplification. *Nature*, 331:461-462, 1988.
17. Martin WJ. Polymerase chain reaction : *A tool for the modern pathologist. In molecular diagnosis in pathology*. (eds, Fenoglio-Preiser CM. and Willman CL). Williams & Wilkins, Baltimore, 21-46, 1991.
18. Singer RH, Ward DC. Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using *in situ* hybridization with a biotinylated nucleotide analog. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:7331-7335, 1982.
19. 박순희, 권두환. 핵산탐침을 이용한 감염성 질병의 진단. 제2회 산학연 심포지움 논문집(한국생화학회), 21-34, 1991.
20. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1.25-1.41. 1989.
21. 박창수. The future of biotechnology in diagnostic pathology. 제1차 분자병리학 워크샵 초록집, 전남대학교 의과대학, 55-67, 1991.
22. Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, *et al.* Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin embedded tissue sections using biotin-labelled hybridization probes. *Virology*, 126:32-50. 1983.

23. Park CS, Manahan LJ, Brigati DJ. Automated molecular pathology : one hour *in situ* DNA hybridization. *J Histotechnol* , 14P219-229, 1991.
24. Unger ER, Brigati DJ, Chenggis ML, *et al.* Automation of *in situ* hybridization: Application of capillary action robotic workstation. *J Histotechnol* , 11: 253-258, 1988.
25. Brown TM, Osorio SA, Rock DL, *et al.* Detection of latent pseudorabies virus in swine using *in situ* hybridization. *Vet Microbiol* , 24:273-280, 1990.
26. Herington CS, McGee JO. Principles and basic methodology of DNA/RNA detection by *in situ* hybridization: Diagnostic molecular pathology a practical approach Vol 1 , Oxford University Press, 69-102, 1992.
27. Park NY, Kim GY, Chi YT, *et al.* Diagnosis of porcine diarrhea by *in situ* hybridization, *25th world Veterinary Congress Proceeding* , 257, 1995.
28. Moench TR, Gendelman HE, Clements JE, *et al.* Efficiency of *in situ* hybridization as a function of probe size and fixation technique. *J Virol* , 11:119, 1985.
29. Kelly CD, Carter ND, Boer PD, *et al.* Detection of CA III mRNA in rat skeletal muscle and liver by *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem* , 39:1243-1247, 1991.
30. Angerer LM, Syoler MH, Angerer RC. *in situ* hybridization with RNA probes ; and automated recipe. New York; Oxford University Press , 1987.
31. Nieuwstadt AP, Zetstra T. Use of two enzyme-linked immunosorbent assays to monitor antibody responses in swine with experimentally induced infection with porcine epidemic diarrhea virus. *Am J Vet Res* . 52: 1044-1050, 1991.
32. Knuchel M, Ackermann M, Muller HK, *et al.* An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus(PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. *Vet Microbiol* , 32:117-134, 1992.
33. Martin H, Robert R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol* , 2235-2239, 1988.