

돼지 유행성 설사증(Porcine Epidemic Diarrhea) 감염 소장상피세포의 전자현미경 관찰

박남용 · 구경본 · 김승재 · 정치영 · 박영석 · 조경오 · 김용환 · 임형호

전남대학교 수의과대학 병리학교실

Ultrastructural Changes in Enterocyte infected with Porcine Epidemic Diarrhea Virus

Nam-yong Park, Kyoung-bon Koo, Seung-jae Kim, Chi-young Chung, Young-seok Park, Kyoung-oh Cho, Yong-hwan Kim, Hyung-ho Im

Department of Veterinary Medicine, Chonnam National University

Abstract : The morphologic changes of small intestinal epithelium in pigs diagnosed as porcine epidemic diarrhea(PED) by virus isolation and immunohistochemistry were studied through light microscope and transmissible electron microscope.

On semi-thin section, the histologic findings showed severe villous atrophy and fusion with hyperplasia of cuboidal epithelium in the villi, inflammatory cell infiltration in lamina propria, and increased mitotic figures in the crypt. The structural changes were mostly restricted to the cytoplasm of affected absorptive epithelium of villi. 3 types of epithelial changes were found; degenerated virus-affected cells, undifferentiated cuboidal cells, and normal columnar cells.

On electron microscopy, round to spherical viral particles of 50~100nm in diameter were found within the dilated vesicles and endoplasmic reticulums of degenerated cells, which had decreased their cytoplasmic electron density due to dilated and missing organelles(e.g. mitochondria, ERs, etc.). Microvilli were shortened and sparse, leaving denuded terminal web of the villous epithelial cells. Fat globules were often found within slightly degenerated enterocytes. On the tip of villi, severely damaged cells were exfoliated and replaced by undifferentiated cuboidal cells.

We found distinct ultrastructural changes in the jejunal epithelium confirming PED virus infection is involved in malabsorptive diarrhea.

Key words: Porcine epidemic diarrhea, PED, coronavirus, electron microscopy, enterocyte.

서 론

돼지 유행성 설사증(porcine epidemic diarrhea; PED)은 코로나바이러스(coronavirus)에 속하는 돼지 유행성 설사증 바이러스(porcine epidemic

diarrhea virus; PEDV)에 의해 발생하는 전염성이 높은 급성 질환으로서, 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하 등의 임상증상을 보이며, 모든 연령에서 100%에 가까운 발병률과 어린 자돈에서는 50%이상의 폐사율을 보인다^{23,24,34}.

최근 PED는 돼지의 다른 바이러스성 설사질환인 돼지 전염성 위장염(transmissible gastro-

enteritis; TGE),^{1,33,37} 돼지 로타바이러스 감염증 (swine rotavirus infection)^{21,32}과 함께 임상적으로 그 심각성이 크게 대두되고 있으며, 이로 인한 경제적 손실도 막대하다.

PED가 1970년대 영국과 유럽의 몇몇 국가에서 처음 발생보고 되었을 때는 TGE와 임상증상이 유사하지만, TGE와는 달리 포유자돈을 제외한 모돈과 비육돈에 발생한 설사 질환을 유행성 바이러스 설사증 제 1형(epidemic viral diarrhea; EVD type 1)으로, 포유자돈을 포함한 모든 연령에서 발생하는 설사질환을 유행성 바이러스 설사증 제 2형(EVD type 2)으로 각각 명명되었다.^{23,34}

이 바이러스는 형태학적으로 다른 코로나바이러스와 유사하여 곤봉상 돌기(projection)를 갖는 직경 95~190nm의 구형의 왕관(crown)모양으로서 분변에서 전자현미경으로 관찰할 수 있으며,^{7,16,22} 전기영동법¹⁰과 여러가지 물리화학적 그리고 생물학적 성상¹⁵에 관한 연구에 의해 RNA핵산을 지닌 코로나바이러스임이 확인되었다. 또한 직접면역형광항체법,^{7,22} ELISA기법,^{2,24} 면역전자현미경법¹⁶에 의해 돼지의 다른 코로나바이러스인 돼지 전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV) 및 혈구응집 뇌척수염 바이러스(hemagglutination encephalomyelitis virus; HEV)와 항원성이 전혀 다름이 확인되었다.^{7,16,22,24} 최근에는 DVD 제 1형과 제 2형의 원인체가 같은 코로나바이러스임이 밝혀져 병명을 돼지 유행성 설사증(PED)으로 통일하였다.²³

우리 나라에서는 1992년 PED발생이 확인된 후,^{38,39} 1992년 가을부터 1995년 봄까지 폭발적으로 발생하여 양돈업계에 막대한 피해를 초래하였다. 이에 1993년 박 등³⁸에 의해 국내 최초로 PEDV의 분리, 동정이 이루어졌으며, 현재는 백신이 개발되어 사용되고 있다.

PEDV는 돼지 소장용모의 흡수상피 세포질에서 증식하여,^{4,7,9} 분변으로 배출된다. 실험실적으로는 아프리카 녹색 원숭이의 신장세포인 vero cell에서 잘 증식하여 Cytopathic effects를 형성한다.^{14,15,18} PEDV를 자돈에 실험접종시 잠복기는 보통 22~36시간이고,^{4,8,9} 접종 후 최초 12시간 후에 면역형광항체반응³³에 양성을 보이며, 감염된 장 상피세포에서 전자현미경을 통해 최초로 바이러스 입자를 확인할 수 있는 시간은 12~18시간이다.⁹ 또한 면역형광항체반응에서 PEDV는 소장

용모 상단의 흡수상피를 침해하여 증식하나, 음와상피는 거의 침해하지 않아 미약한 양성반응이 나타나며,^{4,8} TGE와는 달리 결장 상피세포와 장간막림프절에서도 양성반응을 나타낸다.^{7,8} 접종 후 24~36시간에는 바이러스의 복제가 극치에 달하여 소장 흡수상피의 변성, 괴사 및 탈락이 관찰되며,^{9,16} 결국 소장용모의 위축을 초래하여 소장용모에서의 흡수부전과 삼투압의 변화로 심한 수양성 설사를 초래하게 된다.^{7,8,24}

PED에 이환된 돼지의 부검소견은 TGE와 매우 유사하여 육안적으로 소장벽은 매우 얇아지고, 소장과 결장에 황색의 수양성 장내용물의 저류를 보이며,^{4,7,9} 병리 조직학적으로 소장용모의 위축과 융합, 그리고 용모상피세포의 탈락 및 고유층에 염증세포의 침윤이 관찰된다.⁴

임상적으로 PED는 포유자돈에서 TGE보다 낮은 전파속도와 치사율을 보인다는 것과 이유돈과 성돈에서 급성 설사를 초래한다는 차이점²³에도 불구하고 임상증상만으로는 두 질환을 감별하기는 어렵다. 또한 PED는 TGE와 원인체의 외형, 발병기전 및 병리학적 소견이 매우 유사하므로 부검과 병리조직학적 검사⁴ 또는 분변에서 전자현미경을 통한 바이러스 입자의 관찰^{7,22}은 감별진단에 한계가 있다.

그러므로 이를 진단하기 위해서는 두 바이러스 항원의 특이성을 이용한 직접면역형광항체법,^{4,7,9} ELISA기법,^{2,24} 그리고 혈청중의 PEDV에 대한 항체를 측정하는 간접면역형광항체법⁷과 ELISA기법^{2,17,36}이 유용하다. 최근에는 면역학적 진단법과 더불어 *In situ* hybridization⁴⁰과 같은 분자생물학적 기법이 개발·응용되고 있다. 본 연구에서는 돼지 유행성 설사증(PED) 증상을 보이는 돼지 소장의 박절편(semithin section)을 통해 광학현미경적 변화상을 관찰하고, 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 초박절편(ultrathin section)상에서 바이러스 입자를 확인하고, 소장용모상피의 미세구조의 변화상을 관찰함으로써 PED의 발병기전을 이해하고자 하였다.

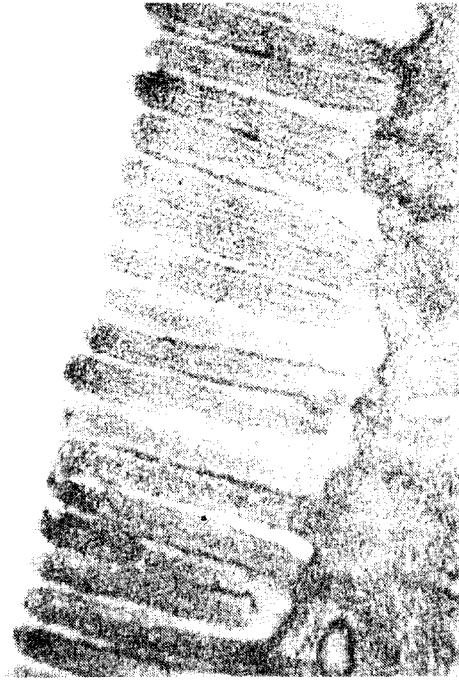
재료 및 방법

1. 실험재료

1991년 12월부터 1993년 3월까지 전남대학교



1



2



3



4

수의과대학 병리학교실에 병성감정 의뢰된 가검물 중 면역형광항체법³⁹과 바이러스 분리동정³⁸에 의해 돼지 유행성 설사증(PED)으로 진단된 가검물 중 4개 농장의 돼지 소장 10건을 이용하였다. 돼지 연령분포는 1주령 미만의 포유자돈에서 20주령 이상의 성돈까지 다양하였으며 대조군으로서는 3일령

의 정상 자돈 2마리를 이용하였다.

2. 광학현미경 및 전자현미경 관찰

부검 즉시 시료를 채취하여 2.5% glutaraldehyde(0.1 cacodylate buffer, pH 7.4)에 전고

정하고, 1% osmium tetroxide(0.1 cacodylate buffer, pH 7.4)에 후고정하였다. 고정된 조직은 각급 ethanol과 ethanol-propylene oxide계열을 거쳐 탈수하여 epoxy resin(AGAR AIDS)에 포매하였고, 45°C, 55°C, 65°C에서 각각 24시간 간격으로 방치하여 중합하였다.

광학현미경적 검사를 위해 ultramicrotome (LKB-V)으로 1nm 두께의 박절편을 만들어 methylene blue-basic fuchsin 염색을 한 후 병변을 관찰하였으며, 여기에서 전자현미경으로 관독할 부위를 선정하여 60~80nm 두께로 초박절편을 만들었다.

초박절편은 copper grid에 부착시켜 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(Carl Zeiss109)을 이용하여 가속전압 50kV 하에서 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경적 소견

대조군의 소장용모는 길이가 긴 원주상피세포로 피복되어 있었다. 원주상피세포의 핵은 기저막부위에 위치하였으며, 점막고유층에는 염증세포의 침윤도 관찰되지 않았다.

특히 어린 자돈 10~12일령 PED 감염돈의 공장과 회장용모는 심한 위축과 융합된 소견을 보였으며, 용모는 입방화된 세포의 증식과 함께 점막고유층에 단핵세포 등의 염증세포 침윤이 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 소견은 공장부위에서 심하게 나타났다. 음와부위의 상피세포는 대조군에 비해 많은 세포분열상(mitosis)이 관찰되었다.

2. 전자현미경적 소견

대조군의 상피세포에서는 병리학적 변화를 관찰할 수 없었으며 정상 신생자돈의 소장 용모상

피세포와 미세구조가 일치하였다.^{25,27} 즉, 상피세포의 미세융모(microvilli)는 길고, 규칙적으로 말단 망(terminal web)에 부착되어 있었으며(Fig. 2), 상피세포의 세포질에는 풍부한 미토콘드리아(mitochondria), 형질내세망(endoplasmic reticulum), 유리리보솜(free ribosome), 그리고 미세소관(microtubule) 등의 미세소기관(organelles)이 관찰되었다(Fig. 3). 10~12일령 감염돈의 소장용모는 정상에 비해 편평해져 입방화되어 있는 상피세포를 다수 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이들 세포는 정상 음와세포(crypt cell)와 같이 미분화되어, 미세융모는 비교적 짧고 세포질내에는 많은 유리리보솜이 관찰되었다.

감염된 10~12일령 돼지 소장용모의 흡수상피세포는 변성되어 다양한 세포병리학적 변화가 관찰되었다. 변성된 상피세포는 핵이 종대되고, 세포질의 전자밀도는 감소되었으며(Fig. 5), 세포질내에는 수많은 공포가 존재하였으며, 미토콘드리아는 종대되어 둥글고, 그 기질은 전자밀도가 감소되었으며, 능선(crista)은 뒤틀어져 정상 구조를 상실하였다(Fig. 6, 7). 또한 형질내세망의 수조(cisternae)는 확장되어 있었으며, 확장된 세망내에는 직경 50~100nm 크기의, 돌기를 함유하고 있지 않은 많은 바이러스 입자들이 관찰되었으며, 전자밀도가 높은 중심부(core)와 그 내부에 원형의 밝은 부위(halo)가 존재하였다(Fig. 8, 9). 유리리보솜은 정상대조군에 비해 증가되어 있었으며, 종대된 과립형질내세망(rough endoplasmic reticulum)에는 리보솜의 수가 줄어 있었고, 특히, 유리리보솜은 종대된 형질내세망 주위에서 많이 관찰되었다(Fig. 9). 지방구(fat globule)로 보이는 크기가 다양한 세포내 물질은 변성이 심하지 않은 상피세포에서 주로 관찰되었다(Fig. 10).

소장 상피세포의 미세융모는 변성이 심한 세포에서는 말단 망과 함께 완전히 탈락된 소견을 보였으며(Fig. 5), 변성이 심하지 않은 세포에서는

Fig.1. Porcine. Jejunum. Villous atrophy and fusion, hyperplasia of cuboidal epithelium and infiltration of inflammatory cell within lamina propria. Methylene blue-basic fuchsin stain, X200.

Fig.2. Porcine. Jejunum. Long and regular microvilli of absorptive epithelium of control piglet. X45,000.

Fig.3. Porcine. Jejunum. Mitochondria of normal enterocyte of control piglet. X18,000.

Fig.4. Porcine. Jejunum. Note cuboidal cell covering villus and microvilli sparser than that of control. X10,500.



Fig.5. Degenerated absorptive cell. Note decreased electron density, severely swollen nucleolus and detached microvilli. X6,600.

Fig.6. Degenerated absorptive cell. Note dilated organelles(mitochondria, vesicles, and ERs) in cytoplasm. X18,000.

Fig.7. Degenerated absorptive cell. Note dilated mitochondria and tortuous, dilated crista. X30,000.

Fig.8. Degenerated absorptive cell. Note viral particles in dilated tubular system. X45,000, bar=220nm.

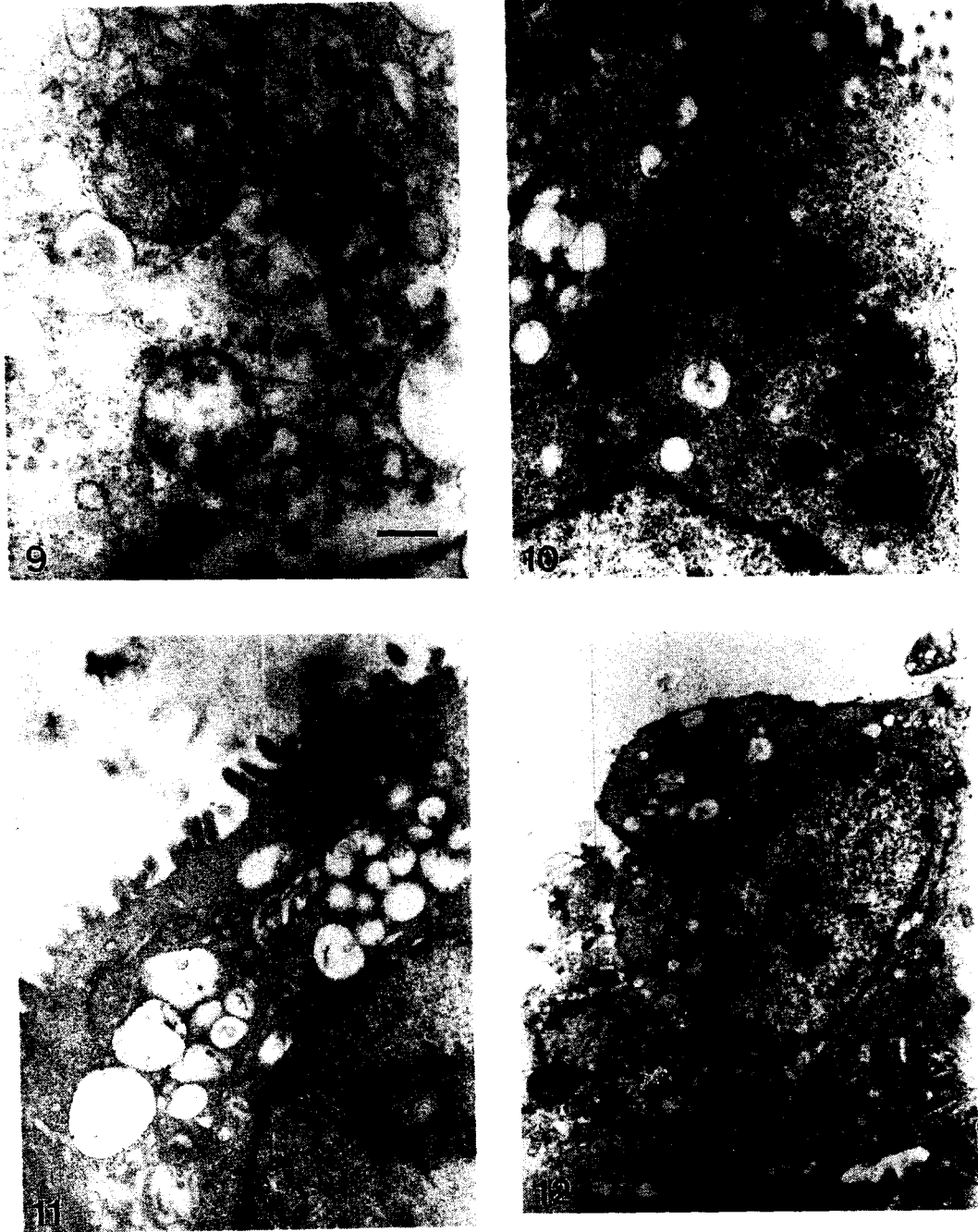


Fig. 9. Degenerated absorptive cell. Note viral particles in endoplasmic reticulum and increased free ribosomes in cytoplasm. X30,000, bar=330nm.

Fig.10. Degenerated absorptive cell. Note variably sized fat globules in cytoplasm. X10,500.

Fig.11. Degenerated absorptive cell. Note short and sparse microvilli and irregular terminal web. X10,500.

Fig.12. Degenerated absorptive cell. Note undifferentiated cuboidal cell with many vacuoles in cytosol on the tip of villi. X6,600.

불규칙하게 짧아지고, 그 수가 감소하여 불완전한 말단 망에 붙어 있었다(Fig. 11).

PEDV에 감염된 돼지의 소장용모에서는 변성 세포, 미분화 입방세포, 원주세포의 3가지 형태의 상피세포가 관찰되었다. 다양한 크기의 바이러스 입자는 변성세포 세포질내의 미세소관, 형질내세망, 그리고 종대가 심하여 그 유래를 알 수 없는 공포에서 많이 관찰되었지만, 미분화 입방상피와 원주상피에서는 거의 관찰되지 않았다.

심하게 변성된 세포는 용모의 상단에서 박리되어 미분화 입방상피세포가 그 자리를 대신하고 있음이 관찰되었다(Fig. 12).

고 찰

본 연구에서는 PED의 발병기전을 이해하고자 PEDV 감염돼지 소장의 박절편 및 초박절편하여 용모상피세포를 광학 및 전자현미경을 통해 바이러스 입자를 확인하고 소장용모상피의 미세구조 변화상을 관찰하였다.

Ducatelle 등⁹과 Coussement 등⁴은 초유를 급여하지 않은 자돈에 PEDV를 실험집종하여 투과 전자현미경과 면역형광항체법을 통해 검사한 결과 PEDV는 주로 소장 용모상피세포의 세포질에서 증식함을 관찰하였는데 본 연구에서도 전자현미경적으로 대부분의 바이러스 입자는 소장의 흡수상피세포 세포질에서 관찰되며, 핵이나 음와부위에서는 거의 관찰되지 않아 이에 일치하였다. 세포질내의 바이러스 입자는 소포(vesicle) 또는 형질내세망에 존재하였으며, 세포 외에 존재하는 바이러스 입자는 미세용모부위에서 주로 관찰되었으며, 돌기를 포함하여 60~90nm(평균 70nm)의 직경을 갖는 다형태성이지만, 대체로 구형으로 관찰되었다고 한다^{9,16}. 그러나, 본변에서 관찰된 바이러스 입자는 직경 95~190nm로 크기가 다양하였다^{7,16,22}. 또한, 면역형광항체법을 통해 PEDV는 TGEV와는 달리 소장용모의 흡수상피세포 뿐만 아니라 음와세포, 결장점막, 장간막림프절에서도 양성반응을 관찰하였다고 한다^{4,8}.

본 실험에서도 소장 특히, 공장의 흡수상피 세포질의 소포와 종대된 형질내세망에서 직경 50~100nm의 많은 바이러스 입자를 관찰하였다. 이들 바이러스 입자는 budding 하기전의 단계로서 돌

기를 함유하지 않았으며, 전자밀도가 높은 중심 부내에 원형의 밝은 부위(halo)가 존재하였으며 세포외에 존재하는 바이러스 입자는 거의 관찰할 수 없었다. 또한, 같은 실험재료를 이용하여 형광항체법을 실시한 실험³⁹에서도 주로 소장점막의 용모상피에서 강한 양성반응을 보였지만, 음와세포와 결장 점막상피세포에서도 약간의 양성반응을 관찰하였다.

TGE나 개의 코로나바이러스 감염증에서도 바이러스 입자는 주로 소장 용모상피세포의 세포질내 소포와 형질내세망에서 직경 85~90nm의 TGEV, 또는 80nm의 개 코로나 바이러스가 구형으로 관찰되었다고 한다^{30,31}.

본 실험에서 관찰된 세포 표면의 변화는 소장 용모상피의 미세용모와 말단 망의 탈락 및 미세용모의 단축, 그리고 수적 감소이었다.

미세용모는 세포손상시 점진적인 세포종창과 함께 불규칙해지거나 탈락되며, 특히 독성 손상시에는 미세용모내 미세섬유(microfilament)는 세포질의 미세소관(microtubule)과의 연락이 붕괴되어 미세용모는 짧아지고 융합이 일어난다고 한다^{3,13}. 미세용모의 이러한 변화는 소화관의 바이러스성 질환인 PED,^{9,16,31} TGE,³¹ 개 코로나바이러스,³⁰ 돼지 로타바이러스,^{19,21} 소의 reovirus-like agent²⁶ 등의 감염에서 관찰되었으며, 기니픽의 살모넬라증²⁸에서도 관찰되었다고 한다.

본 실험에서 관찰되었던 주된 세포질내 변화는 미토콘드리아, 형질내세망 등의 세포미세기관의 종창에 기인한 세포질의 전자밀도 감소였다. 이는 세포변성의 일반적인 소견으로서 세포 손상에 따른 수분의 과다유입으로 발생된다고 한다³.

이러한 세포의 종대는 미토콘드리아의 손상을 의미하는데 심할 경우 능선(crista)은 붕괴되고 종대되며, ATP 생산이 감소되어 수분 유입이 증가하여 세포의 수종변성은 더욱 악화되고,¹² 결국 이러한 ATP 생성장애는 본 실험에서 관찰되었던 세포질내 지방구(fat globules)생성을 유발하게 한다. 이러한 지방구는 지방대사물의 세포간극으로의 운반이 장애되어 생성되거나 RER과 골지체의 변성으로 지방대사의 장애가 일어나게 되는데,³ 장상피 세포질내 지방과립은 세포변성을 유발하는 바이러스성 질환^{9,21,26,30,31} 및 세균성 질환²⁹에서 모두 관찰된다고 한다.

본 연구에서 유리리보솜은 미분화 입방상피세

포 세포질에 미만성으로 혹은 변성세포의 종대된 RER 주위에서 국소적으로 많이 관찰되었는데, 이러한 변성된 세포내의 유리리보솜 증가는 주로 RER의 종대에 의한 탈과립에 의해 발생하며 이는 mRNA의 펩타이드로의 전사과정을 억제하여 단백질 합성을 감소시키므로¹¹ 세포변성은 더욱 심화된다.

하지만 이상의 세포변성시 관찰되는 흡수상피의 미세구조 변화는 PEDV 감염시 관찰되는 특이적 소견은 아니며 바이러스성 질환^{21,26,30,31} 과 세균성 질환^{28,29} 등과 같은 여러가지 원인에 의한 장상피의 변성시에 관찰되는 공통 소견이었다.

Takeuchi 등³⁰에 의한 개 코로나바이러스 감염증의 전자현미경적 관찰에서는 이와 같은 일반적인 세포 병변이외에 세포질내에서 전자밀도가 치밀한 필라멘트양 구조(dense filamentous structure)와 막성소체(membrane-bound body)를 관찰하였으며, 이를 코로나바이러스 감염증의 특징적인 미세구조 변화상이라 하였다. 그러나 본 실험을 포함한 PEDV 감염증^{9,16}과 TGEV 감염증³¹에서는 개 코로나바이러스 감염증과 같은 병변은 관찰되지 않았다.

Ducatelte 등⁹은 신생자돈에 실험적으로 PEDV를 접종하고 시간대별로 부검한 후 전자현미경적 변화상을 관찰하였는데, 접종 후 18시간에 최초로 형질내세망에 바이러스 입자의 출현 후, 접종 후 36시간 이상 경과한 자돈의 소장에서는 변성 세포, 미분화 입방세포, 그리고 정상 원주세포의 3가지 형태의 용모상피세포가 관찰되었으며, 이 중 바이러스 입자는 오직 변성세포에서 관찰할 수 있었다고 했는데, 이러한 소견은 PED 뿐만 아니라 흡수상피에 감수성이 있는 TGE³¹와 로타바이러스 감염증^{19,21}의 회복단계에서도 볼 수 있는 공통소견이었다. 본 연구에서도 대부분의 용모상피에서 3가지 형태의 세포가 관찰되었으며, 이 중 변성세포에서만 바이러스 입자가 관찰되었던 바 본 실험에 사용된 대부분의 돼지는 이미 회복단계에 있었음을 알 수 있었다.

본 실험에서 광학현미경과 전자현미경적 관찰을 통해 용모상단의 상피세포는 변성이 심화되어 장관내로 박리되고 있으며 이를 대체하여 미분화 입방상피가 증식되어 있음을 관찰할 수 있었으며, 음와부위에서는 대조군에 비해 많은 세포분열상(mitosis)이 관찰되었다. 이때 관찰되는 미분

화 입방상피는 음와세포와 유사하여 짧고 불규칙한 미세융모를 지니고 있으며, 세포질에는 다수의 유리리보솜과 많은 분비성 과립을 지니고 있었다. 이는 용모상피세포의 괴사, 박리가 정상에 비해 많아짐에 따라 음와세포의 분열이 증가하여 용모상단으로의 이동이 증가하는데, 이때 세포의 분화속도에 비해 이동속도가 빨라 결과적으로 용모에서 미분화 입방상피가 증가되는 소견이 관찰된다고 한다.³¹ 이러한 소견은 소장의 흡수상피에 감수성이 있는 여러 바이러스성 질환^{6,19,21,30,31}에서 볼 수 있는 공통소견이다.

Moon³⁰은 돼지 소장 용모상피의 정상 교체율은 신생 자돈에서 7~10일 소요되며, 3주령 이상의 돼지는 2~4일 소요된다고 보고하였는데, 이와 같은 사실은 PEDV가 비육돈과 성돈에 감수성이 더 크에도 불구하고 자돈에서 더 높은 폐사율을 보이는 한 이유로 생각된다. 본 실험에서도 약 10~12일령의 나이가 어린 자돈에서 명확한 병변을 관찰할 수 있었는데, 이것도 역시 장상피 교체율에 기인하는 것으로 여겨진다.

소장에서의 소화 및 흡수는 주로 용모상피세포의 미세융모에서 이루어지는데 본 실험에서 관찰된 것과 같은 미세융모의 파괴와 미분화를 초래하는 질병의 이환시에는 소화-흡수 표면의 감소로 인해 흡수부전성 설사가 발생하며, 흡수되지 못한 장관내용물의 발효에 의해 pH가 증가되어 삼투압의 변화가 생기게 되며, 이로 인해 설사가 더욱 악화된다고 한다.^{5,35}

이상의 연구를 통하여 돼지의 PEDV 감염시에는 TGE1, 돼지 로타바이러스 감염증,³² 그리고 개와 송아지의 코로나바이러스 설사증^{6,30} 등에서도 같이 주로 소장의 흡수상피를 파괴하는 바이러스 감염증과 유사한 미세구조의 변화를 일으키며, PED는 주로 미세융모의 변화와 소실에 의한 흡수부전성 설사(malabsorptive diarrhea)와 관련됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Bulter DG, Gall DG, et al. Transmissible gastroenteritis. Mechanisms responsible for diarrhea in an acute viral enteritis in piglets. J Clin Invest 53:1335-1342, 1974.
2. Callebaut P, DeBouck P, et al.

- Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. *Vet Microbiol* **7**:295-306, 1982.
3. Cheville NF. Interpretation of acute cell injury: Degeneration. In: *Ultrastructural pathology*, 1st ed., pp.51-79, Iowa state univ press, Ames, Iowa, USA, 1994.
 4. Coussement W, Ducatelle R, et al. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet pathol* **19**:46-56, 1992.
 5. Crane RK. Enzymes and malabsorption: a concept of brush border membrane disease. *Gastroenterology* **50**:254-262, 1966.
 6. Dea S, Roy RS, et al. Physicochemical and biological properties of neonatal calf diarrhea coronaviruses isolated in Quebec and comarison with the Nebraska calf coronavirus. *Am J Vet Res* **41**(1):23-29, 1980.
 7. DeBouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777. *Am J Vet Res* **41**:219223, 1980.
 8. DeBouck P, Pensaert M, et al. The pathogenesis of an enteric infection in pig, experimentally induced by the coronaviruslike agent, CV777. *Vet Microbiol* **53**:157-165, 1981.
 9. Ducatelle R, Coussement W, et al. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. *Vet Pathol* **19**:57-66, 1982.
 10. Egberink HF, Ederveen J, et al. Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhea virus, strain CV777. *Am J Vet Res* **49**:1320-1324, 1988.
 11. Farber E, Liang H, et al. Dissociation of effects on protein synthesis and ribosomes from membrane changes induced by carbon tetrachloride. *Am J Pathol.* **64**(3):601-617, 1971.
 12. Hirokawa N, Heuser JE. Structural evidence that botulinum toxin blocks neuromuscular transmission by impairing the calcium influx that normally accompanies nerve depolarization. *J Cell Biol* **88**:160-171, 1981.
 13. Hirokawa N, Keller TC 3d, et al. Mechanism of brush border contractility studied by the quick-freeze, deep-etch method. *J cell biology* **96**(5):1325-1336, 1983.
 14. Hofmann M, Wyler R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clinic Microbiol* **26**(11):2235-2239, 1988.
 15. Hofmann M, Wyler R. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus(PEDV). *Vet Microbiol* **20**(2):131-142, 1989.
 16. Horvath I, Mocsari E. Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pig affected with a transmissible gastroenteritis(TGE)-like disease. *Arch virol* **68**:103-113, 1981.
 17. Knuchel M, Ackermann M, 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.
 18. Kusanagi KI, Kuwahara H, et al. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J Vet Med Sci* **54**:313-318, 1992.
 19. McAdaragh JP, Bergeland ME, et al. Pathogenesis of rotaviral enteritis in gnotobiotic pigs: a microscopic study. *Am J Vet Res* **41**(10):1572-1581, 1980.
 20. Moon HW. Intestine. In: *cell pathology*, ed. Cheville NF, 2nd ed., pp.503-529. Iowa State Univ Press, Ames. Iowa, USA, 1983.
 21. Pearson GR, McNulty MS. Ultrastructural changes in small intestinal epithelium of neonatal pigs infected with pig rotavirus. *Arch virol* **59**:127-136, 1979
 22. Pensaert MB, DeBouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* **28**:243-247, 1978.
 23. Pensaert MB, Porcine epidemic diarrhea. In: *Disease of swine*, ed. Leman AD, 7th ed., pp.293-298. Iowa State Univ Press, Ames,

- Iowa, USA, 1992.
24. Pijpers A, van Nieuwstatt AP, 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.
 25. Sibalin M, Bjorkman N. On the fine structure and absorptive function of the porcine jejunal villi during the early suckling period. *Arch Experi Vet* **44**:165-174, 1966.
 26. Stair EL, Mebus CA, et al. Neonatal calf diarrhea. Electron microscopy of intestines infected with a reovirus-like agent. *Vet Path* **10**:155-170, 1973.
 27. Staley TE, Jones EW, et al. The jejunal absorptive cell of the newborn pig: An electron microscopic study. *Anat Rec* **161**:497-516, 1968.
 28. Takeuchi A, Sprinz H. Electron-microscope studies of experimental salmonella infection in the preconditioned guinea pig. *Am J pathol* **51**:137-161, 1967.
 29. Takeuchi A, Formal SB, et al. Experimental acute colitis in the Rhesus monkey following peroral infection with *Shigella Flexneri*. An electron microscope study. *Am J Pathol* **52**(3):503-529, 1968.
 30. Takeuchi A, Binn LN, et al. Electron microscope study of experimental enteric infection in neonatal dogs with a canine coronavirus. *Arch pathol* **34**:539-549, 1976.
 31. Thake DC. Jejunal epithelium in transmissible gastroenteritis of swine. An electron microscopic and histochemical study. *Am J Pathol* **53**:149-168, 1968.
 32. Theil KW, Bohl EH, et al. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* **39**:213-220, 1978.
 33. Theil KW, Linda JS, et al. Concurrent porcine rotaviral and transmissible gastroenteritis viral infections in a Three-day-old conventional pig. *Am J Vet Res* **40**:719-721, 1979.
 34. Timoney JF, Gillespie JH, et al. Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals, 8th ed., pp.897-898. Cornell Univ Press, 1988.
 35. Trier JS. Structure of the mucosa of the small intestine as it relates to intestinal function. *Fed Proc* **26**:1391-1404, 1967.
 36. van 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**(7):1044-1050, 1991.
 37. Woods RD. Efficacy of vaccination of sows with serologically related coronaviruses for control of transmissible gastroenteritis in nursing pigs. *Am J Vet Res* **45**:1726-1720, 1984.
 38. 박남용, 조경오, 등. 돼지 유행성 설사증 바이러스의 분리동정. *대한수의사회지* **29**:360-365, 1993.
 39. 박남용, 조경오. 돼지 유행성 설사증(PED)의 진단을 위한 면역조직화학적 기법의 응용. *대한수의학회지* **34**:805, 1994.
 40. 박남용, 김태주, 등. In Situ Hybridization 기법을 응용한 돼지 유행성 설사증의 진단: 대한수의학회지 투고중.