

한국 이유자돈에서 검출된 돼지 유행성 설사 바이러스의 유전자 서열 분석

신현근 · 김영훈 · 서태원 · 한정희*

강원대학교 수의학부(대학)

(접수 2009. 2. 10, 게재승인 2009. 3. 25)

Genetic sequence analysis of Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detected from postweaning pigs in Korea

Hyun-Geun Shin, Yeong-Hun Kim, Tae-Won Seo, Jeong-Hee Han*

Department of Veterinary Medicine and Institution of Veterinary Science,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received 10 February 2009, accepted in revised from 25 March 2009)

Abstract

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), an enveloped single stranded RNA virus in the family *Coronaviridae*, causes acute viral enteric disease in piglets. Recently outbreaks of porcine epidemic diarrhea (PED) have been rare in Europe but frequent in Asia. In Korea, the increase of PED prevalence is showing specially in postweaning pigs. The purpose of this study was to investigate nucleotide sequence of nucleocapsid protein gene of PEDV field isolates from postweaning pigs in Korea and get more information about the viruses. A total of 15 postweaning pigs clinically suspected of PEDV infection by severe watery diarrhea and dehydration were used in this study. Viral RNA was extracted from small intestines and stools of the pigs. The N gene was amplified by nested RT-PCR, purified, sequenced, analyzed and then compared with published sequences of other PEDV strains. Three PEDVs were isolated from the suspected postweaning pigs. The N gene of three PEDV field isolates consisted of 483 nucleotides. These PEDV field isolates showed nucleotide sequence homology range from 99.6% to 95% with Chinese strains, from 99.8% to 95.2% with Korean strains, from 97.3% to 95.7% with Japanese strains and from 96.5% to 95.7% with Belgium and British strains. The encoded protein shared range from 98.8% to 95.6% with Chinese strains, from 99.4% to 95% with Korean strains, from 97.5% to 96.3% with Japanese strains, from 95.6% to 95% with Belgium and British strains. By phylogenetic tree analysis based on nucleotide sequence, three PEDV field isolates were clustered into two groups which were Chinese isolate groups and other Korean isolate groups. These results indicated that some of PEDV field isolates prevailing in Korean postweaning pigs may be associated with those of Chinese strains and other Korean strains.

Key words : PEDV, Nucleocapsid protein gene, Sequence analysis

* Corresponding author: Jeong-Hee Han, Tel. +82-33-250-8691,
Fax. +82-33-256-3722, E-mail. hanjh@kangwon.ac.kr

서 론

돼지 유행성 설사(porcine epidemic diarrhea: PED)는 돼지에서 전염성이 강한 급성 바이러스성 소화기질환으로서 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus: PEDV)가 그 원인체이다. PEDV는 주로 포유자돈의 소장용모상피세포의 세포질내에서 증식하여 용모상피의 변성 및 괴사, 용모의 위축과 탈락을 일으켜 흡수장애를 초래하고 지속적인 수양성설사로 인한 전해질의 고갈과 탈수로 자돈을 폐사시키며 자돈의 폐사율은 거의 100%에 달한다(Debouck과 Pensaert, 1980).

PED는 1970년대 초 영국에서 처음으로 발생하였다(Oldham, 1972). Pensaert와 DeBouck (1978)는 벨기에에서 유행성 설사가 발생하였을 때 채취한 설사변과 소장을 전자현미경으로 관찰한 결과 coronavirus와 유사한 입자를 관찰하여 CV777주로 명명하였다(Pensaert와 DeBouck, 1978). 이후 독일, 캐나다, 일본, 한국, 프랑스, 벨기에, 스위스 등 대부분의 양돈 국가에서 PED가 발병하는 것으로 보고되고 있다(Pensaert와 Yeo, 2006). 국내에서는 1992년 처음으로 간접형광항체검사서에서 PEDV에 대한 양성반응을 보인 가검체료를 Vero 세포에 연속으로 계대하여 분리하였다(Kweon 등, 1993). PED는 많은 지역에서 지속적인 발병을 보여 국내양돈산업에 있어서 자돈폐사의 주 원인이 되며 이로 인한 경제적인 피해는 심각하다.

PEDV는 TGEV, feline coronavirus, canine coronavirus, human coronavirus 229E와 함께 coronavirus속의 group 1a으로 분류된다. PEDV는 single stranded positive RNA 바이러스로 다형태를 나타내며 표면에는 방사상으로 배열된 18~23nm의 곤봉모양의 표면돌기를 가지고 있고 직경은 95~190nm이다(Egberink 등, 1988). PEDV는 에테르와 클로로포름에 의해 쉽게 불활화되며 TGEV보다 온도에 대한 저항성이 강하다(Hofmann과 Wyler, 1989). 바이러스의 증식은 아프리카 녹색 원숭이의 신장세포(Vero cell)에서 가능하다(Hofmann과 Wyler, 1988).

PEDV의 항원 및 항체를 검출하기 위한 기법으로 면역형광검사법, ELISA법 등이 사용되어 왔으나 최근에는 민감도와 특이도가 높고 빠른 진단이 가능한 중합효소연쇄반응(PCR)이 일반적으로 사용되고 있다(Mahbubani와 Bej, 1994).

PEDV의 genomic RNA에는 major peplomer glycoprotein을 coding하는 S gene, membrane glycoprotein을 coding하는 M gene, nucleocapsid protein을 coding하는 N gene 등이 존재한다(Murphy, 1999). 이 중에서 N gene은 coronavirus에 감염된 세포에서 가장 많이 복제되는 mRNA이므로 N gene은 PEDV의 PCR 검사에 있어서 적합한 표적 유전자가 될 수 있다(Siddel 등, 1982; Siddel 등, 1983; Yamada 등, 1993).

Bridgen 등(1993)에 의하여 CV777주의 3' 말단과 N gene을 포함한 염기서열이 밝혀졌으며, Kubota 등(1990)은 CV777주, 일본분리주, 한국분리주의 N gene 일부를 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)로 증폭하여 염기서열을 비교분석하였다(Bridgen 등, 1993; Kubota 등, 1990). Duarte 등(1994)은 Br1/87주와 CV777주의 N gene과 spike protein (S) gene의 염기서열 분석을 통하여 3개의 주요 open reading frame (ORF)인 M gene, small membrane (sM) gene, ORF3 gene이 존재함을 밝혔다.

최근 PED의 발병 양상은 국가별 차이가 나타나는 것으로 보고되고 있으며, PED의 발병률 및 자돈의 폐사율은 유럽의 국가에서 낮은 반면 한국, 중국, 일본 등의 아시아의 국가에서 매우 높은 것으로 보고되고 있다. 국내에서는 PEDV백신을 접종하고 있지만 PED에 의한 피해는 지속적이고 심각하다. 특히 국내 이유자돈에서 발생하는 주된 바이러스성 설사병은 rotavirus 감염증이었으나 최근에는 PED의 발병도 증가하는 추세이다(Oh 등, 2000). 따라서 본 연구는 국내 이유자돈에서 유행하는 PEDV의 N gene을 RT-PCR법으로 검출하고 N염기서열을 분석하여 기존에 보고된 국외분리주 및 국내분리주와 유전적 특성을 비교분석하였다.

재료 및 방법

공시재료

2007년 1월~12월까지 국내 양돈장에서 PED의 전형적인 임상증상을 나타내는 이유자돈 15두의 소장조직을 본 실험에 사용하였다.

RNA 추출

RNA 추출은 Accuprep[®] viral RNA extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 제사의 설명에 따라 실시

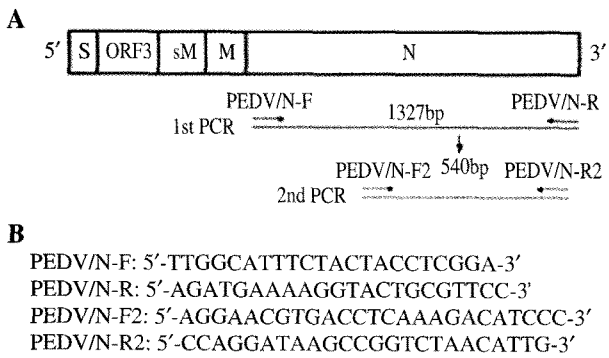


Fig. 1. A) Schematic representation of the gene coding for the N protein. [The positions of the oligonucleotide primers used for PCR amplification are indicated by arrow heads. B) the sequence of the primers].

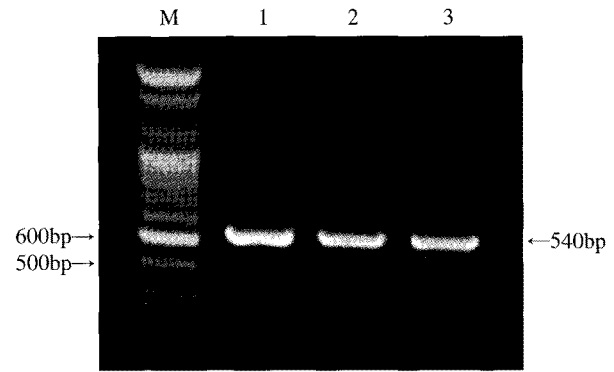


Fig. 2. Amplified N gene of PEDV by nested RT-PCR. [Lanes: M, 100kb size DNA ladder; 1, KPEDV1; 2, KPEDV2; 3, KPEDV3].

하였다.

Oligonucleotide primer

PEDV N gene의 증폭 primer는 Kubota 등(1990)과 동일하게 합성하였다(Fig. 1).

역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)

RNA template 5µl에 0.2µM의 PEDV/N-F1와 PEDV/N-F2 primer, Smart 1step RT/PCR premix 18µl를 첨가한 반응액 25µl를 42°C 40분, 95°C 2분의 반응조건에서 1회 시행한 다음 계속하여 95°C 20초, 55°C 40초, 72°C 1분의 반응조건에서 35회 반복하였고 72°C 5분간 반응조건에서 1회 시행하였다. 1차 PCR에서 증폭된 생성물 5µl에 0.2µM의 PEDV/N-F2와 PEDV/N-R2 primer, Smart 2x PCR-premix 25µl, 멸균된 증류수 18µl를 첨가한 반응액 50µl를 95°C 2분의 반응조건에서 1회 시행한 다음 계속하여 95°C 20초, 61°C 40초, 72°C 1분의 반응조건에서 35회 반복하였고 72°C 5분간 반응조건 1회 시행하였다.

증폭된 PCR산물의 확인은 TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)를 전해질로 사용한 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, 40mM ethidium bromide용액에서 gel을 염색하여 UV transilluminator (Vilberlourmart, France)로 생성된 band를 확인하였다.

정제화 및 염기서열의 분석

PEDV의 염기서열 분석을 위하여 N gene에서 증폭된 540bp의 PCR 생성물을 GENE CLEAN® Turbo kit (BIO101, USA)로 정제하였다. DNA 염기서열은 Macrogen Inc. DNA sequencing service (Macrogen, Korea)를 이용하여 분석하였고, 분석된 염기서열은 Mega version 4.0을 이용하여 기존에 검출된 PEDV 염기 및 아미노산 서열과 비교분석 및 phylogenetic tree를 작성하여 분석하였다.

결 과

중합효소 연쇄반응

PEDV 감염이 의심되는 이유자돈 15두의 소장에서 RNA를 추출하고 nested RT-PCR을 이용하여 N gene을 증폭시킨 후 PCR 생성물을 1% agarose gel에서 전기영동한 결과 3개의 PEDV N gene을 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

N gene의 염기서열 분석

본 실험에서 검출된 PEDV N gene의 염기서열을 기존에 검출된 국내 및 국외 분리주와 비교분석하였다 (Fig. 3).

N gene 염기서열에서 KPEDV1은 KPEDV2와 3개 부위에서 서로 다른 서열을 나타내었고 다른 분리주 KPEDV3와 비교시 22개 부위에서 서로 다른 서열을 나타내었다.

KPEDV1과 KPEDV2의 염기서열은 중국분리주(DX

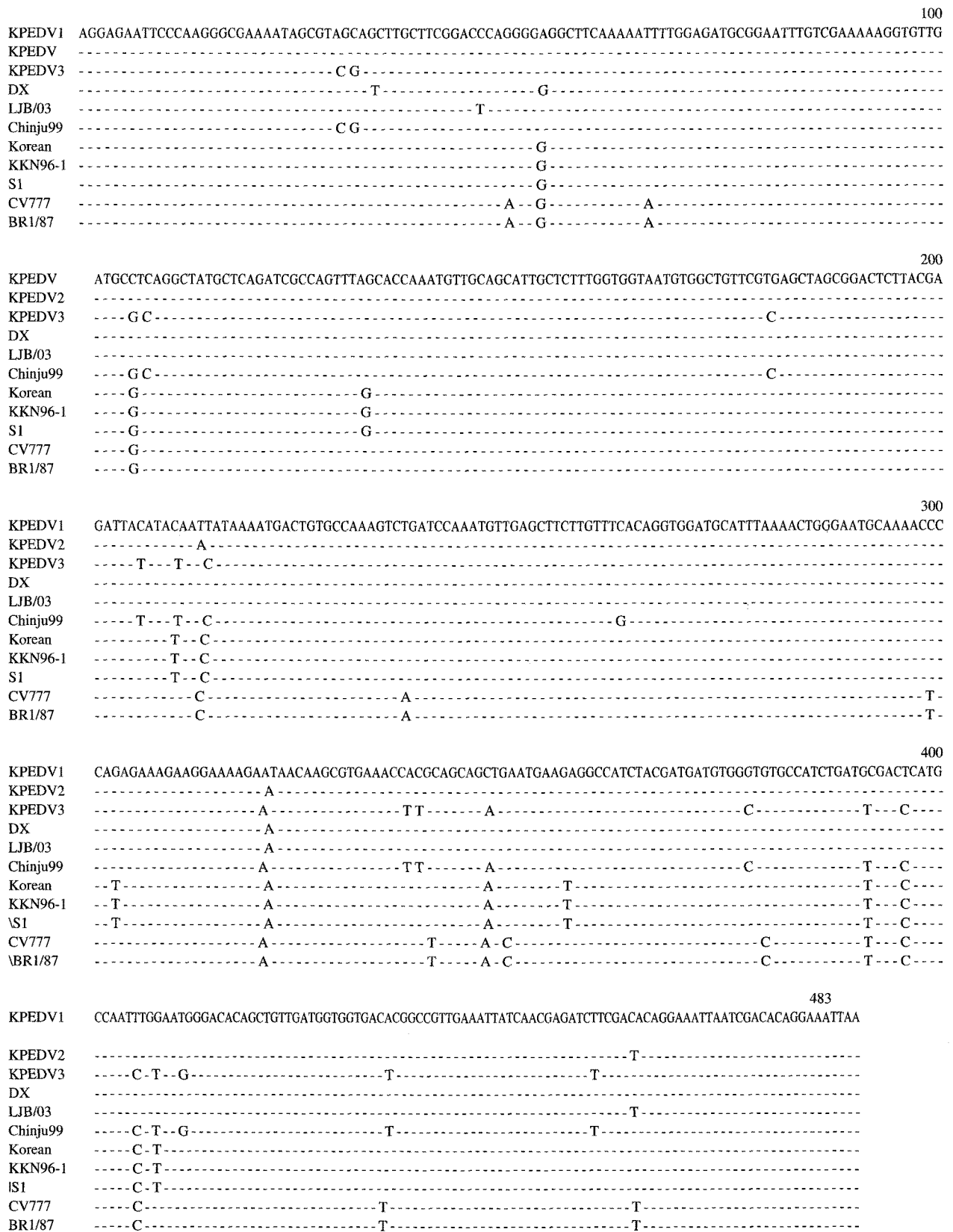


Fig. 3. The nucleotide sequence comparison of nucleocapsid protein gene (N gene) in KPEDV1, KPEDV2, KPEDV3 and PEDV reference strains by MEGA software.

및 LJB/03)와 비교시 2~3개 부위, 한국분리주(Korean 및 Chinju99)와 비교시 13~23개 부위, 일본분리주(KKN 96-1 및 S1)과 비교시 13개 부위, 벨기에분리주(CV777)와 비교시 17개 부위, 영국분리주(BR1/87)와 비교시 17개 부위에서 서로 다른 서열을 나타내었다. KPEDV3의 염기서열은 중국분리주(DX 및 LJB/03)와 비교시 22~23개 부위, 한국분리주(Korean 및 Chinju 99)와 비교시 1~15개 부위, 일본분리주(KKN 96-1 및 S1)와 비교시 15개 부위, 벨기에분리주(CV777)와 비교시 21개 부위, 영국분리주(BR1/ 87)와 비교시 21개 부위에서 서로 다른 서열을 나타내었다.

염기서열에 의한 상동성 분석 결과 KPEDV1은 KPEDV2와 99.4%, KPEDV3와 95.4%의 상동성을 나타내었다. KPEDV2는 KPEDV3와 95.4%의 상동성을 나타내었다. KPEDV1과 KPEDV2는 중국분리주(DX 및 LJB/03)와 99.6%, 한국분리주(Korean 및 Chinju99)와 95.2~97.3%, 일본분리주(KKN-96-1 및 S1)와 97.3~96.9%, 벨기에분리주(CV777)와 96.5%, 영국분리주(BR1/87)와 96.5%의 상동성을 나타내었다. KPEDV3는 중국분리주(DX 및 LJB/03)와 95.2~95.4%, 한국분리주(Korean 및 Chinju99)와 96.9~99.8%, 일본분리주(KKN-96-1 및 S1)와 95.7~96.9%, 벨기에분리주(CV 777)와 95.7%, 영국분리주(BR1/87)와 95.7%의 상동성을 나타내었다(Table 1).

N gene의 아미노산서열 분석

본 실험에서 검출된 PEDV N gene의 아미노산 서열을 기준에 검출된 국내 및 국외 분리주와 비교분석하였다(Fig. 4).

N gene 아미노산 서열에서 KPEDV1은 KPEDV2와 2개 부위에서 서로 다른 서열을 나타내었고 다른 분리주 KPEDV3와 비교시 7개 부위에서 서로 다른 서열을

나타내었다.

KPEDV1과 KPEDV2의 아미노산 서열은 중국분리주(DX 및 LJB/03)와 비교시 2개 부위, 한국분리주(Korean 및 Chinju99)와 비교시 5~7개 부위, 일본분리주(KKN96-1 및 S1)과 비교시 4~5개 부위, 벨기에분리주(CV777)와 비교시 7개 부위, 영국분리주(BR1/87)와 비교시 7개 부위에서 서로 다른 서열을 나타내었다.

KPEDV3의 염기서열은 중국분리주(DX 및 LJB/03)와 비교시 7개 부위, 한국분리주(Korean 및 Chinju99)와 비교시 1~6개 부위, 일본분리주(KKN96-1 및 S1)와 비교시 5~6개 부위, 벨기에분리주(CV777)와 비교시 8개 부위, 영국분리주(BR1/87)와 비교시 8개 부위에서 서로 다른 서열을 나타내었다.

아미노산 서열에 의한 상동성 분석 결과 KPEDV1은 KPEDV2와 98.8%, KPEDV3와 95.6%의 상동성을 나타내었다. KPEDV1과 KPEDV2는 중국분리주(DX 및 LJB/03)와 98.8%, 한국분리주(Korean 및 Chinju99)와 95~96.9%, 일본분리주(KKN-96-1 및 S1)와 96.9~97.8%, 벨기에분리주(CV777)와 95.6%, 영국분리주(BR1/ 87)와 95.6%의 상동성을 나타내었다. KPEDV3는 중국분리주(DX 및 LJB/03)와 95.6%, 한국분리주(Korean 및 Chinju99)와 96.3~99.4%, 일본분리주(KKN-96-1 및 S1)와 96.6~96.9%, 벨기에분리주(CV777)와 95%, 영국분리주(BR1/87)와 95%의 상동성을 나타내었다 (Table 2).

N gene의 phylogenetic tree 분석

염기서열과 아미노산서열에 의한 phylogenetic tree 분석 결과 KPEDV1, KPEDV2는 중국분리주(DX 및 LJB/03)와 같은 계열에 속하였고 KPEDV3는 한국분리주(Chinju99)와 같은 계열에 속하였다(Fig. 5A, 5B). 벨기에분리주(CV777)와 영국분리주(BR1/87)는 같은

Table 1. Percent homology of nucleotide sequence of nucleocapsid protein gene of PEDV

	KPEDV1	KPEDV2	KPEDV3
KPEDV1			
KPEDV2	99.4		
KPEDV3	95.4	95.4	
DX	99.6	99.4	95.4
LJB/03	99.4	99.6	95.2
Chinju99	95.2	95.2	99.8
Korean	97.3	97.3	96.9
KKN96-1	97.3	97.3	95.7
S1	96.9	97.3	96.9
CV777	96.5	95.7	95.7
BR1/87	96.5	95.7	95.7

Table 2. Percent homology of amino acid sequence of nucleocapsid protein gene of PEDV

	KPEDV1	KPEDV2	KPEDV3
KPEDV1			
KPEDV2	98.8		
KPEDV3	95.6	95.6	
DX	98.8	98.8	95.6
LJB/03	98.8	98.8	95.6
Chinju99	95	95	99.4
Korean	96.9	96.9	96.3
KKN96-1	97.5	97.5	96.9
S1	96.9	96.9	96.3
CV777	95.6	95.6	95
BR1/87	95.6	95.6	95

	100
KPEDV1	RRIPKGENSVAAACFGPRGGFKNFGDAEFVEKGVDSAGYAQIASLAPNVAALLFGGNVAVRELADSYEITYNYKMTVPKSDPNVELLSQVDAFKTGNAKP
KPEDV2	-----K-----
KPEDV3	-----R-----P-----I-----
DX	-----V-----
LJB/03	-----L-----
Chinju99	-----R-----P-----I-----A-----
Korean	-----
KKN96-1	-----
S1	-----
CV777	-----
LBR1/87	-----L-----
	160
KPEDV1	QRKKEKNNKRETTQQLNEEALYDDVGVPSDATHANLEWDTAVDGGDTAVEINEIFDTGNLYDDVGVPSDATHANLEWDTAVDGGDTAVEINEIFDTGN
KPEDV2	-----K-----
KPEDV3	-----K-----I-----Q-----V-----
DX	-----K-----
LJB/03	-----K-----
Chinju99	-----K-----I-----Q-----V-----
KoreanH	-----K-----Q-----V-----V-----
KKN96-1H	-----K-----Q-----V-----V-----
S1H	-----K-----Q-----V-----V-----
CV777	-----K-----L-----QH-----A-----V-----
BR1/87	-----K-----L-----QH-----A-----V-----

Fig. 4. Deduced amino acid sequence comparison of nucleocapsid protein gene (N gene) in KPEDV1, KPEDV2, KPEDV3 and PEDV reference strains by MEGA software.

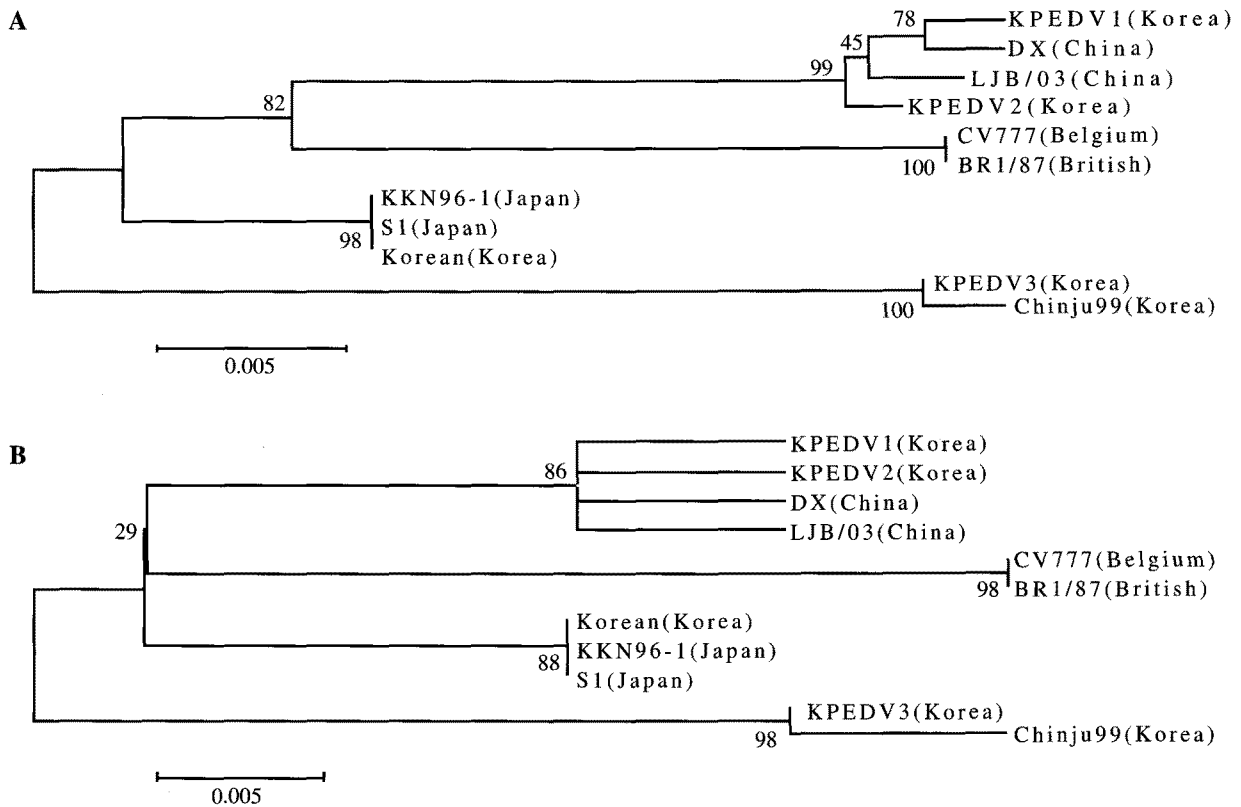


Fig. 5. The phylogenetic trees were produced by the MEGA software based on the nucleotide (A) and amino acid (B) sequences, showing the relationships of the Korean and PEDV reference strains.

계열에 속하였고 일본분리주(KKN96-1 및 S1)와 한국 분리주(Korean)도 같은 계열에 속하였다.

고 찰

Park 등(1995)은 PED의 전형적인 임상증상을 나타내는 포유자돈의 분변에서 얻은 PEDV N gene의 염기서열을 벨기에분리주(CV777)와 비교하였을 때 97%의 상동성을 나타내었다고 보고하였으며, Kubota 등(1999)은 PEDV N gene의 염기서열 분석에서 1996년 일본분리주(KKN96-1 및 S1)는 벨기에분리주(CV777)와 각각 97.2%, 97.4%의 상동성을 나타냈지만 일본분리주(S1)는 한국분리주(Korean)와는 100%의 상동성을 나타내었다고 보고하였다.

본 연구의 N gene 염기서열과 아미노산서열에서 KPEDV1과 KPEDV2는 98.8~99.4%의 높은 상동성을 보였지만 KPEDV3와 95.4~95.6%의 비교적 낮은 상동성을 보여 국내 이유자돈에서 검출된 PEDV는 유전적 차이가 있는 것으로 생각된다. KPEDV1과 KPEDV2는 중국분리주(DX 및 LJB/03)와 N gene의 염기서열에서 99.6%, 아미노산서열에서 98.8%의 매우 높은 상동성을 보였고 N gene의 phylogenetic tree 분석결과 중국분리주와 같은 계열에 속하여 현재까지 국내에서 분리 보고된 적이 없었던 중국분리주에서 유래한 PEDV의 유전자에 pointmutation이 발생한 것으로 추정된다. KPEDV3는 한국분리주(Chinju99)와 N gene의 염기서열에서 99.8%, 아미노산서열에서 99.4%의 매우 높은 상동성을 보였고 N gene의 phylogenetic tree 분석결과 한국분리주와 같은 계열에 속하여 한국분리주에서 유래한 PEDV에 pointmutation이 발생한 것으로 추정된다.

본 연구에서 이유자돈에서 검출된 KPEDV1, KPEDV2, KPEDV3는 N gene 염기서열에서 일본분리주(KKN-96-1 및 S1)와 비교시 95.7~97.3%의 상동성을 보였고 벨기에분리주(CV777)와 비교하였을 때 95.7~96.5%의 상동성을 보여 포유자돈 설사변을 이용하여 연구한 Kubota 등(1990)과 Park 등(1995)의 연구결과와도 차이를 나타내었다.

돼지유행성 설사병의 원인체인 PEDV는 type2 Coronaviridae에 속하는 RNA virus로서 RNA virus의 특성상 mutation이 매우 빠르게 이루어질 것이며, 현재까지의 연구에 의하면 농장에서 질병을 일으키는 field type

과 vaccine strain간의 유전자적 변이가 매우 많이 이루어진 것을 밝혀냈다. 본 실험에서 이유자돈에서 검출된 중국분리주 유래의 PEDV로 추정되는 KPEDV1 및 KPEDV2와 한국분리주 유래의 PEDV로 추정되는 KPEDV3는 현재 국내에서 사용되는 일본백신주의 염기와 아미노산서열의 비교에서도 많은 차이를 나타내는 것으로 판단된다. 현재 국내 양돈장에서 지속적으로 PED 백신을 사용하고 있음에도 불구하고 이 질병의 발생율은 전혀 줄어들지 않고 오히려 더 증가하는 추세이며, 기존에 보고되었던 포유자돈을 대상으로 한 연구결과 뿐만 아니라 이유자돈을 대상으로 한 본 연구의 결과에서도 알 수 있듯이 국내의 PEDV는 유전적 다양성이 더 증가하며 그에 따른 발병양상도 증가하는 추세이다. 따라서 국내에서 유행하는 PEDV의 특성 규명을 위한 좀 더 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구 결과 2007년 국내 양돈장의 이유자돈 15두에서 3개의 PEDV N gene이 검출되었다.

검출된 3개의 PEDV 중 2개는 N gene의 염기 및 아미노산서열에서 중국분리주와 비교시 높은 상동성과 계통성을 보였으며 나머지 1개는 한국분리주와 비교시 높은 상동성과 계통성을 보여 국내 이유자돈에서 검출되는 PEDV는 중국 및 한국 분리주와 유사한 유전자적 특성을 나타내었다.

본 연구를 통해 국내 이유자돈에서 문제가 되고 있는 PED는 기존에 보고되었던 한국 분리주 뿐만 아니라 중국분리주도 함께 연관되어 문제가 되고 있으며 PEDV는 지속적으로 N gene에 point mutation이 진행되는 것으로 사료된다. 본 연구는 국내 PEDV의 계통 유전에 대한 자료를 제공하며, 국내에서 유행하는 PEDV의 특성 규명을 위한 좀 더 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부와 한국산업기술평가원이 지원하는 진주산업대학교 동물생명산업센터의 사업비 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Bridgen A, Duart M, Tobler K, et al. 1993. Sequence determination of the nucleocapsid protein gene of the porcine epidemic diarrhea virus conforms that this virus is a coronavirus related to human coronavirus 229E and porcine transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol* 74: 1795-1804.
- Debouck P, Pensaert M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777. *Am J Vet Res* 41: 219-223.
- Duarte M, Tobler K, Bridgen A, et al. 1994. Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. *Virology* 198: 446-476.
- Egberink HF, Ederveen J, Callebaut P, et al. 1988. Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhea virus, strain CV777. *Am J Vet Res* 49: 1320-1324, 1988.
- Hofmann M, Wyler R. 1989. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Vet Microbiol* 20: 131-142.
- Hofmann M, Wyler R. 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol* 26: 2235-2239.
- Kubota S, Sasaki O, Amimoto K, et al. 1990. Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus. *J Vet Med Sci* 61: 827-830.
- Kweon CH, Kwon BJ, Jung TS et al. 1993. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea. *Kor J Vet Res* 33: 249-254.
- Mahbubani MH, Bej AK. 1994. PCR Technology, Current Innovations, CRC Press, Florida, USA: 307-324.
- Murphy FA. 1999. *Coronaviridae*. In: Veterinary virology, 3 eds. Academic press. San Diego, California, USA: 495-508.
- Oh MH, Eun GS, Kyon YH. 2000. Investigation of disease incidence to pre and postweaning piglets. *Kor J Vet Res* 40(1): 173-186.
- Oldham J. 1972. Pig farming (Oct. suppl): 72-73.
- Park JY, Kim CJ, Shin KS. et al. 1995. Sequence analysis and cDNA probe hybridization of the nucleocapsid (N) protein gene of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Kor J Vet Res* 35: 515-530.
- Pensaert MB, DeBouck P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 58: 243-247.
- Pensaert MB, Yeo SG. 2006. Disease of swine, ed by Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. The Blackwell Publishing Professional, Ames, IA: 367-372.
- Siddel S, Wege H, Ter Meulen V. 1982. The structure and replication of coronaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 99: 131-163.
- Siddel S, Wege H, Ter Meulen V. 1983. The biology of coronavirus. *Gen Virol* 64: 761-776.
- Yamada Y, Yabe M, Yamada A, et al. 1993. Detection of mouse hepatitis virus by the polymerase chain reaction and its application to the rapid diagnosis of infection. *Lab Anim Sci* 43: 285-290.