

免疫電子顯微鏡(IEM) 技法 및 immunogold conjugate 免疫電子顯微鏡(IGC-IEM) 技法을 이용한 돼지 분변내 PED 바이러스의 檢出

김재훈 · 황의경 · 배유찬 · 손현주* · 박중원 · 윤용덕

수의과학연구소 병리진단과
건국대학교 수의학과*
(1995년 4월 13일 접수)

Detection of PED virus by the immunoelectron microscopy and immunogold
conjugate immunoelectron microscopy

Jae-hoon Kim, Eui-kyung Hwang, You-chan Bae,
Hyun-joo Son*, Jung-won Park, Yong-dhuk Yoon

National Veterinary Research Institute, Pathology Division
Department of Veterinary Medicine, Kon-kuk University*
(Received April 13, 1995)

Abstract : Both immunoelectron microscopy(IEM) and immunogold conjugate immunoelectron microscopy (IGC-IEM) techniques were developed for the detection of porcine epidemic diarrhea virus(PEDV) from the feces. Fecal samples were incubated sequentially with anti-PEDV monoclonal antibody(MoAb) and immunogold conjugated goat anti-mouse IgG+IgM. Then negatively stained, mounted on the formvar carbon-coated copper EM grids and observed by the transmission electron microscope.

By the direct electron microscopy(DEM), coronavirus particles were observed from 17 cases of total 33 fecal samples of grower pigs and sows. The virons of coronavirus were moderately pleomorphic but mostly spherical, with a diameter ranged from 90 to 190nm.

PED virus particles were identified from 15 cases of 17 DEM positive samples by the IEM and IGC-IEM techniques. Aggregates of PED virus coated with specific antibody were seen in fecal samples incubated with homologous anti-PED virus MoAb but not in control samples incubated with anti-TGE virus MoAb. Following incubation with immunogold-conjugated secondary antibody, the gold granules were usually distributed around and among the virus particles and soluble and viral particle-associated antigen.

So, IEM and IGC-IEM techniques were proved a rapid and sensitive methods for detection and identification of PED virus from fecal and intestinal contents.

Key words : PED virus, IEM, IGC-IEM, feces

서 론

돼지 流行性 泄瀉症(porcine epidemic diarrhea: PED)은 1971년 영국에서 최초로 發生하여 4-5주령 이하의 어린 돼지를 제외하고 육성돈과 비육돈에서 急性 泄瀉를 일으키는 것이 특징으로 'epidemic viral diarrhea'라고 命名하였다¹. 그런데 1976년 포유자돈을 포함한 전 연령의 돼지에서 돼지 전염성 위장염(transmissible gastroenteritis: TGE)과 유사한 급성 泄瀉症이 발생하였는 바 이를 'epidemic viral diarrhea type II'라고 구분하여 불려 왔다². 그러나 여러 학자들의 바이러스 感染 實驗 및 原因體 調查 結果 이 두가지 疾病이 포유자돈 뿐만 아니라 비육돈 등 전 돈군에 病原성을 나타내기 때문에 근본적으로 같은 原因體라는 것이 밝혀져 現在는 PED로 통용되고 있다^{3,4}.

PED와 TGE는 모두 coronavirus가 原因體로 病原體의 抗原성은 상이하지만 臨床 所見은 거의 같아 어린 자돈, 육성돈, 비육돈 및 모돈에서 심한 泄瀉를 일으키고, 특히 생후 2주 이내의 어린 자돈에서는 구토와 극심한 水樣性 泄瀉를 특징으로 하고 전염성과 폐사율이 높으며, 肉眼 所見과 음모의 위축, 융합 및 상피세포의 變形 등 病理組織學的 病變도 대동소이하기 때문에 두 疾病에 대한 특별한 鑑別診斷이 요구된다^{5,6,7,8,9,10}. 일부 臨床家들은 다른 疾病과는 확연히 구별되는 TGE와 PED의 特性들, 즉 돈군 사이의 빠른 疾病 전파 樣相, 전 연령에 發生하는 점 및 수양성의 'hosepipe' 泄瀉樣相 등을 들어 'viral scoures'라고 命名하고 있으나 두 疾病間의 감별은 매우 어렵다고 하였다¹⁰. 따라서 두 疾病의 감별을 위해서는 정확한 臨床 所見 관찰 및 실험실 診斷이 필수 불가결하다. 현재 PED 感染에 대한 실험실 診斷法으로는 돼지 소장 조직의 동결절편을 利用한 螢光抗體技法, 電子顯微鏡을 利用한 바이러스 粒子 確認法 및 糞便 또는 장내용물에 대한 ELISA 技法들이 사용되고 있으나 각 技法에 따라 다소간의 장단점이 있다^{11,12,13,14,15,16}.

免疫電子顯微鏡技法(immunoelectron microscopy: IEM)은 광학현미경상의 免疫組織化學染色法과 거의 유사한 技法으로 조직 세포내 또는 세균, 바이러스 등의 抗原성을 가지는 물질에 특이적으로 반응하는 抗體에 電子顯微鏡으로 觀察이 가능한 물질을 標識(labeling)시켜서 이 標識 抗體를 조직 절편, 세포, 기타 원인 미생물과 반응시켜 그 결합 부위를 觀察하는 技法이다^{17,18,19,20,21}. 免疫電子顯微鏡의 標識에 利用되는 물질은 페리틴 抗體法, 단백질 金技法(protein-A gold tech-

nique) 등의 중금속 標識 抗體法, 방사선 동위원소 標識 抗體法 및 酵素 標識 抗體法 등이 개발되어 여러 연구 분야에 활용되고 있다^{22,23,24}.

국내에서는 약 4년전 부터 TGE와 臨床症狀은 같으나 發生 樣相이 비교적 다른 바이러스성 泄瀉症이 문제시 되어 PED의 發生이 의심되던 중, 권 등²⁵ 및 박 등²⁶에 의해 泄瀉 자돈에서 PED 바이러스가 분리되었고, 황 등²⁷에 의해 病理學的으로 PED의 感染을 역추적하였던 바 1992년 부터 국내에서 發生하고 있음이 確認되었다.

본 연구는 泄瀉 症狀을 나타내는 비육돈 및 모돈의 糞便內 바이러스 粒子를 電子顯微鏡을 利用하여 觀察하고, 免疫電子顯微鏡 技法(IEM) 및 immunogold conjugate 免疫電子顯微鏡 技法(Immunogold conjugate immunoelectron microscopy: IGC-IEM)을 적용하여 PED 바이러스 感染임이 確認되었기에 각 技法과 電子顯微鏡의 所見을 報告하고자 한다.

材料 및 方法

公試 材料 : 경기도와 충청도 지역의 돼지 농장에서 바이러스성 泄瀉 症狀을 나타내는 육성돈과 모돈의 泄瀉便 33점을 공시 재료로 使用하였다. 泄瀉 糞便은 15ml 원심분리관에 넣어 -40℃에 저장 보관하면서 실험에 공시하였다.

단클론抗體 : 免疫電子顯微鏡 檢査 技法에 使用되는 PED 바이러스에 대한 단클론抗體는 스위스 취리히 대학 수의학부 Dr Ackerman으로부터 분양받은 anti-PEDV monoclonal antibody(MoAb)를 利用하였다. TGE에 대한 단클론抗體는 충북대학교 수의학과 강신영 교수로부터 anti-TGEV MoAb를 분양받아 使用하였다.

電子顯微鏡 檢査 : 채취한 泄瀉便을 멸균 증류수로 10배 稀釋하여 균질화하였다. 泄瀉便 균질액을 3000rpm에서 20분간 원심분리하고, 그 상층액을 10,000×g로 40분간 원심분리한 다음 상층액을 0.45μm membrane filter로 여과한 후 다시 상층액을 취하여 100,000×g에서 3시간 초원심하여 바이러스가 함유된 pellet을 만들었다. 초원심 후 상층액은 버리고 pellet에 소량의 멸균 증류수를 가하여 부유시킨 뒤 formvar-coated carbon-grid에 얹은 다음 1% phosphotungstic acid(PTA: Sigma Chemical Co, St Louis, USA)로 negative 染色하여 電子顯微鏡(H-7100FA, Hitachi Ltd,

Tokyo, Japan)으로 觀察하였다.

免疫電子顯微鏡 檢査 : 免疫電子顯微鏡 檢査는 Dea와 Garzon²² 및 Heckert et al²³의 方法을 다소 변형시켜 실시하였다. 電子顯微鏡 檢査를 위해 바이러스 함유 pellet을 멸균 증류수로 부유시킨 다음 1:40배로 稀釋된 anti-PEDV MoAb와 혼합하여 4℃에서 18시간 정지시키고 31,000×g에서 1시간 원심하여 바이러스와 抗體의 결합물을 만들었다. 침전물을 멸균 증류수로 부유시키고 nickle grid에 얹은 뒤 1% phosphotungstic acid로 染色하여 電子顯微鏡으로 觀察하였다. Gold labeled 免疫電子顯微鏡 檢査를 위하여 바이러스와 抗體 결합물에 10nm 크기의 gold 顆粒이 부착된 immunogold conjugate goat anti-mouse IgG+IgM (BioCell Res Lab, UK)을 gold buffer(0.1% BSA in Tris-buffered saline, pH 8.2)에 1:50배로 稀釋하여 37℃에서 30분간 적용시킨 후 300 mesh formvar carbon-coated copper EM grid에 얹어서 染色한 다음 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

TGE 바이러스인지 여부를 確認하기 위한 免疫電子顯微鏡 및 gold labeled 免疫電子顯微鏡 檢査는 1:20배로 稀釋한 anti-TGEV monoclonal antibody를 사용하여 상기의 方法에 준하여 실시하였다. 음성 대조군으로 PEDV 단클론 抗體를 적용시키지 않은 상태의 실험도 병행하였다.

結 果

電子顯微鏡 檢査 : 모돈과 육성돈의 糞便 33점을 negative 染色한 후 電子顯微鏡으로 檢査한 結果 17예(51.5%)에서 coronavirus 粒子가 檢出되어 가장 많은 비율을 차지하였고, 기타 바이러스로 rotavirus 2예, 직경 20nm 내외의 enterovirus-like 바이러스 粒子가 2예 檢出되었다.

Coronavirus 粒子는 직경이 약 90-190nm 정도이고 매우 다양한 形態를 나타내었으나, 대체적으로 둥근 形態로 觀察되며, 바이러스의 변연부는 electron-lucent 하여 회게 나타나는 반면 중심부는 electron-dense 하여 비교적 검게 染色되어 있고 주변부에는 길이 약 15-20nm의 페달 또는 곤봉 모양의 돌기들이 중심에서 외부로 방사상으로 배열된 모습으로 觀察되었다(Fig 1). 때로는 바이러스 粒子 주변의 돌기들이 소실된 形態로 나타나기도 하였다. 검사 糞便 중 2예에서는 직경 60-70nm의 envelop가 없으며 특징적인 마차바퀴 形態를

나타내는 로타바이러스 粒子가 관찰되었다. 로타바이러스는 두겹의 envelop를 모두 가지고 있는 形態로 보이기도 하고, 일부 외곽의 envelop가 소실되어 표면이 울퉁불퉁한 모양으로 관찰되었다(Fig 2).

免疫電子顯微鏡 檢査 : 免疫電子顯微鏡 檢査를 위하여 糞便內 바이러스 粒子 pellet에 PED 및 TGE 바이러스 단클론 抗體를 결합시켜 PED 또는 TGE 바이러스를 檢出하였다. 糞便 총 33예 중, 직접 電子顯微鏡 檢査에서 coronavirus 粒子가 檢出되었던 17예 중 15예에서 PED에 대한 免疫電子顯微鏡 양성 반응을 나타내었고 한 예에서는 TGE 양성 반응을 나타내었으나 나머지 한 예는 두 바이러스 抗體에 모두 반응하지 않았다. PED 바이러스 粒子들은 비교적 전자밀도를 가지고 불규칙하게 흩어져 있는 단클론 抗體 주변으로 응집하여 적게는 5개에서 많게는 20-30개의 바이러스 粒子가 집단으로 모여 있었다(Fig 3). 바이러스 粒子들은 직경이 대체로 90-190nm에 달하고 외부에 돌기를 가지고 있는 완관 모양의 전형적인 coronavirus 形態를 띠기도 하고, 일부는 돌기가 소실된 狀態로 觀察되기도 하였다.

IEM 檢査時 양성 반응을 나타내었던 시료에 대하여 immunogold conjugate goat anti-mouse IgG+IgM을 적용시키는 IGC-IEM 技法을 도입하였다. Gold 顆粒은 대체적으로 다양한 形態의 PED 바이러스에 피복되어 있는 단클론 抗體 주위 또는 다수의 PED 바이러스와 抗體가 결합되어 있는 면역복합체 주위에 부착되어 觀察되었다(Fig 4). 일부에서는 形態를 알 수 없는 무정형의 자유로이 존재하는 바이러스 抗原 주위에 다수의 gold 顆粒이 분포하는 모습도 觀察되었는데, 이것들은 아마도 전형적인 바이러스 모양을 갖추기 이전의 바이러스 관련 抗原 물질(viral particle-associated antigen)인 것으로 추정되었다.

IEM 技法에서 anti-TGEV monoclonal antibody를 적용한 경우에는 한 예에서 PEDV의 경우와 유사하게 바이러스 입자가 抗體 주위에 모여 있었다. 다른 대부분의 경우는 바이러스와 抗體가 면역복합체를 形成하지 않고 coronavirus가 단독으로 도처에 흩어져 존재하였다. IGC-IEM 技法時 PED 바이러스가 검출되었던 예에 대한 대조군으로 TGEV 단클론 抗體를 적용하거나, 전 과정에서 PEDV 단클론 抗體 적용을 생략한 예에서는 coronavirus 粒子 주위에 gold 顆粒이 부착되지 않고 바이러스와 gold 顆粒이 각각 흩어져 있는 形態로 觀察되었다.

考 索

최근 몇 년 전부터 국내 양돈장에서 포유자돈을 비롯한 이우자돈, 육성돈 및 모돈에까지 심한 수양성泄瀉와 구토를 臨床症狀으로 하고, 포유자돈에서 약 50-80%의 높은 폐사율을 나타내는 TGE와 매우 유사한 疾病이 發生하여 그 원인을 밝히던 중 그 原因體가 PED 바이러스임이 입증되었다^{25,26,27}. 그러나 PED는 TGE와 臨床症狀, 病理解剖學的의 所見, 病理組織學的의 病變이 매우 유사하고, 原因體도 coronavirus로 같기 때문에 두 疾病間의 鑑別 診斷이 시급히 요구되는 실정이다. 현재 두 疾病을 감별하기 위하여 바이러스 분리동정, 螢光抗體 檢査法, 免疫組織化學 染色法, ELISA 技法, 電子顯微鏡 技法 등이 많이 응용되고 있다^{11,12,13,14,15,16}. 그러나 바이러스 분리동정의 경우 coronavirus의 특성상 분리가 매우 힘들고 오랜 시간이 소요되기 때문에 실제 診斷에는 응용되지 않는 실정이며, 螢光抗體 檢査 및 免疫組織化學 染色法의 경우 신선한 시료에 적용해야 좋은 結果를 얻을 수 있으며, 반드시 조직 시료가 있어야 檢査를 할 수 있기 때문에 진단상 제약이 따른다. 따라서 국내 또는 외국의 많은 실험실에서는 腸內 病原性 coronavirus의 感染이 의심되는 개체의 診斷은 腸組織의 感染된 세포내에서 coronavirus 抗原을 檢出하는 螢光抗體 檢査와 糞便 또는 장내용물에서 電子顯微鏡을 이용하여 원인 바이러스를 檢出하는 두가지 실험이 병행되고 있는 실정이다.

Flewett¹²는 傳染性泄瀉 症狀을 나타내는 사람의 糞便에서 電子顯微鏡을 이용한 일반적인 negative 染色 方法과 항혈청을 이용한 免疫電子顯微鏡 技法을 이용하여 rotavirus, adenovirus, coronavirus, astrovirus 등이 檢出됨을 報告하였다. 그러나 coronavirus는 그 形態가 매우 다양하고 바이러스의 처리 과정에서 돌기(peplomer)가 소실되는 경우가 많기 때문에 정확한 동정이 어려울 뿐만 아니라, 세포의 핵 및 세포질 붕괴물과의 구별이 매우 어려운 형편이다. 본 실험에서도 일부의 바이러스는 전형적인 形態를 간직하고 있으나 상당히 많은 수가 돌기를 소실한 形態로 觀察되었다. 따라서 이러한 바이러스의 形態學的의 구분의 어려움을 극복하고, coronavirus 粒子가 TGE 또는 PED인지를 명확히 구분하기 위하여 특이적인 PEDV 단클론 抗體와 TGEV 단클론 抗體를 각각 적용하여 免疫電子顯微鏡 技法을 이용하였다. Coronavirus 粒子는 TGE 抗體에는 한 예가 양성 반응을 나타내었으나, PED 抗體에는 공식 糞便 총 33예 중 15예에서 양성 반응을 나타내어

抗體 주위에 5-30개의 바이러스가 모여 면역복합체를 形成하고 있어 공식 돼지중 DME 기법에 의해 coronavirus가 검출되었던 17예중 대부분의泄瀉 原因體는 PED 바이러스임이 증명되었다. 또한 抗體 주위에 결합된 PED 바이러스는 크기가 90-190nm에 달하여 매우 다양한 形態를 띠고 있으며, 일부는 외부돌기의 소실이 없는 전형적인 모습으로 觀察되었다. 그리고 gold 顆粒이 labeling된 goat anti-mouse IgG+IgM을 PEDV 단클론 抗體와 같이 적용시키는 IGC-IEM 技法을 이용함으로써 PED 바이러스에 抗體가 결합하고, 다시 gold 標識 二次 抗體와 부착함으로써 바이러스 粒子를 더욱 명확하게 찾고, 처리 과정에서 붕괴된 바이러스 입자 또는 바이러스 관련 抗原 物質까지 檢査할 수 있었다.

Horvath와 Mocsari¹⁸는 돼지에서 문제시되는 coronavirus에는 TGEV, PEDV, 호흡기 coronavirus(porcine respiratory coronavirus: PRCV) 및 혈구응집성 뇌척수염바이러스(hemagglutinating encephalomyelitis virus: HEV)가 있으며, 각각의 바이러스는 일반적인 negative 染色상에서는 대동소이하지만 免疫電子顯微鏡 技法을 이용할 경우 감별할 수 있다고 하였다. Heckert²³은 coronavirus에 感染된 송아지의 糞便과 비장 내용물로부터 protein A-gold 免疫電子顯微鏡 技法(PAG-IEM)을 이용한 바이러스 檢出法을 확립하고, 실험 집종한 송아지에서 ELISA 技法과 PAG-IEM 技法을 같이 적용하였을 경우 PAG-IEM 技法이 ELISA에 비하여 민감도가 더욱 높다고 밝힌 바 있다. 또한 Dea와 Garzon²²은 BCV, IBV, TGEV, HEV 등 여러 종류의 coronavirus를 電子顯微鏡을 이용하여 檢出하였던 바, PAG-IEM 技法이 negative 染色에 의한 바이러스 檢出에 비하여 10-50배의 민감도가 증가한다고 하였다.

본 실험 결과 IEM 技法과 IGC-IEM 技法을 이용한 糞便內 바이러스 검출 및 동정은 매우 유용하고 診斷的의 가치가 있음이 입증되었고, 장조직이 없거나, 생체를 부검하지 않고도 診斷에 응용할 수 있는 효과적인 技法인 것으로 생각되었다.

結 論

바이러스성泄瀉 症狀을 나타내는 육성돈과 모돈의泄瀉便을 대상으로 免疫電子顯微鏡 技法과 IGC-IEM 技法을 적용하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 모돈과 육성돈 糞便 33점을 negative 染色한 후 電

子顯微鏡으로 檢査한 結果 17예에서 coronavirus 粒子가 檢出되었고, IEM 및 IGC-IEM 技法으로 15예가 PED 양성 반응을 나타내었다.

2. 일반적인 negative 染色을 실시한 結果 직경 90-190nm의 왕관 모양 coronavirus 粒子를 檢出하였다.

3. IEM 技法을 적용한 바 PEDV 단클론 抗體 주위에 PED 바이러스 粒子가 응집하여 면역복합체를 形成하였다.

4. IGC-IEM 技法을 실시하여 gold 顆粒이 부착된 PED 바이러스를 檢出할 수 있었고, 일부 부정형의 바이러스 관련 抗體 物質까지 檢出되었다.

5. 따라서 본 IEM 및 IGC-IEM 技法은 糞便내 PED 바이러스의 檢出 매우 유용한 방법임이 입증되었다.

Legends for figures

Fig 1. Negatively stained coronavirus particle with short surface projection. Bar=100nm.

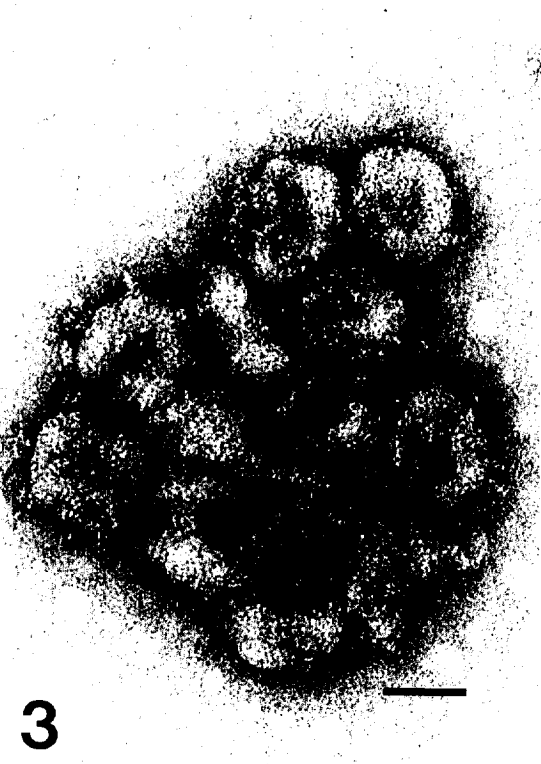
Fig 2. Negatively stained rotavirus particles from fecal samples of pig. Bar=70nm.

Fig 3. Immunoelectron micrograph(IEM) of PEDV. PEDV particles treated with monoclonal antibody to PEDV. Bar=100nm.

Fig 4. IGC-IEM of PEDV. Immunogold labeling of PEDV particles after incubation with monoclonal antibody to PEDV. Bar=100nm.

참 고 문 헌

1. Oldham J. Pig farming(Oct Suppl) 1972; 72-73.
2. Wood EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea. *Vet Rec* 1977; 100: 243-244.
3. Debouck P, Penseart M, Coussement W. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV777. *Vet Microbiol* 1981; 6: 157-165.
4. Pensaert MB, Debouck P. A New Coronavirus-Like Particle Associated With Diarrhea In Swine 1. *Arch Virol* 1978; 58: 243-247.
5. Coussement W, Ducatelle R, Debouck P, et al. Pathology of Experimental CV777 Coronavirus Enteritis in Piglets. I. Histological and Histochemical study. *Vet Pathol* 1982; 19: 46-56.
6. Dea S, Vaillancourt J, Elazhary Y, et al. An Outbreak of Diarrhea in Piglets Caused by a Coronavirus Antigenically Distinct from Transmissible Gastroenteritis Virus. *Can Vet J* 1985; 26: 108-111.
7. Debouck P, Penseart M. Experimental Infection of Pigs with a New Porcine Enteric Coronavirus, CV777. *Am J Vet Res* 1980; 41: 219-223.
8. Ducatelle R, Coussement W, Debouck P, et al. Pathology of Experimental CV777 Coronavirus Enteritis in Piglets. II. Electron Microscopic Study. *Vet Pathol* 1982; 19: 57-66.
9. Takahashi K, Okada K, Oshima K. An Outbreak of Swine Diarrhea of a New-Type Associated with Coronavirus-Like Particles in Japan. *Jpn J Vet Sci* 1983; 45: 829-832.
10. Wood EN. Transmissible gastroenteritis and Epidemic diarrhea of Pigs. *Brit Vet J* 1979; 135: 305-314.
11. Egberink HF, Ederveen J, Callebaut P, et al. Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhea virus, strain CV777. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1320-1324.
12. Flewett TH. Electron Microscopy in the Diagnosis of Infectious Diarrhea. *JAVMA* 1978; 173: 538-543.
13. Hofmann M, Wyler R. Propagation of the Virus of Porcine Epidemic Diarrhea in Cell Culture. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2235-2239.



14. Kusanagi K, Kuwahara H, Katoh T, et al. Isolation and Serial Propagation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Cell Cultures and Partial Characterization of the Isolate. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 313-318.
15. Nieustadt AP, Zetstra T. Use of two enzyme-linked immunosorbent assays to monitor antibody response in swine with experimentally induced infection with porcine epidemic diarrhea virus. *Am J Vet Res* 1991; 52: 1044-1050.
16. Penscort MB, Debouck P, Reynolds DJ. An Innumoelectron Microscopic and Innumofluorescent Study on the Antigenic Relationship Between the Coronavirus-Like Agent, CV777, and Several Coronavirus. *Arch Virol* 1981; 68: 45-52.
17. Bohl EH, Kohler EM, Saif LJ, et al. Rotavirus as a Cause of Diarrhea in Pigs. *JAVMA* 1978; 172: 458-463.
18. Horvath I, Mocsari E. Ultrastructural changes in the Small Intestinal Epithelium of Suckling Pigs Affected with Trasmmissible Gastroemteritis(TGE)-Like Disease. *Arch Virol* 1981;68: 103-113.
19. Larochelle R, Magar R. The The application of immunogold silver staining(IGSS) for the detection of trasmissible gastroemteritis virus in fixed tissues. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 16-20.
20. Mager R, Larochelle R. Immunohistochemical detection of porcine rotavirus using immunogold silver staining(IGSS). *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 3-7.
21. Theil KW, Saif LJ, Bohl EH, et al. Concurrent Porcine Rotaviral and Trasmmissible Gastroenteritis Viral Infection in a Three-Day-Old Conventional Pig. *Am J Vet Res* 1979; 40: 719-721.
22. Dea S, Garzon S. Identification of coronavirus by the use indirect protein A-gold innumoelectron microscopy. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3: 297-305.
23. Heckert RA, Saif LJ, Myers GW. Development of Protein A-Gold Innumoelectron Microscopy for Detection of Bovine Coronavirus in Calves: Comparison with ELISA and Direct Innumofluorescence of Nasal Epithelial Cells. *Vet Microbiol* 1989; 19: 217-231.
24. 손태중. 진단전자현미경학. 서울: 대한교과서주식회사, 1991; 196-272.
25. 권창희, 권병준, 정태성 등. 돼지 유행성 설사 바이러스(Porcine epidemic diarrhea virus)의 국내 분리주 작성에 관한 연구. *대한수의학회지* 1993; 33: 249-254.
26. 박남용, 조경오, 조성수 등. 돼지 유행성 설사 바이러스 분리 동정. *대한수의사회지* 1993; 29: 360-365.
27. 황의경, 김재훈, 진영화 등. 돼지 유행성 설사증의 최근 발생 동향. *농업과학논문집(가축위생)* 1994; 36: 587-596.