

오제스키병의 생체 조기진단을 위한 면역세포화학, *In situ* hybridization 및 전자현미경적 연구

문운경 · 김순복* · 서정향** · 송근석* · 노환국***

수의과학연구소 · 경상대학교 수의과대학*
네브라스카대학교 수의학과** · 부산가축위생시험소***

(1996년 3월 13일 접수)

Immunocytochemistry, *In situ* hybridization and electron microscopy for early diagnosis of Aujeszky's in living pigs

Oun-kyong Moon, Soon-bok Kim*, Jung-hyang Sur**, Geun-suk Song*, Whan-gook Nho***

National Veterinary Research Institute
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University*
Dept. of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska**
Pusan Veterinary Service Laboratory***

(Received Mar 13, 1996)

Abstract : The purpose of this study was to establish early diagnostic methods for the detection of Aujeszky's disease viral antigens and nucleic acid in nasal cells, and buffy coats from experimentally infected living pigs by a combination of immunocytochemistry, *in situ* hybridization with digoxigenin(DIG)-labeled probe and electron microscopy.

Forty days old piglets were inoculated intranasally with $10^{7.0}$ TCID₅₀ of Aujeszky's disease virus (ADV, NYJ-1-87 strain).

The viral antigens and nucleic acid of ADV were detected in nasal cells, and buffy coat for 20 days after inoculation by immunocytochemistry, *in situ* hybridization with DIG-labeled probe and electron microscopical method. The results were compared with conventional methods such as a porcine Aujeszky's disease serodiagnostic(PAD) kit, neutralization test(NT) and virus isolation.

1. The viral antigens, nucleic acids and capsids of ADV were detected in nasal cells, buffy coats from 3 days to 20 days after inoculation by immunocytochemistry, *in situ* hybridization with DIG-labeled probe and electron microscopy, respectively.

2. When viral antigens were detected by the immunocytochemical technique, a diffuse brown deposit was observed in the nucleus and cytoplasm of nasal cells, buffy coats and PK-15 cells

under a microscope.

3. DIG-labeled DNA probe was prepared by amplification of conserved sequence of recombinant ADV-gp50 clone with polymerase chain reaction. When ADV-DNA was detected by ISH with DIG-labeled probe, purplish blue pigmentation were observed in the nuclei and cytoplasm of ADV-infected cells under a microscope. Positive signals were observed in nasal cells and in the buffy coat and PK-15 cells at the first day after inoculation.

4. Where ADV-capsids were detected by transmission electron microscopical method, aggregation of capsids was observed in the nuclei and cytoplasm of nasal cells, buffy coats and PK-15 cells.

The results suggested that these methods were considered as the highly sensitive and reliable tools for rapid and confirmative diagnosis of Aujeszky's disease in living pigs.

Key words : immunocytochemistry, digoxigenin-labeled *in situ* hybridization, electron microscopy, Aujeszky's disease virus, nasal cells, buffy coats.

서 론

오제스키병은 1902년 헝가리의 Aujeszky 에 의해 처음 보고되었으며¹, 소, 개 및 고양이에서는 광견병과 유사한 증상을 보이기 때문에 가성광견병으로 불리워지기도 하는 바이러스성 전염병으로써^{2,3}, 국내에서는 1987년 6월 첫발생된 이후 전국적으로 확산되는 추세에 있어 최근에는 혈청검사 양성분의 도축장출하 유도과 제한된 농장에 대한 국내개발 유전자재조합백신 접종 등의 방역 대책을 수립하여 박멸에 힘쓰고 있는 실정이다⁴⁻⁷.

오제스키병의 진단을 위하여 일반적으로 많이 사용되고 있는 방법으로는 병리학적 검사⁸, 바이러스 분리동정⁹⁻¹² 및 혈청학적 검사법¹³⁻¹⁵ 등이 있다. 그러나 병리학적 검사나 실험동물 접종법 만으로는 다른 유사한 질병들과의 감별이 어려울 때가 많고 도살해부하여야 검사가 가능하며, 원인 바이러스의 분리동정에는 장기간을 요하고, 전자현미경적 관찰은 세포내에서 바이러스 입자 관찰이 용이하지 않고, 혈중항체검사는 감염후 오랜기간이 지난 다음에야 검출이 가능하다는 결점들이 있다.

면역조직화학법은 조직절편내에서 원인체의 항원을 직접 검출하는 방법으로서 원인체의 분리동정없이 단시간내에 확진이 가능하며 오늘날 각종 질병의 진단법으로 개발되어 많이 사용되고 있으며, 김¹⁶과 김 등¹⁷은 오

제스키병의 immunogold-silver법과 avidin-biotin complex (ABC)법 등 그리고 Onno *et al*¹⁸ 및 Ducatelle *et al*¹⁹은 immunoperoxidase법 등의 면역조직화학적 진단법을 확립한 바 있다.

In situ hybridization(ISH)은 조직절편내에서 바이러스 핵산을 검출함으로써 바이러스가 복제증식되고 있는 급성감염기 뿐만아니라 잠복감염상태에서도 검출이 가능하고 또한 바이러스 감염세포가 조직절편내 한개만 존재하여도 검출이 가능하며, 조직의 형태학적 구조를 그대로 유지하면서 바이러스 존재부위를 확인할 수 있는 장점을 가지고 있어 바이러스성 질병을 확진할 수 있는 새로운 진단기법이며 특히 digoxigenin(DIG) 표지 probe를 이용하는 ISH 기법은 방사성물질 표지법에 비해 단시간에 안전한 방법으로 조직내에 존재하는 핵산을 검출할 수 있어 원인체의 분리동정이 어려운 각종 질병의 진단법으로 오늘날 많은 각광을 받고 있다²⁰⁻²⁶.

본 실험은 오제스키병의 기존 진단법들이 가지고 있는 여러가지 결점들을 보완하여, 감염초기에 살아 있는 개체로부터 신속하게 확진할 수 있는 진단기법을 확립할 목적으로 인공감염돼지로부터 면봉채취한 비강상피 세포와 경정맥에서 채혈하여 얻은 buffy coat 에서 면역세포화학법과 ISH 기법을 사용하여 바이러스항원 및 핵산을 검출하고자 하였으며, 이때 세포내 출현하는 바이러스 입자의 전자현미경적 관찰을 병행하였다.

재료 및 방법

바이러스 : 오제스키병바이러스(Aujesky's disease virus: ADV/NYJ-1-87 strain)를 PK-15 cell에 3대 계대증식하여 얻은 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 수준의 ADV를 -70℃에 냉동보관하면서 점종실험에 공시하였다.

돼지 점종실험 : 혈청진단키트시험에서 ADV 항체 음성으로 판정된 40일령 랜드레이스 자돈 3두에다 두당 2ml씩 양쪽비강에 나누어 접종하였으며 접종후 3일간 또는 20일간 매일 비강상피세포와 buffy coat를 동시에 채취하여 실험에 사용하였다.

세포배양²⁷⁻²⁹ : PK-15 cell을 5-10% fetal calf serum이 첨가된 EMEM 배지에서 70-80% 정도 배양세포가 단층이(monolayer) 형성되도록 먼저 슬라이드위에 배양한 다음, 매 슬라이드당 ADV 0.5-1.0ml를 접종하여 1시간 잠작후 EMEM 배지에서 6시간동안 배양하였다. 감염배양세포가 부착된 슬라이드는 0.1M sodium phosphate buffer solution, pH7.4(PB)에 수세한 후 95% EtOH : glacial acid (3 : 1) 희석용액에다 20분간 고정시킨 다음, 탈수 건조시켜 4℃에 보관하면서 면역세포화학 및 ISH 시험에 사용하였다. 또한 점종돼지의 비강으로부터 회수한 바이러스 배양액을 위와 같은 방법으로 점종배양하여 함께 공시하였다.

단층배양세포 ABC 면역염색^{17,30-32} : ADV 점종 단층 세포배양 슬라이드를 PB에 수세한 후 95% EtOH : glacial acid(3 : 1)에 10분간 고정하여 건조 수세시킨 다음, 1차항체로서 3종의 Rabbit anti-ADV/고도면역혈청(문 등²⁸, Dr. Ducatell *et al.*,¹⁹ Dr. Card *et al.*³³)과 3종의 단클론성 항체(6,30,37 ; 수의과학연구소)를 사용하였으며 2% 정상산양혈청으로 100-300배 희석하여 60-120분간 잠작시킨후 5분간씩 3회 수세하였다. 2차 항체는 goat anti-rabbit 또는 mouse IgG biotin conjugate(Vectastain)를 PB로 200-300배 희석하여 60분간 반응시킨 후 5분간씩 3회 수세하였다. 이어 3차항체로서 ABC-kit(Vectastain)를 PB로 200-300배 희석하여 60분간 반응시킨 후 5분간 3회 수세한 다음 DAB로 발색하였다.

In situ hybridization(ISH)³⁴⁻⁴⁰ ;

a. ADV-DNA probe 준비 : 1) Polymerase Chain Reaction(PCR)^{41,42} plasmid pBR 325 내에 cloning 된 *Bam*

HI 7 fragment 에 ADV-DNA가 transformation 된 *E coli*(Dr. Osorio, University of Nebraska)의 insert를 확인하기 위해서 LB broth에 진탕배양후 Birmiom과 Doly⁴³ 및 Ish-Horowicz와 Burke⁴⁴의 alkali lysis 방법을 응용하여 ADV-DNA를 분리하였다. 37℃에서 24시간 진탕배양한 균액 5ml을 4℃에서 13,000rpm 1분간 원심한 뒤 냉각 GET용액(50mM glucose, 25mM Tris Cl pH8.0, 10mM EDTA pH 8.0) 200μl를 가하여 부유시킨 다음, 10분간 방치후 lysis buffer(0.2 N NaOH, 1% SDS) 400μl를 첨가하여 -20℃에서 10분간 반응시켰다. 다음 냉각 5M KOAC(5M KOAC 10ml, glacial acetic acid 11.5ml, dH₂O 28.5ml)용액 300μl를 첨가하여 -20℃에서 15분간 반응시킨 후 상층액을 다른 polypropylene tube에 옮겨 상층액에 동량의 isopropanol을 가하고 -20℃에서 10분간 반응시켰으며, 13,000rpm 으로 15분간 원심하여 pellet 를 취한 후 70% EtOH로 5분간 수세한 다음, 13000rpm으로 7분간 원심하였다. pellet를 10분간 건조시킨 후 1X RNase A(TE 990μl + RNase 10μl) 20μl 에 용해시켜 template DNA로 사용하였다.

분리된 ADV-DNA의 분자량 측정을 위하여 전기영동을 실시하였으며 *Hind*Ⅲ로 절단된 lamda phage DNA를 marker로 사용하여 UV transilluminator 상에서 6.3kb에 상당하는 DNA fragment를 확인하였다. 6.3kb에 상당하는 ADV-DNA fragment(gl, gp50, gp63) 의 공통항원부위인 gp50상에 존재하는 217bp 크기의 target DNA를 증폭하기 위해 primers(sense primer : 5' CACGGAGGACGAGCTGGGGCT 3', antisense primer : 5' GTCCACGCCCGCTTGAAGCT 3')를 제작하였다.

PCR의 진행은 먼저 microcentrifuge tube에 멸균된 dH₂O 67.5μl, 10X buffer 10μl, template DNA 4μl, dNTPs(A : 2μl, C : 2μl, G : 2μl, T : 2μl) 8μl, primers(sense primer 5μl, antisense primer 5μl) 10μl, tag DNA polymerase (원액 2μl + dH₂O 2μl) 0.5μl를 순서대로 혼합시켜 100μl로 만든 다음 13,000rpm으로 5-6초간 spindown 시킨후 mineral oil을 30μl를 첨가하여 PCR 장치에서 denature 94℃ 1분간, annealing 55℃ 1분간, polymerization 72℃ 1분간씩 30 cycle 반복 실시하였다. 증폭된 DNA는 mineral oil을 제거한 후 증폭된 ADV-DNA의 분자량 측정을 위하여 100bp marker를 사용하여 1.5-2% LMP Agarose 상에서 3시간 전기영동하여 UV transilluminator 상에서 217bp 크기의 band를 확인하였다.

2) Gene cleaning : 순수한 217bp의 ADV DNA를 얻기 위하여 band를 절단하여 microcentrifuge tube에 DNA band의 fragment 40 μ l를 넣고 TBE buffer 20 μ l와 NaI 180 μ l를 첨가하여 45-55 $^{\circ}$ C에서 gel을 녹인 다음 glass milk 10 μ l를 넣어 혼합한 후 5-15분간 얼음위에서 정치하여 13000rpm 5초간 원심하였다. 상층액을 제거한 뒤 New washer solution 700 μ l (New concentrate 14ml + dH₂O 280ml + 100% EtOH 310ml)으로 pellet를 13,000rpm 5초간 3회 수세하였으며, glass milk와 동량으로 TE buffer 10 μ l를 첨가하여 45C-55 $^{\circ}$ C에서 2-3분간 방치시킨 후 13,000rpm 5초간 원심한 다음 상층액을 new microcentrifuge tube에 채취하여 -20 $^{\circ}$ C 저장하였다.

3) Digoxigenin DNA labeling : Eluted ADV-DNA 10 μ l를 denature 시키기 위해 100 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 10분간 끓인 뒤 얼음위에서 냉각하여 hexanucleotide mixture 2 μ l, dNTP labeling mixture 2 μ l, Klenowenzyme 1 μ l를 각각 넣은 다음 멸균된 dH₂O를 첨가하여 전체용량이 19 μ l가 되게 조정 혼합하였다. 13,000rpm 5초간 원심한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 20시간 정치한 후 표지된 DNA를 침전시키기 위해 0.2M EDTA(pH8.0) 2 μ l, LiCl 4M/l 2.5 μ l와 냉장된 EtOH 75 μ l를 첨가하여 혼합하여 -20 $^{\circ}$ C에서 2시간 정치하였으며, 13,000rpm으로 20분간 원심한 후 냉장 70% EtOH로 수세 및 재원심하여 상층액을 버리고 건조시킨 후 TE buffer 50 μ l로 용해시켜 -20 $^{\circ}$ C에 저장하면서 digoxigenin-labeled ADV-DNA probe로 사용하였다.

b. 비강상피세포와 buffy coat 및 단층배양세포의 ISH : 면역세포화학적 방법을 위해 실시했던 시료채취와 동일한 방법으로 비강상피세포와 buffy coat를 채취한 후 식염수로 희석하여 cytospin으로 1,000-3,000rpm에서 10분간 원심하여 ProbeOn™ Plus slide(Fisher Biotech)에 부착시킨 것과 ADV 접종단층세포배양 ProbeOn™ Plus slide를 PBS에 수세하여 95% EtOH : glacial acid(3:1)에 10분간 고정 건조하여 PBS로 2-10분간 수세후 4% Proteinase K를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하여 PBS로 2-10분간 2회 수세한 다음, 4% paraformaldehyde에 재고정을 1-2분간 실시한 후 PBS로 3-5분간 수세하면서 dehydration steps에 따라 50%, 70%, 90%, 100% EtOH 단계를 각각 3분간씩 처리한 후 10분간 완전히 건조시켰다, 그리고 DNA probe를 hybridization buffer에 30배로 희석시켜 슬라이드 위에 20 μ l씩 점적한 후 cover slide를 덮고 주위를 nail polish로 밀봉한 다음 100에서 3회, -20에서 2회 10분

간씩 번갈아 가면서 denature 시키고 42 $^{\circ}$ C에서 12-20시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 coverslide를 제거하여 PBS에 수세한후 buffer1에 1분간 수세한뒤 anti-digoxigenin-AP conjugate(Boehringer Mannheim Biochemica)를 buffer 2에 1000배로 희석하여 40분간 반응시켰다. 그리고 buffer 1에 15분간씩 2회 수세하였으며, buffer 3로 2분간 수세한 다음 color solution(NBT sol. 45 μ l + X-phosphate sol. 35 μ l + Buffer 3, 10ml)으로 암실에서 6-7시간 발색시켰다. buffer 4로 5분간 수세한 다음, 1% methyl green 클로로포름용액으로 30분간 배경염색한 후 1-2분간 증류수로 수세하여 wet mounting 하였다.

전자현미경적 관찰^{33,45-49} :

a. 비강상피세포 및 순환백혈구 : 멸균된 면봉으로 채취한 비강상피세포와 전혈에서 얻은 buffy coat를 5% glutaraldehyde와 4% paraformaldehyde가 포함된 PB에 넣어 1500rpm에서 10분간 원심하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 전고정시킨 후 실온에서 PB로 30분간씩 3-6회 수세한 다음 1.0% osmium tetroxide와 1.5% potassium ferricyanid가 함유된 0.1M PB 용액에다 90분후 고정하였다. 실온에서 PB로 30분간 수세한 다음, 2% agar에다 포매하여 일반적인 방법에 따라 탈수, 투명시켰으며, epon-araldite(epon812 15.5mg, araldite502 10.7mg, dodeceny succinic anhydride (DDSA) 30.0mg 및 DMP-30 1.6mg) 혼합제에다 포매하였다. 포매된 조직은 semi-thin 절편에서 핵내포입체를 관찰한 다음, 그 부위를 초박절편하여 2% aqueous uranyl acetate와 reynold's lead citrate로 이중염색한 뒤 전자현미경(Hitachi 800)으로 관찰하였다.

b. 단층배양세포 : PK-15 cell이 70-80% 정도 monolayer가 형성되어 있는 75cm² flask에 3일째 비강으로부터 최수분리한 바이러스를 0.5-1ml 씩 접종하여 6시간째에 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음, 10배 trypsin-EDTA 3-10ml를 주입하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 10분간 방치후 세포를 수확하였다. 1,000rpm으로 10분간 원심한 후 상층액을 버리고 바이러스가 증식배양된 세포 pellet를 만들어 위와 같은 방법으로 표본을 제작하였다.

바이러스 회수 및 역가측정^{17,27,28} : 무균적으로 면봉채취한 비강상피세포를 EMEM 배양액에다 희석하여 냉동과 해동을 3회 번갈아 실시한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 90분간 배양하였으며, 1,500rpm으로 10분간 원심한 후 상층액을 채취하여 PK-15cell의 monolayer에다 75cm²

flask당 0.5ml씩 접종한 뒤 3대 계대증식하였다. 이와같이 증식된 바이러스 배양액은 다시 슬라이드상의 단층 배양세포에 접종하여 6시간 배양한 뒤 ABC 법과 ISH를 실시하였으며, 또한 혈청중화시험과 진단키트를 이용하여 비교 실험을 실시하였다.

결 과

면역세포화학적 바이러스 항원검출 : ADV를 비강접종한 후 20일간 매일 비강상피세포와 buffy coat 그리고 ADV 접종된 단층배양세포를 면역세포화학적 방법으로 ADV 항원검출을 시도한 결과, 비강상피세포에서 접종 후 2일째부터 시험은 3두중 2두에서 갈색의 양성반응세포를 관찰할 수 있었으며, 접종 후 9-10일 사이에는 시험은 2두중 1두에서만 갈색의 양성반응세포를 관찰할 수 있었고 접종 후 11일째 부터는 갈색의 양성반응세포의 발색정도가 아주 미약하거나 관찰되지 않았다.

순환백혈구에서는 접종 후 4일째에 시험은 3두중 2두에서 mononuclear leukocytes에서 양성반응세포를 관찰할 수 있었으며 접종 후 5-10에 전두수에서 양성반응세포를 검출할 수 있었다. 그리고 접종 후 11-12일 사이에는 2두중 1두에서만 양성반응세포의 발색정도가 아주 미약하거나 관찰되지 않았다. 그리고 본 실험에서 병행한 ADV를 접종한 후 6시간만에 회수한 단층배양세포의 핵과 세포질에서 강한 갈색의 양성반응세포를 관찰할 수 있었다(Fig 1).

ISH 기법을 이용한 ADV 핵산 검출 : Plasmid pBR 325 내에 clonig된 *Bam* HI 7 fragment에서 ADV-DNA가 transformation된 *E coli* 의 insert를 akali lysis 방법을 응용하여 분리한 ADV-DNA를 전기영동을 실시하여 UV transilluminator상에서 확인된 6.3kb에 상당한 ADV-DNA를 특이성이 높은 probe를 제작하기 위하여 akali lysis로 분리한 DNA를 template DNA로 사용하여 PCR 장치를 통해 증폭시켰고 모든 병원성 ADV의 conserved sequences인 gp50 부위의 증폭된 217bp 크기의 ADV-DNA probe를 확인하기 위하여 전기영동을 실시하여 UV transilluminator상에서 뚜렷한 217bp band를 관찰할 수 있었다(Fig 2).

ISH을 실시한 비강상피세포와 buffy coat 그리고 ADV 접종된 단층배양세포의 ADV 핵산 검출성적은 다음과 같다. 접종 후 3일째 비강상피세포로부터 회수 분리된 ADV를 접종한 슬라이드를 6시간후에 회수한 결과 감염된 세포의 핵과 세포질내에서 ADV 핵산을 나타내는 청자색의 고도의 특이성을 보이는 양성반응세포를 관찰할 수 있었으며(Fig 3), 접종 후 1일에서 접종 후 3일간 매일 실시했던 비강상피세포와 buffy coat에 대한 ADV 핵산 검출을 시도한 결과 비강상피세포는 접종 후 1일째부터 전두수에서 양성반응세포를 관찰할 수 있었고(Fig 4,5), buffy coat는 접종 후 3일째 전두수에서 양성반응세포를 관찰하였다(Fig 6,7).

전자현미경적 바이러스입자 관찰 : ADV를 형태학적으로 확인하기 위해 병행했던 전자현미경적 관찰에서는 먼봉채취 비강상피세포의 pellet를 semithin section한 후

Table 1. The comparison of sensitivity of three different diagnostic methods to detect Aujeszky's disease

Specimen	Method	Days after inoculation										
		1	2	3	4	6	8	10	12	15	18	20
Nasal cell	PAP	0/3*	2/3	3/3	3/3	3/3	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	ISH	3/3	3/3	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-
	EM	-	-	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-
Buffy coat	PAP	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	2/3	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2
	ISH	0/3	0/3	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-
	EM	-	-	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-
Whool blood	KIT	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2
Serum	NT	0	0	0	0	0	2	4	4	8	16	32

Abbreviation; PAP:peroxidase antiperoxidase staining, ISH:*in situ* hybridization EM:electron microscopy, KIT:porcine Aujeszky's disease serodiagnostic kit test, NT:neutralization test. *;No. of heads showing positive/No. of heads tested.;Not tested.

toludin-blue 염색을 하여 광학현미경상에서 핵내봉입체를 관찰한(Fig 8) 다음, 그 부위를 초박편리한 결과 핵내에서 다수의 ADV capsid를 관찰할 수 있었으며(Fig 9, 10), buffy coat의 단핵백혈구와 PK-15 단층배양세포의 핵과 세포질에서도 ADV-capsid를 관찰할 수 있었다(Fig 11, 12). 그리고 혈청중화시험과 진단키트를 이용한 비교 실험은 Table 1 같이 혈청중화시험에서는 접종후 8일째 처음으로 CPE를 관찰할 수 있었고, 이 시기의 항체역가는 2배였으며 접종후 10일째는 4배, 15일째는 8배, 20일째는 32배 수준이었다. 혈청진단키트를 이용한 혈청항체 양성반응은 항체역가가 8배 수준인 접종후 15일째 이후부터 관찰되었다. 접종후 20일에는 항체가 수준이 32배 었었다.

바이러스 회수 및 역가측정은 접종3일째 비강상피세포로부터 회수한 ADV를 PK-15 cell에 접종하여 3대 계대증식 배양시킨 ADV에 대한 역가측정결과 접종한 표준바이러스와 같은 $10^{7.0}$ TCID₅₀수준이었다.

고 찰

Aujeszky's disease는 각종동물에 대하여 매우 다양한 감수성을 나타내는 걸로 알려져 있으며, 본 실험에서도 바이러스 접종돈은 오제스키병의 전형적인 임상증상과 병리조직학적 검사소견이 타 연구자들과 비슷한 성적을 보였다^{8,27,29,50,51}.

본 질병의 자연감염 경로는 비강점막이나 구강점막을 통해서 이루어지며 감염된 바이러스는 상부호흡기관인 편도선, 비강 및 인후두부 등의 점막상피세포를 침입하여 세포내의 핵내에서 주로 1차 증식하는데, 이렇게 증식된 바이러스는 18시간후 증식한 세포로부터 나와 혈류를 따라 임파선 장기에 한국성 괴사를 유발하며 상부기도 점막을 통해 기관과 폐에 침입하여 간질성 폐렴을 일으키고 삼차신경(trigeminal nerve), 후각신경(olfactory nerve), 설인두신경(glossopharyngeal nerve) 등을 통과하여 24-48시간 이내에 중추신경조직인 뇌조직에 침입하여 뇌막염, 뇌염 및 척추염을 일으키며 모돈에서는 자궁에 태반감염을 일으켜 태아흡수, 미이라화, 유산 및 사산을 일으키는 것으로 알려져 있다^{20,52,53}.

McFerran 과 Dow¹⁰는 비강내로 오제스키병 바이러스를 분무한 후 48시간 매일 swab하여 바이러스 분리실험을 한 결과와 20일동안 행한 본 실험에서도 비슷한 결과

를 얻었다. 이와같은 자연감염 경로를 이용한 돼지 오제스키병 바이러스 인공접종을 통한 많은 연구가 이루어졌는데 특히 Onno *et al*¹⁸은 비강점막 탈락상피세포를 슬라이드에 도말하여 immunoperoxidase법을 이용한 접종후의 양성반응세포 관찰을 실시한 바가 있고, 국내에서는 문 등²⁸에 의해 비강내 돼지 오제스키병 바이러스 인공접종후 비강점막 탈락상피세포와 순환백혈구내에서 항원검출시기와 혈청검사를 통한 항체검출시기에 대한 조사를 병행한 바가 있으나 항원과 항체검출에 의존한 검사로 인하여 둔군에 대한 집단 검색에는 효과적이지만 입식돈 및 병성감정돈에 대한 진단법으로는 감염시기에 따른 진단상 유의성 때문에 본 연구에서는 감염시기와는 무관한 유전자 검색법을 응용한 형태학적인 생체 조기진단을 개발하고자 *in situ hybridization* 응용기법을 실시하였다.

ISH는 분자생물학의 hybridization 기법을 형태학에도 도입한 것으로 세포내에 존재하는 DNA 또는 RNA를 동정하는 것으로 바이러스 검출에 대한 응용가능성이 알려진 이래 각종 세포 및 바이러스의 specific target nucleic acid를 검출하는 방법으로써 특히 분리 동정에 장기간을 요하는 바이러스성 질병의 신속한 진단수단으로서 최근 활발한 연구의 대상이 되고 있다^{23,54,60,61}. 또한 ISH는 조직이나 탈락상피세포의 절편내에 한개의 감염세포만 존재하여도 바이러스핵산 검출이 가능하기 때문에 바이러스 분리동정법에 비해 검출율이 훨씬 높음은 물론 포르말린에 고정하여 장기간 보관되었던 조직에서도 검출이 가능한 장점이 있다. 본 실험에서 digoxigenin으로 표지한 ADV-DNA probe를 이용하여 비강상피세포와 순환백혈구 그리고 ADV를 배양시킨 단층세포내에서 ADV 핵산 동정을 시도하였던 바, 높은 감수성과 특이성을 보이는 purplish blue pigmentation 을 나타내는 양성반응세포를 관찰할 수 있었으며 이 병의 진단에 중요한 수단으로 활용될 수 있으리라 생각된다.

Card³³ 등과 Whealy⁴⁹ 등 및 Narita⁶² 등에 의하면 신경친화성 바이러스인 ADV의 복제는 세포핵내에서 virions의 DNA 복제증식이 핵내에서 일어나 증가한 capsid가 다음 핵막쪽으로 이동하여 핵속막이 먼저 capsid를 감싸면서 핵속막과 외막 사이의 틈으로 침입하여 capsid가 한개의 envelope를 가지면서 형질내세망을 통하여 이동한 후 virion이 가진 한개의 envelope와 형질내세망간에 fusion을 일으키면서 세포질내로 방출된 nucleocapsid 는 다음단계

인 골지장치의 trans-cisternae의 근처로 부터 유도된 완전한 viral glycoprotein을 가진 이중막을 갖는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서도 감염세포의 핵과 세포질에서 바이러스 입자들을 관찰할 수 있었으며, 핵내에서는 capsid 상태로 존재하는 것을 많이 볼 수 있었고, 세포질내에서는 capsid 또는 이중막을 갖는 등 여러형태로 관찰되어 위의 사실들을 뒷받침해 줄 수 있었다.

효과적인 방역대책수립을 위해서는 돈군에 대한 양성돈 색출을 위해 이용하는 기존의 항체검사법과 감염세포내에서 직접 바이러스항원 및 핵산 존재를 확인할 수 있는 면역세포화학적 방법이나 ELISA기법을 응용한 간이감별진단키트와 ISH기법을 병행하여 실시토록 하는 것이 좋을것 같으며 특히 농장내 입식되는 돼지나 혈청을 확보할 수 없는 폐사축 등과 같은 병성감정의뢰돈에 대한 오제스키병 조기진단에 널리 이용될 수 있을 것 같다. 그리고 기존의 형태학적 진단법들이 환축을 도살한 후 시료를 절취하였으나 본 실험의 진단법은 살아있는 개체를 대상으로 할 수 있기 때문에 실험대상 두수를 늘릴 수 있어 진단의 정확도를 높일 수 있으며 경제적으로도 유리한 이점을 가진다고 하겠다.

결 론

오제스키병을 살아있는 개체로부터 신속하게 확진할 수 있는 진단기법을 개발하기 위하여 오제스키병 바이러

스의 국내 분리주(NYJ-1-87 strain)를 40일령된 자돈의 비강에서 $10^{7.0}$ TCID 수준으로 2ml 씩 접종하여 인공감염 시킨후 면역세포화학적, Non-radioactive in situ hybridization 및 전자현미경학적 방법으로 비강상피세포와 순환백혈구 그리고 비강으로 부터 바이러스를 분리증식시킨 단층 배양세포내에서 오제스키병바이러스 항원과 핵산검출 및 바이러스입자를 관찰하였다.

1. 면역세포화학적 방법을 이용하여 비강상피세포와 순환백혈구 그리고 단층배양세포의 핵과 세포질에서 갈색의 양성반응을 관찰할 수 있었다.

2. *In situ* hybridization(ISH)을 위해서 plasmid pBR 325내 cloning된 *Bam* HI 7 fragments(6.3kbp)를 template DNA로 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)법을 적용하여 특이성이 높은 probe를 제작코자 ADV 공통항원 부위인 gp50에 대응하는 217bp band를 증폭시켰다. 다음 Gene clean Kit로 순수분리하여 Digoxigenin으로 표지한 ADV-DNA probe로 ISH를 실시한 결과 비강상피세포와 순환백혈구 그리고 단층배양세포의 핵과 세포질내에서 ADV 핵산존재를 나타내는 암청자색의 양성반응 과립의 침착을 관찰할 수 있었다.

3. 전자현미경적으로 비강상피세포와 순환백혈구 그리고 단층배양세포의 핵과 세포질에서 바이러스입자를 다수 관찰할 수 있었다.

이상의 결과에서 감염초기에 살아있는 개체를 대상으로 신속하게 오제스키병을 확진할 수 있는 진단기법을 확립할 수 있었다.

Legends for figures

Fig 1 were immunostained with avidin-biotin-peroxidase complex (ABPC) method.

Fig 2-8 were observed with *in situ* hybridization method and fig 9-12 were observed with electron microscopy.

Fig 1. Dark brown deposits in the ADV-infected PK-15 cell usually appeared both in the cytoplasm and nucleus at 6hr after inoculation. X 100

Fig 2. DNA for DIG-labeled probe amplified by PCR: A; γ -DNA *Hind*III mark, B;100bp mark, C;PCR-control DNA, 1-5. DNAs amplified using primers for conserved sequences of recombinant ADV-gp50 lone.

Fig 3. Positive cells showed an accumulation of purplish blue pigmentation in ADV-infected PK-15 cell. Both the cytoplasm and nucleus are positive for nucleic acids at 6hr after inoculation. X 200.

Fig 4. Purplish blue pigmentation, indicating the presence of nucleic acids, appeared in both cytoplasm and nucleus of nasal cell on 1st day after inoculation. X 400.

Fig 5. Positive cells showed an accumulation of purplish blue pigmentation in nasal cell. The nucleus is positive for viral nucleic acids on 1st day after inoculation. X 400

Fig 6. Purplish blue pigmentation, indicating the presence of nucleic acids, appeared in both the cytoplasm and nucleus of buffy coat on 3rd day after inoculation. X 200

Fig 7. Positive cells showed an accumulation of purplish blue pigmentation in buffy coat on 3rd day after inoculation. X 100

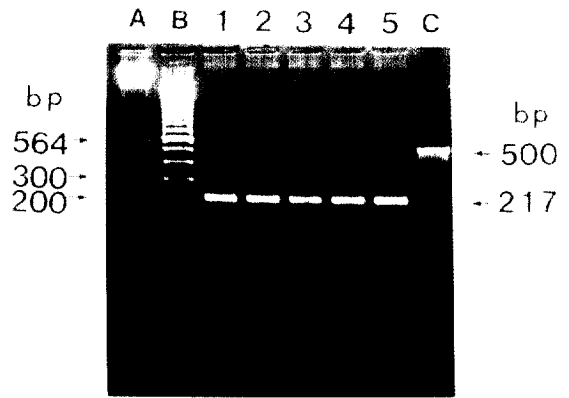
Fig 8. Intracellular eosinophilic inclusions in nasal cells by semithin. X 100

Fig 9. Aggregation of capsids without envelopes in the nucleus of nasal cell on 3rd day after inoculation. X 39,000

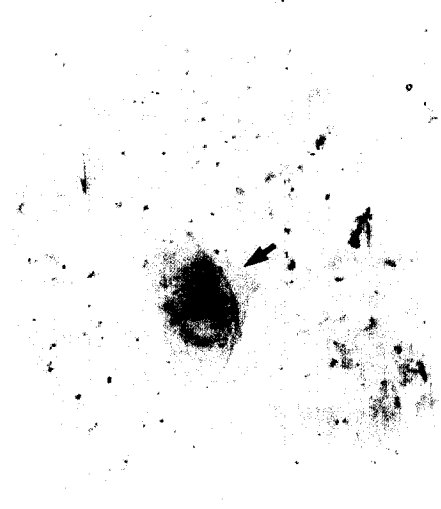
Fig 10. The large inclusions in the nuclei of nasal cell are composed of viral capsids in nasal cells on 3rd day after inoculation. X 104,000

Fig 11. Nucleocapsids are present in the nucleus of cell, both individually and aggregatively in the buffy coat on 3rd day after inoculation. X 104,000

Fig 12. Aggregation of capsids without envelopes in the cytoplasm of infected PK-15 cell at 6hr after inoculation. X 104,000



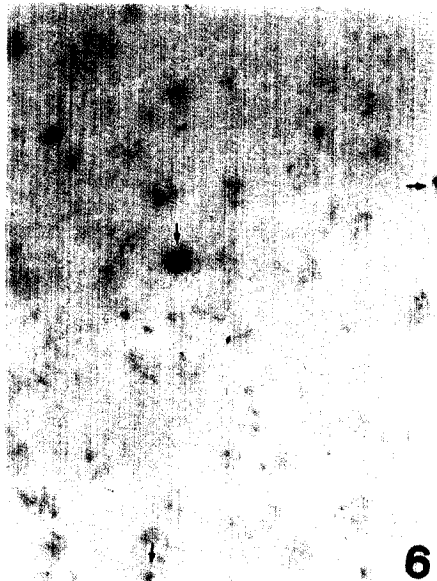
3



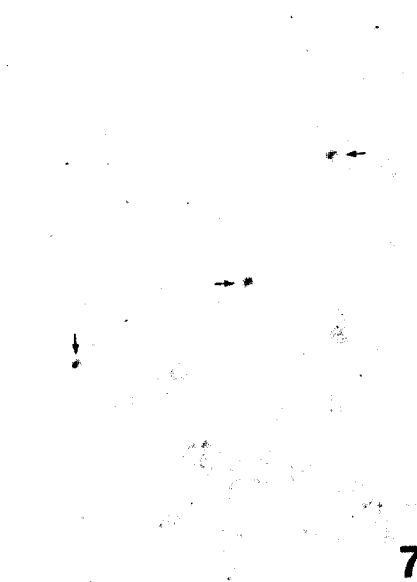
4



5



6



7

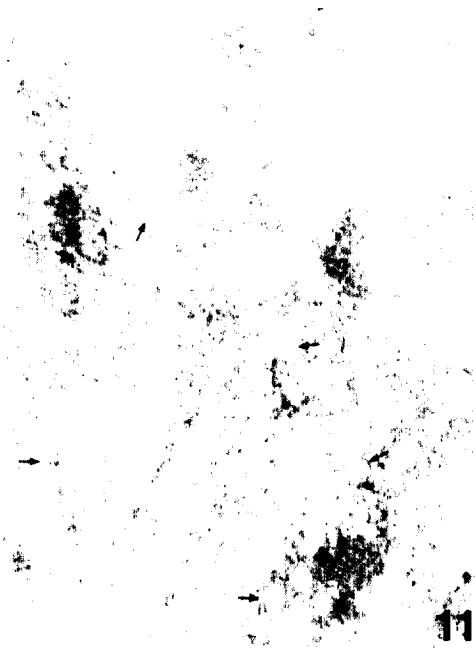




9



10



11



12

참 고 문 헌

1. Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, *et al.* Disease of Swine. Iowa State University Press 7th ed. 615-622, 1992.
2. 전무형. 돼지가성광견병의 실체와 대책. 대한수의학회지, 23 : 433-447, 1987.
3. Baskerville A, McFerran JB, Dow C. Aujeszky's disease in pigs. *Vet Bull*, 43:465-480, 1973.
4. 황의경, 진영화, 권영방 등. 돼지 오제스키병의 국내 발생에 관한 병리학 관찰. 농사논문집, 31 : 24-29, 1989.
5. 진영화, 강문일, 권영방 등. 오제스키병 바이러스 접종돈의 병리조건과 감염 조직내 바이러스 검출에 관한 연구. 농사시험연구논문집, 31 : 30-37, 1989.
6. 권창희, 송재영, 김병환 등. Pseudorabies virus의 gp50과 gp63 유전자 클로닝에 관한 연구. 대한수의학회지, 32 : 311-318, 1991.
7. Petrovskis EA, Timmins JG, Gierman TM, *et al.* DNA sequence of the gene for pseudorabies virus gp50 a glycoprotein without N-linked glycosylation. *J Virol*, 59: 216-223, 1986.
8. Csontos L, Szeky A. Gross and microscopic lesion in the nasopharynx of pigs with Aujeszky's disease. *Acta Vet Acad Sci Hunga*, 16: 175-185, 1966.
9. McFerran JB, Dow C. The distribution of the virus of Aujeszky's disease in experimentally infected sheep. *Res Vet Sci*, 5:143-147, 1964.
10. McFerran JB, Dow C. The excretion of Aujeszky's disease virus by experimentally infected pigs. *Res Vet Sci*, 5: 405-410, 1965.
11. McFerran JB, Dow C. The distribution of the virus of Aujeszky's disease (pseudorabies virus) in experimentally infected swine. *Am J Vet Res*, 26: 631-635, 1965.
12. Robbins AK, Whealy ME, Watson RJ, *et al.* Pseudorabies virus gene encoding glycoprotein gIII is not essential for growth in tissue culture. *J Virol*, 59 : 635-645, 1986.
13. Banks M, Cartwrights S. Comparison and evaluation of for serological test for detection of antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet Rec*, 113: 38-41, 1983.
14. Schoenbaum MA, Beran GW, Murphy DP, *et al.* Pseudorabies virus latency and reactivation in vaccinated swine. *Am J Vet Res*, 51 : 334-338, 1990.
15. Wathen LMK, Platt KB, Wathen MW, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies directed against pseudorabies virus. *Vir Res*, 4: 19-9, 1985.
16. Kim SB. Immunohistochemistry for detection of Aujeszky's disease virus antigens: Immunogold-silver method in tissue section. *Korean J Vet*, 28 : 365-367, 1988.
17. Kim SB, Sur JH, Moon UG. Avidin-biotin complex for immunohisto-chemical diagnosis of Aujeszky's disease and hog cholera. *Korean J Vet*, 30 : 435-440, 1990.
18. Onno M, Jestin A, Nicolas JC. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in infected pigs by direct immunoperoxidase labelling in nasal cells. *Vet Med Rev*, 59 : 152-156, 1988.
19. Ducatelle R, Coussement W, Hoorens J. Immunoperoxidase study of Aujeszky's disease in pigs. *Res Vet Sci*, 32 : 294-302, 1982.
20. Sur JH, Kim SB, Osorio FA, *et al.* Study of transneuronal passage of pseudorabies virus in rat central nervous system by use of immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest*, 56 : 1195-1200, 1995.
21. 김순복, 서정향, 문운경. *In situ* hybridization 조직화학법을 이용한 오제스키병 바이러스 동정. 대한수의학회지, 34 : 327-333, 1994.
22. 김순복, 송근석, 문운경 등. 오제스키병바이러스 인공감염 한국 재래산양의 병리학적 소견 및 절편내 *in situ* hybridization 바이러스 동정. 대한수의학회지, 35 : 369-374, 1995.
23. Michel B, Ashley TH. Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization. *Cell Biology*, 75 : 6125-6129, 1978.
24. Michel B, Ashley TH, Evelyne C. Simultaneous in situ detection of viral RNA and antigens. *Cell Biology*, 81: 5445-5448, 1984.
25. Uhl GR. *In situ* hybridization in brain. Plenum Press

- New York and London, 3-300, 1986.
26. Unger ER, Budgeon LR, Myerson D, *et al.* Viral diagnosis by in situ hybridization: Description of a rapid simplified colorimetric method. *Am J Surg Pathol*, 1-8, 1986.
 27. 전무형, 조성환, 안수환. 이환자돈으로 부터 오제스키병 바이러스 분리와 생물학적 성상. *대한수의학회지*, 24 : 163-171, 1988.
 28. 문운경, 조희택, 김순복 등. 오제스키병의 생체 조기 진단을 위한 돼지 비세 포 및 순환백혈구내 면역세포 화학적 바이러스 항원동정. *대한수의학회지*, 33 : 241-247, 1993.
 29. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, *et al.* Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. Comstock Cornell Univ Press 8th ed, 615-622, 1988.
 30. Allan GM, McNulty MS, Todd D, *et al.* Therapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by direct immunoperoxidase labelling. *Vet Micro*, 10: 481-486, 1985.
 31. 문운경, 조희택, 김순복. Peroxidase-antiperoxidase (PAP) 복합체를 이용한 돼지콜레라의 면역조직화학적 진단. *대한수의학회지*, 30:435-440, 1990.
 32. Schoenbaum MA, 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 tests. *J Vet Diagn Invest*, 2: 29-34, 1990.
 33. Card JP, Rinaman L, Lynn RB, *et al.* Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J Neurosci*, 13 : 2515-2539, 1993.
 34. Wolf BC, Martin AW, Neiman RS, *et al.* The detection of epstein-barr virus in hairy cell leukemia cells byinsitu hybridization. *Am J Pathol*, 136 : 717-723, 1990.
 35. Brahic M, Haase AT. Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization. *Proc Nati Acad Sci*, 6125-6129, 1978.
 36. Brown TM, Osorio FA, Rock DL. Detection of latent pseudorabies virus *in situ* hybridization. *Vet. Microbiol*, 24: 273-280, 1990.
 37. Gravitt PE, Manos MM. Nucleic acid hybridization methods to detect microorganisms. *Lab Anim Sci*, 43 : 5-10, 1993
 38. Robin GM, David GT. DNA hybridization procedure to detect pseudorabies virus DNA in swine tissue. *Am J Vet Res*, 46 : 1133-11 36, 1988.
 39. Trimmer PA, Phillips LL, Oswald S. Combination of in situ hybridization and immunocytochemistry to detect messenger RNAs in identified CNS neurons and glia in tissue culture. *J Histochem Cytochem*, 39:891-898, 1991.
 40. Weiss LM, Chen YY. Effects of different fixatives on detection of nucleic acids from paraffin-embedded tissues by in situ hybridization using oligonucleotide probes. *J Histochem Cytochem*, 1991; 39 :1237-1242, 1991.
 41. Jestin A, Foulon TH, Pertuiset B, *et al.* Rapid detection of pseudorabies virus genomic sequences in biological samples from infected pigs using polymerase chain reaction DNA amplification. *Vet Micro*, 23: 317-328, 1990.
 42. Hasebe H, Wheeler JG, Osorio FA. Gene specific assay to differentiate strations of pseudorabies virus. *Vet Microbiol*, 34: 221-231, 1993.
 43. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extractin procedure screerining recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res*, 9:2989, 1979.
 44. Ish-Horwicz D, Burke JF. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res*. 1981. 9:2989.
 45. Baskerville A. Ultrastructural change in pulmonary airways of pigs infected with a strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci*, 13: 127-132, 1972.
 46. Baskerville A. Ultrastructural changes in the lungs of pigs infected with Aujeszky's disease virus. *Res Vet Sci*, 14: 229-233, 1973.
 47. 조경제, 김명옥, 강형채 등. 신경계 추적자인 Pseudorabies 바이러스에 관한 전자현미경적 연구. *대한해부학회지*, 26 : 469-483, 1993.
 48. Wolber RA, Beals TF, Lloyd RV. Ultrastructural lo-

- calization of viral nucleic acid by *in situ* hybridization. *Laboratory investigation*, 59:144-151, 1988.
49. Whealy ME, Card JP, Meade RP, *et al.* Effect of brefeldin A on alphaherpes virus membrane protein glycosylation and virus egress. *J Virol*, 65 : 1066-1081, 1991.
 50. Baskerville A, McCracken RM, McFerran JB. The histopathology of experimental rhinitis in pigs produced by a strain of Aujeszky's disease virus. *Res Vet Sci*, 12: 323-326, 1971.
 51. McFerran JB, Sow C. The excretion of Aujeszky's disease virus by experimentally-infected pigs. *Am J Vet Res*, 112 : 631-635, 1964.
 52. Corner AH. Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets. *Res Vet Sci*, 6: 337-343, 1965.
 53. Dow C, McFerran JB. The neuropathology of Aujeszky's disease in the pig. *Res Vet Sci*, 3: 436-442, 1962.
 54. Belak 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 section. *J Vet Med*, 36: 10-20, 1989.
 55. Cloude B, Malika B, Dominique F. A simple method for coupling *in situ* hybridization and immunocytochemistry : application to the study of peptidergic neurons. *J Histochem Cytochem*, 39 : 859-862, 1991.
 56. Crabb ID, Huges SS, Hicks DG, *et al.* Nonradioactive *in situ* hybridization using digoxigenin-labeled Oligonucleotides. *Am J Pathol*, 141 : 579-589, 1992.
 57. Cremers AKM, Jansen WN, Wiegant J. nonradioactive *in situ* hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems. *Histochem*, 86: 3413-3416, 1987.
 58. Harold AM, Daniel LR. Comparative usefulness of tissue fixatives for *in situ* viral nucleic acid hybridization. *J Histochem Cytochem*, 33 : 1026-1032, 1985.
 59. Nuovo GJ, MacConnell P, Forde A, *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 139 : 847-854, 1991.
 60. Ming C, Beckstead JH.. Localization of cytomegalovirus DNA in plastic-embedded sections by *in situ* hybridization. *Am J Pathol*, 134 : 457-463, 1989.
 61. Rigby PW, Diecmann M, Rhodes C, *et al.* Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 237-251, 1977.
 62. Narita M, Osada M, Fukusho A. An electron microscopic study of solar ganglia in piglets infected with Aujeszky's disease virus. *Natl. Inst Anim*, 23: 61-66, 1983