

***In Situ* Hybridization에 의한 돼지 유행성설사증 (Porcine Epidemic Diarrhea)의 진단**

박남용*, 조호성, 김태주, 박영석¹

전남대학교 수의과대학, ¹공주대학교 특수동물학과

(게재승인: 2003년 6월 4일)

Rapid and Easy Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) by *in situ* Hybridization

Nam-yong Park*, Ho-seong Cho, Tae-ju Kim and Young-seok Park¹

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

¹Department of Companion Laboratory Animal Science, Kongju University, Gongju 314-712, Korea

(Accepted: June 4, 2003)

Abstract: Molecular diagnostic techniques have been used to identify porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), a causative agent of acute enteritis in swine, but they were difficult to be performed and time-consuming. To detect PEDV in a rapid and easy way, we developed biotinylated cDNA probe for N gene encoding the nucleoproteins of PEDV. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissues from 24 naturally infected pigs were used for the experiment.

The ISH produced a positive reaction in all cases. When intestinal tissues were hybridized with PEDV probe, strong signals were seen in the villus enterocytes of the jejunum and ileum. Hybridization signals were also found in the duodenum from one pig and in colon from another. In conclusion, ISH with a biotinylated cDNA probe was provided to be a useful diagnostic method for detecting PEDV effectively in routinely processed tissue sections.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus, *in situ* hybridization, cDNA probe, PED

서 론

돼지 유행성 설사증 바이러스 (porcine epidemic diarrhea virus; PEDV)는 전 연령의 돼지에서 감염되어 급성 설사증을 야기하며 특히 신생자돈에서 폐사율이 100%에 달할 만큼 치명적이다. 이와 함께 유사한 증상을 나타내므로 감별진단 되어야할 돼지 전염성 위장염 바이러스 (transmissible gastroenteritis virus; TGEV)가 있으며 이들은 모두 코로나바이러스 과에 속한다 [7, 19].

돼지 유행성 설사증 (porcine epidemic diarrhea: PED)은 1978년 벨기에와 영국에서 최초로 보고되었다 [18, 23]. 그 이후로 유럽의 많은 양돈 국가들에서 발생이 보고되었으며 국내에서도 1992년 저자 등에 의하여 발생이 보고된 이래 지속적인 발병을 보이고 있다 [2, 4]. 돼지 전염성 위장염 (transmissible gastroenteritis: TGE)과는 임상적으로 구별할 수 없으며 병리조직학적 소견도 회장과 공장에서 장용모상피를 파괴시켜 위축을 일으키는 것으로 매우 유사하다 [6]. PED 감염시 임상증상은

* Corresponding author: Nam-yong Park
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel: +82-62-530-2843, Fax: +82-62-530-2847, E-mail: nypark@chonnam.ac.kr

식욕저하, 구토, 설사와 함께 탈수가 일어나며 심한 설사와 탈수로 인해 5일령 이하의 신생 자돈에서는 이환률과 폐사율이 100%에 달한다. 그러나, 10일령 이상의 감염 자돈에서는 10% 이하의 폐사율을 나타낸다 [8, 23].

PEDV는 약 120-130 nm 크기로 선형의 positive-sense, single-stranded RNA를 가지며 복제는 주로 숙주세포의 세포질에서 일어난다. Genomic RNA의 3' 말단에는 major peplomer glycoprotein을 coding하는 S gene, membrane glycoprotein을 coding 하는 M gene, nucleocapsid protein을 coding 하는 N gene 등이 존재한다 [17]. TGEV를 포함한 다른 코로나 바이러스들의 M gene 내의 염기서열을 비교할 때 50% 정도의 낮은 상동성을 보이나 다른 PEDV strain들 사이에서는 잘 보존되어있는 부위로 알려져 있다 [7].

지금까지 PEDV를 진단하는 방법으로는 세포배양을 통한 PEDV의 분리·동정이 시도되었으나 배양이 어렵기 때문에 PEDV의 항원과 항체를 검출하는 방법이 개발되었다 [3, 5]. 조직내에서 PEDV의 항원을 검출하는 방법으로 단클론 항체나 다클론 항체를 이용한 면역조직화학방법을 통하여 공장과 회장의 장용모상피에서 검출이 이용되어왔다 [9, 13]. 그러나, 항원-항체반응은 비특이적인 반응이 많아 진단의 정확성이 떨어지고 포르말린 고정과정에서 항원의 변형이 일어나 위양성 반응이 많을 뿐 아니라 같은 바이러스과에 속하는 돼지 전염성 위장염 바이러스와의 감별이 어렵기 때문에 보다 민감한 진단법이 필요하게 되었다. PEDV 핵산을 검출하기 위한 방법으로 viral RNA에 상보적인 DNA probe를 이용하는 *in situ* hybridization (ISH)는 세포나 조직의 형태학적 형태를 잘 보존하면서 바이러스 유전자를 직접 확인 할 수 있게 해주는 특이성이 높은 검사 방법으로 알려져 있다 [1, 12].

그러나, 지금까지 조직에서 PEDV를 검출하기 위하여 이용된 ISH 기법은 실험절차상 수행하는데 어렵고 일상적으로 진단에 적용되기에는 많은 시간이 소요된다. 따라서, biotin이 표지된 cDNA probe를 이용하여 PEDV 핵산을 2시간 이내에 검출할 수 있는 쉽고 빠른 ISH 기법을 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

1991년 3월부터 1994년 8월까지 전남대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 가검물중 임상증상, 조직병리학적 소견 등을 통해 PEDV로 의심되는 13개 농장에서 24마리 돼지를 이용하였다. 각각의 농장마다 1-3마리를

실험에 사용하였으며 28일령에서 150일령까지 다양한 일령분포를 보였다. 음성대조군으로는 PEDV가 국내에서 발생하기 전인 1984년도에 면역조직화학법에 의해 TGEV로 진단된 돼지의 소장과 결장의 파리핀 포매조직을 이용하였다.

ISH를 위한 조직 처리

10% 중성 포르말린에 고정된 십이지장, 공장, 회장, 결장등의 조직을 파리핀에 포매하여 5 μ m의 절편을 만든 후 ProbeOn™ Plus slide (Fisher Biotech)에 부착하여 실험에 사용하였다.

Plasmid DNA 정제와 PEDV-cDNA probe의 생산

PEDV의 cDNA probe는 Plasmid DNA Vector pUC19 내에 PEDV M-gene protein 부위의 DNA 절편 (492 bp)이 삽입된 *E. coli* 균주를 충남대학교 수의과대학 김철중 교수로부터 분양받아 Sambrook *et al* [22]의 alkali lysis 방법을 응용, 분리하였다.

Probe labeling

PEDV-cDNA fragment의 표지는 biotin-14-dATP와 BioNick™ labeling system (BRL, USA)을 이용한 nick translation방법을 통하여 biotin을 표지하였으며 표지된 probe는 hybridization cocktail (Amresco®, 45% Formamide)과 Brigati diluent (Research Genetics, USA)에 최종 200 ng/ml이 되게 희석하여 ISH에 사용되기 전까지 -20°C에 보관하였다.

ISH

ISH의 전 과정은 MicroProbe™ capillary action system (Fisher Biotech®)을 이용하였으며, ProbeOn™ Plus slide를 맞대어 생기는 gap 사이로 모세관현상에 의하여 시약이 쉽게 스며들고 흡수성이 좋은 pad 위에 slide를 놓으면 slide 사이의 시약이 쉽게 제거되는 원리를 이용한 것으로 1-2시간내에 수행하였다(Table 2).

Deparaffinization: Dewaxing agent (AutoDewaxer, Research Genetics)를 사용하여 110°C에서 2분간 탈파라핀 과정을 3회 반복하고 100% ethanol에서 5회씩 세척하여 Dewaxing agent를 제거하고 탈수시켰다.

Enzyme predigestion: 탈파라핀 조직절편내 probe 투과성의 증진과 핵산이 잘 노출되도록 단백분해효소인 pepsin (Research Genetics, USA)에 110°C, 2분 30초간 반응시켰다.

Heat denaturation and hybridization: 조직절편내 target

Table 1. Procedures of ISH for the detection of PEDV

Reagent	Cycle	Time (minute)	Temperature (°C)
AutoDewaxer (RG)	3	2	110
AutoAlcohol	5	1 wash	RT
Pepsin	1	2.5	110
PreHybe Plus (RG)	1	3	110
Probe			
heating	1	2	110
cooling	1	0.5	RT
heating	1	2	105
cooling	1	0.5	RT
heating	1	0.5	105
cooling	1	1	RT
heating	1	0.5	95
cooling	1	2	RT
heating	1	0.5	85
cooling	1	3	RT
heating	1	0.5	85
cooling	1	4	RT
2X SSC	4	0.1	RT
Auto Blocker (RG)	1	2	50
2X SSC	3	0.1	RT
Streptavidine-alkaline phosphatase (DAKO)	1	10	50
Probe Lock (RG)	1	0.1	RT
STABLE FAST TR/NP (RG)	2	10	50
Distilled water	2	0.1	RT
Auto hematoxylin (RG)	1	1	RT
Distilled water	2	1 wash	RT

RG: Research Genetics, Huntsville, USA.

RT: Room temperature.

DAKO: DAKO, Carpinteria, USA.

viral RNA와 probe cDNA의 denaturation을 위하여 처음 PreHybe Plus (Research Genetics)에 110°C 3분간 반응시킨 다음 biotinylated cDNA probe를 첨가하여 110°C에서 2분간 denature시키고, 30초 cooling, 105°C 2분 denaturation, 30초 cooling, 105°C 30초 denaturation, 1분 cooling, 95°C 30초 denaturation 2분 cooling, 85°C 30초 denaturation 3분

cooling, 85°C 30초 denaturation 4분 cooling 시켜 target RNA와 probe를 hybridization 시키고 비특이적으로 결합한 probe를 제거할 목적으로 2X SSC (0.3 M NaCl and 0.03 M Sodium Citrate)로 6초간 4회 세척한 후 Auto Blocker (Research Genetics)로 2회 세척하여 내인성 peroxidase를 억제하였다.

Detection: Streptavidin-alkaline phosphatase detection system (Research Genetics)을 이용하여 50°C 10분간 반응시킴으로서 target RNA와 hybridization된 probe의 biotin과 결합하도록 하였다.

Chromogen: Chromogen을 반응시키기 전에 alkaline phosphatase의 역가를 증대시키기 위하여 Probe Lock (Chromogen Enhancer, Research Genetics)을 처리하였고 stable fast TR salt/naphthol phosphate (Research Genetics)를

Table 2. Results of ISH for PEDV detection in the intestinal villi of naturally infected pigs

Farm No.	Pig No.	Age (days)	ISH			
			Duodenum	Jejunum	Ileum	Colon
1	1	50	+	+	+	-
	2	50	+	+	+	-
2	3	70	-	+	+	-
	4	70	-	+	+	-
	5	120	-	+	+	-
3	6	120	-	+	+	-
	7	45	-	+	+	-
4	8	45	-	+	+	-
	9	70	-	+	+	-
5	10	60	-	+	+	-
	11	80	+	+	+	-
6	12	80	+	+	+	-
	13	75	-	+	+	-
7	14	75	-	+	+	-
	15	90	-	+	+	+
8	16	150	-	+	+	-
	17	150	-	+	+	-
9	18	28	-	+	+	-
	19	28	-	+	+	-
10	20	90	-	+	+	-
	21	90	-	+	+	-
11	22	45	-	+	+	-
	23	45	-	+	+	-
12	24	45	-	+	+	-

+, detected; -, not detected

50℃에서 10분간 반응시킴으로서 양성반응을 나타내도록 하였다. Auto Wash (Research Genetics)로 2회 수세하여 실험과정 중의 모든 시약을 완전히 세척하였다.

Counterstain: 조직의 형태가 잘 구분되도록 Auto Hematoxylin (Research Genetics)으로 대조염색한 후 증류수로 4회 수세하였고 조직이 건조되지 않도록 하여 Universal Mount (Research Genetics)를 2-3방울 떨어뜨려 봉입하고 광학현미경으로 검경하였다.

Control

양성 대조군으로는 포유동물의 공통유전자에 해당하는 Alu I/II mix probe를 사용하였고 음성대조는 면역조직화학법에서 TGE로 진단된 돼지의 장조직을 사용하였다.

결 과

최적의 hybridization 조건 확립을 위해 다수의 반복 실험을 실시하였다. 점막과 점막아래 분비세포에서의 비특이적 반응을 줄이기 위하여 실험조건을 조정하였으며 여러 조건 중 펩신의 반응시간이 실험결과에 가장 중요한 영향을 주었다. 염색의 강도와 조직의 형태 유지에 매우 민감한 조건으로 30초 간격으로 5분까지 반응시간을 적용한 바 2분 30초의 pepsin (2 mg/ml)의 반응시간이 가장 적절하였다. 또한 probe의 농도가 실험결과에 많은 영향을 줄 수 있었는데 동일한 조직에서 probe의 농도가 0.1 ng/μl 인 경우 미약한 양성 반응을 보이기 시작하였으며 가장 적절한 농도는 1-2 ng/μl 이었다.

ISH의 결과는 Table 2 와 같다. 실험에 사용된 모든 예의 공장 (Fig. 1), 회장 (Fig. 2)의 장 상피세포의 세포질에서 적색의 양성반응을 확인할 수 있었다. 또한 두

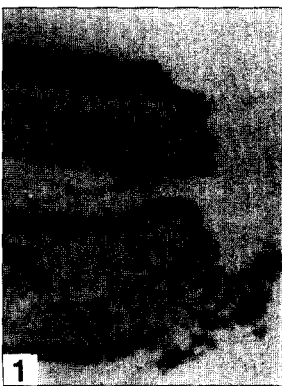


Fig. 1. Red positive signals were observed in the cytoplasm of jejunal epithelium. ISH. $\times 200$.



Fig. 2. Red positive signals were observed in the cytoplasm of ileal epithelium. ISH. $\times 100$.

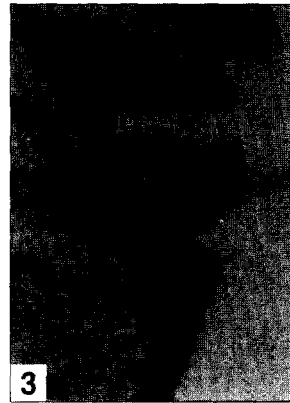


Fig. 3. Red positive signals indicating presence of the nucleic acids appeared in the cytoplasm of duodenal epithelium. ISH. $\times 100$.



Fig. 4. Red positive signals indicating presence of the nucleic acids appeared in the cytoplasm of colonic epithelium. ISH. $\times 100$.

개 농장 4마리의 돼지에서는 십이지장 (Fig. 3)의 장상피세포의 세포질에서 적색의 양성반응이 관찰되었으며 한 개 농장의 한 마리 돼지의 경우 결장 (Fig. 4) 장 상피세포 세포질에서도 양성반응을 확인할 수 있었다. 한편 음성대조군으로 사용한 TGEV 감염 돼지 장절편은 모든 실험마다 동시에 ISH를 수행하였을 때 양성반응을 관찰할 수 없었다.

고 찰

분자생물학은 질병의 진행과정을 이해하고 유전자 수준에서 질병을 진단하는데 유용하게 이용되고 있는데 PCR과 ISH 등의 기법은 병리학에 있어 광범위하게 적용되고 있다 [11, 14].

PEDV 감염증을 진단하는 방법으로는 바이러스의 배양·분리동정, 특이항체의 검출, 항체를 이용한 capsid 항원의 검출 그리고 전자현미경을 통한 virion의 확인 등과 같은 방법들이 있다 [9, 13, 15, 20]. 그러나, 바이러스 배양법은 진단을 위한 가장 확실한 방법이지만 많은 비용과 노력이 필요하며 결과를 얻는데 많은 시간이 소요되므로 통상적인 검사법이 되기에는 어려움이 있다 [16]. 단클론 항체를 이용한 면역조직화학법은 포르말린 고정에 의한 항원의 변성으로 항원의 교차반응이 일어나 위양성 결과를 나타낼 수 있다 [9]. 특이 primer를 이용하여 유전자를 증폭하는 PCR은 소수의 바이러스 입자를 증폭할 수 있는 우수한 진단법이나 바이러스가 감염성을 갖는 농도 이하로 존재할 때에도 질병의 원인체로 진단될 수 있고 조직내에서 바이러스의 분포를 확인할 수 없다는 단점이 있다 [14]. 최근에는 실시간으로 PCR 산물을 정량할 수 있는 real-time PCR을 이용할 수 있으나 고가의 장비가 필요한 기법이므로 현재로서는 적용하기 어려운 실정이다 [10, 21]. 따라서, 조직내에서 바이러스 핵산을 직접 검출할 수 있는 ISH 기법이 실제 질병의 진단에 적용되기에 유용한 방법으로 여겨지고 있다 [11, 12].

PEDV를 진단하기 위한 ISH는 Kim과 Chae [12]에 의해 수행되었는데 PEDV에 자연감염된 자돈의 포르말린 고정조직을 대상으로 PEDV RNA 중 M gene 부위에서 377bp의 cDNA를 RT-PCR 방법을 통해 얻은 후 digoxigenin을 표지하고 ISH에 이용하였다. 그러나, 이 같은 통상적인 ISH 진단은 hybridization을 위해 37°C에서 overnight 해야 하므로 2일 이상의 시간이 소요된다. 따라서, 보다 신속하고 경제적인 ISH 기법의 필요성이 요구되어 본 연구에서 적용한 방법은 Microprobe™ capillary action system 으로 실험과정이 매우 단순하여 전 과정

을 1-2시간내에 마칠 수 있을 뿐 아니라 사용되는 시약 및 probe의 양을 최소화 할 수 있다는 장점이 있어서 국내에서 발생되고 있는 PED를 신속하고 정확하게 진단할 수 있게 되었다 [1].

PED는 TGE와 병원체, 임상증상 및 병리조직학적 병변이 매우 유사하므로 감별진단하는 것이 중요하다 [8, 11]. 두 바이러스는 공장과 회장의 장용모상피세포의 세포질에서 복제되어 장상피세포의 위축과 융합을 일으켜서 장표면적을 감소시킨다. 이로 인하여 소화와 흡수의 부전을 동반하여 심한 설사와 탈수가 일어나게 된다 [8]. 따라서, 병리조직학적 검사로 두 바이러스를 감별하기는 어렵기 때문에 바이러스 핵산의 특이부위를 찾아 검출하는 것이 감별 진단하는데 효과적이다.

PEDV의 복제부위로 잘 알려진 공장과 회장 이외의 부위에 대한 양성반응이 본 연구에서도 관찰되었다. PEDV를 돼지에 실험적접종하고 면역항체법으로 항원을 검출한 결과 결장과 맹장의 표층에 있는 장상피세포에서 양성반응이 관찰되었다고 보고한 연구 [6]와 ISH를 통해 대장에는 어떠한 양성반응도 관찰할 수 없었다는 연구 [12] 등의 서로 다른 보고가 있다. 본 연구에서도 한 증례에서 결장의 양성반응이 관찰되었고 네 증례에서 십이지장의 양성반응도 확인할 수 있었다. 선행연구에서 시도한 면역항체법이 본 연구에서 수행한 ISH와 비교하여 기법상 특이성이 떨어진다 하더라도 Kim과 Chae [12]가 제안한 소수의 증례에서만 나타난 점, 바이러스주들 간의 차이, 돼지연령, 감염기간 및 품종의 감수성 차이 등의 많은 변수가 있기 때문에 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것이다.

본 실험에 대상이 되는 돼지는 28일령에서 150일령까지 연령분포를 보이고 있다. 이는 주로 10일령 이하의 자돈을 대상으로 다른 연구 [12]와 비교할 때 다양한 연령분포를 보인다. 이는 PEDV 감염에 있어 폐사율이 100%에 달하는 연령은 5일령 이하의 자돈이고 10일 이상의 감염 자돈에서는 10% 이하의 폐사율을 보인다는 보고 [8, 23]를 통해 지금까지 PEDV 감염 여부를 조사하는 대상이 주로 10일령이하의 자돈이었다. 그러나, PEDV는 돼지의 전 연령에 걸쳐 감수성을 나타내므로 10일령 이상의 연령에 대한 PEDV 감염에 대한 조사도 필요할 것으로 생각되었다. 따라서, 본 연구 결과에서 양성반응이 28일령에서 150일령 걸쳐 나타난 것을 통해 PEDV 감염이 치사율은 낮지만 다양한 연령에 걸쳐 설사증을 유발하는 것을 확인 할 수 있었다.

본 연구에서 수행한 ISH 기법의 장점은 1-2시간 이내에 결과를 확인할 수 있는 점이다. 이를 위하여 가장 중요한 부분이 조직절편의 세포내 핵산을 노출하기 위한

단계이다. 핵산을 노출시키기 위한 단백분해 효소로는 trypsin, proteinase K, pepsin, protease 등이 사용되는데 본 실험에서는 pepsin을 사용하였고 염색의 강도와 조직의 형태를 유지하는데 매우 민감한 조건으로 1분 간격으로 10분까지 반응시간을 적용한 결과 2분 30초의 pepsin (2 mg/ml)의 반응시간이 가장 적절한 것을 알 수 있었다.

또한 본 실험의 장점은 기존의 포르말린 고정된 파라핀 조직까지도 검사가 가능하다는 점이다. 이는 PED 발생의 역추적 조사에도 좋은 방법이 될 것이며 기타 바이러스, 세균성 질병의 진단을 위한 ISH기법의 수립에도 크게 도움이 될 것으로 생각된다.

결 론

PEDV의 cDNA probe (492 bp)에 biotin을 표지하여 PEDV에 감염된 돼지 장조직의 포르말린 고정된 파라핀 절편에서 Microprobe™ capillary action system을 이용하여 ISH를 수행하였던 바 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

실험에 이용한 모든 예의 공장과 회장 용모 상피세포 세포질내에서 PEDV의 양성 반응을 확인하였다. 또한 일부 예에서는 십이지장과 결장의 장 용모 상피세포에서도 양성반응이 관찰되었다. 한편 실험과정의 단순화와 pepsin 농도 조절을 통한 hybridization의 최적화를 위한 조건을 확립하였으며 이를 통해 진단에 소요되는 시간을 줄일 수 있었다.

이상의 결과에서 biotin을 표지한 cDNA probe를 Microprobe™ capillary action system에 적용한 ISH의 수행은 PED를 신속하고 정확하며 효과적으로 진단할 수 있는 새로운 기법이라 할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 대형공동연구(1998-2000) 내용의 일부임.

참고문헌

1. 김승재, 박남용. 돼지 생식기 및 호흡기 중후군 진단을 위한 *in situ* hybridization기법의 응용. 대한수의학회지. 1997, 37, 793-807.
2. 박남용, 조경오, 조성수, 하용공. 돼지 유행성 설사 바이러스의 분리 동정. 대한수의사회지. 1993, 29, 360-365.
3. Callebaut, P., Debouck, P. and Pensaert, M. Enzyme-

linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. Vet. Microbiol. 1982, 7, 295-306.

4. Debouck, P., Callebaut, P. and Pensaert, M. Prevalence of the porcine epidemic diarrhea (PED) virus in the pig population of different countries. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Congr. 1982, 7, 53.
5. Debouck, P., Callebaut, P. and Pensaert, M. The diagnosis of coronavirus-like agent (CVLA) diarrhea in suckling pigs. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. 1981, 13, 59-61.
6. Debouck, P., Pensaert, M. and Coussement, W. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV777. Vet. Microbiol. 1981, 6, 157-165.
7. Duarte, M., Tobler, K., Bridgen, A., Rasschaert, D., Ackermann, M. and Laude, H. Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. Virology. 1984, 198(3), 466-476.
8. Ducatelle, R., Coussement, W., Debouck, P. and Hoorens, J. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. Vet. Pathol. 1982, 19, 57-66.
9. Guscetti, F., Bernasconi, C., Tobler, K., Van Reeth, K., Pospischil, A. and Ackermann, M. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998, 5, 412-414.
10. Helps, C., Reeves, N., Tasker, S. and Harbour, D. Use of real-time quantitative PCR to detect Chlamydia felis infection. J. Clin. Microbiol. 2001, 39(7), 2675-2676.
11. Horvath, I. and Mocsari, E. Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pig affected with a transmissible gastroenteritis (TGE)-like disease. Arch Virol. 1981, 68, 103-113.
12. Kim, O. and Chae, C. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets. Vet. Pathol. 2000, 37, 62-67.
13. Kim, O., Chae, C. and Kweon C. H. Monoclonal antibody-based immunohistochemistry to detect porcine epidemic diarrhea virus agents in formalin-fixed,

- paraffin-embedded intestinal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999, **11**, 458-462.
14. Kubota, S., Sasaki, O., Amimoto, K., Okada, N., Kitazima, T. and Yasuhara, H. 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.* 1999, **61(7)**, 827-830.
 15. Lee, H. M., Lee, B. J., Tae, J. H., Kweon, C. H., Lee, Y. S. and Park, J. H. Detection of porcine epidemic diarrhea virus by immunohistochemistry with recombinant antibody produced in phages. *J. Vet. Med. Sci.* 2000, **62(3)**, 333-337.
 16. Martin, W. J. Polymerase chain reaction: A tool for the modern pathologist. *In* Molecular Diagnosis in Pathology. Fenoglio-Preiser, C. M. and Willman, C. L. (eds). pp. 21-46. Williams & Wilkins, Baltimore, 1991.
 17. Murphy, F. A. Coronaviridae. *In* Veterinary Virology, pp. 495-508. 3th ed. Academic press, San Diego California U.S.A., 1999.
 18. Pensaert, M. B. and Debouck, P. A. New coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* 1978, **58(3)**, 243-247.
 19. Pensaert, M. B. Porcine Epidemic Diarrhea. *In*: Disease of Swine, 8th ed. Straw, B. E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L., and Taylor, D. I. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa U.S.A. 1999, 179-185.
 20. Posischil, A., Hess, R. G. and Bachmann, P. A. Light microscopy and ultra histology of intestinal changes in pigs infected with epizootic diarrhea virus (EDV): comparison with transmissible gastroenteritis (TGE) virus and porcine rotavirus infections. *J. Vet. MED. B.* 1981, **28**, 564-577.
 21. Risatti, G. R., Callahan, J. D., Nelson, W. M. and Borca, M. V. Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41(1)**, 500-505.
 22. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning a Laboratory Manual, pp. 125-128. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
 23. Wood, C. N. Transmissible gastro-enteritis of swine. *Vet. Bull.* 1969, **39**, 239-248.