

돼지 생식기 및 호흡기 증후군 진단을 위한 *in situ* hybridization 기법의 응용

김 승 재 · 박 남 용

전남대학교 수의과대학
(1997년 9월 20일 접수)

Application of *in situ* hybridization for diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome

Seung-jae Kim, Nam-yong Park

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received Sep 20, 1997)

Abstract : We tried to develop detection system of porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV) by *in situ* hybridization(ISH) in the piglets experimentally infected with KPRRS-2, the Korean isolate(12 piglets) or Mn-1b, the American isolate(4 piglets), and in the natural infection suspected 6 piglets.

Twelve 30-days-old piglets(two pigs per each inoculated group) were inoculated by nasal instillation of KPRRS-2 virus(total dose $10^{4.5}$ TCID₅₀). Six piglets(one pig per each group) were induced contact infection with inoculated piglets, during the experiment, and two piglets were used as control. Inoculated or contacted piglets were euthanized at 1, 3, 5, 7, 14 and 21 days postinoculation(DPI).

The respiratory signs such as coughing and nasal discharge were observed on day 3 DPI, and ear cyanosis were on day 5 DPI, including contacted piglets. Through the necropsy, purple discolorization of dorsal part of lung, and hypertrophy of local lymph nodes were observed. The histopathological lesions of lung were interstitial pneumonia characterized by type 2 pneumocyte hyperplasia.

We prepared the probe for ISH by RNA isolation from KPRRS-2, RT-PCR, and biotin labeling.

We performed the ISH within only 1~2 hours using Microprobe™ capillary action system. As the results, the strong red specific positive signals, means PRRSV distribution, was mainly observed in the cytoplasm of alveolar macrophages. And also signals were detected in some type 2 pneumocytes and bronchiolar epithelium of lung, myocardium, liver, kidney, tonsil, spleen,

gastrointestinal mucosa, testis and lymph nodes.

Key words : porcine reproductive and respiratory syndrome, *in situ* hybridization, PRRS, RT-PCR.

서 론

돼지 생식기 및 호흡기 증후군 (Porcine reproductive and respiratory syndrome ; PRRS)은 모돈에서 번식장애와 자돈에서 호흡기 증상을 보이는 돼지의 신종 바이러스 성 질환으로서 1987년에 미국에서 최초로 발생이 확인 되었으며, 1990년대 이후 유럽 등 전세계적으로 발생이 보고되어 양돈업계에 큰 영향을 주고있다^{1,4}.

우리나라에서는 1993년 신 등⁵이 최초로 발생보고하였으며 더욱이 1993년에서 1994년까지 간접형광항체법을 통하여 실시한 혈청학적 역학조사에서 농장별 17.6%, 개체별 6.25%의 항체 양성율을 나타냈으나 1994년에서 1995년에는 농장별 양성율 22%, 개체별 10.6%로 양성율이 급증하여 PRRS가 급속도로 전파되는 추세이다⁶.

PRRS 바이러스는 분리된 지역에 따라 항원성이 다른 다양한 strain이 존재하며⁷, 심지어는 같은 지역내에서도 항원성이 다른 strain들이 동시에 존재하는 것으로 알려져 있다⁸. 또한 Meng *et al*⁹은 PRRS 바이러스의 항원구조를 결정짓는 ORF6와 ORF7의 아미노산 서열 비교를 통한 각 strain의 동일성을 파악한 결과, 미국주와 캐나다주 사이에는 96~100% 정도로 유사하였지만 유럽주와의 동일성은 각각 57~59%, 78~81% 정도로 상이함을 나타냈다고 한다.

PRRS 바이러스 감염은 모든 연령의 돼지에서 발생하지만 임상증상은 주로 모돈과 자돈에서 관찰된다¹⁰. 그러나 발생농장에 따라 불현성 감염례에서 치명적인 예까지 그 임상증상이 매우 다양하며 이에 따른 경제적 손실도 다양하다. 이는 개체의 면역상태, 바이러스 strain의 다양성 특히 세균의 이차감염 등의 여러가지 요인 때문인 것으로 알려져 있으며, 이러한 요인 때문에 PRRS 바이러스 감염증의 임상적 진단을 매우 어렵게 하고 있다^{11,12}.

PRRS 바이러스의 CPE 형성에 의한 진단에는 초대배양세포로서 폐포 대식세포(porcine alveolar macrophage;

PAM)가 이용되며, 계대배양으로서는 돼지 정소세포, CL 2621, MA 104 및 MARCS 등을 이용하는 것으로 알려져 있다¹²⁻¹⁵. PRRS 바이러스 감염증의 진단을 위해서는 바이러스의 분리 및 동정이 가장 정확한 방법이나 절차가 까다롭고 또한 Bautista *et al*¹⁶에 의하면 여러 분리주 가운데 PAM cell이나 CL 2621 cell line에서 동시에 배양되는 것은 일부분이고 대부분의 분리주는 이중 한 cell line에서만 증식된다고 하였으며, 더욱이 CPE를 형성하는 분리주도 한정되어 있다고 하였는데 이러한 이유 때문에 PRRS 분리동정을 위해서는 여러개의 cell line을 동시에 이용해야 하는 어려움이 있다.

PRRS 바이러스 감염시 병리부검 및 조직조건상 특징적인 간질성 폐렴이 관찰된다. 그러나 대개 Mycoplasma¹⁷와 화농성 기관지폐렴을 일으키는 세균에 의한 이차감염이 흔하기 때문에 그 진단이 모호해지는 경우가 많으며¹² 태어나 모돈의 조직은 자돈에 비해 병변이 거의 관찰되지 않기 때문에 병리조직학적 시료로서 부적합하다는 문제점이 있다¹³.

현재 널리 이용되고 있는 PRRS 바이러스 감염증의 진단법으로 혈청학적 진단방법이 응용되고 있는데 혈청학적 진단법에는 면역 퍼옥시데이스 단층세포 검정법(Immunoperoxidase monolayer assay)¹³과 간접 면역형광항체법(Indirect immunofluorescent assay; IFA)¹⁸, 중화항체 시험(Serum neutralization test)¹⁹ 그리고 ELISA²⁰와 같은 방법이 있다. 그러나 현재는 이미 PRRS 바이러스가 넓게 퍼져 있고, 백신이 상용화 됨에 따라 항체가의 존재가 바로 임상적인 질병상태를 의미하지 않으므로 paired sera와 많은 수의 시료가 필수적이다¹³. 또한 각 strain의 혈청형이 다양하고⁸, 더욱이 한지역내 여러 종류의 혈청형이 존재한다는 문제점이 있다⁹.

최근 수의학 분야에 분자생물학적 기법의 응용이 확대되는 가운데 PRRS의 진단에도 분자생물학적 기법의 응용이 보고되고 있어 Reverse transcription 및 Polymerase chain reaction(RT-PCR) 기법²²⁻²⁴과 *In situ* hybridization(ISH) 기법²⁵을 이용한 진단법이 소개되고 있다. 특

히 Mardassi et al²³과 Kim et al²⁴은 RT-PCR을 통하여 각 strain의 감별은 물론이고 공통 염기서열에 해당되는 primer를 이용하여 동시에 여러종류의 strain을 검출할 수 있었다고 한다. 그러므로 현재까지 혈청학적 진단에 의존하고 있는 PRRS 바이러스 감염증의 진단은 보다 간편하고 다양한 strain을 동시에 진단해낼 수 있는 특이성 높은 실험실적 기법의 개발이 절실한 상태이다. 이에 본 연구에서는 RT-PCR을 이용하여 공통염기 서열부위에 해당되는 cDNA를 작성하여 Probe를 제작하고 ISH를 수행하여 PRRS 바이러스의 존재를 확인하고자 하였다.

ISH 기법은 조직의 형태를 그대로 유지하면서 세포내 핵산을 직접 검출해내는 기법으로서 특정 DNA나 RNA의 염기서열을 세포질이나 핵에서 Probe를 이용하여 검출해낼 수 있다. PCR이나 기존의 filter hybridization 기법은 세포의 형태를 유지할 수 없는 반면 ISH 기법은 세포나 조직의 형태를 유지할 수 있다는 점에서 병리학자들에게 각광을 받고 있으며, 질병의 기전을 연구하는 데에도 많은 도움이 된다^{26,27}. 특히 근래에 들어 probe에 비방사선 물질을 사용하면서 경비와 위험부담이 줄었기 때문에 특히 바이러스 질병의 진단기법으로서 응용은 점점 확대되어 가고 있다²⁸.

본 연구에서는 RT-PCR을 이용하여 PRRS의 cDNA를 작성하고 여기에 biotin을 labeling 하여 ISH의 probe로 이용하고, 한국분리주인 KPRRS-2주 또는 미국분리주인 Mn-1b주를 실험접종하여 얻은 자돈의 각종 장기의 조직과 자연발생례 6건의 자돈의 각종 장기에 존재하는 바이러스의 분포를 파악하고, 더 나아가 ISH 기법을 PRRS를 진단하는데 보다 특이적이고 간편한 기법으로서 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 바이러스 : 본 실험에 사용된 바이러스는 국내에서 분리된 KPRRS-2주²⁹(역가 $10^{4.5}$ CID₅₀/ml)로서 수의과

학연구소로부터 분양받아 이용하였다.

본 실험실에서 이미 자돈 접종실험에 이용했던 미국주인 Mn-1b주30(역가 10^5 TCID₅₀/ml)는 중앙가축연구소의 윤인중 박사로부터 분양받아 이용하였다.

자돈 접종실험 : 자돈의 접종실험은 한국분리주인 KPRRS-2주를 이용하여 실시하였다.

1) 실험설계 : 임상적으로 건강하며, 간접 면역형광항체법을 통하여 PRRS 항체음성인 30일령의 자돈 20두를 Table 1과 같이 대조군을 포함하여 일령별로 7개군으로 나누었으며, 3주간 외부와의 노출을 최소화 하기 위해 격리사육하여 실험하였다. 바이러스는 각 군의 2마리에 1ml(역가 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml)씩 비강에 점적하여 접종하였으며, 각 군당 1마리씩은 동거 감염시켰다. 각 실험군은 접종후 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 21일에 각각 3마리씩 안락사시켜 각종 장기를 채취하여 실험재료로 사용하였다. 실험기간중 호흡기 증상 및 기타 임상증상을 관찰하였으며, 체온의 변화도 매일 관찰하였다.

2) 병리부검 및 시료채취 : 각 실험군은 접종후 1일, 3일, 5일, 7일 14일 21일에 안락사시켜 일반적인 부검술식에 따라 시료채취를 실시하였고 대조군은 접종전과 접종군의 실험후에 각각 부검을 실시하였다.

폐조직은 우측의 첨엽, 중간엽, 심엽, 횡격엽의 중간부위에서 채취하였으며 편도, 흉선, 하악림프절, 폐림프절, 중격 림프절, 외측후인두 림프절, 천서해 림프절 그리고 장간막 림프절과 같은 림프조직과 함께 기관(중간부위), 심근(좌심실 중간부위), 간, 비장, 대뇌(제7 뇌신경 부위에서 횡단), 소뇌 등을 채취하였고, 기타장기로서 위(기저부), 공장, 회장, 방광 및 흉강 대동맥을 채취하였다. 이렇게 채취한 각 장기는 10% 중성 포르말린에 고정하여, 다음 절차에 이용하였다.

*In situ hybridization*을 위한 조직 : 전남대학교 수의병리학교실에 임상소견상 호흡기 증상으로 의뢰되어 조직병리학적 소견상 간질성 폐렴소견을 보여 PRRS 감염증으로 의심되었던 4개의 농장 6마리 자돈의 폐를 비롯한

Table 1. Experimental design of KPRRS-2 virus inoculation

Group	A	B	C	D	E	F	control
Day post exposure	1	3	5	7	14	21	-
No. of inoculated piglets	2	2	2	2	2	2	-
No. of contacted piglets	1	1	1	1	1	1	-
No. of piglets	3	3	3	3	3	3	2

실질장기와 한국 분리주인 KPRRS-2주를 실험접종하여 얻은 10마리 자돈의 각종 장기 및 미국분리주인 Mn-1b 주를 실험접종하여 얻은 4마리 자돈의 포르말린 고정, 파라핀 포매된 조직을 이용하여 ISH를 실시하였다.

Probe 준비 : PRRS 유전자의 검출을 위한 probe를 제작하기 위해 RNA를 추출하여 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)을 실시하여 cDNA를 작성하고 증폭시켰다.

1) Primer 합성 : RT-PCR을 위한 primer의 제작은 Oligo 1000TM (BECKMAN)을 이용하여 1쌍을 합성하였으며, primer는 Lelystad strain의 ORF1b에 해당되는 부위로서 RNA polymerase를 합성하는데 관여하는 부위를 선택하였다: Sense:5'-GACCCCGTCACCAGTGTGTC-3'(8749-8768, Lelystad virus), antisense: 5'-GTCCGTTCTGAAACCCAGCA-3'(8987-9006 Lelystad virus)²⁴.

2) RNA 추출 및 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) : 수의학연구소에서 분양받은 KPRRS-2 바이러스 배양 상층액에서 RNA를 분리하기 위해 QIAamp[®] HCV kit (QiAGEN Inc, USA)를 이용하여 바이러스 RNA를 추출하였다.

추출한 RNA 1.5에 총 반응액이 20 μ l가 되도록 random nanomer 1 μ l, 10XRNA PCR buffer (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.) 2 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, RNAase free D.W. 2 μ l, RNAase inhibitor (TaKaRa Shuzo Co.,Ltd.) 0.5 μ l, dNTPs mix(dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 2.5mM) 8 μ l 그리고 Avian Myeloblastomasis virus 유래의 AMV Reverse Transcriptase XL(TaKaRa Shuzo Co.,Ltd.) 5 unit를 첨가하였다. 20 μ l의 반응액은 30 $^{\circ}$ C에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분 역전사 반응시킨 후 Reverse transcriptase를 불활화시키기 위해 99 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. 이렇게 합성된 바이러스의 cDNA를 template로 하여 PCR을 실시하였다.

PCR 반응은 Thermal cycler(PerkinElmer, USA)에서 최종량 100 μ l로 반응시켰다. 역전사 반응에서 얻은 20 μ l의 반응액에 63.5 μ l의 멸균증류수, 25mM MgCl₂ 6 μ l, 10X extaq buffer(TaKaRa Shuzo Co., Ltd.) 8 μ l, DNA polymerase (Takara ex taq, TaKaRa Shuzo Co., Ltd.) 2.5 unit 그리고 각각 20 pmole의 sense, antisense primer 1 μ l씩 첨가하였다. predenaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 2분간하였으며, denat-uration은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, primer annealing은 56 $^{\circ}$ C에서 30초 그리고 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 진행하여 10회 반복하였고 그 다음에는 primer annealing 온도를 55 $^{\circ}$ C에서

30초, 54 $^{\circ}$ C에서 30초 조건으로 낮추어 각각 10회씩 반응시켜 총 30회 증폭시켰다. 마지막으로 증폭 후에 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension을 실시하여 PRRS바이러스의 특이 유전자를 증폭시켰다.

RT-PCR의 결과는 반응액을 2 μ l를 취하여 2% agarous gel에 loading한 후 35V로 30분간 전기영동하여 증폭된 산물을 확인하였다. 그리고 RNA 추출 및 RT-PCR을 실시하는 전과정 중에 필요한 증류수 및 기구는 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리하여 RNAase에 의한 RNA의 분해를 최소화 하였다.

3) Biotin 표지 : PCR에 의해 증폭된 PRRS 바이러스의 cDNA에 biotin을 표지하기 전에 spun column(SUPRECTM)을 이용하여 primer와 oligonucleo-tides를 제거하였으며, Biotin-Chem-Link kit (BOEH-RINGR MANNHEIN)를 이용하여 biotin을 표지하였다. 표지된 probe는 최종 농도가 400ng/ml이 되도록 Brigati diluent(Research Genetics)와 Hybridizaton cocktail(americo[®])에 희석하였으며, 사용하기 전까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

In situ Hybridization :

1) In situ hybridization을 위한 조직처리 : 10% 중성 포르말린에 고정된 폐, 림프절 등의 조직을 파라핀에 포매하여 5-6 μ m의 절편을 만든 후 ProbeOnTM Plus slide(Fisher biotechR)에 부착하여 in situ hybridization 실험에 사용하였다.

2) 실험과정 : ISH는 모세관 현상을 이용하여 시약을 흡수하고, pad 위에서 시약을 제거하는 원리를 이용한 MicroProbeTM capillary action system(Fisher BiotechR)을 이용하였으며, ISH 전과정은 1~2시간내에 수행하였다 (Table 2).

Deparaffinization : Dewaxing agent(HistochoiceTM clearing Agent 1X, amrescoR)를 사용하여 110 $^{\circ}$ C에서 2분간 탈 파라핀 과정을 5회 반복하고 100% ethanol에서 5번씩 세척, 2회 반복하여 Dewaxing agent를 제거하고 탈수시켰다.

Enzyme Predigestion : 탈파라핀 조직절편내 probe 투과성의 증진과 핵산이 잘 노출되도록 단백분해 효소인 Pepsin(Research Genetics)에 110 $^{\circ}$ C, 2분간 반응시켰다.

Heat Denaturation & Hybridization : 조직절편내 Target viral RNA와 Probe cDNA의 denaturation을 위해 처음 Prehybe Plus(Research Genetics)에 110 $^{\circ}$ C 3분간 반응시킨 다음 Biotinylated cDNA Probe를 첨가하여 110 $^{\circ}$ C에서 2분

Table 2. Procedure for *In situ* hybridization

Step	Reagent	Cycle	Time	Temp
Deparaffinization	Dewaxingagent	5	2 min	110℃
Dejudratopm	Auto Alcohol	10	1 wash	RT*
Protein digestion	Pepsin	1	2 min	110℃
Probe enhance	Prehybe Plus	1	3 min	110℃
		Probe/Tissue	1	1 min
		1	15~30 sec	RT
	Preobe/Tissue	1	2 min	105℃
		1	15~30 sec	RT
Denaturation	Probe/Tissue	1	0.5 min	105℃
Hybridization	Probe/Tissue	1	1 min	RT
		1	0.5 min	95℃
	Probe/Tissue	1	2 min	RT
		1	0.5 min	85℃
	Probe/Tissue	1	3 min	RT
		1	0.5 min	85℃
		1	4 min	RT
Washing	2 X SSC	4	5 sec	RT
Peroxidase inhibition	Auto Blocker	1	2 min	50℃
Washing	2 X SSC	4	5 sec	RT
Detection	STREP-AP	1	10 min	50℃
Chromogen enhancer	Probe Lock	1	1 wash	RT
Chromogen	Stable fast TR/NP	2	10 min	50℃
Washing	Auto Wash	2	1 wash	RT
Counterstain	Auto Hematoxylin	1	1 min	RT
Washing	Distilled water	2	1 wash	RT
Buffering	Immune/DNA buffer	1	1 wash	RT
Washing	Distilled water	2	1 wash	RT

* RT : Room Temperature.

간 denaturation시키고, 15~30초간 cooling, 105℃ 2분 denaturation, 15~30초 cooling, 105℃ 30초 denaturation 1분 cooling, 95℃ 30초 denaturation 2분 cooling, 85℃ 30초 denaturation 3분 cooling, 85℃ 30초 denaturation 4분 동안 cooling 시켜 target RNA와 probe를 hybridization 시키고, 비특이적으로 결합한 probe를 제거할 목적으로 Post Hybe Wash(2X SSC, Research Genetics)로 5초간 4회 세척한 후, Auto Blocker(Research Genetics)로 2회 세척하여 내인성 peroxidase를 억제하였다.

Detection : Streptoavidin-alkaline phosphatase Detection System(Research Genetics)을 이용하여 50℃ 10분간 반응시킴으로서 Target RNA와 hybridization된 probe의 Biotin 과 결합하도록 하였다.

Chromogen : Chromogen을 반응시키기 전에 alkaline-phosphatase의 역가를 증대시키기 위해 Probe Lock(Chromogen Enhancer, Research Genetics)을 처치하였고 alkaline-phosphatase에 대한 발색제는 적색을 나타내는 Stable Fast TR salt/Naphthol Phosphate(Research Genetics)를 50℃에서 10분씩 2회 반응시킴으로서 양성반응을 강하게 나타내도록 하였고, Auto Wash(Research Genetics)로 2회 수세하여 조직염색 과정중의 모든 시약을 완전히 세척하였다.

Counterstain : 조직의 형태가 잘 구분되도록 Auto Hematoxylin(Research Genetics)으로 대비 염색하여 증류수로 4번 세척하였으며 1X Immuno/DNA buffer로 1회 세척한 후 다시 증류수에 2번 수세하였고 조직이 건조되지

않도록 하여 Universal Mount(Research Genetics)를 2~3방울 떨어뜨려 봉입하고 광학현미경으로 검경하였다.

Controls : 양성대조군으로는 사람과 포유동물의 공동 Gene에 대한 probe인 Alu I/II mix(Research Genetics)를 사용하였으며, 음성 대조군으로서는 PRRS 바이러스에 감염되지 않은 negative control 자돈의 각종 장기를 이용하였다. 또한 probe를 대신 probe 희석용 cocktail만을 사용하여 ISH를 실시함으로써 biotin-labeled probe 이외의 다른 요인에 의해 발색반응이 일어나는지를 확인하였다.

결 과

자돈접종 실험 :

1) 임상증상 : KPRRS-2를 접종한 자돈과 접촉감염을 시킨 자돈에서 임상증상을 관찰한 결과 주된 호흡기 증상으로서 기침 및 콧물이 접종 3일째부터 관찰되었으며, 접종 5일째부터는 간혹 호흡곤란에 의한 과호흡 증상도 관찰되었다. 귀 및 회음부, 사지의 발적 및 청색증은 접촉군을 포함하여 5일째부터 관찰되었으며 일부 자돈에서는 눈 주위의 발적과 부종을 관찰할 수 있었다. 접촉군 6두에서는 접종 1일째부터 미약한 발열반응을 보이

다가 2일째에는 심한 발열(40℃ 이상)을 나타냈으며, 접촉감염시킨 군에서는 2일째부터 미약한 발열을 관찰할 수 있었다(Table 3).

2) 부검소견 : 폐의 육안적 소견은 접종후 3일째 부검한 자돈의 침엽, 심엽, 중간엽 배측에 간질성 폐렴병변으로 의심되는 보라색의 경미한 변색이 관찰되기 시작했으며, 접종 5일에는 그 정도가 심화되면서 황격엽 배측 부위까지 병변이 확대되어 관찰되었고, 접종 21일째까지 계속 관찰되었다(Fig 1). 한편 접촉군에서도 이러한 변색이 5일째부터 관찰되어 21일째까지 지속되었다. 또한 접종후 5일째부터는 접촉군과 접촉군에서 폐의 침엽과 중간엽의 변연부에 마이코플라스마 감염증시 관찰되는 암적색의 변색과 경결감의 병변이 폐에서 관찰되었다.

하악 림프절, 폐 림프절 그리고 중격 림프절의 종대 및 출혈은 접종 1일째부터 관찰되어 21일째까지 계속 지속되어 관찰되었다.

3) 조직소견 : 접종후 1일째부터 21일째까지 침엽, 심엽, 중간엽, 황격엽 모두에서 경미한 간질성 폐렴에서 정도가 심한 간질성 폐렴의 소견이 관찰되었다. 접종후 시간이 지날수록 간질성 폐렴의 정도가 심하였으나 크게 유의성 있는 차이는 나타내지 않았다. 제2형 폐포상피세

Table 3. Clinical signs of piglets experimentally infected with KPRRS-2 and contacted with infected piglets

Day post-inoculation	Inoculate					Contact				
	fever*	respiratory	sign	ear cyanosis	periocular edema	fever	respiratory	sign	ear cyanosis	periocular edema
		+	++				+	++		
1	1/12†	0/12	0/12	0/12	0/12	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
2	6/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	2/10	4/10	1/10	0/10	0/10	3/5	1/5	0/5	0/5	0/5
4	1/8	5/8	1/8	0/8	0/8	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
5	1/8	3/8	2/8	5/8	0/8	0/4	0/4	0/4	2/4	0/4
6	2/6	1/6	1/6	4/6	3/6	1/3	1/3	0/3	2/3	2/3
7	0/6	2/6	0/6	4/6	3/6	0/3	1/3	0/3	3/3	3/3
9	ND**	0/4	4/4	4/4	4/4	ND	2/2	0/2	2/2	2/2
11	ND	0/4	4/4	4/4	4/4	ND	1/2	1/2	2/2	2/2
13	ND	2/4	2/4	4/4	4/4	ND	2/2	0/2	2/2	2/2
15	ND	1/2	1/2	2/2	2/2	ND	1/1	0/1	1/1	1/1
17	ND	1/2	1/2	2/2	2/2	ND	0/1	1/1	1/1	1/1
19	ND	1/2	1/2	2/2	2/2	ND	0/1	1/1	1/1	1/1
21	ND	1/2	1/2	2/2	2/2	ND	0/1	1/1	1/1	1/1

* : fever over 40℃, ** : not done, † : positive piglets/tested piglets, + : either nasal discharge or coughing, ++ : either dyspnea or hyperpnea.

포의 증식 및 비후가 관찰되었으며, 폐포중격에 단핵세포의 침윤과 중격이 비후되어 있었다(Fig 3). 폐포강내에는 폐포 대식세포가 침윤되어 있었으며 가끔 괴사파편이 관찰되었다.

접종후 14일째부터 21일째까지 3마리의 심근에서는 혈관주위와 심근 사이에 단핵구의 침윤도 관찰되었다.

접종후 1일에서부터 21일째까지 일부 자돈의 하악 림프절, 폐림프절 편도 등의 림프조직에서 국소성 출혈 및 림프구의 상실이 관찰되었지만 그외에는 조직소견상 뚜렷한 병변은 관찰되지 않았다.

기타 간조직이나 신장, 비장 등의 실질장기에서는 뚜렷한 병변을 관찰하지 못했다.

RT-PCR : cDNA를 작성하여 probe로서 사용하기 위해 한국 분리주인 KPRRS-2 바이러스에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시한 결과 257bp의 증폭산물을 관찰할 수 있었다(Fig 2). 증폭된 산물의 농도를 측정하기 위해 흡광도를 측정한 결과 파장 260~280nm 사이에서 2.4 OD값을 얻을 수 있었다. GenBank database를 이용하여 증폭된 부분에서의 Lelystad주와 Mn-1b의 염기서열을 비교한 결과 69%의 상동성을 나타내었다.

In situ hybridization : PRRS 바이러스에 이환된 것으로 의심되는 자연발생례 6마리와 한국분리주인 KPRRS-2주를 실험감염시킨 12마리 자돈의 각종 장기와 Mn-1b주를 실험감염시킨 4마리 자돈의 폐조직을 포르말린에 고정한 후, 파라핀 포매한 조직절편을 이용하여 ISH를 실시하였다.

ISH 결과, 바이러스 분포를 나타내는 강한 적색의 발색반응은 침엽, 중간엽, 심엽, 횡격엽 모든 엽의 폐포 대식세포의 세포질에서 뚜렷이 관찰되었으며, 일부 2형 상피세포와 종말 세기관지 점막에서도 양성반응이 관찰되었다(Fig 4). 그러나 기관이나 기관지 점막상피와 같은 상부 호흡기도에서는 양성반응이 관찰되지 않았다.

PRRS 바이러스에 감염된 것으로 의심되었던 6마리의 폐조직중 3개의 폐와 KPRRS-2접종 12마리의 폐조직중 12개 폐조직에서 Mn-1b 접종 4마리의 폐조직중 3개의 폐조직에서 양성반응을 관찰할 수 있었으며, 특히 KPRRS-2주의 접촉감염군에서도 양성반응이 관찰되었고, 시간의 경과에 따른 의한 양성반응의 차이는 유의성이 없이 접종 1일째부터 모든 폐엽의 폐 대식세포에서 양성반응이 관찰되었다.

다른 장기에서의 양성반응은 심근, 간, 신장, 편도, 비

장, 림프절, 위장관, 고환 등에서 관찰되었으며, 양성반응이 빈번히 관찰되었던 장기는 폐를 비롯하여 심근, 신장, 간, 림프절 등이었다(Table 4).

Table 4. Demonstration of PRRS virus in different organs by ISH

Tissue	field cases	KPRRS-2	Mn-1b infected
Lungs	3(6)	12(12)	3(4)
Heart	1(2)	10(12)	2(4)
Liver	3(6)	9(12)	1(4)
Kidney	2(6)	10(12)	2(4)
Tonsil	ND**	7(12)	ND
Spleen	2(4)	8(12)	0(2)
Lymph nodes	1(3)	12(60)	1(4)
GI tracts	ND	14(24)	1(4)
Testis	ND	2(4)	ND

* : Contacted group(3 piglets) included, ** : Not done, () : tested piglets.

심근에서의 양성반응은 주로 혈관주위의 심근의 근형질과 침윤된 단핵세포 및 혈관 내피세포에서 관찰되었으며 또한 간세포의 세포질, 신장의 신세뇨관 상피세포, 림프절, 편도 및 비장의 림프구(Fig 5) 그리고 위점막의 주세포(Fig 7)와 일부 소장 점막상피에서 양성반응이 관찰되었다. 고환에서의 양성반응은 정세관 사이의 간질에 침윤한 단핵세포와 간질세포의 세포질에서 관찰할 수 있었다(Fig 6). 접종후 시간의 경과에 따른 장기별 양성반응의 결과도 유의성이 있는 차이를 보이지 않았다.

이들 양성반응은 조직과 세포의 형태를 그대로 유지 하면서 PRRS 바이러스 핵산의 분포를 효과적으로 나타내고 있었으며, 바이러스를 접종하지 않았던 음성대조군의 각종 장기에서는 양성 발색반응이 관찰되지 않아 정상세포의 유전자와는 반응하지 않았음을 알 수 있었다(Fig 8). 또한 ISH의 모든 과정의 이상유무를 판단하기 위해 포유류의 공통 염기서열에 대한 probe인 Alu I/II로 ISH를 실시한 결과 각 조직의 핵에서 적색의 양성반응을 관찰할 수 있었으며, 양성반응이 있었던 조직에서 probe 대신 cocktail을 이용하여 ISH를 실시한 결과 아무런 발색반응을 확인할 수 없었다.

고 찰

돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)에 대

한 cDNA를 작성하기 위해 RT-PCR을 실시하였으며, Biotin으로 labeling 하여 probe를 제작하였다. 실험재료로서 PRRS에 이환된 것으로 의심되는 자연발생례와 한국 분리주인 KPRRS-2주를 실험감염시킨 자돈의 각종 장기와 Mn-1b주를 실험감염시킨 자돈의 폐조직을 포르말린에 고정한 후, 파라핀 포매한 조직절편을 이용하였다.

ISH의 전 과정은 MicroProbe™ capillary action system하에서 1~2시간내에 실시하여 각종 장기내에 존재하는 PRRS 바이러스의 핵산을 검출함으로써 PRRS를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 기법으로서 확립하였다.

한국 분리주인 KPRRS-2주를 30일령 자돈에 접종하여 임상증상을 관찰한 결과 접종 초기의 고열과 기침, 비루 및 호흡곤란에 의한 과호흡 등의 호흡기증상과 귀와 사지말단의 청색증 그리고 눈 주위 부종을 관찰할 수 있었는데 이는 장 등³¹의 한국 분리주를 실험접종하여 관찰한 임상증상과 일치하였으며 또한 네덜란드³², 미국¹⁰, 등지에서 분리된 바이러스주의 접종실험에서 관찰된 임상증상과도 유사하였다.

접종자돈 폐조직에서는 단핵구의 간질내 침윤과 제 2형 폐포상피세포의 증식을 특징으로하는 전형적인 간질성 폐렴을 관찰할 수 있었는데, 이는 일반적으로 PRRS 바이러스 감염시 관찰되는 특징적인 병리조직학적 소견이었다¹². 또한 본 실험에서는 마이코플라스마성 폐렴병변으로 의심되는 기관지 간질성 폐렴의 소견이 일부 자돈의 침엽과 중간엽에서 관찰되었는데 이는 실험동물로서 보통돼지(conventional piglet)를 이용하고 보통환경에서 실험하였으므로 대개 야외의 자연발생례에서 빈발하는 2차 감염이 일어난 것으로 생각된다.

Rossow *et al*¹⁰은 gnotobiotic 돼지를 이용하여 미국 분리주인 ATCC VR-2332 바이러스를 접종실험한 결과 간질성 폐렴 이외의 병리조직학적 소견으로서 림프구 괴사와 cyst 형성 등을 특징으로 하는 Lymphadenopathy와 혈관염, 심근염 그리고 혈관주위 세포침윤(Perivascular cuffing; PVC)을 특징으로 하는 뇌염을 기술하였지만, 본 실험에서는 3마리의 심근에서 심근염이 관찰된 것을 제외하고는 주목할 만한 다른 병변은 관찰되지 않았다. 이는 장 등³¹의 해석과 같이 한국 분리주가 미국 분리주에 비해 병원성이 낮아서 폐 이외의 장기에서는 병변이 뚜렷이 관찰되지 않은 것으로 사료된다.

자연발생례와 KPRRS-2 및 Mn-1b 접종자돈의 폐조직을 대상으로 ISH를 실시한 결과 폐 대식세포에서 강한

양성반응을 관찰할 수 있었으며, 일부 2형 폐 상피세포 및 종말 세기관지 상피세포에서 양성반응을 관찰할 수 있었다. 이러한 소견은 면역조직화학염색법^{32,34,35}이나 ISH^{25,36,37,38}를 통하여 폐 조직에서 실시한 바이러스 검출 소견과 일치하였으며, 이미 잘 알려진 바와 같이 PRRS 바이러스의 주된 증식세포가 폐 대식세포임을 확인할 수 있었다.

지금까지 알려진 PRRS 바이러스의 분리장기는 폐를 비롯하여 골수, 비장, 림프절, 편도, 흉선, 심근, 간, 신장, 뇌, 근육, 고환 등이며^{4,12,13,39} 콧물, 유사산태아, 혈장, 혈청, 말초 백혈구, 정액, 뇨, 분변 등에서도 바이러스가 분리되는 것으로 알려져 있다^{12,39}. 이는 면역조직화학염색법^{12,34,35}과 ISH^{36,37} 기법에 의한 장기별 바이러스 분포의 검사와 일치하였으며, 본 실험에서는 흉선과 뇌에서 바이러스가 검출이 되지 않은 것을 제외하고는 일치하였다.

PRRS 바이러스 감염시 자돈에서 감염후 바이러스혈증이 최초 12시간에서 길게는 56일까지, 대개는 28일까지 장기간 동안 지속하는 것으로 알려져 있는데⁴⁰, 이러한 원인 때문에 바이러스가 다양한 조직내에 분포하는 것으로 이해되고 있다¹². 또한 본 실험에서 접종후 시간의 변화에 따른 양성반응의 차이가 유의성이 없었던 이유도 PRRS 바이러스 감염시의 이러한 특징 때문인 것으로 이해되며, 앞으로 보다 정확한 PRRS 바이러스의 발병기전을 이해하기 위해서는 장기간의 실험이 필요하리라 생각된다.

지금까지 폐 대식세포 이외의 다른 장기의 세포에서 바이러스가 증식된다는 확실한 증거는 없으나 Yoon *et al*¹⁵이 원숭이 신장세포인 MA 104 세포주를 이용하여 바이러스의 계대배양에 성공함으로써 PRRS 바이러스가 다른 장기에서도 증식할 수 있다는 가능성이 제시되었다¹². 더우기 Rossow *et al*¹⁰은 림프절과 림프계 조직인 편도에서 조직소견상 괴사와 다발성 낭종성 변성(Polycystic degeneration) 그리고 다핵세포(Polykaryocyte)의 형성의 관찰과 함께 바이러스의 역가를 측정함으로써 폐 대식세포 보다는 미약하지만 림프절과 편도에서도 바이러스가 증식된다고 하였으며 심근, 비장 등의 장기에서도 바이러스가 증식되는 것으로 추정하였다. 또한 Halbur *et al*³⁴의 면역조직화학염색에 의한 바이러스 항원의 검출실험 결과도 이러한 사실을 뒷받침하고 있었다. 본 실험에서도 림프절, 편도, 비장과 같은 림프기관의 단핵

세포에서 ISH 양성반응을 관찰함으로써 바이러스의 증식 내지는 분포를 확인할 수 있었다.

또한 Shin *et al*³⁷은 riboprobe를 이용한 ISH를 통하여 성돈의 고환조직 간질부위에서 바이러스의 분포를 확인함으로써 정액을 통하여 바이러스가 배출됨을 증명하였는데, 본 실험에서는 생식능력이 없는 이유자돈의 고환 간질부위에서 양성반응이 관찰되어 PRRS 바이러스는 성성숙과 관련없이 고환조직에 바이러스가 분포함을 알 수 있었다.

본 실험에서 심근의 근형질, 간세포의 세포질, 신장의 세뇨관 상피 그리고 위점막의 주세포와 일부 소장 점막상피에서의 양성반응이 관찰되었지만 면역조직화학 염색법을 실시한 다른 연구자들^{32,34}은 심근에 침윤된 단핵구와 혈관 내피세포에서는 양성반응을 관찰하였으나 근형질에서는 관찰되지 않았다고 하였고 신장, 간, 소장에서는 양성반응을 확인하였다고 기술하고 있었으나 구체적인 조직내 분포를 기술하고 있지 않았으며, 위점막에서 양성반응을 관찰했다는 보고는 없었다. 이러한 조직내 바이러스 분포의 차이는 Larochelle *et al*³⁶이 면역조직염색법과 ISH 기법의 민감도를 비교 실험한 결과와 같이 ISH 기법이 면역조직화학 염색법에 비해 민감도가 높기 때문에 바이러스의 분포가 적은 조직에서도 양성반응이 쉽게 관찰된 것으로 생각된다. 또한 뇨, 분변과 같은 시료에서 바이러스의 분리의 여부는 연구자들에 따라 달랐으며¹⁰, 조직에서 분리된 바이러스의 역가도 차이가 있었다¹². 이는 PRRS 바이러스가 각 strain에 따라 병원성의 차이가 심한 것으로 알려진 바¹²와 같이 각 분리주에 따라 장기별 분포에도 차이가 생길 수 있을 것으로 추정할 수 있으므로 각 분리주에 대한 병원성 및 장기별 바이러스의 분포에 대한 연구가 더 필요하리라 생각된다.

최근에 RT-PCR^{22,23}을 실시하거나 또는 이를 통하여 cDNA를 작성하고 cDNA를 probe로 이용하여 Southern hybridization²²⁻²⁴ 또는 ISH^{25,37}를 실시하여 PRRS를 진단하는데 응용한 보고가 있는데 여러가지 strain에 대한 특이 염기서열을 증폭하여 각 strain을 감별하거나 공통 염기서열부위를 증폭하여 각 strain을 동시에 진단도 가능하였다고 하였다. 본 실험에서도 이미 알려져 있는 PRRS 바이러스 RNA 유전자중에서 ORF 1b에 해당되는 염기서열²⁴를 참고하여 primer를 합성하고 RT-PCR을 실시하여 cDNA를 작성하므로써 ISH를 실시한 결과 한국

분리주인 KPRRS-2주 또는 미국분리주인 Mn-1b주 접종 자돈의 각종 조직과 자연감염례로 의심되었던 자돈의 각종 조직에서 양성반응을 관찰할 수 있었다.

본 실험에서 PRRS 바이러스의 검출에 응용하였던 ISH 기법은 조직의 형태를 유지하면서 조직내 특정 DNA나 RNA 염기서열의 분포를 확인할 수 있는 기법으로서 조직병리학적 검사와 병행하여 실시할 수 있다는 장점이 있으며, blot analysis에서 필수적인 DNA나 RNA의 추출과정이나 전기영동 등의 과정을 생략할 수 있으므로 비교적 간편하고 신속하게 유전자를 검출할 수 있는 방법이다. 또한 포르말린에 고정되어 파라핀에 포매된 시료를 사용할 수 있기 때문에 오랫동안 보관된 시료에서도 실험이 가능하므로 질병을 역추적하여 연구할 수 있는 장점이 있다⁴¹.

ISH 기법은 Gall *et al*⁴²에 의하여 1969년도 처음으로 소개될 당시에는 검사방법이 복잡하고 시간이 많이 소요되었으나 최근 Unger *et al*⁴³과 Park *et al*²⁷에 의하여 capillary action system에 의한 자동화 과정이 도입되면서 1~2시간내에 ISH가 가능해졌다.

ISH를 실시하는데 있어서 가장 중요한 것은 target nucleic acid를 특이적으로 검출할 수 있는 probe의 작성에 있다. 염기서열의 길이와 성상에 따라 20~50 base pairs인 oligonucleotide probe^{38,44}, RNA probe³⁷ 그리고 유전자 재조합 cDNA probe²⁵로 나눈다. 길이가 너무 짧은 oligonucleotide probe는 조직을 잘 투과하는 높은 민감도를 갖지만 비특이적인 결합을 일으킬 수 있는 반면 너무 긴 것은 특이성이 높으나 민감도가 떨어지므로 가장 적절한 길이는 50~150 base pairs로 알려져 있다. 또한 RNA를 probe로 사용하는 riboprobe의 경우에는 일반적인 환경에서 RNA 분해효소에 쉽게 파괴되므로 각별한 주의가 필요하여 진단목적으로는 이용이 어렵다는 한계가 있다^{41, 45}.

Probe 표지하는 물질은 ³²P, ³H, ¹⁴C 등의 방사성 물질과 비방사성인 Biotin, digoxigenine, photobiotin, bromodeoxyuridine, FITC 등이 이용되고 있으나 진단목적으로 ISH법을 실시할 경우 다량의 시료를 처리해야 하는 까닭에 방사성 물질은 그 안전성이 문제가 되어 현재는 비방사성 물질을 주로 이용하고 있다⁴⁵.

ISH 기법은 세포내 정상 또는 비정상적인 핵산을 검출하는데 응용되고 있어 바이러스나 세균 등의 감염성 질환, 유전성 질환과 종양에서의 유전자 이탈검사 및 특

정 단백질로 translation 하는 mRNA의 검출에 이용되고 있다⁴¹. 특히 바이러스성 질환에서는 원인 바이러스의 분리 및 동정을 거치지 않고도 바이러스를 검출할 수 있으므로 ISH 기법이 가장 빈번하게 응용되고 있다⁴⁶.

본 연구에서는 RT-PCR을 실시하여 PRRS 바이러스에 상보적인 cDNA를 증폭시킨 후, 비방사선 물질인 biotin을 표지하여 probe를 제작하였으며, KPRRS-2주 또는 Mn-1b주를 실험접종하여 얻은 각종 장기와 자연발생례로 의심되었던 자돈의 장기의 포르말린 고정·파라핀 포매된 조직을 대상으로 ISH를 실시하여 1~2시간내에 폐를 비롯한 각종 장기에서 바이러스를 검출하였다. PRRS의 진단을 위한 여러가지 기법에 비해 ISH 기법은 비교적 간편하고 특이성이 있는 검사방법임을 알 수 있었으며, 아직 미진한 부분이 있지만 PRRS의 각 장기별 분포를 파악함으로써 PRRS의 발병기전을 이해할 수 있다.

결론

본 실험에서는 *In situ* hybridization(ISH) 기법을 이용하여 돼지 생식기 및 호흡기 증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS)을 신속하고 특이성 있게 진단할 수 있는 기법을 확립하였다.

30일령 자돈에 KPRRS-2를 접종하여 임상증상과 부검 및 조직학적 소견을 관찰하였고, 바이러스주에 상보적인 cDNA를 RT-PCR을 통하여 증폭시켜 만든 biotinylated probe를 제작하였으며, KPRRS-2주 또는 Mn-1b주를 실험접종하여 얻은 각종 장기와 자연발생례로 의심되었던 자돈의 장기의 포르말린 고정·파라핀 포매된 조직

을 대상으로 MicroProbe™ capillary action system하에서 ISH를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 한국 분리주인 KPRRS-2주를 자돈에 실험접종하여 발열과 호흡기 증상 및 청색증의 임상증상을 관찰할 수 있었으며, 접촉군에서도 이에 상응하는 결과를 얻을 수 있었다.

2. KPRRS-2주에 감염 및 접촉군의 자돈 폐조직에서 PRRS 바이러스 감염증에서 전형적으로 관찰되는 제2형 폐포 상피의 비대 및 증식과 단핵구 침윤을 특징으로 하는 간질성 폐렴소견을 관찰하였으며, 일부 심근에서는 단핵구성 심근염이 관찰되었다.

3. KPRRS-2주 또는 Mn-1b주를 접종한 자돈과 자연발생례로 의심되었던 자돈의 각종 장기를 대상으로 ISH를 실시한 결과 바이러스 분포를 나타내는 적색의 강한 발색반응은 주로 폐 대식세포에서 관찰하였으며 또한 일부 제2형 폐 상피세포, 종말 세기관지 상피, 심근, 간, 신장, 편도, 비장, 림프절, 위장관 점막 그리고 고환조직에서도 양성을 확인할 수 있었다.

4. KPRRS-2주를 접종 또는 접촉군의 자돈의 각종 장기를 대상으로 ISH를 실시한 결과 접종후 시간에 의한 각 장기별 분포의 차이는 크게 유의성을 나타내지 않았는데, 이는 장기간 동안 바이러스혈증이 지속되는 PRRS 바이러스 감염의 특징 때문인 것으로 해석할 수 있었다.

이상의 결과에서 PRRS를 진단하는데 있어서 ISH 기법은 바이러스를 1~2시간 이내에 간편하고 신속하게 검출할 수 있었으며, 바이러스의 분리·동정, 혈청학적 검사법 등의 다른 검사법의 단점을 보완할 수 있어 앞으로 PRRS를 진단하는데 있어 크게 도움이 되고 그 응용이 확대 될 것으로 전망된다.

Legends for figures

Fig 1. Necropsy findings of piglet infected with KPRRS-2 virus (14 days postinoculation: DPI) showed multifocal coalescing discolorization of dorsal diaphragmatic lobes, and enlargement and hemorrhage of thoracic lymph nodes. The suspected lesion of mycoplasmal pneumonitis was observed in margin of apical and medial lobes.

Fig 2. Ethidium bromide-stained 2% agarose gel showing KPRRS-2 viral cDNA amplified by RT-PCR. Lane 1: marker ladder (λ DNA/Hind III fragment), Lane 2 and 3: 257bp RT-PCR amplified product in duplicate.

Fig 3. *In situ* hybridization on lung tissue section from KPRRSV-2 experimentally infected piglet(5 DPI). Interstitial pneumonia was

characterized by mononuclear cell infiltration and type 2 pneumocytes hyperplasia. Hematoxylin counterstain, X 100.

- Fig 4. High power view of demonstration of KPRRS-2 viral genomic evidence by ISH. Red positive signals in the cytoplasm of alveolar macrophages from experimentally infected piglet's lung(3 DPI). Hematoxylin counterstain, X 1,000.
- Fig 5. Detection of PRRSV on the cytoplasm of mononuclear cells in splenic redpulp from naturally infected piglet with PRRSV. Hematoxylin counterstain, X 400.
- Fig 6. Red positive signals were observed on the interstitial cells and infiltrated mononuclear cells of testis from experimentally infected piglet (3 DPI). Hematoxylin counterstain, X 400.
- Fig 7. Detection of PRRSV on the chief cells of gastric mucosa from experimentally infected piglet(7 DPI). Hematoxylin counterstain, X200.
- Fig 8. Negative control for ISH, no positive red signal was observed on gastric mucosa from PRRSV non infected normal piglet Hematoxylin counterstain, X200.

참 고 문 헌

1. Dial G, Parsons T. SMEDI-like syndrome(EMC?). *American Assoc Swine Pract Mtg*, Des Moines. Oral presentation. 3/5-7, 1989.
2. Zimmerman J. A survey of the American Association of Swine Practitioner for the presence of mystery swine disease herds. MSD Com Mtg, Bloomington:Livestock Conservation Institute. Oral presentation. 4/9-11, 1991.
3. Lindhaus W, Linhaus B. Ratselhfte sweinekrankheit. *Der Praktische Tierarzt*, 5:423-425, 1991.
4. Meredith MJ. Review of porcine reproductive and respiratory syndrome. Pig Dis and Info Center. Cambridge. July, 1992.
5. Shin JH, Kang YB, Kim YJ, *et al.* Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. *VECARO*, 4: 99-106, 1993.
6. Kang YB, Shin JH, Kim YJ, *et al.* Sero-epidemiological surveillance of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in the Republic of Korea in 1994-1995, in *proceedings*. 14th Int Pig Vet Soc. *The Bologna*, P80, 1996.
7. Yoon KJ, Zimmermann JJ, McGinley MJ, *et al.* Failure to consider the antigenic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolates may be lead to misdiagnosis. *J Vet Diagn Invest*, 7:386-387, 1995.
8. Bautista EM, Goyal SM, Collins JE, *et al.* Sero-logical survey for Lelystad and VR2332 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in United States swine herds. *J Vet Diagn Invest*, 5:612-615, 1993.
9. Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, *et al.* Phylogenetic analyses of the putative M(ORF 6) and N(ORF 7) genes of porcine-reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. *Arch Virol*, 140:745-755, 1995;.
10. Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, *et al.* Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic. Pigs. *Vet Pathol*, 32:361-373, 1995.
11. Blaha T. Epidemiologic investigations into PEARS in Germany:consequences in fattening pigs. in *proceedings*. 12th Int Pig Vet Soc. *The Hague*, P126, 8/17-20, 1992.
12. Christianson WT, Joo HS. Porcine reproductive and respiratory syndrome: A review. *Swine Health and*

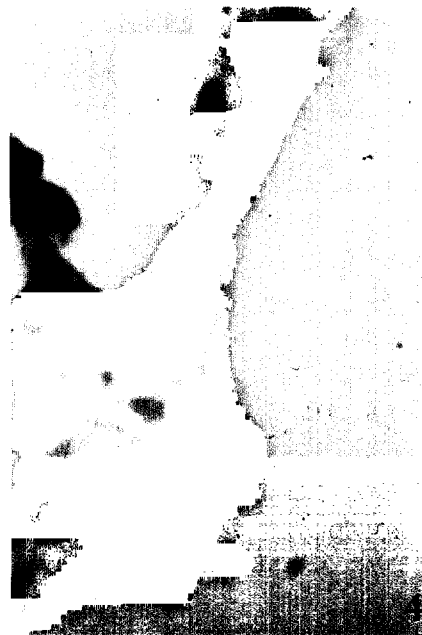


M 1 2

564
257



2





- Production*, 3-4:10-28, 1994.
13. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, *et al.* Mystery swine disease in the Netherland: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q*, 13:121-130, 1991.
 14. Benfield DW, Nelson E, Collins JE, *et al.* Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest*, 4: 127-133, 1992.
 15. Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, *et al.* Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous sub-population of MA-104 cell line. *Arch Virol*, 133:477-483, 1993.
 16. Bautista EM, Goyal SM, Yoon IJ, *et al.* Comparison of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J Vet Diagn Invest*, 5:163-165, 1993.
 17. Kobayashi H, Morozumi T, Miyamoto C, *et al.* Mycoplasma hyorinis infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *J Vet Med Sci*, 58:109-113, 1996.
 18. Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, *et al.* An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest*, 4:144-147, 1992.
 19. Frey M, Eemisse K, Landgraf J, *et al.* Diagnostic testing for SIRS virus at the National Veterinary Service laboratories(NVSL). *American Assoc Swine Pract News*, 4:31, 1992.
 20. Albina E, Leforban Y, Baron T, *et al.* An enzyme-linked immunosorbant assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann Rech Vet*, 23:167-176, 1992.
 21. Wensvoort G, De Kluyver EP, Luijtz EA, *et al.* Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J Vet Diagn Invest*, 4:134-138, 1992.
 22. Suarez P, Zardoya R, Prieto C, *et al.* Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch Virol*, 135:89-99, 1994.
 23. Mardassi H, Wilson L, Mounir S, *et al.* Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *J Clin Microbiol*, 32: 2197-2203, 1994.
 24. Kim YJ, Kang YB, Kweon CH, *et al.* Characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated in the Republic of Korea. *in proceedings*. 14th Int Pig Vet Soc. The Bologna, P 53, 7/7-10, 1996.
 25. Larochelle R, Mardassi H, Dea S, *et al.* Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J Vet Diagn Invest*, 8:3-10, 1996.
 26. 박순희, 권두환. 핵산 탐침을 이용한 감염성 질병의 진단. 제2회 산학연심포지움 논문집(한국 생화학회), 1-34, 1991.
 27. Park CS, Manahan LJ, Brigati DJ. Automated Molecular Pathology: one hour *In Situ* DNA Hybridization. *J of Histotech*, 14:4:219-229, 1991.
 28. Crabb ID, Hbhes SS, Hicks DG, *et al.* Nonradioactive *In situ* Hybridization Using Digoxigenin-labeled oligonucleotides. *American J Pathol*, 579-589, 1992.
 29. Kweon CH, Kwon BJ, Lee HJ, *et al.* Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Korea. *Kor J Vet Res*, 34:77-83, 1994.
 30. Yoon IJ, Joo HS, Goyal SM, *et al.* A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest*, 6:289-292, 1994.
 31. 장경수, 조성환, 권창희 등. 국내 분리 porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus에 인공감염된 자돈에 관한 연구. *동물의과학연구지*, 3: 9-20, 1995.
 32. Pol JMA, van Dijk JE, Wensvoort G, *et al.* Pathological, ultrastructural, and immuno histochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease(synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome

- (PEARS)). *Vet Q*, 13:137-143, 1991.
33. Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, *et al.* Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol*, 32: 361-373, 1995.
 34. Halbur PG, Miller LD, Paul PS, *et al.* Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Vet Pathol*, 32: 200-204, 1995.
 35. Magar R, Larochelle R, Robinson Y, *et al.* Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Can J Vet Res*, 57:300-304, 1993.
 36. larochelle R, Margat R. Detection of PRRS virus in paraffin-embedded tissue: comparison of immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *in proceedings*. 14th Int Pig Vet Soc. *The Bologna*, 78, 1996.
 37. Shin J, Torrison J, Kang YB, *et al.* *In situ* localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar tissues. *in proceedings*. 14th Int Pig Vet Soc. *The Bologna*, 57, 1996.
 38. Park NY, Kim SJ, Chi YT, *et al.* Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome by *in situ* hybridization with non-radioactive probes. *in proceedings*. 14th Int Pig Vet Soc. *The Bologna*, 81, 1996.
 39. Ohlinger V, Haas B, Sallmuller A, *et al.* *In vivo* and *in vitro* studies on the immunobiology of PRRS. *American Assoc Swine Pract News*, 4:27-28, 1992.
 40. Edward S, Roberrson IB, Wilesmith J, *et al.* PRRS (blue-eared disease) in Great Britain. *American Assoc Swine Pract News*. 4:32-36, 1992.
 41. Herrington CS, McGee JO. Diagnostic Molecular Pathology A Practical Approach Vol I, Principles and basic methodology of DNA/RNA detection by *in situ* hybridization. Oxford University Press, 69-102, 1992.
 42. Gall JF, Pardue ML. Formation and detection of prepartitions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 63:387-383, 1969.
 43. Unger ER, Brigati DJ, Chenggis ML, *et al.* Automation of *In situ* hybridization : Application of capillary action robotic workstation. *J Histotechnol*, 11: 253-258, 1988.
 44. Crabb ID, Hbhes SS, Hicks DG, *et al.* Nonradioactive *In Situ* Hybridization Using Digoxigenin-labeled oligonucleotides. *American J Pathol*, 579-589, 1992.
 45. 박창수. *In Situ* hybridization을 이용한 mRNA의 검출. 제11차 대한 내분비학회 추계학술대회 심포지움(별책), 23-25, 1992.
 46. 박창수. The future of Biotechnology in diagnostic pathology. 제1 차 분자 생물학 워크샵 초록집(전남대학교 의과 대학) 55-67, 1991.