

## 제주지역에서 돼지 전염성 위장염 바이러스의 분리

현진우, 이두식, 손 원근\*

제주대학교 생명자원과학대학 수의학과

### Isolation and Diagnosis Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) in Jeju

Jinwoo Hyun, Du-Sik Lee, Won-Geun Son\*

Dept. of Veterinary Medicine, Cheju National University

**ABSTRACT** : Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) was highly contagious enteric virus of swine. TGEV belongs to *Coronaviridae* with positive sense viral genomic RNA. Mortality is high in 2 days to 14 days old and may reach almost 100% in young pigs. TGEV is characterized by a sudden onset of vomiting, diarrhea and dehydration. Weakness and emaciation are progressive to death.

In this study, TGEV were isolated by Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and indirect immunofluorescent antibody (IFA) methods from small intestinal tissues and feces of 4 weaned piglets that had clinical signs on transmissible gastroenteritis (TGE).

1. Cytopathic effect (CPE) in swine testis(ST) cell line, which inoculates the clinical sample, was implying the present of viral particles.
2. The viral isolates were identified as TGEVs by the IFA test and RT-PCR.
3. A 572 bp DNA fragment specific to the S gene of the TGEV was amplified by RT-PCR.

## 서론

돼지 전염성 위장염 (Transmissible gastroenteritis, TGE)은 TGEV에 의해서 일어나며 TGEV는 *Coronaviridae*의 *Coronavirus*종으로 분류된다. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)는 다형태성의 envelope를 가지고 있으며 핵산은 negative sense single-strained RNA로 구성되어 있다 (Mendez 등, 1996; Garwes 등, 1978; Godet 등, 1992). 이 질병이 1946년 미국의 Dolye와 Hutchings에 의해 처음 보고 된 이래 유럽, 중남미, 북미, 일본, 대만, 한국, 필리핀과 중국 등 현재 전 세계적으로 발생하고 있다 (Doyle 등, 1946). TGEV는 전파가 빠르고 잠복기가 18-22시간이며 소장 상피세포의 crypt에 정착, 증식하여 융모상피세포가 변성 또는 괴사되며 융모의 위축과 탈락을 일으킨다. 그러므로 소장에서의 소화와 흡수능력이 현저히 저하되고 lactose분해 능력도 상실되어 장관내의 lactose 농도 증가로 인해 삼투압경사에 따라 체액중의 수분이 장관내로 역류하여 설사를 일으킨다. 돼지 전염성 위장염 (TGE)의 특징적인 증상인 구토와 수양성 설사에 의하여 탈수를 일으켜 생후 2주전의 포유자돈이 TGEV감염 1-2일 후 거의 100% 폐사되므로 양돈산업에 막대한 경제적 손실을 주고 있다 (Cox 등, 1990; Laude 등, 1993; Saif 등, 1979; Callebaut 등, 1989).

TGEV는 돼지에 높은 전염성을 가진 Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) (De Arriba 등, 2000; Kim 등, 2003)와 TGEV의 호흡기 변종인 porcine respiratory coronavirus (PRCV) (Chae 등, 2000; Cornaglia 등, 1994; Cox 등, 1990; Cox 등, 1992; Saif 등 1994)와 감별이 필요하다 (Cox 등, 1997; Theresa 등, 1995). 이를 위하여 현재 Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), *In situ* hybridization (ISH)과 특이 cDNA 탐침을 이용한 hybridization 등으로 감별이 가능하다 (류영수 등, 1997; 박지용 등, 1995; Jung 등, 2003; Paton 등, 1997). TGEV는 ST cell에 CPE 형성이 잘 이루어지는 (돼지고환 세포) ST cell에서 분리한다 (Kim 등, 2000). 바이러스 중화시험에 의하면 TGEV는 한 종류의 혈청형만 존재하는 것으로 알려져 있지만 PRCV와 같은 다른 corona virus와 교차반응을 할 수 있고 이는 TGEV의 특이적인 단 클론항체를 이용한 직접면역형광항체법이나 간접형광 항체법 (IFA)을 이용하여 TGEV 진단 및 항원적 변이를 확인하는데 이용되어 지고 있다 (Hohdatsu 등, 1987; Kwon 등, 1993; Register 등, 1994; Sanchez 등, 1992; Simkins 등, 1992; Vaughn 등, 1993; Wesley 등, 1990; Woods, 1978). 그 외의 진단 방법으로는 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 등이 있다 (Callebaut 등, 1989; de Arriba 등, 2002; Enjuanes 등, 2003; Kim 등, 2003; Ines 등, 1996; Saif Linda, 1996; Sirinarumitr 등, 1996).

본 실험에서는 제주도의 돼지에서 TGEV 감염을 진단하기 위해 수행하였고 TGEV감염이 의심되는 돼지의 소장과 분변으로부터 swine testis (ST) cell을 이용한 바이러스 분리와 직접면역형광항체법과 RT-PCR법 등을 이용한 진단을 하였다.

## 재료 및 방법

**Sample:** 본 실험에 사용한 시료는 2002년 12월에서 2003년 4월까지 본 실험실에 의뢰된 수양성 설사를 보여 TGEV 감염이 의심되는 1주령 이하 자돈의 소장부

조직절편과 분변을 이용하였다. 바이러스 표준주는 국립수의과학 검역원에서 분양 받은 The Purdue strain (PUR46-MAD)을 이용하였다.

**세포배양:** 국립수의과학 검역원에서 분양 받은 ST cell를 이용하여 바이러스 분리 및 증식, 직접면역형광 항체법과 Reverse transcription 및 Polymerase chain reaction (RT-PCR)기법의 실험에 사용하였다. ST cell은 5% 우태아 혈청 (FBS, Jeil biotechservices Inc), lactalbumin stock sol. (10 x)과 MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Invitrogen corporation)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)을 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃ 배양기에서 배양하였다.

**바이러스 분리 및 배양:** 바이러스를 분리하기 위하여 활발하게 증식하고 있는 단층 배양된 ST cell을 준비하고 DEAE-DEXTRAN 가 첨가된 DMEM (50/μg) 충분히 도포하고 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃ 배양기에 20분간 처리하였다. 준비된 바이러스 시료를 세포에 접종하여, 접종액이 흡착될 수 있도록 가끔 흔들어 주면서 37℃에 60-90 분간 흡착시켰다. 그 후 접종액을 버리고 5% FBS 함유 배지를 넣어 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃ 배양기에 배양하여 단층으로 배양된 ST cell의 75-95%가 CPE를 보일 때 -70℃ 냉장고에 동결하였다. 동결시킨 ST cell을 동결, 해동을 3회 반복하여 원심 분리 (3000 rpm, 10분) 후 상층 액을 수거한 후 -70℃에 보관하여 직접면역형광항체법과 RT-PCR에 사용하였다.

**직접면역형광항체법:** TGEV로 의심되는 바이러스를 24 well의 plate (Costar, USA)에 단층 배양된 ST cell에 접종하여 12시간 배양 후 100% methanol 200 μl를 각 well에다 넣어서 고정하였다. 그 후 증류수와 PBS의 세척과정을 거친 후 세포를 건조시켜 수의과학 검역원에서 분양 받은 TGEV 특이 단 클론 항체를 충분히 도포 한 후 30분간 반응시킨 다음 PBS로 5회 세정하고 FITC (Flourescene Isothyocyanate) conjugate Antimouse IgG (Sigma, USA) 를 FA

PBS에 1:64로 희석하여 충분히 도포 한 후 5% CO<sub>2</sub> 가 공급되는 37°C 배양기에서 30분간 반응시킨 다음 형광현미경(IX70 Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

**RNA 추출:** TGEV로 의심되는 1주령이하 자돈 4두의 소장부의 유체 액을 ST cell에 접종여 CPE 확인후 3회에 걸쳐 동결과 용해를 반복한 후 상층액을 RT-PCR에 사용하였다.

RNA 추출방법은 Chomczynski & Sacchi 등이 보고한 single-step RNA isolation method (TRIzol Reagent, Gibco)를 이용하였다. 간단히 설명을 하면 바이러스 상층액 250  $\mu$ l와 TRIzol Reagent 750  $\mu$ l를 1.5 ml tube에 분주하고 혼합하여 실온에서 5분 정치하고 Chloroform 200  $\mu$ l 첨가하여 실온에 5분 정치한 후 원심분리 (12,000 rpm, 15분, 4°C)하여 상층액 500  $\mu$ l에 Isopropanol 500  $\mu$ l 첨가하여 실온에 10분 정치하였다. 10분 정치 후 원심분리(12,000 rpm, 10분, 4°C)한 후 75% cold alcohol 500  $\mu$ l 첨가하여 원심분리 (7,500 rpm, 5분, 4°C)하여 5분간 건조시킨 다음 DEPC 30  $\mu$ l로 재현탁 하여 추출한 RNA를 cDNA합성에 이용하였다.

**Primers:** TGEV에 대한 Oligonucleotide primer는 TGEV의 S gene에서 설계한 것으로 TGEV와 PRCV와 감별하여 검출할 수 있는 Fowerd primer (TcF2)는 5'-AGA ACTA TAG GTA ACC ATT GG-3' Reverse primer (TcR2)는 5'-TTC TAA TGT AGTC GCA CGC AT-3'로 572 bp 크기의 예상된 분절이 증폭되도록 합성하였다 (류영수 등, 1997).

**Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR):** 추출한 RNA 용액을 새 튜브에 10 $\mu$ l씩 옮긴다. 1  $\mu$ l의 reverse Primer (TcF2)를 더한 후 5분 동안 끓인 다음 신속히 얼음에 옮겨 5분간 냉각하였다. 냉각된 RNA에 20  $\mu$ l DEPC-treated D.W, 10  $\mu$ l 5 $\times$  first strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, Gibco, USA)와 5  $\mu$ l 0.1M dithiothreitol (DTT), 2  $\mu$ l 10mM dNTP (Promega), 1  $\mu$ l RNase inhibitor (RNasin 40 U/ $\mu$ l, Promega), 1  $\mu$ l M-MLV Reverse transcriptase (200 U/ $\mu$ l, Gibco, USA)

를 첨가하여 37°C에서 90분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 합성된 cDNA를 -20°C에 보관하면서 PCR에 사용하였다.

역 전사 반응 (Reverse transcription: RT)에서 합성된 cDNA 5  $\mu$ l, Fowerd primer (TcF2) 1  $\mu$ l, reverse primer (TcR2) 1  $\mu$ l, 20  $\mu$ l DEPC-treated D.W와 PCR premix (40 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP, 2.5 U Taq polymerase (Bioneer, Korea))를 혼합한후 initial reaction (95°C 30초, 50°C 45초, 72°C 60초 1 cycle), cycle reaction (95°C 45초, 50°C 45초, 72°C 60초를 한 cycle로 하여 30 cycle), last reaction (50°C 45초, 72°C 30초)로 PCR을 실행 하여 TGEV의 S gene의 특이적인 PCR product를 확인하였다.

PCR 증폭 산물 10  $\mu$ l를 취하여 2% agarose gel에서 TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 사용하여 100 V에서 30분간 전기영동을 실시하고 Ethidium Bromide (EtBr)로 염색하였다. 증폭산물을 확인하기 위해 100bp DNA Ladder (Gibco)를 molecular size marker로 사용하였고 전기영동 후 UV transilluminator로 TGEV virus S gene에 대한 특이적인 band를 확인하였다.

**바이러스 역가 측정:** 바이러스 역가 측정에는 Karber method를 이용하였다. 간단히 설명하면 cell culture 용 96 well plate를 사용하여 희석배지로 stock virus를 10배수 희석, 동량의 바이러스 희석액을 각 바이러스 희석배수마다 8개의 well에 각각 50  $\mu$ l씩 접종하고, 세포 부유 액을 50  $\mu$ l씩 가하여 48-72시간 배양한 다음, CPE를 관찰하여 Karber method로 TCID<sub>50</sub>를 계산하였다.

## 결 과

**TGEV 분리:** 돼지전염성 위장염 (TGE)이 의심되는 포유 자돈의 소장과 분변 시료를 돼지 고환세포에 접종한 결과 그림.1의 B)처럼 TGEV의 특이적인 세포변성효과 (CPE)를 확인하였다. 분리된 TGEV를 각각 JW1, JW2, JW3와 JW4라 명명하였다.

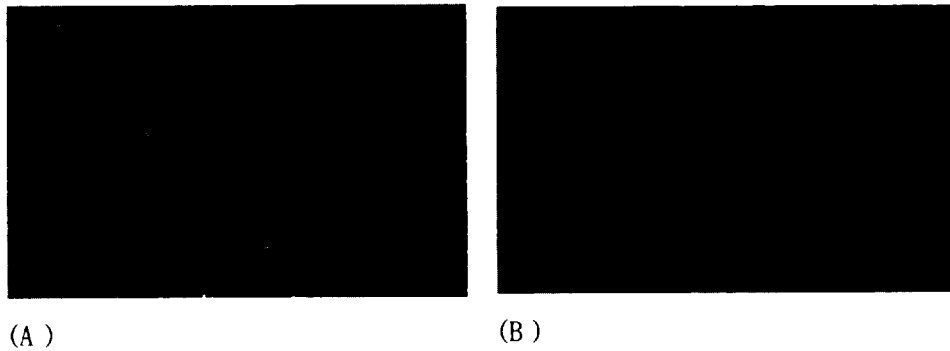


Fig 1. (A) Uninfected ST cell ×100 and (B) Cytopathic effect (CPE) of TGEV in ST cell (B) JW1-infected ST cell. ×100

직접면역형광항체법에 의한 바이러스 진단: 분리된 바이러스 JW1, JW2, JW3와 JW4를 단층 배양된 ST cell에 접종하여, 12시간 배양 후 TGEV 특이 단 클론

항체와 반응시켜 직접면역형광항체법을 한 결과 그림.2의 (B)처럼 현저한 TGEV양성 형광을 확인하였다.

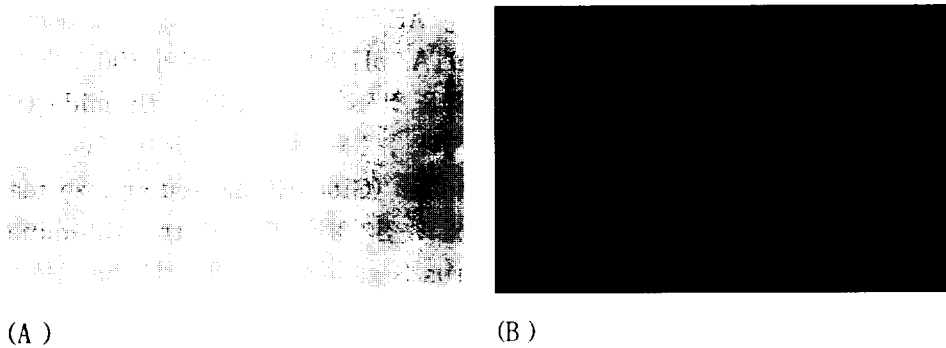


Fig 2. (A) Uninfected ST cell ×200 and (B) Direct Immuneflouroscent Antibody test JW1. ×200

PCR을 이용한 바이러스 진단: 확인된 TGEV의 S gene에 대한 특이적인 Primer로 RT-PCR을 한 결과

그림.3처럼 전 시료에서 572 bp 크기의 예상된 PCR product를 확인하였다.

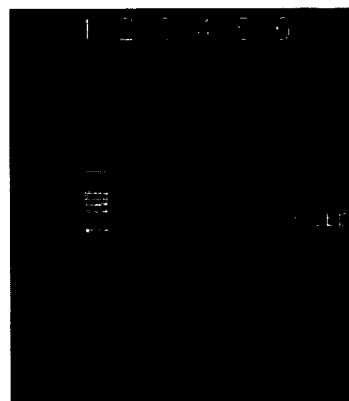


Fig 3. RT-PCR amplification of S gene of TGEV from filed outbreak samples, positive reference strain. Lane1: 100 bp DNA ladder (Gibco, USA). Lane2: Positive control, Lane3: JW1, Lane4: JW2, Lane5: JW3, Lane6 : JW4

**분리 바이러스의 감염역가 측정:** 분리 바이러스 JW1, JW2, JW3와 JW4에 대한 바이러스의 감염역가를 측정한 결과 JW1은  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/0.5ml을, JW2는  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/0.5ml을, JW3는  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/0.5ml과 JW4는  $13^3$  TCID<sub>50</sub>/0.5ml의 감염역가를 확인하였다.

## 고 찰

돼지 전염성 위장염 바이러스 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)는 돼지고환 세포 (ST cell)에 CPE 형성이 잘 이루어졌으므로 TGEV분리에는 ST cell이 적합하였다. 바이러스분리 재료를 접종하기 전에 DAEA-DEXTRAN으로 ST cell을 처리하였는데 처리하지 않은 ST cell에 비하여 TGEV 아외주를 분리하는데 매우 효과적이었다. 이는 DAEA-DEXTRAN이 ST cell에 charge 등의 변화를 유도하여 TGEV 아외주들의 흡착을 용이하게 하는 것으로 보인다.

최근의 TGEV에 대한 연구동향은 TGEV와 PEDV, PRCV 등을 감별하기 위한 RT-PCR와 ISH에 대한 연구와, TGEV의 단백질 유전자에 대한 염기서열의 분석이나, PCR 과 RFLP 분석을 이용한 TGEV의 아외 분리주에 대한 항원적 구조적 변이와 PRCV와 PEDV의 구조단백질의 차이점 대한 연구가 이루어졌으며 최근에는 TGEV의 백신에 대한 예방효과에 대한 연구들이 이루어지고 있다. 돼지에 감염되는 주요 coronavirus인 TGEV, PRCV와 PEDV는 모두 group 1 에 속하는 바이러스로 서로 유사한 유전적 구조를 가지고 있으나 PEDV는 TGEV와 PEDV와는 달리 open reading frame (ORF) 3이 분화되어있지 않고 또한 ORF 7이 결손 되어있다. 그리고 TGEV와 PRCV는 ORF 3, ORF 3-1와 ORF 4에서 차이를 나타낸다. 바이러스 중화시험에 의하면 TGEV는 한 종류의 혈청형만 존재하는 것으로 알려져 있지만 아외에서 항원적 변이가 있음을 보여주는 연구가 많이 되어지고 있고 (Hohdatsu 등, 1987; Laude 등, 1986; Simkins 등, 1992; Vaughn 등, 1993), 현재 표준주

로 사용하고 있는 Miller와 P111 strain와의 염기서열 분석비교에 의하면 S glycoprotein gene과 ORF 3-1사이에서 두 곳의 deletion이 있어 P111 strain에 존재하는 45 nucleotides가 결여되어 있고 TGEV strain의 항원적 변이에 관계하는 epitope는 주요 neutralization domain외에 존재하였고 이들은 중화능력이 없는 항체를 유도한다고 한다. 우리나라에서 분리되는 TGEV 분리 주에서도 다양한 유전적 변이가 일어나고 있으므로 변이에 따라 백신에 대한 예방효과의 차이가 심하다는 연구가 보고되기도 하였다. 본 연구의 목적은 TGE증상을 보이는 자돈으로부터 virus를 분리 및 진단을 함으로서 가축질병 관리의 기초 자료와 적절한 진단으로 본 질병의 적절한 방역 대책을 세우는데 있다.

## 요 약

제주도에서 돼지전염성위장염 (TGE)증상을 보이는 자돈 4 두의 소장과 분변으로부터 TGEV를 분리하고, RT-PCR 그리고 직접 면역형광 항체법을 이용하여 진단한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 돼지전염성 위장염 (TGE) 증상을 보이는 포유 자돈 4 두의 소장과 분변 시료를 돼지 고환세포에 접종한 결과 TGEV의 특이적인 세포변성효과(CPE)를 확인하였다.
2. 돼지고환세포에 CPE를 일으킨 바이러스를 계대 배양하여 TGEV 특이 단 클론항체를 이용한 직접 면역 형광항체법으로 진단한 결과 TGEV를 확인하였다.
3. 확인된 TGEV의 S gene에 대한 특이적인 Primer 로 RT-PCR을 한 결과 전 시료에서 572 bp 크기의 예상된 PCR product를 확인하였다.

위 결과로 보아 제주도내에 전염성 위장염 바이러스에 대한 연구를 보다 심도 있게 수행하여 효율적인 방제 및 피해대책을 수립해야 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Callebaut, P. and Pensaert, M.B. 1989. A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with the TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Veterinary Microbiology* 20:9-19.
- Chae, C. and Kim, O. 2000 Seroprevalence of porcine respiratory coronavirus in selected Korean pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 46:293-296.
- Cornaglia, E. and Chretien, N.S. et al. 1994. Detection of porcine respiratory coronavirus and transmissible gastro- enteritis virus by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Microbiology* 42:349-359.
- Cox, E. and Pensaert, M.B. 1990. Intestinal replication of a porcine respiratory coronavirus closely related antigenically to the enteric transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol* 23:237-243.
- Cox, E., Pensaert, M.B., Callebaut, P. 1992. Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs immune after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine* 10:292.
- Cox, E. and Pensaert, M.B. 1997. Goddeeris TGEV-specific IgA at different mucosae following infection of pigs with transmissible gastroenteritis virus or the antigenically related porcine respiratory coronavirus. *Immunology Letters* 56:178.
- de Arriba, M.L. and Carvajal, A. 2002. Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoeavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 85:85-97.
- Doyle, L.P., and Huthings, L.M. 1946. A transmissible gastroenteritis in pig. *J Am Vet Med Assoc*, 108:257-259.
- Enjuanes, L. and Almazan, F. 2003. Virus-based vectors for gene expression in mammalian cells: Coronavirus. *New Comprehensive Biochemistry* 38:151-168.
- Ines, M.A. and Silvia, G. 1996. Cooperation between transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) structural proteins in the in vitro induction of virus-specific antibodies. *Virus Research* 46:111-124.
- Garwes, D.J., Lucas, M.H., Higgins, D.A., Pike, B.V., Cartwright, S.F. et al. 1978. Antigenicity of structural components from porcine transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol* 3:179-190.
- Godet, M., L'Haridon, R., Vautherot, J.F., Laude, H. 1992. TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology* 188:666-675.
- Hohdatsu, T., Eiguchi, Y. and Tsuchimoto, M. 1987. Antigenic variation of porcine transmissible gastroenteritis virus detected by monoclonal antibodies. *Vet Microbiol* 14:115-124.
- Jung, K., Kim, J. 2003. Differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by multiplex RT-nested PCR and comparison with in situ hybridization. *Journal of Virological Methods* 108:41-47.
- Kim, B. and Kim, O., et al. 2000. Transmissible gastroenteritis virus induces apoptosis in swine testicular cell lines but not in intestinal enterocytes. *Journal of comparative pathology* 123:64-66.
- Kim, O. and Chae, C. 2003. Experimental infection of piglets with a Korean strain of porcine epidemic diarrhoea virus. *J of*

- comparative pathol. 129:55-60.
- Kim, S.J. and Han, J.H., et al. 2003. Partial sequence of the spike glycoprotein gene of transmissible gastroenteritis viruses isolated in Korea. *Vet. Microbiol.* 94:195-206.
- Kwon, H.M., Jackwood, M.W, and Gelb, J. Jr. 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis* 37:194-202.
- Laude, H., van Reeth, K, et al. 1993. Porcine respiratory coronavirus: Molecular features and virus-host interactions. *Vet Res* 24:125-150.
- Laude, H., Chapsal, J.M., and Gelfi, J. 1986. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. I. Properties of monoclonal antibodies directed against virion proteins. *J Gen Virol* 67:119-130.
- Mendez, A. and Smerdou, C. 1997. Molecular characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus defective interfering genomes: Packaging and heterogeneity. *Virology* 217:495-507.
- Paton, D. and Iyata, G., et al. 1997. Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. *Journal of Virological Methods* 66:303-309.
- Register, K.B. and Wesley, R.D. 1994. Molecular characterization of attenuated vaccine strains of transmissible gastroenteritis virus. *J Vet Diagn Invest* 6:16-22.
- Saif, L.J. and Bohl, E.H. 1979. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. *AM J Vet Res* 40:115-117.
- Saif, L.J. 1996. Mucosal immunity: an overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infections in a swine model of enteric disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54:163-169.
- Sanchez, C.M., Gebauer, F., Sune, C., et al. 1992. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology*, 190:92-105.
- Simkins, R.A., Weilnau, P.A. and Bias, J. 1992. Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV. *Vet Res* 53:1253-1258.
- Sirinarumit, T. and Paul, P.S., et al. 1996. In situ hybridization technique for the detection of swine enteric and respiratory coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV), in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Journal of Virological Methods* 56:149-160.
- Theresa, A. Brim, J.L. and Van, C., et al. 1995. Cellular immune responses of pigs after primary inoculation with porcine respiratory coronavirus or transmissible gastroenteritis virus and challenge with transmissible gastroenteritis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48:35-54.
- Vaughn, E.M. and Paul, P.S. 1993. Antigenic and biological diversity among transmissible gastroenteritis virus isolates of swine. *Vet Microbiol* 36:333-347.
- Wesley, R.D., Woods, F.E, and Cheung, A.K. 1990. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 64:4761-4766.
- Woods, R.D. 1978. Smaal plaque variant transmissible gastroenteritis virus. *J Am Vet Med Assoc*, 173:643-647.
- 류영수, 박희규. 1997. 가축질병진단, 수의과학 연구소 면역 병리 연구실. p 87-9121.
- 박지용 1995. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)와 porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)의 nucleocapsid(N) 단백질 유전자에 대한 염기서열 분석과 cDNA probe hybridization. 대한 수의학회지 p515-530.