

송아지 大腸菌 Pilus Vaccine 開發에 관한 研究 : Ⅱ. 試驗백신의 免疫原性 및 防禦效果

金鍾萬 · 尹用德 · 朴政文 · 金鳳煥*
家畜衛生研究所 · 慶北大學校 農科大學 獸醫學科*
(1986. 2. 28 接受)

Studies on Development of *Escherichia coli* Subunit Vaccine against Calf Diarrhea; Ⅱ. Immunogenicity and Protective Efficacy of *Escherichia coli* K99 and F41 Pilus Vaccines in Experimental Animals

Jong-man Kim, Young-dhuk Yoon, Jeung-moon Park and Bong-hwan Kim*
Veterinary Research Institute, Rural Development Administration
Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Kyungpook National University*
(Received February 28th, 1986)

Abstract: The oil emulsion and alhydrogel pilli vaccines were prepared from a strain(O9: K35, K99, F41) of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea and their immunogenicity was tested in guinea-pigs, pregnant goats and cows.

Serum antibody responses to K99 and F41 antigens in guinea-pigs given experimental oil and gel vaccines peaked at 4 and 6 weeks after vaccinations.

At that time, the mean hemagglutination inhibition titers to K99 and F41 antigens in guinea-pigs given oil vaccine were 1:25 and 1:1,218 and those given gel vaccine were 1:54 and 1:724 respectively.

Agglutinin titers in pregnant goats given the oil vaccine were significantly higher(mean 1:2,347) compared to those of control group(mean 1:160).

Less than 12.5% of goatlings from vaccinated goats developed scours compared to nearly 100% in control group after oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* within 24 hours after birth.

The highest agglutinin titers of cow serum and colostrum and of the serum of calves 48 hours after birth from cows given oil vaccine were 1:256, 1:512 and 1:64 respectively.

On the other hand, those titers of serum and colostrum and of the serum of nursing calves from nonvaccinated cows were 1:8, 1:16 and 1:20 respectively.

The protective efficacy of the oil emulsion vaccine was 72.1% under field conditions.

These results strongly indicated that the vaccine could be applied for protection of diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves.

緒 論

Rutter와 Keynote²⁷⁾, Smith와 Halls²⁸⁾ 그리고 Snodgrass 등²⁹⁾은 腸毒素를 產生하는 病原性大腸菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)에 의한 송아지 泄瀉는 주로 分娩後 수일내 特히 1~2일에 가장 感受性이 높다고 하였으며, Fairbrother 등⁶⁾, Lintermans 등¹¹⁾ 그리고 후과 鄭³²⁾은 家畜에서 分離되는 大腸菌의 抗生物質에 對한 耐性菌 出現頻도가 날로 增加하는 趨勢에 있다고 하였다. 따라서 이러한 大腸菌性 新生 송아지 설사에 對處하는 가장 效果의인 方法中의 하나가 ETEC의 病原性 要因인 pilus에 대한 높은 抗體를 初乳를 통해 송아지에 傳하여 주므로서 病原性大腸菌의 腸壁에 附着·増殖을 막아 泄瀉를 豫防하는 것이다. 이 目的으로 pilus 精製백신을 生産하여 妊娠한 소, 양, 쥐에 接種한 結果 그들 後孫의 泄瀉發生率, 泄瀉持續期間 및 死亡率 등의 顯著한 감소 效果가 있음이 여러 學者들에 의해 報告된 바 있다.^{2, 9, 14, 15, 20, 21)}

本 研究에서는 K99와 F41 pilus를 病原性大腸菌으로부터 純粹分離 精製하여 gel 및 oil emulsion백신을 製造하여 이 백신의 實驗動物 및 野外 妊娠牛에 對한 免疫原性 및 분만 송아지에 대한 防禦效果를 試驗하여 다음과 같은 結果를 얻었기 報告하는 바이다.

材料 및 方法

試驗백신 生産: gel백신의 경우 前報에서와 같은 方法으로 精製된 pilus抗原의 濃度を 調節(K99: 64배, F41: 256배, MRHA titer)하여 aluminium hydroxide gel 50mg/ml을 加하여 吸着시켰고, oil백신의 경우는 抗原 4에 oil adjuvant(mineral oil 93.3%, Aracel A 3.3%, Tween 80 1.4%) 6의 比率로 混合하여 blender mixer로 均質化하여 製造하였다.

백신 接種: 기니픽(300~350g)에는 oil과 gel백신을 씩 0.5ml씩 2週 간격으로 2回, 山羊에는 oil백

신을 分娩 6週와 2週 前 2ml씩 2回 筋肉注射하였고, 妊娠牛에도 山羊에서와 同一한 方法으로 백신을 接種하였다.

抗體價 調査: 기니픽 血中抗體價는 血球凝集抑制試驗(HI test)에 의해 調査하였다. 이들 血清은 非動化한 뒤 0.5% D-mannose가 含有된 PBS(pH 7.2)로 microplate에서 50 μ l용량으로 二重(duplicate), 2進稀釋하고 同量의 K99와 F41腸性菌培養液(4MRHA titer)을 각각 加하고 37°C 30分 反應시킨 뒤 100 μ l의 1%기니픽 血球液은 F41菌液이 있는 鑵에, 1% 馬 血球液은 K99菌液이 있는 鑵에 加하고, 5°C에서 3時間 反應시킨 뒤에 結果를 判讀하였다. 山羊과 소의 血中 및 乳汁抗體價는 시험관에서 試料를 0.5ml 용량으로 2進稀釋한 뒤 同量의 pilus 含有菌體(4MRHA titer)를 加하여 37°C 2時間 反應시킨 뒤 5°C서 수시간 定置하여 結果를 判讀하는 試驗管凝集反應法으로 調査하였다.

防禦效果 調査: 分娩仔羊에 대한 防禦效果는 分娩後 12-24時間內에 攻擊菌 10ml(9.9×10^8 C. F. U. /ml)를 經口로 接種하고, 野外 송아지는 對照群과 함께 飼育하면서 泄瀉發生 狀況을 分娩後 10日間 觀察하였다.

結 果

試驗 백신의 기니픽에 對한 血中抗體價: oil emulsion과 gel 2種의 백신에 對한 免疫原性을 K99 및 F41 抗原別로 調査한 HI抗體價는 Table 1과 같다. 백신 接種前 기니픽 血中에서는 抗體를 檢出할 수 없었으며 1次接種 2週後 oil emulsion백신의 K99抗體價(log 2)는 3.00 ± 1.31 , F41은 5.63 ± 0.74 였고, gel백신의 K99抗體價는 0.88 ± 1.00 , F41의 경우 2.75 ± 0.89 였다. 最高의 抗體價는 oil emulsion백신의 경우 2次接種 2週後(4週), K99는 4.67 ± 1.53 , F41은 10.25 ± 0.50 이었고, gel백신의 경우는 2次接種 4週後(6週), K99는 5.75 ± 1.26 , F41은 9.50 ± 0.58 이었다.

山羊에 對한 免疫效果: 山羊에 對한 血中抗體價와

Table 1. Hemagglutination-Inhibition Titers of Guinea-pig Sera Against K99 and F41 Antigens

Weeks (No. of G-pigs)	HI titers(log 2)			
	Oil adjuvant + Antigen		Gel + Antigen	
	K99	F41	K99	F41
0 (n=8)	0	0	0	0
2 (n=8)	3.00 ± 1.31	5.63 ± 0.74	0.88 ± 1.00	2.75 ± 0.89
4 (n=5)	4.67 ± 1.53	10.25 ± 0.50	4.80 ± 1.64	8.40 ± 1.82
6 (n=4)	4.50 ± 0.71	9.33 ± 2.08	5.75 ± 1.26	9.50 ± 0.58
8 (n=3)	4.50 ± 2.12	5.33 ± 4.73	2.00 ± 3.46	5.00 ± 1.00

Table 2. Immunogenicity of Pilus Oil Emulsion Vaccine of *Escherichia coli* in Goats

Experiments	No. of Goat	Vaccination		Mean agglutinin titers		
		Dose	Route	Before vaccination (0)	4 weeks after 1st vaccination (4wks)	2weeks after 2nd vaccination (6wks)
Vaccination	6	2ml	I/M	267	1706	2347
Control	3	—	—	240	80	160

Table 3. Protective Efficacy of Pilus Oil Emulsion Vaccine of *Escherichia coli* in Goats

Experiments	No. of dams	No. of progenies	Challenge		Incidence of diarrhea		% Protective efficacy
			Dose	Route	Number	%	
Vaccination	6	8	10ml (9.9×10 ⁸ /ml)	oral	1	12.5	87.5
Control	3	5	"	"	5	100.0	

% Protective efficacy = $\{1 - (\% \text{ incidence of diarrhea in progenies from vaccinated dams} / \% \text{ incidence of diarrhea in progenies from non-vaccinated})\} \times 100$

攻撃接種後の 防禦効果는 Table 2, 3에서와 같다. 백신接種前 試驗群 6頭의 平均 凝集抗體價는 267, 對照群 3頭는 240이었다. 백신 接種群은 1次接種 3週後 1,706 배, 2次接種 2週後(分娩時) 2,347로 抗體價가 上昇하였으나 對照群은 80~160배로 커다란 變化가 없었다.

分娩仔羊에 對한 攻撃接種 結果 백신 接種群에서 分娩된 8頭 중 1頭(12.5%)가 攻撃接種 1日後 泄瀉를 일으켜 3日間 經過하다 自然治癒된 반면 對照群에서 分娩

된 5頭 중 2頭는 攻撃接種 1日後, 2頭는 2日後, 1頭가 3日後 泄瀉를 일으켜 全頭數가 觀察期間(6日)동안 지속되었다. 泄瀉發生率에 의한 백신 接種群의 對照群에 대한 防禦效果는 87.5%였다.

妊娠牛의 血中, 乳汁 및 송아지移行抗體價: 백신接種에 따른 妊娠牛의 血中 및 乳汁抗體價와 송아지의 移行抗體價(log 2)는 Fig. 1에서와 같이 試驗群에서는 백신 接種前 2있던 것이 1次接種 3週後엔 5, 2次接種

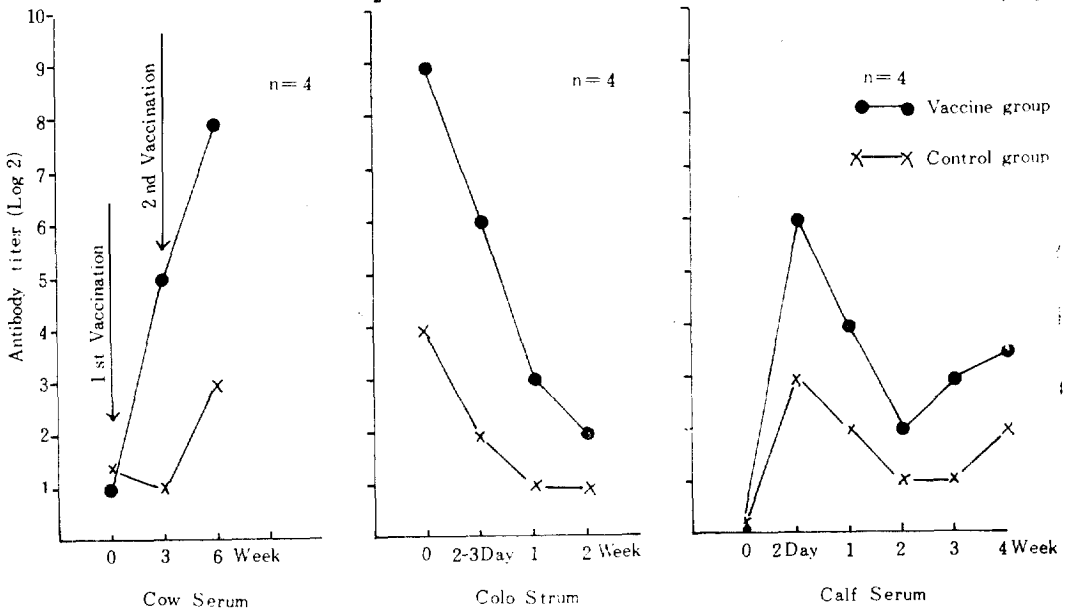


Fig. 1. Agglutinin titers in cow sera, colostrum and progeny calf sera from vaccinated and nonvaccinated cows

Table 4. Protective Efficacy of Pilus Oil Emulsion Vaccine of *Escherichia coli* in Calves under Field Condition

Farms	Group	No. of calves tested	Incidence of diarrhea		% Protective efficacy
			Number	%	
A	Vaccine	23	2	8.6	71.4
	Control	10	3	30.0	
B	Vaccine	17	1	5.8	80
	Control	7	2	28.5	
C	Vaccine	14	2	14.3	66.6
	Control	7	3	42.8	
Total	Vaccine	54	5	9.3	72.1
	Control	24	8	33.3	

% Protective Efficacy = $(1 - (\% \text{ incidence of diarrhea in calves from vaccinated dams} / \% \text{ incidence of diarrhea in calves from non-vaccinated dams})) \times 100$

3週後(分娩時) 8로上昇하였으나 對照群에서는 별다른 抗體價의 變化가 없었고, 初乳에서도 백신接種群은 9, 對照群은 4로 큰 차이가 있었으며 시일이 經過하면서 급격히 消失되었다. 分娩時 송아지에서는 백신항원에 대한 抗體를 檢出할 수 없었으나 初乳給與 2日後 백신 군 송아지는 6, 對照群은 3에서 2週까지 下落하다가 그 이후 조금씩 血中抗體價가 上昇하였다.

野外 송아지에 對한 防禦效果·3個 牧場의 백신 接種群 송아지 54頭, 對照群 24頭에 對한 分娩後 10日間의 泄瀉發生 狀況을 調査한 성적은 Table 4와 같다. 백신 接種群은 54頭 중 5頭(9.3%), 對照群은 24頭 중 8頭(33.3%)가 泄瀉를 일으켜 防禦率은 72.1%였고, 牧場別로는 66.6%에서 80%로 多樣하였다.

考 察

Pilus抗原의 기니피에 對한 免疫原性 調査에서 oil emulsion백신이 gel백신보다 全般的으로 抗體價가 높고 오래 持續되어, pilus抗原에 oil adjuvant가 우수함을 알 수 있었으며 이는尹 등³¹⁾이 돼지대장균백신(菌體多價백신) 試驗에서 gel보다 oil emulsion 백신이 免疫原性이나 防禦效果에서 우수하였다고 報告한 성적이나 一般的인 免疫理論과 一致하는 結果였다. K99보다 F41에 對한 抗體價가 높은 것은 免疫原性的 差異보다 백신에 含有된 pilus量의 差異 때문으로 생각된다. Myers¹⁷⁾는 백신 중의 K99 pilus量이 K99 백신의 效果와 直結된다고 하는 데 본 실험에서는 pilus의 特定動物 赤血球凝集能을 利用한 血球凝集抑制試驗(HI test)으로 기니피의 血中抗體價를 測定하여 백신의 免疫原性を 調査하여 백신 중에 들어있는 pilus의 量은 물론 效果를 比較할 수 있었다. 그러나 소, 산양 등의 反芻

類 血清 중에는 非特異적으로 血球凝集能이 있어 HI시험으로는 이들의 抗體價를 調査할 수 없었으며 이에 대한 研究가 좀더 遂行되어야 할 것으로 생각된다.

攻擊接種에 對한 分娩仔羊의 平均防禦率 87.5%는 Snodgrass 등²⁹⁾의 송아지에 對한 防禦效果 83.3%, 緬羊에서의 90%와 類似한 성적이었으며 이는 우리나라에서 試驗動物로 쉽게 利用할 수 없는 송아지나 緬羊 대신에 구입이 용이한 山羊을 使用해도 됨을 알 수 있었다.

Nagy²⁰⁾는 新生 家畜의 泄瀉豫防에 初乳抗體價가 重要하다고 하였고, Brinton⁴⁾은 初乳 중의 pilus 抗體에 의한 pilated phase의 病原性大腸菌 中和能力을 證明한 바 있다. 本 試驗에서 백신을 接種한 分娩牛의 初乳抗體價(log 2)가 對照群 4에 比하여 월등히 높은 9로서 백신의 腸管免疫效果를 期待할 수 있었으며 이러한 初乳抗體價는 Snodgrass 등²⁹⁾이 ELISA 方法으로 調査한 소 初乳抗體價 4.3(log 10)과 Moon 과 McDonald¹²⁾의 2,560倍 등 과는 試驗方法의 差異로 比較할 수 없었으며, Nagy 등²¹⁾이 돼지 初乳를 本 試驗에서와 같은 方法으로 調査한 抗體價(K88ab: 215배, K88ac: 58배)보다 비교적 높았으나 대상 동물과 pilus type이 달라 역시 正確한 比較는 할 수 없었다.

野外 송아지에 대한 防禦效果는 分娩後 10日間 관찰한 結果 72.1%로서 ETEC에 의한 송아지 泄瀉를 效果의으로 豫防해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

結 論

病原性大腸菌에서 pilus를 分離 精製하여 백신을 生産하고 이에 대한 試驗動物과 野外 송아지에서의 免疫原性 및 防禦效果를 調査하여 다음과 같은 結果를 얻

었다.

1. 기니픽에 對한 gel 및 oil emulsion pillus백신의 血中抗體價를 HI試驗으로 調査 比較한 바 oil emulsion 백신이 抗體價 및 抗體持續期間 등에서 gel백신보다 우수하였다.

2. 山羊에 對한 血中抗體價는 백신 接種前 267배에서 2次接種 2週後(分娩時) 가장 높아 2,347배로 上昇하였으나 對照群은 240~160배로 別다른 變動이 없었다. 이들에게서 分娩된 仔羊의 攻撃接種에 따른 防禦効果는 87.5%였다.

3. 妊娠牛의 血中凝集抗體價(log 2)도 分娩時 가장 높아 8이었고 初乳抗體價는 9였으며, 初乳給與 2日後 송아지 移行血中抗體價가 가장 높아 6이었다.

4. 野外 송아지에 대한 防禦効果는 72.1%였다.

參 考 文 獻

1. Acres, S.D., Forman, A.J. and Kapitany, R.A. : Antigen-extinction profile in pregnant cows, using a K99-containing whole cell bacterin to induce passive protection against enterotoxigenic colibacillosis of calves. Am. J. Vet. Res. (1982) 43: 560.
2. Acres, S.D., Isaacson, R.E., Babiuk, L.A. and Kapitany, R.A. : Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. Infect. Immun. (1979) 25:121.
3. Ashwell, G. : Colorimetric analysis of sugars. Methods Enzymol. (1957) 3:73.
4. Brinton, C.C. Jr. : The piliation phase syndrome and the uses of purified pili in disease control In C. Miller(ed), 8th U.S.-Japan Conference on Cholera, Atlanta (1978) pp.34~68.
5. Brinton, C.C., Bryan, J.D., Guerina, N., Jacobson, L.J., Labik, A., Lee, S., Levine, A., Lim, S., McMichael, J., Polen, S., Rogers, K., To, C.-C. and To, S.C.-M. : Uses of pili in gonorrhoea control: role of bacterial pili in disease, purification and properties of gonococcal pili and progress in the development of a gonococcal pilus vaccine for gonorrhoea. Infect. Immun. (1978) 18:216.
6. Fairbrother, J.M., McDonough, P.L. and Shin, S.J. : A Survey of drug resistance in *Escherichia*

coli isolated from neonatal calves in New York state from 1976 to 1978. 2nd Int. Symp. on Neonatal Diarrhea(1978) p.515.

7. Haggard, D.L., Johanson, D.W., Springer, J.A., Ward, G.E. and Vosdingh, R.A. : Evaluation of an *Escherichia coli* bacterin containing the K99 antigen or preventing bovine neonatal enteric colibacillosis. Vet. Med. Small Anim. Clin. (1982) 77:1391.
8. Henriguera, M., Reis, L., Jurandry, C.V. and Luie, R.T. : Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. Applied and Environmental Microbiology(1980) p.270.
9. Jones, G.W. and Rutter, J.M. : Contribution of the K88 antigen of *Escherichia coli* to enteropathogenicity; protection against disease by neutralizing the adhesive properties of K88 antigen. Am. J. Clin. Nutr. (1974) 27:1441.
10. Kessler, S.W. : Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent. J. Immunol. (1975)115:1617.
11. Lintermans, P., Vanmuylem, K., Kaeckenbeeck, A. and Pohl, P. : Enterotoxigenic *Escherichia coli* in the calf; Evaluation of their resistance patterns Vi Dierg. Tijdsch. (1981) 50:394.
12. Moon, H.W. and McDonald, J.S. : Antibody response of cows to *Escherichia coli* pilus antigen K99 after oral vaccination with live or dead bacteria. Am. J. Vet. Res. (1983) 44:493.
13. Moon, H.W., Isaacson, R.E. and Pohlenz, J. : Mechanisms of association of enteropathogenic *Escherichia coli* with intestinal epithelium. Am. J. Clin. Nutr. (1979) 32:119.
14. Moon, H.W. : Pili as protective antigens in vaccines for the control of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. In proceedings, 2nd Int Symp. Neonatal Diarrhea, Veterinary Infectious Disease Organization (1978) p.393-410.
15. Morgan, R.L., Isaacson, R.E., Moon, H.W., Brinton, C.C. and To, C.-C. : Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987 or K99 pili; protection correlates with pilus homology of vaccine

- and challenge. *Infect. Immun.* (1978) 22:771.
16. Morris, J.A. : *Escherichia coli* fimbrial adhesins. *Pig News and Information* (1983) 4:19.
 17. Myers, L.L. : Passive protection of calves against experimentally induced and naturally occurring enteric colibacillosis. *Am. J. Vet. Res.* (1980) 41:1952.
 18. Myers, L.L. : Passive protection of calves against enteric colibacillosis by vaccination of their dams with capsular and fimbrial K antigens of *Escherichia coli*. Proceedings of the second symposium on Neonatal Diarrhea. Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, (1979). p. 427~442.
 19. Myers, L.L. : Enteric colibacillosis in calves: immunogenicity and antigenicity of *Escherichia coli* antigens. *Am. J. Vet. Res.*(1978) 39:761.
 20. Nagy, B. : Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxigenic colibacillosis. *Infect. Immun.* (1980) 27:21.
 21. Nagy, B., Moon, H.W., Isaacson, R.E., To, C.C. and Brinton, C.C. : Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect. Immun.* (1978) 21:269.
 22. Nagy, L.K., Bhogal, B.S. and Mackenzie, T. : Evaluation of *Escherichia coli* vaccines against experimental enteric colibacillosis. *Research in Veterinary Science*(1976) 24:39.
 23. Ørskov, I. and Ørskov, F. : Serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Prog. Allergy*(1983) 33:80.
 24. Ørskov, F. and Ørskov, I. : Special *Escherichia coli* serotypes from enteropathies in domestic animals and man. *Frsch. Vet.* (1979) S29:7.
 25. Ørskov, I. and Ørskov, F. : Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains from diarrhea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol.* (1977) 163:99.
 26. Ørskov, I., Ørskov, F., Smith, H.W. and Sojka, W.J. : The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco" possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.* (1973) 88:31.
 27. Rutter, J.M. : Keynote Address. Bacterial colonization of the Alimentary tract in neonatal diarrhea of animals. 3rd. Int. Symp. On neonatal diarrhea. (1980). pp.183~195.
 28. Smith, H.W. and Halls, S. : Observation by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J. Pathol. Bacteriol.* (1967) 93:499.
 29. Sondgrass, D.R., Nagy, L., Sherwood, D. and Campbell, I. : Passive immunity in calf diarrhea: Vaccination with K99 antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* and Rotavirus. *Infect. Immun.* (1982) 37:586.
 30. Toledo, M., Regina, F., Alvariza, M., Docarmo, B. and Trabulsis, L.R. : Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect. Immun.* (1983) 38:585.
 31. 尹用德, 金鍾萬, 金東成 : 仔豚의 大腸菌性 설사 증에 관한 研究. *農試報告*(1984) 26:72.
 32. 卓鍊斌, 鄭吉澤 : 豚由來 *Escherichia coli*의 抗生物質耐性 및 傳達性耐性 因子에 關하여. *대한수의학회지*(1976) 16:159.