

송아지 大腸菌 백신開發에 關한 研究

安載文, 郭鶴求, 金鴻起

忠淸北道 家畜衛生試驗所堤川支所

Studies on Protective Efficacy of Escherichia coli Vaccines

Jae -Moon Ahn, Hak -Goo Kwak, Hong -Ki Kim

Chechon Branch of Chung Buk Veterinary Service Laboratory

Abstract

The oil emulsion and alhydrogel vaccines were prepared from a strain of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from calves with diarrhea and their protective efficacy and immunogenicity were tested in Guinea-pigs. Enterotoxigenic Escherichia coli, isolated from calves with diarrhea, has K99 and F41 antigen as 46.2% and 50.9% with 48 and 53 strains respectively out of 104 strains. The protective efficacy of the gel and oil vaccines were 60% and 80% respectively. Agglutinin titers to sera of Guinea-pigs vaccinated with experimental gel and oil vaccines peaked at 5 and 6 weeks after vaccination.

Key words: oil emulsion vaccine, alhydrogel vaccine, agglutinin titer, protective efficacy.

서 론

송아지 大腸菌症은 新生송아지에 있어서 가장 흔하게 發生되는 疾病으로서 泄瀉를 主症로 하는 腸炎型과 急死를 일으키는 敗血症型이 있다. 송아지에서 大腸菌性 泄瀉症을 일으키는 大腸菌은 수많은 大腸菌의 血清型中 몇鍾의 血清型만이 原因이 된다는 事實이 많은 研究者들^{1, 2, 3)}에 의해서 밝혀졌다. Rutter⁴⁾, Smith와 Halls⁵⁾ 그리고 Snodgrass等⁶⁾은 腸毒素을 産性하는 病原性大腸菌(Enterotoxigenic Escherichia coli; ETEC)에 의한 송아지 泄瀉는 主로 分娩後 數日

內 特히 1-2日에 가장 感受性이 높다고 하였으며, Fairbrother等⁷⁾, Lintermans 等⁸⁾ 그리고 卓과 鄭⁹⁾은 家畜에서 分離되는 大腸菌의 抗生物質에 對한 耐性菌出現頻度가 날로 增加하는 趨勢에 있다고 하였다. 따라서 송아지 泄瀉症을 豫防하기 爲해서는 病原性大腸菌(ETEC)이 가지고 있는 病原性 因子인 Pilus에 對한 백신을 妊娠牛에 接種하여 初乳를 통한 抗體를 송아지에 供給함으로써 病原性大腸菌이 腸壁에 附着, 增殖되는 것을 防止하여야 한다.

本 研究에서는 大腸菌 백신開發을 爲하여 송아지 泄瀉便에서 分離된 病原性 大腸菌中 K99

와 F41 Pilus 抗原을 가진 菌株을 選拔하여 gel 및 oil emulsion백신을 製造하여 試驗動物에 對한 免疫原性 및 防禦效果 試驗을 實施하였다.

材料 및 方法

病原性 大腸菌의 分離

泄瀉病으로 斃死하였거나 심한 泄瀉症勢를 나타내는 송아지의 小腸(12指腸 또는 空腸)內容物 또는 直腸綿捧法으로 採取한 材料를 McConkey agar에 分離培養하여 乳糖을 分解한 集落을 選定 OF試驗, IMVIC試驗, 其他 生化學試驗을 實施하였다.

病原性 大腸菌의 K99 抗原 分布調查

Glantz¹⁰⁾의 方法에 準하여 K99와 F41 因子 抗血清을 製造하고 分離菌을 平板凝集反應法으로 K99와 F41 positive大腸菌의 分布調查를 하였고 이들 중에서 백신製造菌株을 選拔하였다.

백신 製造 過程

가) 使用菌株: 송아지 泄瀉便으로부터 分離, 同定된 病原性 大腸菌中 平板凝集反應法에 의하여 K99와 F41 positive Escherichia coli로 確認된 3株를 백신製造 菌株로 使用하였다.

나) 種菌培養 및 不活化: 1% dextrose가 添加된 TSB(trypsin soy broth)에 選定된 K99와 F41 positive 大腸菌을 接種37°C incubator에서 20時間 培養된 것을 種菌으로하여 이 培養液 3ml를 300ml의 1% dextrose가 添加된 TSB에 移植培養하고 이 培養液을 60°C water bath에서 30分間 加溫處理한 다음 0.2% formalin을 加하여 室溫에 1晝夜 放置시키면서 不活化하였다.

다) aluminium hydroxide adjuvant(gel)製造: 5% aluminium sulfate溶液 250ml에 5% sodium hydroxide 100ml의 比率로 混合한 다음 3,000rpm에 20分間 遠心 沈澱시켜 沈澱部分을 滅菌蒸溜水로 2回 洗滌하고 少量의 0.15M saline로 液狀을 만들어 15Ib 30分間 高壓蒸氣

滅菌하여 製造하였다.

라) gel 백신 製造: 85%의 本培養液에 15%의 Al(OH)₃ gel液을 混合한 다음 0.01%되게 merthiolate를 添加하여 gel 백신을 製造하였다.

마) oil emulsion백신 製造: 75% oil adjuvant에 25%의 本培養液을 少量씩 添加하면서 homogenizer에서 約 20分間 잘 混合시킨 다음 0.01% merthiolate를 添加하여 oil emulsion 백신을 製造하였다.

試驗백신의 免疫原性 및 防禦效果 試驗

기니피에 對한 免疫原性 및 防禦效果: 백신生産菌株에 對한 抗體陰性인 기니피에 gel 백신은 10頭에 0.6ml씩 2回, oil emulsion백신은 0.4ml씩 10頭에 1회 筋肉接種한 試驗群과 對照群(10頭)으로 區分하여 1週間隔으로 8週까지 血中抗體價를 測定하여 免疫原性を 調査하였으며 防禦效果 試驗에서는 免疫原性試驗에서와 同一한 方法으로 백신을 接種한 다음 5週에 攻擊菌(2×10⁷/ml) 1ml를 腹腔內 接種하고 7일간 觀察하였다.

抗體價 測定方法

가) 抗原製造: 백신製造 菌株를 1% dextrose가 添加된 TBS에 20時間 培養한 다음 0.5% formalin을 加하여 不活化된 것을 抗原으로 使用하였다.

나) 試驗管凝集反應: 可檢血清은 1:10부터 2進稀釋하고 製造된 抗原을 0.2ml씩 잘 混合하여 37°C water bath에서 2時間 反應시키고 5°C에서 18時間 放置한 다음 그의 凝集程度에 따라서 判讀하였다.

結 果

當 試驗所 管內 12個 農場에서 飼育되는 송아지의 泄瀉便으로부터 大腸菌을 分離한 結果 表1에서와 같이 104株의 大腸菌을 分離할 수 있었

Table 1. No. of Escherichia coli isolated from calves with diarrhea by farms.

Farms	No. of materials	No. of isolates		
		Escherichia coli	Others	Total
Total	85	104	40	144

다. 況을 調査한 結果 表2와 같이 K99抗原을 가진 生化學的 檢査結果 大腸菌으로 確認된 104株 것이 48株로서 46.2%이었으며 F41抗原을 가진 의 大腸菌을 對象으로 K99와 F41 抗原分布 狀 것이 53株로서 50.9%이었다.

Table 2. Distribution of pili containing E.coli isolated from calves with diarrhea.

No. of strains tested	Methods	No. of pili positive strains (%)	
		K99	K99 & F41
104	Agg. test	48(46.2)	53(50.9)

大腸菌 백신開發을 爲한 菌株 選拔은 이들 K99 抗原과 F41 抗原을 含有한 菌株에서 3株를 選拔하여 使用하였다.

試驗백신의 動物接種 : 기니픽에 대한 免疫效果를 試驗하기 爲하여 體重 300g以上되는 健康한 기니픽에 gel 백신의 境遇 0.6ml을 2회에 걸쳐 3週간격으로 接種하고 oil 백신의 境遇 0.4ml을 1回 筋肉內 接種한 다음 5週後에 攻撃菌을 對

照群과 같이 2×10^9 /ml되게 調節된 菌液을 腹腔內에 1ml씩 接種하였던 바 表2와 같이 gel 백신의 境遇 10頭中 6頭가 生存하여 60%의 免疫效果를 나타내었고 oil 백신의 경우 10頭中 8頭가 生存하여 80%의 免疫效果를 나타내었다. 對照群의 境遇 10頭中 8頭가 攻撃菌 接種後 2-3日 만에 斃死하였다.

기니픽에 대한 試驗백신의 免疫原性を 調査하

Table 3. Protective efficacy in guinea-pigs challenged with enteropathogenic Escherichia coli after vaccination with gel and oil vaccines.

Vaccines	No. of G-Ps tested	Vaccination		Challenge			% protective efficacy
		1st	2nd	weeks	dose	route	
Gel	10	0.6ml IM	0.6ml IM	2wks	1ml	IP	6/10(60%)*
Oil	10	0.4ml IM	-	5wks	1ml	IP	8/10(80%)
Control	10	0.6ml saline	-	5wks	1ml	IP	2/10(20%)

IM : Intramuscular injection IP : Intraperitoneal injection

* : No. of survivals/ No. of G-Ps tested

기 爲하여 免疫效果 試驗에서와 같은 方法으로 gel 및 oil백신을 筋肉內 接種한 다음 1週 間隔으로 血中抗體價를 測定한 結果 그림 1에서와 같이 gel백신의 경우 2次 接種後 1週째에 抗體價가 1:560 程度로 最高에 달했다가 8주째에는 1:

160배로 下降하였다. oil백신의 境遇에는 3週째 부터 抗體價가 上昇하기 始作하여 5-6週에 1:2,560배로 最高에 달했다가 8週째에는 1:320배로 떨어졌다. 그러나 對照群의 境遇에는 全試驗 期間을 통하여 抗體價를 전혀 確認할 수 없었다.

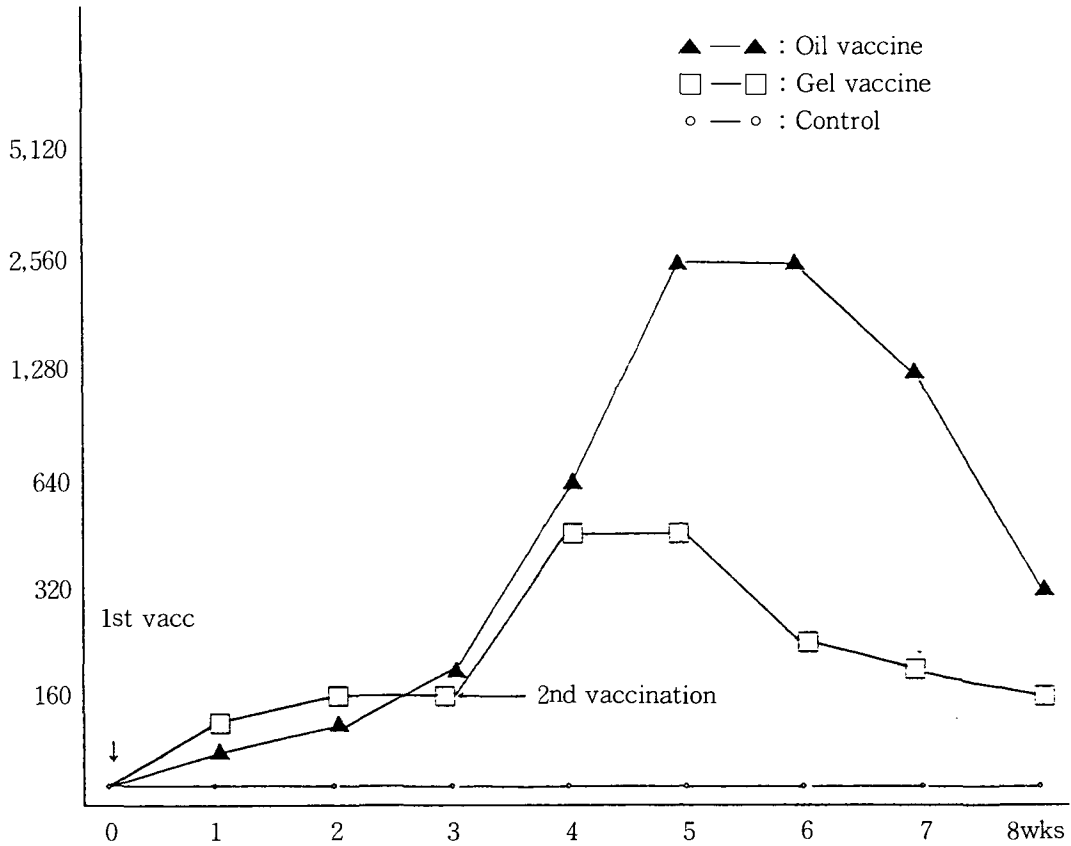


Fig 1. Comparisons of agglutination titers to sera of Guinea-pigs vaccinated with gel and oil Escherichia coli vaccines.

考 察

Ashwell¹⁾, Gaastra와 Graaf²⁾, 그리고 Ørskov 等³⁾은 腸毒性 大腸菌(ETEC)의 病原性에 關係된 重要한 因子인 Pilus는 家畜의 種類에 따라 特異한 型이 있으며 송아지에는 K99와 F41이 關係한다고 하였으며, 金等¹¹⁾은 송아지泄瀉

更에서 分離된 大腸菌의 Pili分布 調査結果 K99rk 36.1%, F41이 51.6%를 차지한다고 하였다.

K99와 F41 血清型을 가진 大腸菌은 耐熱性 腸毒素(Heat-stable EnterotoxinST)를 生成하고 이毒素가 腸上皮內의 Guanylate cyclase를 活性化하여 腸內分泌를 促進함으로써 泄瀉症

이 發生하는 것으로 알려졌다.^{10, 12, 13, 14)}

本 研究에서 백신製造菌株를 選拔하기 위해서 송아지 泄瀉便으로부터 分離된 病原性 大腸菌 104株를 對象으로 K99抗原分布狀況을 調査한 成績은 陽性率이 48株(46.2%)로서 이것은 金等¹¹⁾의 國內調査成績 48%와 비슷하였으나 Burrows 등¹⁵⁾의 소와 양에서 分離한 大腸菌의 70-95%가 K99陽性菌株였다는 報告와는 큰차이를 보였는데 이는 調査對象 및 調査方法上의 差異 때문인 것으로 생각된다.

Pilus는 菌體에 붙어 있는 매우 微細한 sub-unit로 이것만을 純粹 精製하여 백신을 製造하는데는 大量的의 Pilus를 生産하여야 하는 어려움이 있는데 金等¹⁶⁾은 Minca medium이 Pilus를 生成하는데 가장 優秀한 배지라고 하였다.

Guinee와 Jansen¹⁷⁾은 大腸菌 感染症의 豫防을 爲하여 K88 抗原을 含有한 菌株로서 백신을 製造하여 泄瀉症 豫防에 좋은 效果를 볼 수 있었다고 하였고, Dam¹²⁾은 015, 078, 0115의 菌株로 Trivalent 백신을 製造하여 mice에 對한 免疫效果 試驗을 實施한 結果 백신接種群에서 生産된 새끼 mice의 경우 15%가 斃死하였고 對照群에서는 79%가 斃死하였다고 報告하였으며, 尹等¹⁸⁾은 mice 대신 기니픽을 使用하여 gel 백신의 경우 70%, oil 백신의 경우 100%의 免疫效果를 나타내었고 對照群에서 20%의 免疫效果를 나타낸다고 하였는데, 本 試驗에서는 試驗動物로서 기니픽을 使用한 結果 gel 백신의 경우 60%, oil 백신의 경우 80%로서 尹等의 成績보다 다소 낮았다.

金等²¹⁾은 송아지 설사변에서 分離한 病原性 大腸菌에서 K99 Pilus를 分離精製하여 oil백신을 製造한 結果 山羊에서의 防禦能力이 87.5%이며 野外송아지에대한 防禦率은 平均 72.1% (66.6%-80%)임을 報告한 바 있는데 이는 本 試驗에서의 기니픽에 대한 防禦能力 80%와 비슷하였다. 따라서 Pilus 分離, 배양에 따른時間的, 經濟的 努力과 農場에서의 適用 可能性등 여러 要素를 綜合하여 볼 때 K99 Pilus를 含有한

菌株를 選拔하여 菌을 不活化한 백신을 生産하여 適用하는것이 보다 有利할 것으로 생각된다.

結 論

管内 송아지 泄瀉便에서 分離한 病原性 大腸菌에서 백신菌株를 選拔하여 試驗 백신을 製造하여 試驗動物에 對한 免疫原性 및 防禦效果 試驗을 實施한 結果 다음과 같은 成績을 얻었다.

1. 송아지 泄瀉便으로부터 104주의 大腸균을 분리하였다.

2. 病原性 大腸菌 104株에 對한 K99와 F41 抗原分布 狀況을 調査한 結果 K99抗原을 가진 것이 48株로 46.2%이었으며, F41抗原을 가진 것이 53株로서 50.9%이었다.

3. 試驗백신의 기니픽에 對한 免疫效果 試驗效果 gel 백신은 60%의 免疫效果를 나타내었고 oil 백신은 80%의 免疫效果를 나타내었다.

4. 기니픽에 對한 試驗백신의 抗體形成能은 gel 백신의 경우 백신接種後 4週에 1:560倍로 最高에 달하였으며, oil 백신의 경우 接種後 5-6週에 1:2,560倍로 最高에 달하였다.

5. 以上の 成績으로 보아 oil 백신이 gel 백신보다 抗體形成能 및 防禦效果에서 우수함을 알 수 있었다.

參考文獻

1. Ashwell G. 1975. Colorimetric analysis of sugars. *Methods Enzymology* 3: 73.
2. Gaastra W and De Graaf FD. 1982. Host-specific fimbrial adhesions of noninvasive enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microbiology Rev.* 46: 129.
3. Ørskov I and Ørskov F. 1983. Serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Prog Allergy* 33: 80.
4. Rutter JM. 1980. Keynote Address. Bacterial colonization of the alimentary tract

- in neonatal diarrhea of animals. 3rd Int Symp on Neonatal Diarrhea : 138-195.
5. Smith HW and Halls S. 1967 Observation by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on Escherichia coli infections in pigs, calves, lambs, and rabbits. J. Pathol Bacteriol. 93 : 499.
 6. Snodgrass DR, Nagy L, Sherwood D, et al. 1982. Passive immunity in calf diarrhea; Vaccination with K99 antigen of enterotoxigenic Escherichia coli and Rotavirus. Inf Immunol. 37 : 586.
 7. Fairbrother JM, McDonough PL and Shin SJ. 1978. A survey of drug resistance in Escherichia coli isolated from neonatal calves in New York state from 1976 to 1978 2nd. Int Sump on Neonatal Diarrhea : 515.
 8. Lintermans P, Vanmuylem K, Kaeckenbeek A and Phol P. 1981. Enterotoxigenic Escherichia coli in the calf: Evaluation of their resistance patterns. Vi Dierg, Tijdsch. 50 : 394.
 9. 卓鍊斌, 鄭吉澤. 1976. 豚由來 Escherichia coli의 抗生物質耐性 및 傳達性耐性因子에 關하여. 大韓獸醫學會誌 16 : 159.
 10. Glantz, PJ. 1969. Serological identification of Escherichia coli : 1-58. The Pennsylvania State Univ.
 11. 金種萬, 尹用德等. 1986. 송아지 大腸菌 Pilus vaccine開發에 關한 研究. 大韓獸醫學會誌 26 : 103.
 12. Dam A. 1971. Preliminary experiments on vaccination and serum treatment in the prophylaxis of E.coli infection in new born piglets. Acta Vet Scand. 12 : 457-459.
 13. Moon HW. 1978. Pili as protective antigens in vaccines for the control of enterotoxigenic E.coli infections. 2nd Int. Symp. Neonatal Diarrhea, Veterinary Infectious Disease Organizations : 393-410.
 14. So M, HW Boyer, M Betlach, S Falkow. 1976. Molecular cloning of an Escherichia coli plasmid determinant that encodes for the production of heatstable enterotoxin. J Bacteriol. 128 : 463-472.
 15. Burrows MR, Sellwoods R, Gibbons RA. 1976. Hemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of E coli. J. Gen Microbiol. 96 : 269.
 16. 金種萬, 尹用德. 1986. 송아지 大腸菌 Pilus vaccine開發에 關한 研究. 大韓獸醫學會誌 26 : 97-102.
 17. Guinee PAM, WH Jansen. 1979. Behavior of E coli K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and hemagglutination. Infection and immunity. 23(3) : 700-705.
 18. 尹用德. 1984. 仔豚의 大腸菌性 瀉泄症에 關한 研究. 農試報告. 26 : 172-79.