

돼지에서 대장균 자가백신 효과

윤교복, 김종술, 정동수, 박양주, 이유섭, 한정희*

강원도가축위생시험소, 강원대학교 수의과대학*

Effect of autogenous *Escherichia coli* vaccine in pig

Kyo-Bok Yoon, Jong-Sool Kim, Dong-Su Chung, Yong-Joo Park,
You-Sub Lee, Jeong-Hee Han*

Kangwon Veterinary Service Laboratory
College of Veterinary Medicine, Kangwon National University*

Abstract

This study was performed to investigate the immunogenicity of autogenous *E coli* vaccines and their preventive effects on diarrhea in suckling piglets. Autogenous *E coli* live and killed vaccines were made from the *E coli* strains isolated from piglets showing diarrhea in field. In group I, pregnant sows were administered with live and killed vaccines at 4 and 2 weeks before parturition, respectively. Killed vaccines were administered twice to pregnant sows at 4 and 2 weeks before parturition in group II, and saline instead of autogenous *E coli* vaccines was administered to pregnant sows in group III for the control. After parturition, antibody titers in colostrum and milk from sows, incidence of diarrhea in suckling piglets, and immunoreactivity in the ileum of piglets from each treatment group were examined. The results were as follows :

1. Sixty-two strains of *E coli* were isolated from suckling piglets with diarrhea. Of the strains, K88 pilus and K99 pilus antigens were identified in 6(9.8%) and 4(6.5%), respectively. Molecular weights of K88 and K99 pilus were 27,500 and 18,500 daltons, respectively.

2. Antibody titers in colostrum from sows after parturition were 1 : 512 to 1 : 1,024 in group I, 1 : 256 to 1 : 512 in group II, and 1 : 4 to 1 : 16 in group III.

3. The incidences of diarrhea in suckling piglets of group I, II and III were 3.3%, 9.4% and 21.4%, respectively.

4. When the immunoreactivity in the ileum of piglets from each group was examined, the proportion of IgG-immunoreactive cells in group I or II was higher than that in group III. In conclusion, administration of autogenous *E coli* vaccines to pregnant sows before parturition can be an effective way to prevent diarrhea in suckling piglets.

Key words : Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Autogenous vaccines, Pig

서 론

*Escherichia coli*는 혈청형에 따라 somatic antigen(lipopolysaccharide : O) 171종 이상, flagellar antigen(H) 56종 이상, capsular antigen(polysaccharide : K) 80종 이상이 서로 복잡하게 연관되어 약 9,000여종 이상의 혈청형이 알려져 있고 병인론적으로 설사를 일으키는 *E. coli*는 O : H 혈청군을 토대로 한 4가지의 장독소성 *E. coli*(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 장침입성 *E. coli*(enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 장병원성 *E. coli*(enteropathogenic *E. coli*, EPEC), 장출혈성 *E. coli*(enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)로 분류된다^{1,2)}. 이중 ETEC는 heat labile enterotoxin(LT)과 heat stable enterotoxin(ST) 중 한 개 또는 두 개의 독소를 동시에 생산하며 K88, K99, 987P 및 F41 등의 pilus 항원을 보유하고 있어 주로 어린 가축에서 장염으로 인해 심한 설사를 일으키는 대장균으로 보고 되었다³⁻⁵⁾. 특히 이들 대장균이 어린 가축에 감염되면 소장점막상피세포에 부착되어 발육·증식하면서 장독소를 분비하므로 이것에 의해 설사증을 유발시킨다^{6,7)}. Pilus에는 가축의 종류에 따라 특이한 형이 있으며 어린 송아지와 양에서는 K99와 F41의 대장균이, 돼지에서는 K88, K99, 987P 및 F41 등이 주로 문제가 된다^{8,9)}. K99 pilus의 굵기는 4.8nm, 길이는 0.3 μ m이고, K88 pilus의 굵기는 8~13nm, 길이는 0.2~1.3 μ m라 하였다. 단백질로서 균체당 약 100개 정도가 있으며 이러한 pilus의 생성은 균주, 배지 조성, 배양 시간, 온도 및 균체에서 pilus를 분리 정제하는 방법에 따라 분리되는 pilus 양과 순도에 차이가 있다고 하였다^{10,11)}. Pilus 항원은 mannose 존재하에서의 혈구응집능(mannose-resistant hemagglutination, MRHA)이 각기 달라서 K88 항원과 F41 항원은 기니피크 적혈구에, K99 항원은 말과 양의 적혈구에 대하여 MRHA 반응을 일으키지만, 987P 항원은 기니피크 및 말과 양의 적혈구에 응집능이 없다^{13,12-14)}. ETEC에 의한 설사증을 막기 위해서 *E. coli*의 bacterin을 모돈에 주사하였을 때 자돈에서 설사발생률이 감소하였으며 또한 균체로부터 분

리한 K88 항원을 모돈에 주사하였을 경우 초유를 통하여 방어항체가 자돈에 이행되어 자돈에서 설사발생률이 감소한다고 보고하였다^{15,16)}. 또한 Moon 등^{17,18)} Nagy 등^{3,4)}은 ETEC의 설사증에 대한 백신연구에서 정제된 ETEC의 K88 pilus와 K99 pilus로 이루어지는 혼합백신을 임신모돈에 투여함으로써 초유를 통하여 자돈을 수동면역케 한다고 보고하였다. 모돈의 병원성 대장균에 대한 면역항체 수준을 높이기 위해서는 백신 중에 장독소와 부착항원이 항원물질로서 포함되어야 한다^{19,20)}. 국내 산업용 백신은 4종의 혈청군을 백신제조용 세균주로 사용하여 제조된 사균백신 및 수입용 bacterin-toxoid 백신이 있으나, 농장에서 설사를 유발하는 대장균 혈청형과는 다른 경우가 많으므로 설사예방에 효과적이지 못하다²¹⁾. 본 연구는 농장에서 설사를 일으키는 병원성 대장균을 분리하여 항원형별 특이성을 조사하고 이 대장균으로부터 균체 및 K88, K99 pilus를 정제하여 생균백신과 사균백신을 제조하였다. 이들 백신을 임신모돈과 분만포유자돈에 투여시 면역원성의 효과를 시험연구하여 돼지농장별 대장균 자가백신을 제조 공급함으로써 대장균설사증을 예방하는데 효과가 있는 지를 알아보 고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

동일한 사양조건에서 집단사육중인 임신모돈 55두와 포유자돈 560두를 실험에 사용하였다. 포유자돈은 분만실에서 출생하여 어미젖을 자연포유시켰으며 약 24일령에 이유하였다.

2. 실험균주

강원도 양구에 소재한 양돈장에서 전형적인 대장균 설사증세를 보이는 포유자돈의 설사분을 채취하여 다음과 같은 방법으로 병원성 대장균을 분리하여 백신제조에 사용하였다.

설사포유자돈으로부터 대장균의 분리: 설사증으로 폐사하였거나, 심한 설사증세를 나타내

는 포유자돈에서 소장내용물 및 직장내용물을 면봉법으로 채취하여 4°C에서 보관하였다. 6시간 이내에 시료를 MacConkey agar, 5% sheep blood agar, EMB agar 등의 배지에 배양하여 순수 분리된 lactose 분해균을 tryptic soy agar 사면배지에 접종, 보관하면서 IMViC test, 용혈성 시험 및 ViteK system(bioMerieux, USA)을 이용하여 최종 동정하였다. 대조균으로는 국립수의과학연구소로부터 분양받은 *E coli* S-69, S-90, S-127 및 S-92 균주를 사용하였다.

분리세균의 혈청학적 동정: 동정된 *E coli*의 serotype과 pilus type의 동정은 Qrskov 등²²⁾의 방법에 준하여 항혈청(Seiken, Japan)을 사용하여 평판응집반응법으로 혈청학적 검사를 실시하였다.

Mannose-resistant hemagglutination (MRHA) test: 혈청학적으로 동정된 *E coli*을 5% sheep blood agar(SBA) 배지에 37°C에서 18시간 배양한 후 smooth colony를 minca broth에서 37°C에서 24시간 2대 계대배양하였다. 배양세균을 5°C의 9,000g에서 20분간 원심분리하여 집균하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 세척한 뒤 5% D-mannose를 함유한 PBS에 10⁷/ml로 부유시켜 pilus의 유무를 조사하는 세균액으로 사용하였다. 세균액 50 µl를 U형 microplate에 넣고 0.5% mannose PBS로 단계적으로 2배 희석한 후 동량의 1% 기니픽 또는 말 적혈구액을 떨어뜨려 혼합하고 4°C 냉장고에서 3시간 반응시킨 후 응집여부를 판독하였다.

Pilus의 분리 및 정제: *E coli* 각 균주를 minca broth에 37°C에서 24시간씩 2대 계대배양한 각 세균액 5ml를 Roux병에 제조된 minca agar 배지에 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후 PBS와 초자구를 넣고 잘 흔들어서 배지표면으로부터 균체를 분리시켜 집균하고 각 균주별로 배양용량의 1/10량의 PBS에 부유시켜 60°C에서 20분간 열처리한 후 5°C의 17,000g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 상층액을 2~5°C로 유지하면서 포화상태가 될 때까지 magnetic bar를 회전시키면서 유산암모늄을 서서히 가하였다. 침전된 pilus를 20,000g에서

30분간 원심분리하여 수집하고 적량의 PBS로 부유시켜 5°C에 보존하였다. 정제된 pilus는 sodium dodecyl sulfa-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하여 pilus의 분자량을 측정하였다.

3. 분리세균을 이용한 백신제조 및 접종

생균백신 제조: 순수분리된 *E coli*를 5ml tryptic soy broth(TSB)에 18시간 배양하고 다시 TSB에 1% 정도의 배양세균을 넣어 18시간 증균배양한 후 여기에 정제된 pilus항원을 넣고 혼합하여 10⁷/ml로 하였다.

사균백신 제조: 순수분리된 *E coli*를 SBA에서 18시간 배양 후 5ml TSB에 18시간 재배양하고 다시 TSB에 1% 정도의 배양세균을 넣어 18시간 증균배양한 후 7,000g에서 30분간 원심분리하여 집균하고 세균액을 0.3% 포르말린 용액으로 37°C에서 24시간 불활화처리한 후 SBA에 37°C에서 48시간 배양함으로써 불활화를 확인하였고, 정제된 pilus 항원을 넣어 혼합한 후 aluminum hydroxide adjuvant를 10mg/ml 농도로 첨가, 부유시켜 10¹⁰/ml 농도가 되도록 제조하였다.

백신의 접종: 실험군은 임신모돈에 생균백신과 사균백신을 접종하는 실험 I 군, 사균백신만 접종하는 실험 II 군 및 대조군인 실험 III 군으로 구분하였다. 실험 I 군은 임신모돈 20두에 분만 4주전 50ml 생균백신을 사료에 혼합하여 경구투여하고, 분만 2주전에 2ml 사균백신을 근육주사하였다. 실험 II 군은 임신모돈 20두에 분만 4주전 사균백신을 근육주사하고, 다시 분만 2주전 사균백신을 근육주사하였다 (Table 1). 백신투여군과 대조군의 모돈에서 태어난 포유자돈의 설사발생을 이유시까지 관찰하였다.

4. 돈유항체가 조사

분만모돈의 돈유항체가 측정은 시험관응집 반응법에 의하여, 시험관에 0.5ml PBS와 0.5ml 돈유를 넣고 단계적으로 2배 희석한 후 임신모돈에 접종했던 세균액 0.5ml씩을 넣은 다음

Table 1. Experimental design for vaccination with live and killed *E coli* vaccines in pregnant sows

Group	Treatment ^a	No of sows tested	Vaccination ^b	
			1st	2nd
I	L and K	20	50ml, OA, 4 weeks before parturition	2ml, IM, 2 weeks before parturition
II	K	20	2ml, IM, 4 weeks before parturition	2ml, IM, 2 weeks before parturition
III	—	15	Saline	Saline

a : L ; live vaccine, K ; killed vaccine

b : OA ; oral administration, IM ; intramuscular injection

37°C에서 2시간 반응시키고 5°C에서 24시간 방치한 후 응집여부를 판독하였다.

5. 면역조직화학적 관찰

백신접종군과 대조군에서 소장의 회장부위를 IgG에 대한 면역원성세포를 관찰하기 위하여 3주령 자돈의 회장조직을 10% 중성포르말린용액에 고정시킨 후 일반표본제작법에 의거하여 조직을 제작하였으며 avidin-biotin complex 방법²³⁾을 이용한 면역염색을 하였으며 광학현미경하에서 반응을 관찰하였다. 회장조직을 탈파라핀 및 함수과정을 거친후 endogenous peroxidase의 반응을 억제하기 위해 0.3% H₂O₂-Methanol로 30분간 반응시키고 0.1M PBS(pH 7.2)에 5분간 2회 수세한 후 실온에서 10% normal goat serum(Vector Co., U.S.A.)에 1시간 반응시켜 비특이성 염색반응을 최소화하였다. 1차 항체는 swine-IgG Goat(KPL, USA)를 0.01M PBS로 1 : 3000배 희석하여 4°C에서 24시간 반응시킨 뒤 0.01M PBS로 5분간 2회 수세하였다. 2차항체로는 biotinylated anti-goat IgG (Vector Co, USA)로 실온에서 1시간 반응시키고 0.01M PBS로 10분간 2회 수세하였다. 3차항체로는 avidine-biotinylated horse reddish peroxidase conjugated complex(Vector Co, USA)를 실온에서 1시간 반응시키고 0.01M PBS 수세한 후 갈색반응을 띄게하는 3, 3'-diaminobenzidine 4HCl(Sigma Co)에 10분 내외

로 발색시키고 0.01M PBS로 수세한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하고 탈수와 투명화 과정을 거친 후 glycerin-PBS로 봉입하였다.

결 과

1. 설사포유자돈으로부터 대장균의 분리·동정

포유자돈의 설사변에서 분리된 세균 66주중 62주가 *E coli*로 동정되었고, 생화학적 성상은 indole(+), citrate(-), arabinose(+), glucose (+), urea(-), sorbitol(+), esculine (-), lysine decarboxylase(+), β-glucuronidase(+))를 나타내었으며, 분리세균중 6주(9.7%)는 SBA에 용혈성을 나타내었다(Table 2).

2. 분리세균의 혈청학적 동정

E coli 62주 중에서 K88 pilus가 6주(9.7%), K99 pilus가 4주(6.5%)로 동정되었다(Table 3).

3. Pilus의 유무시험

K88 pilus 및 K99 pilus 항원을 갖는 *E coli* 균주의 MRHA시험결과 K88 항원은 1 : 2~1 : 8배, K99 항원은 1 : 4~1 : 16배의 MRHA를 나타내었고, SDS-PAGE에 의해 분리·정제된 K88 pilus의 분자량은 27,500Da이었으며, K99 pilus는 18,500Da으로 확인되었다(Photo 5).

Table 2. Biochemical properties of 62 *E coli* isolated from piglets showing diarrhea

Test	Isolated strains
	Positive(%)
Indole	100
Methyl-red	100
Voges-proskauer	0
Simmon's citrate	1.6
Hydrogen sulfide	0
Urease	100
MUG(β -glucuronidase)	100
Esculin	0
Gelatin	0
Motility	88.7
Hemolysis(sheep RBC)	9.7
Lysine decarboxylase	98.4
Arginine dihydrolase	0
Ornithine decarboxylase	40.3
Glucose acid	100
Gas	100
Lactose	100
Mannitol	100
Inositol	0
Sorbitol	100
Rhamnose	98.4
Sucrose	87.1
Melibiose	98.4
Amygdalin	1.6
Arabinose	100
Cytochrome-oxidase	0

Table 3. Serotyping of *E coli* isolated from piglets showing diarrhea

O antigen	No. of strains isolated	Pilus antigen		
		K88	K99	Others
O147	8(12.9)	4	—	4
O9	6(9.7)	—	—	6
O101	6(9.7)	—	3	3
O27	5(8.1)	1	1	3
O158	2(3.2)	1	—	1
O15	4(6.5)	—	—	4
O164	2(3.2)	—	—	2
Nonidentified	29(46.7)	—	—	—
Total	62(100)	6(9.7)	4(6.5)	23(37.1)

4. 분만모돈의 돈유항체역가

분만 4주전에 생균백신을 경구투여하고, 분만 2주전에 사균백신을 근육주사한 실험 I 군의

초유항체가는 1 : 512~1 : 1,024였으며, 분만 4주전 및 2주전에 사균백신을 근육주사한 실험 II 군은 1 : 256~1 : 512였고, 대조군인 실험 III 군에서는 1 : 4~1 : 16으로 나타내었다. 돈유의 항체가는 실험 I 군과 실험 II 군이 실험 III에 비하여 높게 관찰되었다(Fig 1).

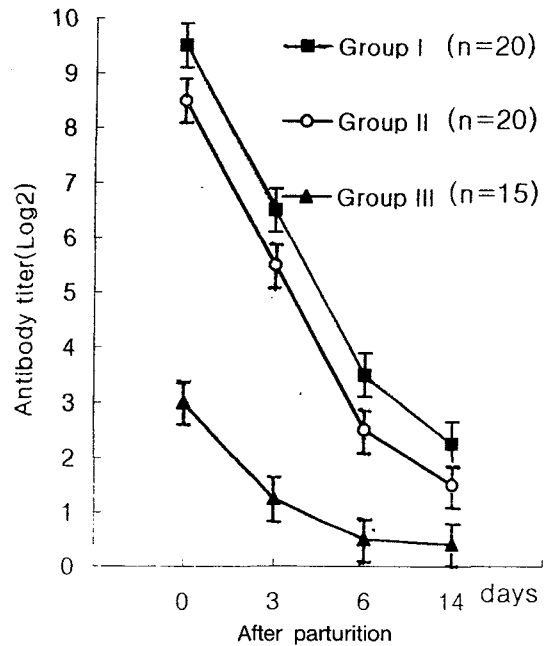


Fig 1. Agglutinin titers in milk from vaccinated(Group I and II) and nonvaccinated (Group III) sows

5. 포유자돈의 설사발생을 및 폐사율

백신투여군과 대조군의 모돈에서 태어난 포유자돈의 설사발생을 이유시까지 관찰한 결과 설사발생율은 실험 I 군이 가장 낮은 3.3%를 나타내었으며 폐사율도 없었고, 실험 II 군과 실험 III 군은 설사발생율이 각각 9.4% 및 21.4%를 나타내었으며, 폐사율도 각각 1.0% 및 6.9%였다. 연령에 따른 설사발생율은 백신접종을 실시한 실험 I 군과 실험 II 군은 1주령에 1.4% 같은 결과였으며, 2주령에는 각각 1.6% 및 5.2%였다. 그리고 실험 III 군은 1주령에서 8.8%, 2주령에서 6.3%로 나타나 가장 설사빈도가 높았다(Table 4).

6. 면역조직화학적 소견

E coli 자가백신을 실시한 후 모돈에서 태어난

Table 4. Incidence of diarrhea and death in piglets according to age

Group	No of piglets	Incidence of diarrhea(wk)					Death (%)
		1	2	3	4	Total(%)	
I	209	3	3	1	-	7(3.3)	-
II	192	3	10	5	-	18(9.4)	2(1.0)
III	159	14	10	9	1	34(21.4)	11(6.9)

포유자돈을 3주령에 부검하여 소장조직의 면역조직표본을 제작하여 경검한 결과 회장의 점막부위에서 anti-IgG 항체에 대한 면역반응 세포가 다수 관찰(Photo 1, 2)되어 대조군(Photo 3, 4)과는 현저한 차이가 있었다.

고 찰

설사를 일으키는 포유자돈변에서 분리된 대장균은 모두 IMViC시험결과 표준균주의 성상과 같았으며, H₂S, urea, gelatin, esculin 시험에서는 표준균주에서와 같이 분리균 모두가 음성반응을 나타내었고, lysine decarboxylase, β-glucuronidase에서 양성반응을 나타내어 분리세균과 표준균주간에 차이가 없었다. lactose의 9종의 당분해 시험결과 분리균 모두가 표준균주와 비슷한 성상으로 최종 ViteK system을 이용하여 동정한 결과 62주가 *E coli*로 확인되었다^{24,25)}. 자돈의 설사증을 일으키는 *E coli*의 O혈청형, 독소생성 및 pilus 항원과 관련하여 Gastra와 de Graaf¹⁾는 K88 pilus 항원을 가진 *E coli*는 O45, O138, O141, O147, O157 이고 K99 pilus 항원을 가진 *E coli*는 O64, O101로 보고하였으며, 윤 등²⁰⁾은 162주의 대장균중 O101 : K99 항원을 가진 *E coli*는 6주(3.7%) 및 O157 : K88 항원을 가진 *E coli*가 6주(3.7%)를 분리하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 62주의 *E coli*중 O101 : K99 항원 3주(4.8%), O27 : K99 항원 1주(1.6%) 및 O147 : K88 항원 4주(6.5%) O27 : K88 항원 1주(1.6%), O158 : K88 항원 1주(1.6%)로 매우 다양한 혈청형 분리를 나타내어 비교할 수는 없지만, O101 : K99는 윤 등²⁰⁾의 결과보다 다소 높았다. 이는 설사원인체의 지역적 분포, 검사

시료수 및 낮은 위생환경등에 기인되고, 지역별 및 농장별 pilus 항원을 가진 *E coli*의 혈청형은 매우 다르므로 산업용 표준백신균주로서 제조된 대장균 백신을 야외적용시 만족할만한 효과를 거두기 어렵다고 생각된다. 윤 등²⁰⁾은 K99 pilus 항원의 증명을 위해서 말 적혈구응집능을 조사한 바 1 : 8~1 : 64이었고, Jones와 Ruffer¹²⁾는 K88 pilus 항원을 증명하기 위해서 기니픽 적혈구응집능으로 조사한 바 1 : 32였다. 본 실험에서는 K88 pilus 항원 및 K99 pilus 항원의 MRHA시험결과 1 : 2~1 : 8 및 1 : 4~1 : 16으로 낮은 수준을 나타내었다. 이는 배지조성 성분 및 실험대상균주들 간의 차이라고 생각된다. 대장균설사증의 분리세균으로 생균백신과 사균백신을 제조하여 임신모돈에 생균백신을 분만4주전 경구투여한 후 다시 분만2주전 사균백신을 근육주사한 실험 1군의 초유항체가는 1 : 512~1 : 1,024였고, 사균백신만 분만 4주전과 2주전 접종한 실험 II군은 1 : 256~1 : 512, 대조군인 실험 III군은 1 : 4~1 : 16으로 나타내었다. 윤 등²⁰⁾은 분만 5~6주전과 2주전 사균백신 3ml 근육주사한 실험군의 초유중 항체가가 1 : 640~1 : 4,500였다고 보고하였다. 이 결과로 본 실험 II군과의 비교에서 차이를 나타내었는데 이 차이는 백신제조균주와 접종용량이 다르기 때문이라고 생각된다. 또한 본 실험의 결과 중 실험 I군과 실험 II군과의 결과 차이는 실험 I군은 생균백신 경구 투여한 후 사균백신을 접종하였고, 실험 II군은 사균백신만 접종하였기 때문에 실험 I군이 높은 항체가를 나타내었다. 여기서 생균백신을 분만4주전 임신모돈에 경구투여한 후 임상소견을 관찰한 바 특히 증상은 발견할 수 없었으므로 김 등²⁷⁾의 결과와도 일치하였다. 대장균 자가백신의 효능에 대하여 백신접종한 모돈에서 태어난 포유자돈 및 대조군의 포유자돈에서 설사발생율을 조사한 바, 김 등²⁷⁾은 자가생균백신만 1회 경구접종한 백신군에서 1주령과 2주령에 설사발생율은 1.6% 및 4.7%였으며, 대조군은 1주령과 2주령에 10.7% 및 15.7%였다고 하였다. 본 실험에서는 백신접종군과 대조군에서 태어난 포유자돈에서 실험 I군은 설사발생율이 3.3%이고 폐사율은 없었으며, 실험 II군은 설사발생율이 9.4%이고 폐사율이 1.0%였다. 실험 III군은

군은 설사발생율이 9.4%이고 폐사율이 1.0%였다. 실험 III군은 설사발생율 21.4%이고 폐사율은 6.9%를 나타내었다. 이를 연령별로 조사한 바 실험 I군은 1주령과 2주령에 1.4%로 같은 결과였고, 실험 II군은 1주령과 2주령에 1.6% 및 6.3%였으며, 실험 III군은 1주령과 2주령에 8.8% 및 6.3%를 나타내었다. 실험 I군의 1주령과 2주령 및 대조군 1주령과 2주령에서 설사발생율은 낮은 수준을 나타내었다. 이는 백신접종 2회로 booster효과 및 사육환경, 초유의 유질 등에 의한 것으로 생각된다. 특히 본 실험의 실험 I군과 실험 II군과의 비교에서 설사발생율 및 폐사율은 실험 I군이 현저히 낮은 수준을 나타내었다. 이는 백신접종 방법에서 생균백신을 경구투여한 효과이다. 그러므로 백신접종방법에 있어서 생균백신 경구투여한 후 사균백신을 근육주사 하는 것이 효과적이라고 생각된다. 대장균 자가백신은 생물학적 제제로서 ETEC의 K88 pilus 항원 및 K99 pilus 항원에 의한 대장균설사증에 대한 면역을 자극시켜 방어기전을 형성한다. 본 실험에서 대장균 자가백신접종된 모돈에서 태어난 포유자돈 소장의 회장부위에 분포되어 있는 세포에서 anti-IgG 항체에 면역반응을 보이는 세포가 다수 관찰되었다. 이러한 국소면역 및 전신면역형성기전으로 경구투여와 근육주사를 한 후 대식세포 및 림프구의 반응으로 B세포가 분화하여 immunoglobulin(Ig)형성을 유도하게 된다^{18,28-30}. 또한 생균백신 경구투여는 점막면에 효과적인 면역(S-IgA)을 유도한다. 앞으로는 돼지농장마다 혈청형별 pilus항원의 구조가 다르기 때문에 농장 세균주 유래 pilus를 혼합하여 대장균 자가백신을 제조한 후 생균백신과 사균백신의 접종방법을 응용할 경우 자돈에서의 대장균설사증을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

포유자돈의 설사분으로부터 분리된 *E coli*로 자가백신을 제조하여 임신모돈에 접종한 후 모돈과 포유자돈에서의 효능에 대한 초유내 항체가, 포유자돈의 설사발생율 및 폐사율조사와 포유자돈 회장에서 IgG-immunoreactive 세포를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 설사 포유자돈으로부터 분리된 *E coli*는 62주로, 이 중 K88 pilus가 6주(9.8%), K99 pilus는 4주(6.5%)가 분리되었고, 분자량은 K88이 27,500Da, K99가 18,500Da이었다.

2. 분만모돈의 초유항체는 생균백신과 사균백신을 접종한 실험 II군은 1:512~1:1,024이었고, 사균백신만 접종한 실험 II군에서는 1:256~1:512, 대조군은 1:4~1:16이었다.

3. 포유자돈의 생균백신과 사균백신을 접종한 실험 II군은 설사발생율이 3.3%이고, 폐사율은 없었으며, 사균백신만 접종한 실험 II군은 설사발생율 9.4%이고, 폐사율은 1.0%였다. 대조군은 설사발생율이 21.4%, 폐사율은 6.9%이었다.

4. 백신접종된 모돈의 포유자돈은 회장의 점막층에서 백신접종을 하지않은 모돈의 포유자돈 회장점막층보다, anti-IgG 항체에 대한 면역반응세포가 현저하게 다수 관찰되었다.

Legends for Photos

Photo 1. Ileum of 3 week-old piglet in live and killed vaccinated group. High portion of IgG-immunoreactive cells (arrows) in the mucosa and submucosa was observed. ABC immunoperoxidase staining($\times 100$).

Photo 2. Higher magnification of Photo 1. High portion of IgG-immunoreactive cells(arrows) in the Peyer's patch was observed. ABC immunoperoxidase staining($\times 400$).

Photo 3. Ileum of 3week-old piglet in nonvaccinated group. Low portion of IgG-immunoreactive cells in the mucosa and submucosa was observed. ABC immunoperoxidase staining($\times 100$).

Photo 4. Higher magnification of Photo 3. Low portion of IgG-immunoreactive cells in the Peyer's patch was observed. ABC immunoperoxidase staining($\times 400$).

Photo 5. SDS-PAGE of *E coli* pili
Lane 1, 8 : k88, Lane 2, 7 : K99,
Lane 3, 6 : 987P, Lane 4, 5 : F41

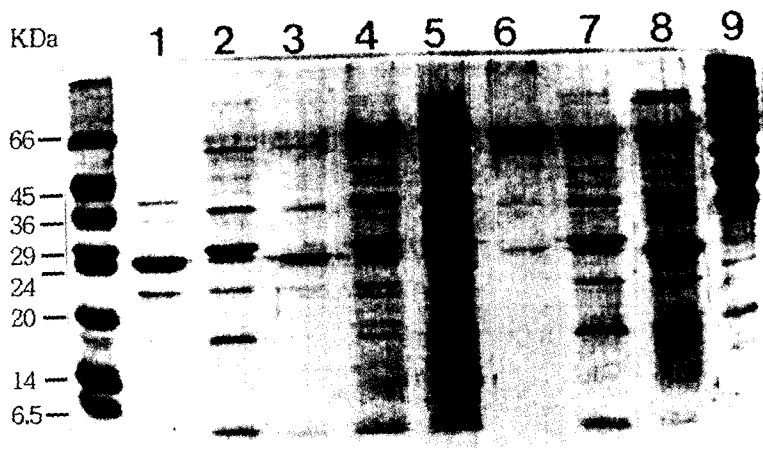
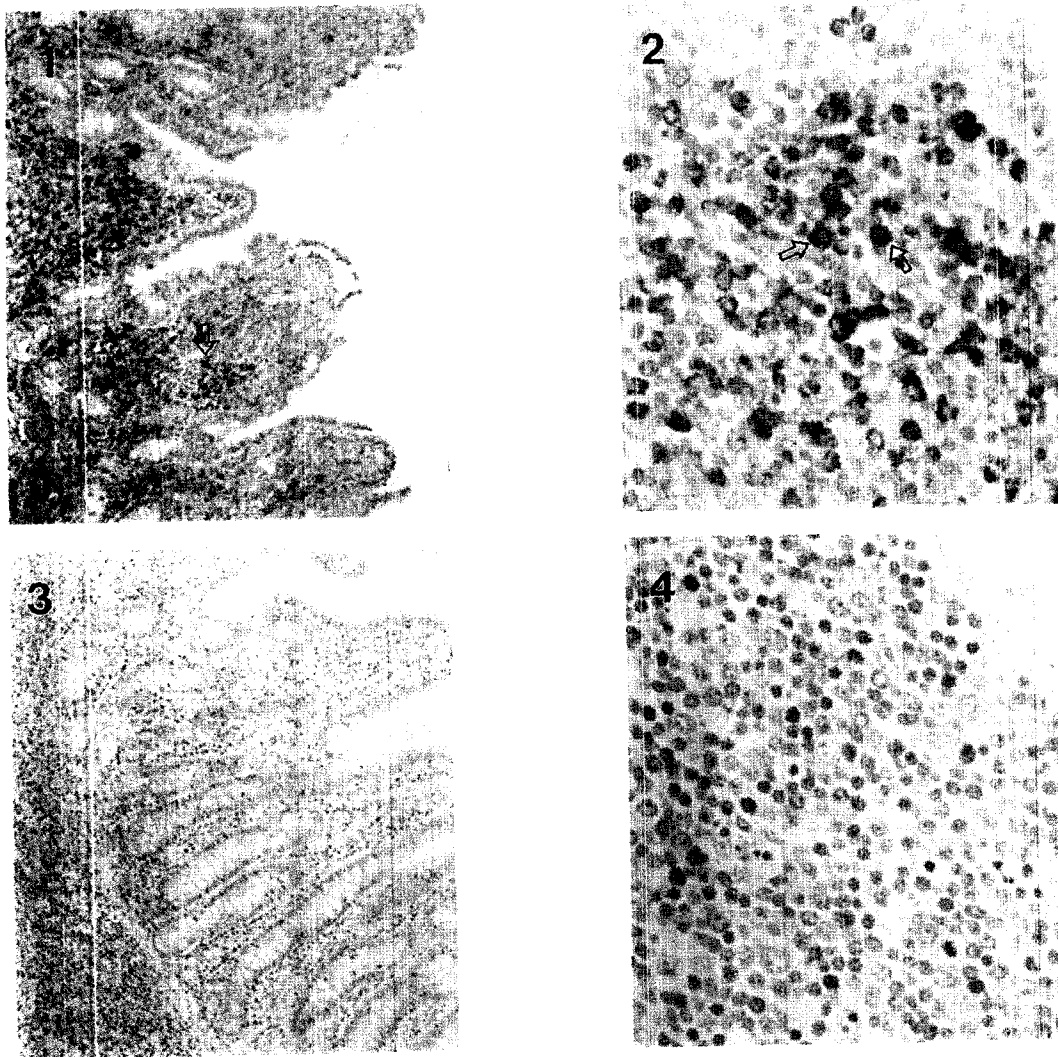


Photo 5. SDS-PAGE of *E. coli* pili

참고문헌

1. Gaastra W, Graaf FK. 1982. Host-specific fimbria adhesin of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Am J Microbiol* 46 : 129~161.
2. Levine MM. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent, *J Infect Dis* 55 : 377~379.
3. Nagy LK, Mackenzie T, Bharucha Z. 1976. *In vitro* studies on the antimicrobial effects of colostrum and milk from vaccinated and unvaccinated pigs on *Escherichia coli*, *Res Vet Sci* 21 : 303~308.
4. Nagy LK, Bhogal BS, Mackenzie T. 1976. The effect of colostrum or past colibacillosis on the adhesion of *Escherichia coli* to the small intestine of the pig, *Res Vet Sci* 21 : 303~308.
5. Mainil JG, Bex F, Pohl P, et al. 1990. Prevalence of four enterotoxin(STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit(K 99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am Vet Res* 51 : 187~190.
6. Sellwood R. 1982 *Escherichia coli*-associated porcine neonatal diarrhea : Antibacterial activities of colostrum from genetically susceptible and resistant sows. *Infect Immun* 35 : 396~401.
7. Denrke CF, McGowan K, Larson AD. et al. 1984. Attachment of human and pig(K 88) enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to either human or porcine small intestinal cells, *Infect Immun* 45 : 522~524.
8. Morris JA., Thorns CJ, Wells GAH, et al. 1976. The production of F41 fimbriae by piglet strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack K88 K99 and 987P fimbriae, *J Gen Microbiol* 129 : 2753~2759.
9. Salit IE, Vavougiou J, Hofmann T. 1983. Isolation and characterization of *Escherichia coli* pili from diverse clinical sources, *Infect Immun* 42 : 755~762.
10. Guinee PAM, Veldkamp J, Jansen WH. 1977. Improved minca for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 15 : 676~678.
11. Isaacson RE. 1977. K99 surface antigen of *Escherichia coli* : Purification and partial characterization. *Infect Immun* 15 : 272~279.
12. Jones GW, Rutter JM. 1974 The association of K88 antigen with hemagglutination activity in porcine strains *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 84 : 135~144.
13. To SC, Moon HW, Runnels PL. 1984. Type I pilus(F1) of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* : Vaccine trial and tests for production in the small intestine during disease, *Infect Immun* 43 : 1~5.
14. Yoshimatsu K, Yuyama Y, Ono E, et al. 1991. New methods for isolation of K99 fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Vet Med Sci* 53 : 1119~1121.
15. Chidlow JW, Porter P. 1978 The role of oral immunisation in stimulating *Escherichia coli* antibody of the IgM class in porcine colostrum, *Res Vet Sci* 24 : 254~257.
16. Sarmiento JI, Dean EA, Moon HW. 1988. Effects weaning on diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in three-week-old pigs, *Am J Vet Res* 49 : 2030~2034.
17. Moon HW, Rogers DG, Rose R. 1988. Effects of an orally administered live *Escherichia coli* pilus vaccine on duration of lacteal immunity to enterotoxigenic *Escherichia coli* in swine, *Am J Vet Res* 49 : 2068~2072.

18. Moon HW, Bunn TO. 1993. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine* 11 : 213~220.
19. Klipstein FA, Engert RF, Clements J. 1982. Development of a vaccine of cross-linked heat stable and heat labile enterotoxins that protects against *Escherichia coli* producing either enterotoxin. *Infect Immun* 37 : 550~557.
20. 윤용덕, 김종만, 김동성. 1984. 자돈의 대장균성 설사증에 관한연구. 1. 설사자돈으로부터 분리된 병원성 대장균의 혈청형 분포조사. 2. 자돈의 대장균성 설사증 백신개발, 농시보고 26 : 66~79.
21. Biehl LG, Hoefling D. 1986. Diagnosis, treatment, and prevention of diarrhea in 7- to 14-day-old pigs. *J Vet Med Javma* 88 : 1144~1147.
22. Qrskov I, Qrskov F, Jann B. et al. 1977. Serology, chemistry and genetics of O and K antigen of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* 41 : 667~710.
23. Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75 : 734~738.
24. Coates SR, Hoopes KH. 1979. Sensitivities of *Escherichia coli* isolated from bovine and porcine enteric infections to antimicrobial antibiotics. *Am J Vet Res* 41 : 1882~1883.
25. Krumperman PH. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol* 46 : 165~170.
26. 윤용덕, 김종만, 고경원 등. 1988. 병원성 대장균의 K99 pilus유전자 크로닝에 관한 연구. 농시보고 30 : 1~13.
27. 김봉환, 김동성, 이창구. 1981~2. 자돈의 병원성 대장균증에 관한연구. 1. 양돈농가실내 설사자돈에서 분리한 대장균의 성장조사. 2. 설사자돈으로부터 분리한 대장균의 혈청형 동정. 3. 임신모돈에 대한 대장균 생균백신의 경구투여가 자돈의 대장균설사병 예방에 미치는 영향, 대한수의학회지 21 : 81~89, 22 : 155~159.
28. Sasaki T, Maede Y, Namioka S. 1987. Immunopotential of the mucosa of the small intestine of weaning piglets by peptidoglycan. *J Vet Sci Jpn* 49 : 235~243.
29. Terpstra C, Kroese AH. 1996. Potency control of modified live viral vaccines for veterinary use. *Vaccine* 14 : 13~18.
30. Demicheli V, Jefferson T. 1996 Economic aspects of vaccination. *Vaccine* 14 : 941~943.