

난황항체를 이용한 돼지 대장균설사증 방제기법 개발

II. 난황항체의 돼지 대장균증에 대한 치료효과

김종만 · 우승룡 · 권창희 · 김종엽 · 허 원*

국립수의과학검역원

대성미생물연구소*

(1998년 8월 18일 접수)

Development of preventive method for enterotoxigenic colibacillosis using egg yolk antibodies

II. Therapeutic effect of egg yolk antibodies against colibacillosis of piglets

Jong-man Kim, Seng-ryong Woo, Chang-hee Kweon, Jong-yeom Kim, Won Huh*

National Veterinary Research and Quarantine Services

*Dae Sung Microbiological Laboratory**

(Received Aug 18, 1998)

Abstract : The present study describes the effectiveness of egg yolk antibodies (IgY) against enteric colibacillosis and edema disease in piglets. The antibodies were gained from the egg yolk of hens immunized with k88, k99, 987p fimbrial adhesin and heat-labile toxin antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Orally-administered egg yolk antibodies solution protected against experimental challenge with ETEC K88⁺ and k99⁺ strains in neonatal piglets and mice. In field trial, a total of 598 diarrheal piglets were orally treated with 3ml of antibody once a day to determine for the therapeutic effect. Of them, 582 (97.3%) piglets were recovered from diarrhea in 3 days. We also experimentally treated with the egg yolk antibodies twice a day for 5 consecutive days for 94 weaning piglets with edema disease for the determination of therapeutic effects. Seventy four piglets (78.7%) were recovered from clinical edema signs. These findings indicate that egg yolk antibodies against k88, k99, 987p and LT of ETEC are useful source of passive immunity for enteric colibacillosis and edema disease of piglets.

Key words : egg yolk antibody, *Escherichia coli*, fimbriae and heat labile toxin, colibacillosis, edema disease.

서 론

장관독소원성 대장균(*enterotoxigenic E coli*)은 포유기 및 이유기자의 대장균설사증에 가장 흔한 원인체로서 이들의 병원성 인자는 대장균이 장관상피세포에 부착, 증식할 수 있게 하는 F4(k88), F5(k99), F6(987p) 등의 섬모(*fimbriae/pilus*)와 염소이온 등의 분비촉진으로 설사를 유발하는 장관독소(*heat-stabile enterotoxin ST, heat-labile enterotoxin LT*)이다^{1,2}. 이들 장관독소원성 대장균은 소장 상부에서 주로 작용하게 되며 따라서 이들에 대한 효과적인 방제대책은 이 국소부위에 고역가의 항체를 적용하여 대장균의 장점막부착을 억제하고 분비된 장관독소를 중화시키는 것이다. 이러한 대책의 일환으로 지금까지 임신모돈에 *fimbriae* 단독 또는 LT첨가 정제항원으로 만든 백신을 접종하여 초유를 통해서 항체를 자돈에 공급하는 방법을 주로 이용하여 왔다³⁻⁵. 그러나 유즙을 통한 수동면역은 모돈의 면역능, 초유항체의 급속한 감소 및 섭취불량 등에 따라 다양한 결과를 나타낼 수 있으며 이러한 문제점을 해결하기 위하여 필요한 시기에 고역가의 항체를 지속적으로 공급할 수 있는 유즙대체 수동면역방법이 모색되어 왔다. 이중 최근에 가장 많이 연구되고 있는 것이 산란기에 백신을 접종하여 생산한 난황으로부터 항체를 분리하여 이용하는 방법이다^{6,7}. 연자들은 병원성 대장균으로부터 k88, k99, 987p 및 LT를 순수분리, 정제하여 만든 *subunit* 백신의 산란기에 대한 면역원성 및 항체지속성, 난황으로부터 분리한 특이면역글로브린(IgY)의 역가 등에 대한 연구결과를 보고한 바 있다.

본 연구에서는 개발한 난황항체의 실험동물과 목적동물인 아의 설사자돈에 대한 치료, 예방효과 및 부종병에 대한 치료효과를 시험하고자 하였다.

재료 및 방법

공시동물 : 병원성 대장균 공격접종에 대한 난황항체의 방어효과를 조사하기 위하여 임신말기의 백색 랜드 레이스 2두를 구입하여 분만한 자돈을 공시하였고, 마우스는 체중 15~20g의 백색 ICR 마우스를 사용하였다. 설사병 및 부종병 치료시험을 위한 포유 및 이유자돈을 강원, 경기, 충청지역의 3개 양돈장 및 1개 양돈단지의 발

병자돈 598두를 대상으로 실시하였다.

공시난황항체 : *Fimbriae* 항원 생산을 위해서는 *Minca medium, heat labile toxin(LT)*을 생산하기 위해서는 *Casamino acids yeast extract broth(CAYE broth)*에 대장균을 배양하고 그 배양물로부터 k88, k99, 987p 및 LT를 분리정제, 혼합하여 *subunit* 백신을 조제하였다. 이 시험백신을 산란기에 접종하여 고도면역시킨 후 얻어진 난황으로부터 항체만을 추출하여 멸균여과한 액체상태로 시험에 공시하였다. 공시 난황항체의 각 항원별 ELISA 항체가(면역난황항체 추출물 OD/대조난황 추출물(OD))는 k88은 1:320배로, 난황을 희석하였을 때 2.280/0.508, k99는 1:1,280배로 각각 희석하였을 때 3.003/0.685, 987p는 1:320배에서 2.822/0.312 그리고 LT는 1:320배로 희석하였을 때 2.847/0.782로서 전체적으로 10배를 기본희석배수로 하여 2진 희석하였을 때 면역난황추출물과 대조난황추출물의 OD치는 약 5단계(32배) 정도의 차이가 있는 것을 공시하였다.

난황항체의 마우스 방어효과 조사 : 공시마우스 60수를 난황투여군 40수, 무투여대조군 20수로 나누고 난황투여군에 공시 난황항체 0.3ml를 복강내로 접종하였다. 난황접종 24시간후에 *Minca broth*에 진탕배양한 k88, k99 *fimbriae* 양성 대장균을 균농도를 *MacFarland scale no. 1*으로 조절하여 각 0.3ml를 *fimbriae*별로 난황투여군과 대조군 마우스에 복강으로 공격접종하고 5일간 사육하면서 생존수를 조사하였다.

신생자돈 공격접종에 대한 방어효과 조사 : 2두의 모돈에서 분만한 자돈 중 1복 9두는 난황항체 예방시험군, 나머지 1복의 9두는 치료시험군으로 하여 시험하였다. 예방시험군 자돈 9두중 3두는 대조군으로 하고 나머지 6두에 분만일부터 공시 난황항체 3ml씩을 1일 1회, 3일간 경구투여하고 *MacFarland scale no. 1*으로 농도조절한 k88, k99 *fimbriae* 양성대장균 혼합액(6×10^9 cfu/ml) 2ml를 경구로 공격접종하고 7일간 설사발생 및 폐사수를 조사하였다. 2일령의 치료시험군 자돈 9두중 3두의 대조군과 나머지 6두의 시험자돈에 앞에서와 같은 공격균액 2ml를 경구로 공격접종하여 설사를 유발시킨 후에 시험자돈 6두에 공시난황 3ml을 1일 2회(오전, 오후) 3일간 경구로 투여하면서 7일간 설사증식 및 생존수를 조사하였다.

아의 자돈에 대한 설사병 치료, 예방효과 조사 : 98년 4월부터 7월 사이에 강원 양구/춘천의 1개 양돈장과 1개

양돈단지, 경기 성환 1개 양돈장, 충남 천안의 1개 양돈장의 세균성 설사발생 포유자돈 598두를 대상으로 공시난황항체를 1일, 1회 3ml씩 3일간 경구로 투여하면서 설사치료효과를 조사하였다.

부종병 치료시험 : 충남 천안의 부종병이 지속적으로 발생하고 있는 양돈장의 이유자돈(35~40일령) 94두를 대상으로 공시난황을 1일 1회 5ml씩 5일간 경구로 투여하면서 부종병 치료효과를 조사하였다.

결 과

마우스에서 병원성 대장균 공격접종에 대한 예방효과 : 난황항체를 복강으로 투여한 후 24시간에 fimbriae type 별 대장균을 복강으로 공격접종하고 5일간 관찰한 결과 대조군 마우스는 fimbriae type에 관계없이 24시간내에 100% 폐사하였으나 난황투여군중 k88 대장균으로 공격

접종한 마우스 20수중 17수(85.0%), k99 대장균으로 공격접종한 마우스는 20수중 19수(95.0%)가 생존하여 높은 방어효과를 보였다(Table 1).

병원성 대장균 공격접종에 대한 난황항체 투여자돈의 치료, 예방효과 : 난황항체 치료시험을 위하여 초유를 급여한 1일령 신생자돈에 병원성 대장균(k88, k99) 배양액 2ml를 경구로 공격접종하고 18~24시간후 설사가 발생한 9두중 3두를 무치치 대조군으로 하고 나머지 6두에 공시난황액 3ml를 1일 2회 3일간 경구투여한 결과 난황투여군 6두중 2두(33.3%)는 설사가 지속되면서 2일후에 폐사하였고 4두(66.6%)는 3일후부터 설사가 완화되면서 5일후에 완치되었으나 대조군 3두(100%)는 공격접종 1~2일후 모두 폐사하였다. 난황항체의 예방효과를 보기 위하여 1일령 자돈 9두중 3두의 대조군을 제외하고 6두에 1일 1회 3ml의 공시난황항체를 3일간 경구투여한 후 치료시험에서와 같이 공격접종하고 관찰한 결과 대조군 3두는 공격접종후 24시간내에 3두(100%) 모두가 폐사한 반면 난황항체를 투여한 6두중 4두(66.6%)는 설사발생 없이 내과 생존하였으나 2두(33.3%)는 설사발생과 함께 폐사하였다(Table 2).

야외자돈 치료효과 : 3개 지역 8개 양돈장의 대장균증을 주증으로(PED 등 바이러스성 설사증상이 있는 자돈은 제외)하는 세균성 설사자돈 598두를 대상으로 1일 1회 3ml씩 3일간 경구로 공시난황항체를 투여하고 치료효과를 관찰한 바, 치료 1일후 112두(18.7%), 2일후 318두(53.2%), 3일후 152두(30.6%)가 치료되어 전체적으로 582두, 97.3%의 치료효율을 나타내었고 16두(2.7%)에서는 치료효과를 볼 수 없었다(Table 3).

부종병 치료효과 : 대장균 설사병 치료시험중인 1개 양돈장의 이유자돈에서 다수의 부종병(전형적인 임상

Table 1. Protective effect of egg yolk antibodies in mice after challenge with enterotoxigenic *Eshcerichia coli* k88* and k99* strains

Group	Challenge strain	No. of mouse	Administration of egg yolk antibodies (route/treatment)	No. of mouse survived after challenge(%)
Admini- stration	k88	20	0.3ml(intraperi- tonial/24 hours before challenge)	17(85)
	k99	20		19(95)
Control	k88	10	-	0
	k99	10	-	0

Table 2. Preventive and therapeutic effects of egg yolk antibodies on newborn piglets after challenge with ETEC k88* and k99* strains

Group	No. of head	Challenge k88/k99	Administration of egg yolk antibodies	No. of diarrhea piglets	No. of dead piglets(%)
Treatment	6	2ml per oral	3ml/oral, for 3 days after challenge, 2 time	6	2(33.3)
Control	3	route	a day	3	3(100)
Prevention	6	"	3ml/oral, for 3 days before challenge	2	2(33.3)
Control	3			3	3(100)

Table 3. Clinical responses of diarrheal piglets treated with egg yolk antibodies against k88, k99, 987p and heat labile toxin

Pig farm	No. of piglets treated	Administration of egg yolk antibodies	No. of piglet recovered from diarrhea by treatment with egg yolk antibodies on day			
			1	3	5 day	Total(%)
A	48	Administration 3ml of antibody	12	15	21	48(100)
B	34	Once a day for 3 days	10	18	4	32(94.1)
C	19	"	6	11	0	17(89.5)
D	497	"	84	274	127	485(97.6)
Total	598	"	112(18.7)	318(53.2)	152(30.6)	582(97.3)

Table 4. Therapeutic effects of egg yolk antibodies against k88, k99, 987p and LT on edema disease of postweaning piglets

Trial	No. of piglets	Administration of egg yolk antibodies	No. of piglets recovered from edema signs	No. of dead piglets
First	19	Oral administration, 5ml of the extracts for 3-5 days	14(73.7%)	5(26.3%)
Second	75		60(80.0%)	15(20.0%)

및 부검소견과 균분리, 동정으로 확진)이 발생하여 시험적으로 난황항체 투여시험을 실시하였다. 부종병이 발생한 35~40일령의 이유자돈중 신경증상을 나타내는 등병증이 심한 자돈을 제외하고 발증초기의 이유자돈 94두에 공시난황항체를 1일 5ml씩 3~5일간 경구투여한 결과 74두(78.7%)가 회복되었으며, 20두(21.3%)는 폐사하였다 (Table 4).

고 찰

4P⁺ ETEC는 adhesin이라 불리는 fimbriae를 이용하여 소장 상부에 부착, 증식하면서 enterotoxin을 생성하여 설사를 일으키며 돼지의 일령이 많아질수록 장점막이나 점액층에 있는 fimbriae에 대한 receptor 손실로 대장균 설사에 대한 감수성이 감소하게 된다⁸⁻¹⁰. 마우스에서도 수유중인 신생마우스만이 장관감수성이 있어 경구로 대장균 공격접종시험을 많이 하고 있다¹⁰. 본 연구에서는 마우스에 난황항체와 공격균을 경구접종이 아닌 복강으로 접종하고 방어시험을 실시하여 경구접종에서와 유사한 치료, 예방효과를 확인할 수 있었는 바 경구투여에 따른

직접적인 장벽부착억제효과를 시험한 것은 아니었으나 복강내에서 공격접종대장균의 fimbriae나 LT 중화에 의한 방어효과를 손쉬운 방법으로 측정할 수 있었다.

목적동물에 대한 대장균 공격접종시험은 대상동물의 면역상태, 특히 fimbriae에 대한 receptor 유무¹¹, 초유섭취 여부, 위장에서의 불활화 정도, 공격균의 병원성, 저항성 및 투여량, 투여한 항체의 역가¹² 등에 따라서 결과가 다양하게 나타날 수 있다. 신생자돈을 대상으로 공격접종에 의한 설사발생 및 폐사에 대한 예방, 치료효과를 조사한 바 폐사수에서는 예방과 치료군이 유사하였으나 설사발생에서는 치료군의 6두(100%)보다 예방군이 2두(33.3%)로 월등히 적은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 예방군의 경우는 미리 투여한 항체에 의해 대장균의 장벽부착, 증식이 억제된 반면 치료군의 경우 공격접종 24시간후에 난황항체를 투여함으로써 그 사이에 증식한 대장균의 장독소 작용에 의한 장점막세포의 설사반응에는 영향을 줄 수 없었기 때문으로 사료되며, 이는 사람에게 대한 rotavirus 공격시험에서 공격접종후 난황항체의 투여시간의 간격이 클수록 방어효과가 낮았다는 보고³와 유사한 경향으로써 난황항체는 가능하면 질병초기

그리고 예방목적으로 사용하는 것이 효율성이 높을 것으로 사료된다. 그러나 무투여대조군에 비하여서는 난황투여 치료군의 폐사율과 설사에서의 회복율이 현저히 높은 것으로 볼 때 투여한 난황항체에 의해 균증식억제와 일부 생성된 LT의 중화효과가 있었을 것으로 추정된다. 경구로 투여한 난황항체는 초유항체처럼 장에서 흡수되어 혈액으로 들어가며 반감기는 1.85일로 혈중 IgG의 반감기 12~14일보다 매우 짧다¹⁴. 비록 혈중항체가 높아도 장점막의 국소면역에는 영향을 주지 못하며 따라서 소장 상부에서 주로 병원성을 발휘하는 대장균 설사병에 효율적으로 대처하려면 항체공급은 장점막 국소부위에서 병원체와 적절히 작용할 수 있는 충분한 양의 항체를 자주 공급하여야 한다고 하였다¹³⁻¹⁵. 본 연구의 야외 설사자돈에 대한 치료시험에서도 1회 투여에서는 현저한 치료효과를 볼 수 없었으나 2-3회 연속투여후 90% 이상의 현저한 치료효과를 나타내었으며 이는 난황항체가 장벽에 지속적으로 작용한 결과로 생각되며 앞으로 난황항체의 임상적용에 참고하여야 할 사항으로 사료된다.

이유기 자돈에서 주로 발생하는 부종병은 이유후의 각종 환경변화 및 스트레스 등의 발병요인과 함께 F18 fimbriae를 갖고 VTc 독소를 생성하는 병원성 대장균의 급격한 증식에 의하여 일어나며 이 독소가 혈관으로 흡수되어 혈압상승과 소동맥을 손상시켜 부종이 일어나게 된다¹⁶⁻¹⁸. 따라서 임상증상이 발생한 부종병에 대해서는 적당한 치료법이 지금까지 없는 것으로 알려져 왔다. 본 연구에서 대장균성 설사병과 부종병이 많이 발생하고 있는 양돈장의 부종병 초기 환돈에 대장균 난황항체를 투여한 결과 70~80%의 치료효과를 보였다. 이같은 부종병원인체가 아닌 대장균 설사병 난황항체의 부종병 치료효과는 부종병의 주요 혈청형인 0138, 0139, 0141은 설사병 원인체이기도 하기 때문에 toxin과 fimbriae type은 달라도 polyspecific antibody에 의하여 교차방어를 나타낼 수 있을 것으로 사료되며 이러한 추론은 Davis *et al*¹⁶이 부종병원인 용혈성 대장균과 비병원성 대장균의 배양추출물의 soluble antigen이 agar-gel diffusion test에서 교차반응하였다는 보고에서도 유추할 수 있으나 보다 정확한 교차방어 효과에 대하여는 좀더 연구되어야 할 것이다.

결 론

가축의 대장균 설사병의 효율적 방제를 위하여 개발한 k88, k99, 987p 및 LT에 대한 난황항체의 실험동물 및 야외자돈에 대한 설사병과 부종병 치료, 예방효과시험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

실험실내에서 실시한 마우스 및 신생자돈에 대한 병원성 대장균(k88/k99) 공격집중시험에서 난황항체는 우수한 예방 및 치료효과를 나타내었다. 설사를 하고 있는 야외양돈장의 포유자돈에 대한 설사병 치료시험에서 1회 투여시까지는 현저한 치료효과를 볼 수 없었으나 2-3회 투여후에는 90% 이상의 완치 또는 증상호전효과를 나타내었다. 부종병 초기증상이 있는 이유자돈에 난황항체를 경구로 투여한 바 설사병 치료효율보다는 낮았지만 70~80%의 양호한 치료결과를 얻었으나 병이 진행되어 증상이 심한 경우에는 뚜렷한 치료효과를 볼 수 없었다.

참 고 문 헌

1. Schneider RA, Sam CM To. Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains that express k88 and 987p pilus antigens. *Infect Immun*, 36:417-418, 1982.
2. Sam CM To. F41 antigen among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strains lacking k88, k99 and 987p pili. *Infect Immun*, 43:549-554, 1984.
3. Bianchi ATJ, Scholten JW, van Zuijdeveld AM, *et al*. Parenteral vaccination of mice and piglets with F4⁺ *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. *Vaccine*, 14:199-206, 1996.
4. Haan L, Holtrop M, Verweij WR, *et al*. Mucosal immunogenicity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin : role of the subunit. *Vaccine*, 14:260-266, 1996.
5. Nagy LK, Bhogal BS, Mackenzie T. The effect of colostrum or past colibacillosis on the adhesion of *Escherichia coli* to the small intestine of the pig. *Research in Veterinary Science*, 21:303-308, 1976.
6. Svendsen L, Crowley A, Ostergaard LH, *et al*. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Laboratory Animal Science*, 45:89-93, 1995.
7. Brown J, Resurreccion RS, Dickson TG, *et al*. The re-

- lationship of egg yolk and serum antibody. I. Infectious bursal disease virus. *Avian Disease*, 33:654-656, 1989.
8. Dean EA. Comparison of receptors for 987p pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* strain in the small intestines of neonatal and older pigs. *Infect Immun*, 58: 4030-4035, 1990.
 9. Runnels PL, Moon HW, Schneider RA. Development of resistance with host age to adhesion of k99⁺ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 28:298-300, 1980.
 10. Nagy B, Casey TA, Whipp SC, *et al.* Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. *Infect Immun*, 60:1285-1294, 1992.
 11. Ketyi I, Kuch A, Vertenyi A. Stability of *Escherichia coli* adhesive factors k88 and k99 in mice. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*, 25:77-86, 1978.
 12. Smith HW, Huggins MB. The influence of plasmid determined and other characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs. *J Med Microbiol*, 11:471-492, 1978.
 13. Ikemori Y, Kuroki M, Peralta RC, *et al.* Protection of neonatal calves against fetal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with k99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res*, 53:2005-2008, 1992.
 14. Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, *et al.* Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun*, 60:998-1007, 1992.
 15. Yokoyama H, Peralta RC, Sando S, *et al.* Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *Am J Vet Res*, 54:867-872, 1993.
 16. Jungling A, Wiedemann V, Kuhlmann R, *et al.* Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. *J Vet Med*, B38:373-381, 1991.
 17. Davis JW, Allen RC, Smibert RM. Studies on hemolytic *Escherichia coli* associated with edema disease of swine. I. Separation and properties of a toxin of hemolytic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res*, 736-740, 1961.
 18. Johansen M, Andresen LO, Jorsal SE, *et al.* Prevention of edema disease in pigs by vaccination with verotoxin 2e toxoid. *Can J Vet Res*, 61:280-285, 1997.
 19. Gordon VM, Whipp SC, Moon HW, *et al.* An enzymatic mutant of shiga-like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. *Infect Immun*, 60:485-490, 1992.