

난황면역제를 이용한 개 주요 소화기 및 호흡기질병 방제에 관한 연구

I. 개 보데텔라, 파보바이러스 및 개디스토펜퍼 항원의 닭에서의 면역반응

이희수* · 김종만 · 우승룡 · 정병열 · 조운상 · 탁동섭 · 임숙경 · 유한상¹
윤용덕² · 허 원³ · 문영식³ · 오진식²

국립수의과학검역원

¹서울대학교 수의과대학 및 농생명공학부

²녹십자수의연구소

³대성미생물연구소

(게재승인: 2004년 2월 20일)

Control of canine respiratory and diarrheal disease using egg yolk antibodies

I. Induction of antibody in hens immunized with combined antigens of *Bordetella bronchiseptica*, parvovirus and canine distemper virus

Hee-soo Lee*, Jong-man Kim, Seng-ryong Woo, Byeong-yeal Jung, Yun-Sang Cho,
Dong-seob Tark, Sook-kyoung Lim, Han sang Yoo¹, Yong-dhuk Yoon²,
Woo Huh³, Young-sik Mun³, and Jin-sik Oh²

National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-016, Korea

¹College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea

²Green Cross Veterinary Science Institute, Yongin 449-770, Korea

³Dae Sung Microbiology Laboratory, Uiwang 437-815, Korea

(Accepted: February 20, 2004)

Abstract : This study was carried out to produce IgY against *B. bronchiseptica*, parvovirus and distemper virus that are major pathogens in alimentary and/or respiratory diseases of dogs. In the comparison of adjuvants, ISA70 was the best in the rapid induction and maintenance of antibody titers. Agglutination antibody titers against *B. bronchiseptica* were 1:1,280 ~ 1:10,240 in sera and 1:160 ~ 1:1,280 in egg yolk. Hemagglutination inhibition(HI) titers against parvovirus in sera and egg yolk were 1:80 ~ 1:320 and 1:64 ~ 1:256, respectively. Virus neutralization titers against canine distemper was 1:8 ~ 1:64 in sera and egg yolk. These results suggested that egg yolk antibody titers could be variable according to a sort of adjuvant and antigens of the pathogens.

Key words : egg yolk antibodies, *B. bronchiseptica*, parvovirus, distemper virus, immune response

본 연구는 농림기술개발사업(관리번호 198010-3)에 의하여 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

*Corresponding author: Hee Soo, Lee

National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-016, Korea
[Tel: +82-31-467-1768, Fax: +82-31-467-1778, E-mail: leehsoo@nvrqs.go.kr]

서 론

개 파보바이러스 감염증은 심한 설사와 구토 및 높은 치사율이 특징이고, *Bordetella bronchiseptica*는 단독 또는 복합감염에 의해 tracheobronchitis와 kennel cough를 유발시키며, 개 디스토펙 바이러스는 호흡기, 소화기질환 및 신경증상과 높은 치사율을 유발시킨다 [1, 6, 12].

개 기관지폐렴균의 경우 항생제 등으로 어느 정도 치료가 가능하나 개 파보바이러스 및 디스토펙 감염의 경우 높은 폐사율로 인하여 개 사육농가의 막대한 피해에도 불구하고 뚜렷한 치료약제가 없는 실정이다. 더욱이 최근 가축질병의 치료 및 예방목적으로 사용되는 항균 물질의 오남용과 슈퍼박테리아 출현 등 항생제 내성균 문제가 사회적으로 부각되고 있는 상황에 난황항체는 아직까지 치료제가 없는 주요 바이러스성 질병방제에 효과적인 활용이 기대되며 안전성이 확보된 항생물질의 대용으로서 여러 연구자들에 의해서 연구되어 왔다 [2-5, 7-11, 13, 15, 18-20]. 특히나 포유류에서 항원성이 없거나 약한 항원일지라도 어미닭에서는 특이적인 항체생성이 가능하며, 닭에서 생성되는 IgY는 포유동물의 IgG와 교차반응이 없이 포유류 항원에 대해서 특이성이 높은 IgY 항체를 생성하는 것으로 보고되고 있다 [4, 10, 11, 17].

이와 같은 난황항체의 다양한 유용성에도 불구하고 병원의 닭에 대한 면역증강 및 난황으로부터의 항체 추출·정제 기술 미흡 및 투여방법 등 기술상의 문제로 실용화가 활발하지 못하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 개 주요 소화기, 호흡기질환 원인의 복합항원과 여러가지 adjuvant를 이용하여 시험백신을 제조하고 산란기에 면역접종시킨 후 닭 혈중 및 난황중의 항체가를 비교조사하여 최적 복합난황항체를 생산하는데 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

항원의 정제 및 조제

(1) 보데텔라균

균체 항원제조를 위하여 기관지폐렴 증상이 있는 개 가검물로부터 분리된 *Bordetella bronchiseptica* 분리균을 사용하였으며, 냉동보관중인 분리균을 blood agar에 1차 배양하고 다시 brain heart infusion(BHI, difco) broth에서 37°C, 18시간 배양한 후에 8,000 rpm, 30분간 원심분리하여 균을 집균하고 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)로 2회 세척하여 적당량의 PBS에 부유시킨 후, 2% formalin을 첨가하여 37°C에서 2일간 불활화시켰다. 8,000 rpm, 30분간 원심분리하여 PBS(pH 7.2)로 1회 세척하고 흡광도(optical density: OD)를 측정하여 균 농도를 조절

하였다. Dermonecrotxin(DNT) toxoid는 균을 BHI broth에서 37°C, 18시간 배양한 후에 8,000 rpm, 30분간 원심분리하여 균을 집균하고 PBS(pH 7.2)로 2회 세척하여 적당량의 PBS에 부유시켜 sonication으로 균을 파괴하였다. 이것을 8,000 rpm, 30분간 원심분리하여 상층액을 수집하고 BCA protein assay reagent kit(Pierce Co)를 이용하여 단백질 농도를 측정 한 후에 crude DNT로 하고 이것을 formalin으로 불활화하여 toxoid로 사용하였다.

(2) 개 파보바이러스

Seed virus는 KCPVC(녹십자수의약품보유)를 사용하였으며 세포단층이 80% 형성된 CRFK(crandell feline kidney) cell에 접종하고 4일간 배양한 후 80% cytopathic effect(CPE)가 보일 때 채득하여 동결을 2회 반복하여 항원으로 사용하였다.

(3) 디스토펙바이러스

개 디스토펙 바이러스를 종독으로 하여 7일령 SPF란의 장노막에 계란 1개당 0.2 ml 씩 접종하여 37°C에서 7일간 배양한 후 장노막만을 분리, 수집하여 homogenizer로 유제후 원심분리하여 상층액중의 바이러스를 SPF란을 이용하여 형성한 chicken embryofibroblast(CEF)에 접종하여 6일간 37°C에서 배양하고 세포변성이 80-90% 나타났을 때 채득하였다. 이 바이러스를 다시 단층이 형성된 MDCK cell에 접종하고 37°C에서 6일간 배양하면서 세포변성이 100% 나타났을 때 채득하여 MDCK cell에서 2회 계대한 다음 항원으로 사용하였다.

시험백신 제조 및 접종

시험백신의 항원은 개 기관지폐렴균의 경우 균체 항원은 410 nm 파장에서 흡광도 1.3의 농도로 조절하여 사용하였으며, crudeDNT 항원은 500 µg/ml의 농도를, 파보바이러스는 hemagglutination inhibition(HI) test 역가 2¹⁰의 농도를, 디스토펙 바이러스 MDCK cell에서의 바이러스역가 10^{8.1}TCID₅₀/ml 농도의 항원을 면역보좌제로서 Al(OH)₃ gel, ISA25 및 면역증강제와 freund's complete adjuvant(difco) 및 ISA70 등을 다양하게 사용하여 시험백신을 제조하였으며, 보좌제와 혼합된 시험백신의 경우는 근육접종을, 정맥주사시에는 항원만을 주사하였다. 1차 시험의 경우는 개 기관지폐렴과 파보바이러스 항원에 대한 항체 형성능을, 2차 시험의 경우는 개 디스토펙 바이러스를 추가한 혼합 시험백신에 대한 항체생성 양상을 조사하였다.

혈청분리 및 난황항체의 추출

백신접종전 및 접종후 2주 간격으로 닭의 익하정맥에

Table 1. Vaccination schedule of chickens for test 1

Groups	Vaccines ^A (Antigens)	No. of chickens	Inoculation schedule(on weeks after 1st)									
			1st	2nd(1)	3rd(4)	4th(5)	5th(6)	6th(7)	7th(9)	8th(22)	9th(24)	10th(29)
A	Gel (Bb+BbcDNT+Pv)	4										
B	ISA25 (Bb+BbcDNT+Pv)	4	IM		IV (Antigens)		IM		IV (Antigens)		IM(ISA70)	
C	Immunomodulators (Bb+BbcDNT+Pv)	4										

^ABb: *Bordetella bronchiseptica*, cDNT: crude dermonecrotxin, Pv: Parvovirus, IM: intramuscular, IV: intravenous

Table 2. Vaccination schedule of chickens for test 2

Groups	Vaccines(antigens) ^A	No. of chickens	Inoculation schedule(on weeks after 1st)						
			1st	2nd(1)	3rd(2)	4th(4)	5th(17)	6th(19)	7th(24)
D	Gel+ISA 25 (Bb+BbcDNT+Pv+Dv)	4				IM			
E	ISA25 (Bb+BbcDNT+Pv+Dv)	4					IV (Antigens)		IM (ISA70)
F	Antigens (Bb+BbcDNT+Pv+Dv)	5				IV			

^ABb: *Bordetella bronchiseptica*, cDNT: crude dermonecrotxin, Pv: Parvovirus, Dv: Distempervirus

서 채혈하여 혈청을 분리하고 56°C에서 30분간 비동화하여 혈중항체가 측정에 사용하였다. 난황내 항체가 변화 및 역가측정을 위하여 계란은 백신접종전 및 접종후 2주부터 주기적으로 수거하여 우등 [3, 4]의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 수집된 계란을 난황만 분리하여 50 ml 원심튜브에 넣은 후 동량의 PBS(pH7.2)를 가하여 vortex하고, 다시 혼합액에 동량의 chloroform을 가하고 실온에서 2시간 정치시킨 후 상층액을 수거하거나 일부를 취하여 eppendorf tube에 옮겨 8,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 IgY 항체가를 측정하였다.

닭 혈중 및 난황중의 항체가 조사

(1) 개 기관지폐렴균

Microplate agglutination test에 의하여 항체역가를 측정하였으며, 응집용 항원은 *B. bronchiseptica* 균을 BHI broth에서 1일 배양한 뒤 PBS로 2회 세척하고(6,000 rpm 30분) spectrophotometer로 410 nm에 OD 0.5 정도의 탁도가 되도록 조절한 뒤 formalin을 0.2% 첨가하여 냉장 보관하면서 사용하였다. 응집항체역가의 검사는 96 well microplate를 이용하여 PBS(pH7.2)로 혈청의 경우 10배부터, 난황의 경우 2배부터 단계적으로 희석한 후 동량의 항원(50 µl/well)을 가하여 2-3분간 shaking한 후 37°C

에서 overnight 반응시킨 후 응집역가를 측정하였다.

(2) 파보바이러스 및 디스토포바이러스

파보바이러스는 hemagglutination inhibition(HI) test에 의하여 각각 혈중 및 난황중의 항체역가를 측정하였으며 닭 혈청의 경우 56°C에서 30분간 비동화시킨 후 kaoline 처리한 혈청을 5배부터, 난황의 경우 2배부터 단계별로 희석하였다. 시험에 이용된 혈구는 pig erythrocyte를 0.7% 농도로 희석하여 사용하였으며, HI 시험에 이용한 바이러스 항원은 8 HA units/50 µl로 조정하여 사용하였다. 디스토포바이러스는 바이러스 중화시험법을 이용하여 난황중의 항체역가를 측정하였다.

결 과

개 기관지폐렴균(*B. bronchiseptica*) 항원의 항체형성능

(1) 산란계 혈중 항체가

개 기관지폐렴균 항원을 파보바이러스 등 타 항원과 혼합한 후 여러가지 adjuvant를 이용하여 닭에 면역접종하여 나타나는 닭 혈중의 항체가를 microplate 응집역가로 나타내었다(Fig. 1). 시험 1에서 백신접종 후 5주까지는 adjuvant로서 gel 및 ISA25 사용한 경우보다 면역증

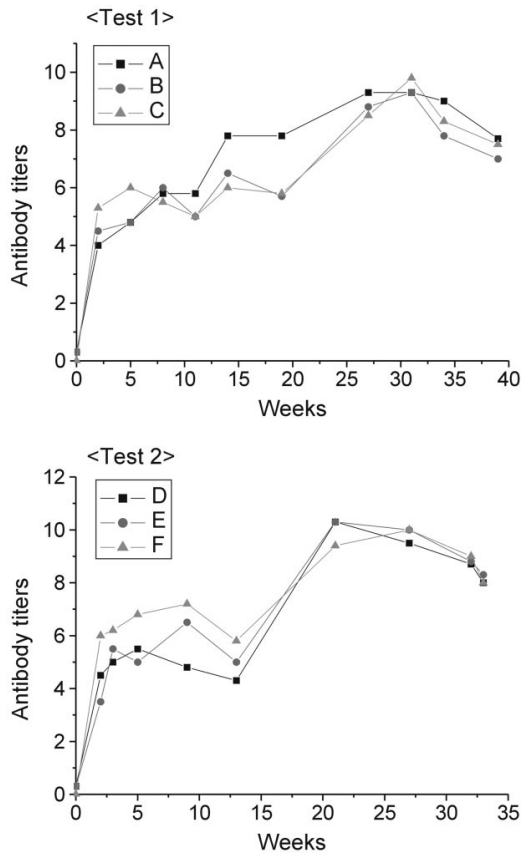


Fig. 1. Antibody titers against *B. bronchiseptica* antigens in sera of chicken immunized vaccines of various types. Values of antibody titer is the mean based on data transformed to $1/10 \log_2$ base values by microplate agglutination test (n=3~4).

강제를 사용한 그룹에서 다소 높게 나타났으나 그 이후 25주까지 gel 백신접종 그룹에서 높은 혈중 항체가 나타내었다. 다량의 높은 난황항체를 얻기 위하여 모든 그룹에 ISA70를 사용한 결과(시험 1 24주, 시험 2 19주) 사용전의 수준인 4.0~8.0($1/10 \log_2$ base) 혈중항체가 사용 후 크게 상승하여 모든 그룹에서 9.0~10.0($1/10 \log_2$ base) 수준의 높은 항체가 나타내었다.

(2) 난황중 항체가

닭 혈중 항체가 측정과 같은 방법으로 시험한 결과 난황중의 항체는 모든 그룹에서 4.0~7.0($1/10 \log_2$ base)의 수준으로 닭 혈중 항체가 4.0~10.0($1/10 \log_2$ base)보다는 다소 낮은 경향이었으며, ISA25 및 gel를 사용한 그룹보다는 면역증강제를 사용한 그룹에서 높게 나타낸 것이나, 모든 그룹에 ISA70를 사용한 이후의 난황중 항

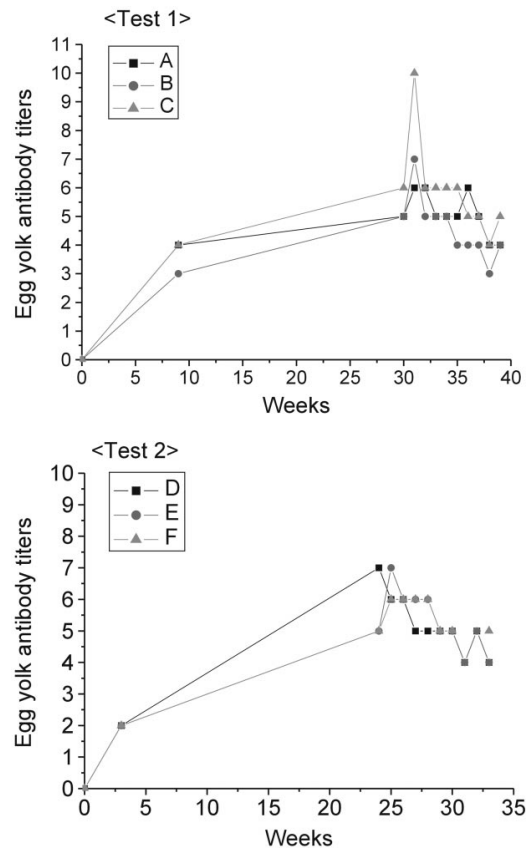


Fig. 2. Antibody titers against *B. bronchiseptica* antigens in egg yolk antibodies of hens immunized with vaccines of various types. Values of antibody titer is the mean based on data transformed to $1/10 \log_2$ base values by microplate agglutination test (n=15~20).

체의 상승은 닭 혈중항체의 향상과 유사한 결과로 나타났으나 전반적으로 닭 혈중 항체보다는 다소 낮게 나타났다(Fig. 2).

개 파보 바이러스(Canine parvovirus)에 대한 항체형성능

(1) 산란계 혈중 항체가

개 파보바이러스 백신접종 후 닭 혈중 항체를 HI 역가로 나타내었다. 1차 시험에서 1차 및 2차 접종 후 나타나는 각 adjuvant 별 항체는 ISA25(그룹 B)가 가장 높게 나타났으며, 이후 2차례의 혈관내 항원 접종 및 3차례에 걸친 각 백신의 근육접종결과 계속적으로 혈중 항체는 상승하였고 그 이후 백신을 중단한 22주까지의 항체가 변화에서도 그룹 B에서 가장 완만한 하락곡선을 나타내어 파보바이러스항원에 대한 닭 혈중항체가

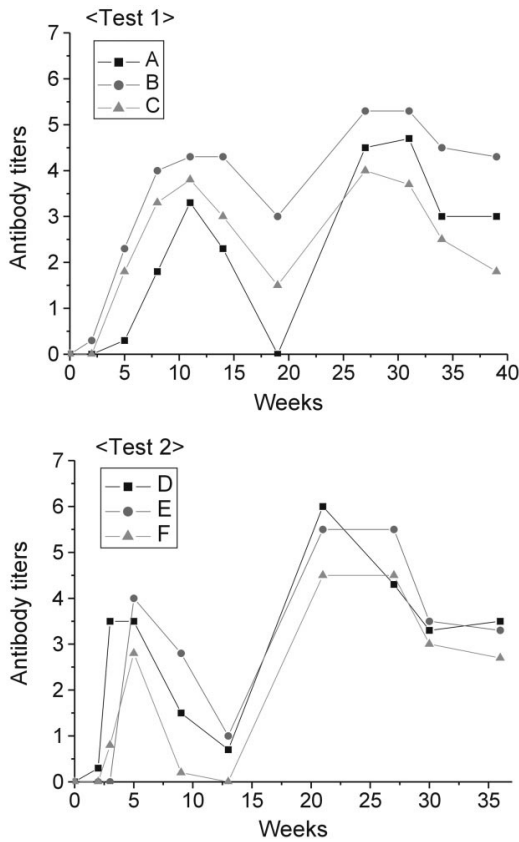


Fig. 3. Antibody titers against canine parvovirus antigens in sera of chicken immunized with vaccines of various types. Values of antibody titer is the mean based on data transformed to 1/10 log₂ base values by hemagglutination inhibition test(n=3~4).

는 ISA25가 gel이나 변역증강제보다 변역형성 및 항체가 유지에 우수하게 나타났다(Fig. 3).

이와 같은 결과는 전반적으로 시험 2에서도 같은 양상이었으나, 그룹 D의 gel과 ISA25를 혼합하여 사용한 경우에서 ISA25 단독(그룹 E) 및 항원만 접종시보다 빠른 항체형성능이 나타났으며, 특히 그룹 E에서 5주 이후에 나타나는 최고 항체가와 항체소실이 가장 완만하게 이루어지는 것으로 나타났다. 그 이후 모든 시험그룹에 ISA70을 사용한 결과 기관지 폐렴균과 같은 양상으로 급속하게 항체가는 상승하여 평균적으로 장기간 높은 수준의 항체가를 유지하는 것으로 나타내었다.

(2) 난황중 항체가

난황중 개 파코바이러스에 대한 항체역가는 백신접종 후 9주째 측정된 결과 음성으로 나타났으며 그 이후

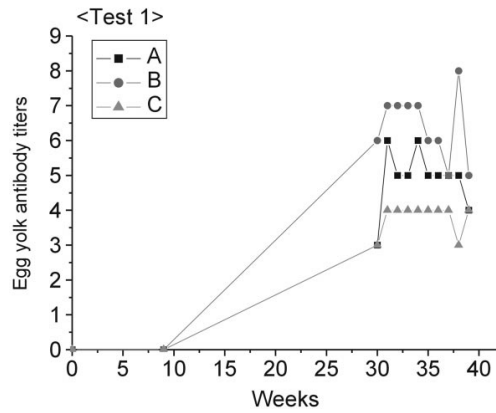


Fig. 4. Antibody titers against canine parvovirus antigens in egg yolk antibodies of hens immunized with vaccines of various types. Values of antibody titers are means based on data transformed to log₂ base values by hemagglutination inhibition test(n=15~20).

adjuvant로써 ISA70를 사용하여 닭 혈중항체가의 상승을 확인한 후 난황 중 항체를 측정된 결과 닭 혈중 항체가와 같이 adjuvant를 ISA25를 사용한 그룹 B에서 평균항체가 6~7(log₂ base)로서 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 gel이 5~6 및 변역증강제 3~4의 순이었다. 이들 항체가는 마지막 접종 후 약 10주까지 계속적으로 유지하였다.

개 디스토펜퍼 바이러스에 대한 항체형성능

개 디스토펜퍼항원으로 면역시킨 닭의 혈중 및 난황에 대한 항체역가를 바이러스 중화시험에 의하여 측정하였다. 이 시험 결과는 2차 시험에서의 타 항원과의 혼합에

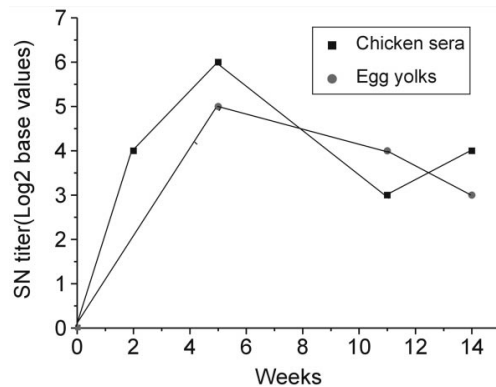


Fig. 5. Antibody titers in sera and egg yolk antibodies of hens immunized with antigens canine ditekemper virus with ISA70 as adjuvant.

의한 닭에 대한 백신접종시 adjuvant 종류 및 접종횟수에 관계없이 중화시험에 의한 항체형성이 확인되지 않았으며, 그 이후 디스토펙퍼 단일항원에 대하여 adjuvant로서 ISA70을 사용하여 2주 간격으로 3회에 걸쳐 추가 접종한 후 항체형성을 Fig. 5와 같이 확인할 수 있었다. 즉, 디스토펙퍼 항원량의 증가와 계속적인 ISA70의 사용으로 닭 혈중 평균항체 및 난황항체는 각각 3.0에서 6.0(이상 log₂ base)으로서, 디스토펙퍼 항원에 대한 닭에서의 항체형성능은 전술한 개 기관지폐렴균이나 파보바이러스에 비하여 매우 낮게 나타났다.

고 찰

난황항체는 뚜렷한 치료제가 없는 가축의 바이러스성 질병이나 [7, 14, 16], 대장균증 등 일부 소화기계질병의 치료에 효과적인 것으로 보고되고 있다 [3, 8, 13, 18-20]. 난황항체를 이용하여 개에서 큰 피해를 주고 있는 parvovirus [2], distemper virus 및 *B. bronchiseptica* [4] 등의 개별항원에 대한 일부 연구가 있어 왔으나 닭이나 돼지에 비해 상대적으로 미미한 실정이다. 본 연구에서는 이들 3가지 주요 병원체에 대한 혼합백신을 제조하고 닭에 면역접종하여 생성되는 난황을 이용하여 바이러스와 세균, 소화기성 질병과 호흡기질병을 동시에 효과적으로 방제하려는 데 적용하고자 수행되었으며, 여러 가지 부형제를 달리하여 비교시험한 결과, 먼저 *B. bronchiseptica*의 경우 ISA70을 사용한 경우에서 사용전보다 높은 항체상승효과를 유도할 수 있었다. 이는 신 등 [4, 5]이 보고한 돼지 호흡기질병 원인균 항원에 대한 난황항체 생성시험에서 gel 사용 그룹보다 ISA70을 사용한 그룹에서 높은 ELISA 항체가 장기간 유지한 시험성과 일치하는 결과이다. 또한 난황중 항체는 모든 그룹에서 4.0~7.0(1/10 log₂ base)의 수준으로 닭 혈중 항체가 4.0~10.0(1/10 log₂ base) 보다는 다소 낮은 경향이었고, ISA70을 사용한 후에 모든 그룹에서 난황중 항체의 상승은 닭 혈중항체 상승 양상과 유사하게 나타났으나 난황중 항체는 닭 혈중항체에 비하여 다소 낮고 2-4주 늦게 나타났다. 이와 같은 결과는 신 등 [4, 5]의 난황에서 닭 혈중보다 낮은 ELISA 항체를 보인 성적과 유사한 결과이며, ISA70 사용 이후 전 그룹에서 난황중 항체가 높게 상승하여 나타난 것은 adjuvant의 선택이 면역반응에서 중요하게 작용함을 알 수 있었다.

개 파보바이러스에 대한 항체는 ISA25를 사용한 그룹에서 높은 항체를 장기간 지속하는 것으로 나타났으며, 특히 gel과 ISA25를 혼합하여 사용한 경우에서 ISA25 단독 및 항원만 접종시보다 빠른 항체형성과 높은 항체를 유지하였으며 그 이후 모든 시험그룹에

ISA70을 사용한 결과 기관지 폐렴균과 같은 양상으로 급속하게 항체는 상승하여 평균적으로 장기간 높은 수준의 항체를 유지하였다. 본 시험에서 얻은 닭 혈중 및 난황중의 항체 역가는 오 등 [2]의 4회 근육접종 후 닭혈중 혈구응집억제반응 역가 1:640~1:5,120 및 난황중 역가 1:640~1:2,560에 비해 다소 낮은 경향이나 닭의 개체차이 및 접종된 항원량과의 관련이 있는 것으로 추정되었다.

개 디스토펙퍼 바이러스에 대한 닭 혈중 및 난황에 대한 항체역가를 바이러스 중화시험에 의하여 측정된 결과 2회의 시험에서 다른 항원과 혼합에 의한 백신접종시 adjuvant 종류 및 접종횟수에 관계없이 중화시험에 의한 항체형성이 확인되지 않았고, 그 이후 디스토펙퍼 단일 항원에 대하여 adjuvant로서 ISA70을 사용하여 2주 간격으로 3회에 걸쳐 추가 접종한 후에 비로서 항체형성이 확인된 것은 항원량의 증가와 ISA70의 사용의 결과로 추정되나 개 기관지폐렴균이나 파보바이러스에 비해 상대적으로 항체역가가 낮고 치료목적으로 사용하는 데는 어려움이 예상되어 이에대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

결 론

개 기관지폐렴균, 파보바이러스 및 개 디스토펙퍼 바이러스 혼합항원을 이용하여 닭에 백신접종 후 닭 혈중 및 난황에서의 항체가 조사결과 adjuvant로 ISA70을 사용할 시 이들 항원에 대한 가장 높은 항체가 유도할 수 있었다. 기관지 폐렴균의 경우 닭 혈중 항체는 1,280~10,240를, 난황중 항체는 160~1,280의 수준으로 가장 높게 나타내었으며, 파보바이러스는 ISA25로 초기면역시킨 후 ISA70을 사용한 경우에서 항체형성 및 지속기간이 우수하게 나타내어 혈중 항체가 80~320, 난황항체는 64~256를 각각 나타내었다. 반면 개 디스토펙퍼의 경우는 고농도의 단일 항원에 ISA70을 사용한 경우에서 바이러스 중화역가 8~64의 낮은 항체형성이 확인되어 닭 혈중 및 난황항체 형성능은 항원의 종류에 따라 다양하게 나타날 수 있으며 adjuvant의 선택 또한 중요함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 수의진업병학교수협의회. 수의진업병학. pp. 307-349, 개정판, 경북대학교 출판부, 대구, 1994.
2. 오태호, 한홍윤. 개의 파보바이러스에 대한 난황항체 생산. 대한수의학회지. 1996, 36, 895-902.
3. 우승룡, 김종만, 권창희, 이희수, 임숙경, 김종염. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제기법 개발.

- I. 대장균 pilus 항원과 LT로 면역시킨 닭의 면역반응. 대한수의학회지. 1998, **38**, 829-836.
4. 신나리, 김종만, 유환상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한 연구. 1. *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 및 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 주요 면역원 분석 및 IgY의 생산. 대한수의학회지. 2000, **40**, 551-561.
 5. 신나리, 김종만, 최인수, 유환상. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한 연구. II. 면역된 산란계로부터 생산된 난황항체의 특이성 분석. 대한수의학회지. 2001, **41**, 197-202.
 6. Bemis, D. A., Greisen, H. A. and Appel, M. J. Pathogenesis of canine bordetellosis. J. Infect. Dis. 1977, **135**, 753-762.
 7. Brown, J., Resurreccion, R. S., Dickson, T. G. and Horne, A. The relationship of egg yolk and serum antibody. I. Infectious bursal disease virus. Avian Dis. 1989, **33**, 654-656.
 8. Farrelly, C. O., Branton, D. and Wanke, C. A. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. Infect. Immun. 1992, **60**, 2593-2597.
 9. Jungling, A., Wiedemann, V., Kuhlmann, R., Erhard, M., Schmidt, P. and Losch, U. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. J. Vet. Med. 1991, **B38**, 373-381.
 10. Kowalczyk, K., Daiss, J. and Halpern, J. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. Immunology. 1985, **54**, 755-762.
 11. Larsson, A., Balow, R. and Lindahl, T. L. Chicken Antibody: Taking advantage of evolution-a review. Poultry Sci. 1993, **72**, 1807-1812.
 12. McCadlish, I. A., Thompson, H., Cornwell, H. J. and Wright, N. G. A studies of dogs with kennel cough. Vet. Rec. 1978, **102**, 293-301.
 13. Nagy, L. K., Bhogal, B. S. and Mackenzie, T. The effect of colostrum or past colibacillosis on the adhesion of *Escherichia coli* to the small intestine of the pig. Res. Vet. Sci. 1976, **21**, 303-308.
 14. Silim, A. and Venne, D. Comparison of egg yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme linked immunosorbent assay using paired field samples. Avian Dis. 1989, **33**, 643-648.
 15. Svendsen, L., Crowley, A. and Ostergaard, L. H. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. Lab. Anim. Sci. 1995, **45**, 89-93.
 16. Theresa, H., Piela, M., Gulka., Vance, J., Yates. and Pei, W. C. Use of egg yolk in serological tests(ELISA and HI) to detect antibody to Newcastle disease, Infectious Bronchitis, and *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 1984, **28**, 877-883.
 17. Warr, G. W., Magor, K. E. and Higgins, D. A. IgY: Clues to the origins of modern antibodies. Immunol. Today. 1995, **16**, 392-398.
 18. Yokoyama, H., Paralta, R. C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. and Kodama, Y. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. Infect. Immun. 1992, **60**, 998-1007.
 19. Yokoyama, H., Paralta, R. C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. and Kodama, Y. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulin in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. Am. J. Vet. Res. 1993, **54**, 867-872.
 20. Yukata, I., Masahiko, K., Robert, C., Peralta. and Hideaki, Y. Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res. 1992, **53**, 2005-2008.