

IgY 투여에 따른 포유자돈의 설사에 대한 예방효과 I. 혈청학적 결과, 형광항체검사 및 RT-PCR 검사

김 문, 윤병일, 한정희*

강원대학교 수의학(부)대학
(접수 2008. 3. 4, 게재승인 2008. 3. 26.)

Protective effects of IgY against diarrhea in suckling piglets I. Serological result, FA test and RT-PCR

Wen Jin, Byung-IL Yoon, Jeong-Hee Han*

*Department of Veterinary Medicine and Institution of Veterinary Science,
Kangwon National University, Chuncheon, 200-701; Kangwon-Do, Republic of Korea*

(Received 4 March 2008, accepted in revised from 26 March 2008)

Abstract

The purpose of this study was to investigate the protective effects against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in suckling piglets by oral administration of IgY. Twenty piglets were divided into two groups with the same number: group I (treated with IgY) and group II (not treated). Group I was administered orally with IgY for three days from one-day-old and experimentally challenged with PEDV and TGEV at four-day-old. The other was administered with saline solution and challenged with PEDV and TGEV at four-day-old. Serum antibody titers against PEDV and TGEV were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the detection of PEDV or TGEV antigen from feces and small intestines was performed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and indirect immunofluorescence (IFA). The antibody titers of the group I was higher than that of the other, and lasted at the end of experiment. In the detection tests of both virus from feces and small intestine, the rate of the group I was lower. Based on these results, oral administration of IgY may be effective to prevent the diarrhea caused by PEDV and TGEV.

Key words : PEDV, TGEV, IgY, protective effect

* Corresponding author

Phone : +82-33-250-8691, Fax : +82-33-256-3722

E-mail : hanjh@kangwon.ac.kr

서론

돼지 전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV)와 돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea; PEDV)는 코로나바이러스과에 속하는 바이러스로 모든 일령의 돼지에서 감수성이 있으나 특히 어린 연령일수록 발병률과 치사율이 높다. 돼지유행성 설사(PED)는 포유자돈에서 50% 이상의 폐사율을 야기하고 급성의 심한 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하 등의 임상 증상을 보이고^{1,2)} 돼지전염성 위장염(TGE)는 흡수불량성 설사와 구토를 일으켜 탈수를 유발하여 2주령 이하의 포유자돈에서 폐사율이 거의 100%에 달하여 양돈산업에 막대한 경제적 손실을 주고 있는데 자돈에서의 빠른 전파와 높은 폐사율을 제외하고는 PED와 매우 유사하다³⁻⁵⁾.

PED가 빈번하게 발생되고 있는 아시아의 양돈국가에서는 PED를 예방하기 위하여 임신돈에 생백신을 접종하여 고역가의 모체가 행항체를 포유자돈에 부여하는 방법, 감염자돈의 장유체액으로 모돈에 인공감염시켜 유즙면역을 자극시키는 방법, 산란계에 바이러스를 접종하여 생산된 난황항체를 신생자돈에 투여하는 방법 등의 여러 가지 방법을 모색하여 왔다^{1,6,7-9)}.

TGE의 경우에는 강독백신, 약독화 백신, 불활화 백신, subunit 백신을 경구, 비강, 근육, 피하 또는 유방에 접종하여 국소면역항체 및 혈중항체를 높여 주는 방법을 많이 이용하고 있다¹⁰⁻¹⁶⁾.

난황 중의 항체는 포유류의 IgG 분류의 항체에 해당되나 단백질화학적 성분이 약간 다르고 또한 난황 유래의 항체이므로 IgY (Immunoglobulin yolk)라 칭한다¹⁷⁾. 닭에는 IgG, IgA 그리고 IgM, 3가지 종류의 항체가 혈액 내에 존재한다. 닭은 계란생성 과정 중 계란의 난백

(egg white)으로 IgM과 IgA를 이동시킨다. 이에 반해 IgG(IgY)는 난황(egg yolk)으로만 축적된다¹⁸⁾. 산란계에 백신을 접종하여 생산된 난황으로부터 항체를 분리하여 이용하는 유즙대체 수동면역방법이 연구되고 있으며 PEDV에 대한 난황항체(IgY)를 신생자돈에 투여하여 면역방어효과를 조사한 결과 바이러스 공격에 대한 자돈의 폐사율이 유의성 있게 감소하여 항PEDV-IgY가 모돈의 유즙항체와 유사한 방어효과가 있다는 것이 밝혀졌다^{6,7,9)}.

난황항체(IgY)의 장점은 토끼와 같은 소동물을 과면역시켜 그 혈액을 채취해 특이적인 항체를 획득하는 기존의 이용하던 항체에 비해 난황항체(IgY)는 채란이란 간단한 작업으로 항체원료를 대량 수집할 수 있으며, 산란계를 대규모 자동화시스템을 이용, 생산비를 절감할 수 있다. 또한, 혈액에서 얻는 기존의 방법보다 위생적인 안전성이 높으며 다른 면역글로불린들이 특이하게 반응하는 보체, protein A에 전혀 반응하지 않아서 진단의 오차를 감소시키며 포유동물에서 유래한 항원에 대해 반응도가 높은 장점을 지니고 있다¹⁹⁾.

본 연구는 국내 양돈산업에서 신생자돈, 포유자돈 및 이유자돈에 설사증을 유발하여 경제적으로 많은 피해를 주고 있는 PED와 TGE 설사증에 대한 방어대책으로 포유자돈에 난황항체(IgY)를 투여하여 효과적인 수동면역을 형성시켜 PEDV와 TGEV의 공격에 대한 방어효과를 조사하고자 실시하였다.

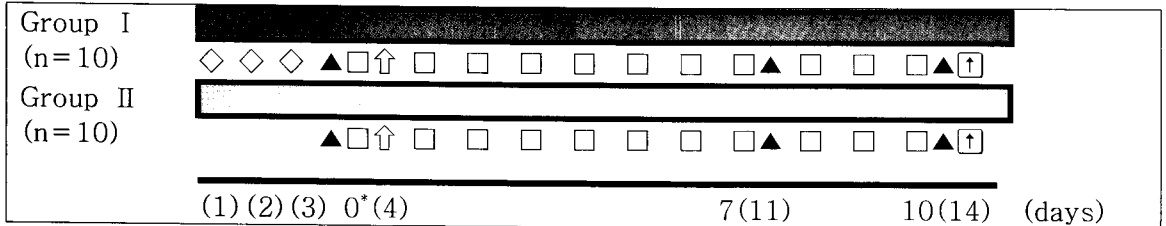
재료 및 방법

시험동물 및 시험설계

산차를 고려하여 분만중인 모돈의 초유를 섭취하지 않은 포유자돈 20두를 대상으로 실시하였다. 실험군(Group I)은 10두의 포유자돈을 초유전부터 3일간 2ml씩 난황항체(IgY)

를 경구투여 하였으며, 대조군(Group II)은 10두로써 동일한 조건하에서 난황항체를 투여하지 않고 생리식염수를 3일간 2ml씩 투여하였다.

실험군과 대조군의 포유자돈은 각각의 실험 돈방에 넣어 24시간 동안 적응시킨 후 4일령에 공격접종을 실시 시기별로 채혈하고 체중을 측정하였다(Fig 1).



Group I: Piglets were administrated with IgY and challenged orally with PEDV and TGEV.

Group II: Piglets were not administrated with IgY but challenged orally with PEDV and TGEV.

◇ : administration of IgY orally, ▲ : blood collection, □ : feces collection.

↑ : PEDV and TGEV challenge, † : autopsy, *: days post-challenge.

Fig 1. Diagram for experimental design

실험기간 동안에는 대용유(돈돈밀크, (주) 제일제당사료)를 제조사의 권장사항에 따라 급여하였고 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 돈방주위는 정기적으로 소독하였다.

시험 난황항체 (Immunoglobulin yolk)

본 실험에서는 사용한 난황항체(Ig Y)는 시중에서 구입할 수 있는 난황항체를 함유한 면역증가제인 Ig-Top(AD BIOtech. Korea)으로서 그 성분은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of commercial IgY used in this study

Specific antibody	Content(mg/g)*
Anti-PEDV	3.8
Anti-TGEV	3.8

*: mg per 1g of egg powder.

PEDV와 TGEV 공격접종

공격접종시 사용된 PED, TGE 바이러스 역가는 각각 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml이었다. 각각 1.5ml 와 1.5ml씩 2회 투여하였다.

PEDV와 TGEV 대한 항체역가 검사

실험대상 자돈의 수동면역상태를 확인하기 위한 항체역가검사를 위하여 경정맥에서 혈액을 채취하여 응고시킨 후 3,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 eppendorf tube에 옮긴 다음 56℃에서 30분간 비동화시킨 뒤 사용하였다.

항체역가검사는 ELISA를 실시하였다.

Multiplex RT-PCR에 의한 PEDV, TGEV 검출

공격접종한 PEDV, TGEV의 분변을 통한 배출 여부를 조사하기 위해 매일 소독된 면봉으로 실험자돈의 직장에서 분변을 채취하였다. 실험도중에 폐사한 실험자돈의 소장에서 PEDV를 확인하기 위하여 소장조직을 pestle로 분쇄하여 멸균된 500µl PBS (pH 7.2)에 넣어 충분히 혼합시킨 다음 14,000 rpm에서 20분간 원심하여 상층액을 취하여 -70℃에 보존하여 RT-PCR을 실시하였다.

Primer

PEDV를 특이적으로 검출하기 위해 forward primer는 5'-GGGCGCCTGTATAGAGTT-TA-3', reverse primer는 5'-AGACCACC-AAGAATGTGTCC-3'로 412bp 크기의 fragment가 증폭되도록 설계하였다.

TGEV를 특이적으로 검출할 수 있는 것으로 forward primer는 5'-GATGGCGACCAGATAGAAGT-3', reverse primer는 5'-GCA-ATAGGGTTGCTTGTACC-3'로 612bp 크기의 fragment가 증폭되도록 설계하였다.

RNA 추출

분변과 소장조직에서 RNA 추출은 RNeasy® Mini kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 실시하였다.

역전사 반응(Reverse transcription; RT)

역전사 반응은 RNA template 5µl, 0.2 µM의 1쌍의 reverse primer, diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수 31µl, 10×RT buffer (MBI, Lithuania), 0.2mM dNTPs (MBI), 40 unit RNasin (Promega, USA), 2.5 mM MgCl₂ (Promega)를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시킨 뒤 200 unit Molony murine leukemia virus reverse transcriptase (MBI)를 첨가하여 50µl의 반응액으로 42°C에서 1시간, 94°C에서 5분으로 1 cycle을 시행하여 cDNA를 합성하였다.

중합효소 연쇄반응(PCR)

역전사 반응에서 합성된 5µl cDNA에 0.2 µM의 primer, 10× PCR buffer, 2.5 unit *Taq* DNA polymerase, 0.2mM dNTPs, 2.5mM MgCl₂, 멸균된 증류수 32µl를 첨가한 50µl의 반응액을 94°C 5분, 51.5°C 45초, 72°C 1분의 반응조건에서 1회 시행한 다음 계속하여 95°C 45초, 51.5°C 45초, 72°C 1분의 반응조건에서 30회 반복하였고 51.5°C 45초, 7

2°C 5분간 반응조건에서 1회 시행하였다.

증폭된 PCR산물의 확인은 TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 전해질로 사용한 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, 40 mM etidium bromide 용액에서 gel을 염색하여 UV transilluminator (Vilberlourmat, France)로 생성된 band를 확인하였으며 DNA marker로는 100 bp DNA ladder (Promega, USA)를 사용하였다.

형광항체검사

실험도중에 폐사하였거나 실험종료시에 안락사시킨 실험자돈은 부검을 실시하여 십이지장, 공장, 회장의 조직을 10µm 두께로 냉동절편하여 슬라이드에 부착시켜 실온에서 5분간 정치하여 건조시킨 후 냉동아세톤으로 4°C에서 10분 동안 냉장상태로 고정시켰다. PEDV monoclonal antibody (MAb) (국립수의과학검역원 분양),

TGEV MAb(국립수의과학검역원 분양)를 각각동일 표본의 다른 슬라이드에 첨가하고 37°C의 습상에서 45분간 반응시켰다. 여분의 MAb를 제거하고 PBS (pH 7.2)로 5분간 3회 세척하였다. FITC conjugated anti-mouse IgG (국립수의과학검역원 분양)를 첨가한 다음 37°C의 습상에서 30분 동안 반응시킨 후 PBS (pH 7.2)로 5분간 3회 세척한 다음 mounting media로 처리하여 형광현미경 (Olympus BX-50, Japan)으로 검경하였다. 형광반응에 대양성반응지수는 음성은 0, 1~29%의 상피세포에 나타난 것은 1, 30~59%의 상피세포에 나타난 것은 2, 60~100%의 상피세포에 나타난 것은 3으로 구분하여 판정하였으며, 소장의 부위별 평균 양성반응지수는 소장검사재료의 양성반응지수를 더하여 소장검사재료수로 나누어 표시하였다.

통계학적 처리

난황항체(IgY)를 경구 투여한 시험군과 투여

하지 않은 대조군간의 통계처리 SAS package (Ver 6.12, USA)를 이용하여 Duncan's new multiple t-test에 의하여 ($P < 0.05$) 수준에서 유의성 검정을 진행하였다.

결 과

PEDV와 TGEV에 대한 혈청 항체역가

PEDV와 TGEV을 4일령에 공격접종하기 전과 접종 후 7, 10일에 실험군과 대조군 각각 10두씩 시기별로 채혈하여 항체역가를 측

정하였다(Fig 2).

PEDV의 경우, 공격접종 전, 공격접종 후 7일 및 10일 시험군과 대조군의 평균 혈청항체가는 각각, 공격접종 전에는 0.66 ± 0.17 , 0.68 ± 0.15 , 공격접종 후 7일에는 0.65 ± 0.10 , 0.59 ± 0.07 , 공격접종 후 10일에는 0.72 ± 0.08 , 0.59 ± 0.08 이었다. TGEV의 경우, 공격접종 전, 공격접종 후 7일 및 10일 시험군과 대조군의 평균 혈청항체가는 각각, 공격접종 전에는 0.75 ± 0.34 , 0.86 ± 0.13 , 공격접종 후 7일에는 0.84 ± 0.05 , 0.72 ± 0.33 , 공격접종 후 10일에는 0.85 ± 0.07 , 0.72 ± 0.11 이었다(Table 2).

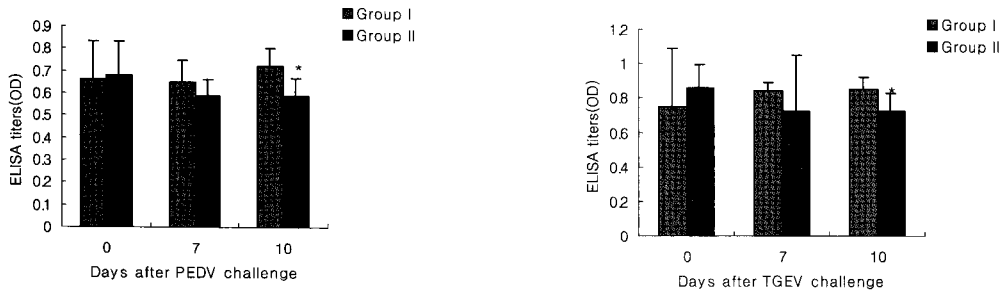


Fig 2. ELISA titers to PEDV and TGEV after challenge

Table 2. ELISA titers¹⁾ to PEDV and TGEV after challenge

Group	Days after challenge					
	Titer to PEDV			Titer to TGEV		
	0	7	10	0	7	10
I	0.66 ± 0.17 ²⁾	0.65 ± 0.10	0.72 ± 0.08 ³⁾	0.75 ± 0.34 ²⁾	0.84 ± 0.05	0.85 ± 0.07 ³⁾
II	0.68 ± 0.15	0.59 ± 0.07	0.59 ± 0.08	0.86 ± 0.13	0.72 ± 0.33	0.72 ± 0.11

1) Values are mean \pm SD, n = 20.

2) Not significant at $P < 0.05$ by Duncan's new multiple t-test.

3) Values between groups are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's new multiple t-test.

PEDV는 공격접종한 대조군은 공격접종 후 7일에서 항체가가 다소 감소하였으며 공격접종 후 10일에서는 공격접종 후 7일과 비슷한 상태를 유지하였다. 난황항체 투여 후 PEDV를 공격접종한 실험군은 공격접종 후 7일까지는 별다른 변화를 보이지 않았으며 공격접종 후

10일에서는 다소 증가하였다. TGEV를 공격접종한 대조군은 공격접종 후 7일에서 공격접종 당일에 비해 현저하게 감소하였으며 공격접종 후 10일에서는 공격접종 후 7일과 별다른 변화를 보이지 않았다. 난황항체 투여 후 TGEV를 공격접종한 실험군은 공격접종 후 7일에서

현저하게 증가하였으며 공격접종 후 10일에서는 공격접종 후 7일에 비해 약간의 증가만 보였다.

RT-PCR에 의한 PEDV, TGEV 검출

RT-PCR에 의한 분변과 소장에서 PEDV와 TGEV를 검출한 결과는 Table 3와 Fig 3와

같다. 실험군의 10두에서는 공격접종 후 5일째 까지 분변에서 PEDV가 검출되었으며 공격접종 후 8일째까지 분변에서 TGEV가 검출되었다. 공격접종 후 1일째부터 10일째까지 총 100예의 분변재료 중 3예에서 PEDV, 26예에서 TGEV 검출되어 각각 3%, 26%의 검출률을 보였으나 소장에서는 검출되지 않았다.

Table 3. Detection* of TGEV and PEDV from feces and small intestine of piglets

Group	Piglet No	Day of post-challenge													Small intestine		
		Feces															
		-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	5	8	>10	
I	1	-	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	T	T	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	P	-	PT	T	PT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	T	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	T	T	T	T	T	T	T	T	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	1	-	-	-	P	T	PT	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	T	-	T	T	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	P	P	P	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	T	PT	PT	PT	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	P	T	T	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	T	P	T	P	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	P	P	P	P	-	P	P	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	T	T	T	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	P	P	P	D**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	T	T	T	T	T	-	D	-	-	-	-	-	-

Detection* = - :no detection, P ; detection of PEDV, T ; detection of TGEV, D** =died.

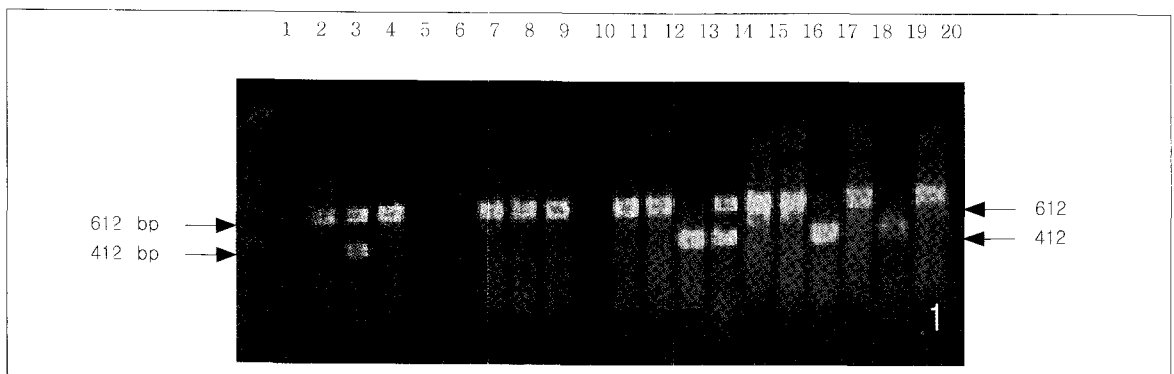


Fig 3. Detection of PEDV, TGEV from fecal samples of piglets challenged with PEDV, TGEV. Lane M, 100bp DNA size ladder, lane 1-10, IgY administrated group; lane 11-20, control group.



Fig 4. Jejunal villi of piglet challenged with PEDV, TGEV after administration of IgY showing mild fluorescent positive reaction. IFA, $\times 200$.

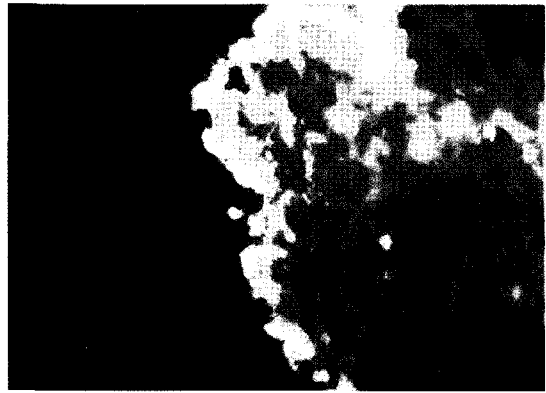


Fig 5. Jejunal villi of piglet challenged with PEDV, TGEV after no administration of IgY showing intensive fluorescent positive reaction. IFA, $\times 200$.

Table 4. Detection of PEDV and TGEV by IFA test in the small intestine of piglets after challenging

Group	Piglet No	Grade* of fluorescent lesion			Cumulative positivity
		Duodenum	Jejunum	Ileum	
I	1	0	0	0	PEDV : 0/30** TGEV : 2/30
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
	4	0	0	0	
	5	0	0	0	
	6	0	0	0	
	7	0	0	0	
	8	0	0	0	
	9	0	1	1	
	10	0	0	0	
II	1	0	0	0	PEDV : 6/30 TGEV : 6/30
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
	4	0	0	0	
	5	0	0	0	
	6	0	0	0	
	7	0	0	0	
	8	0	0	0	
	9	1	3	2	
	10	1	3	2	

Grade* : 0: negative, 1: 1~29% of epithelial cells which were positive reaction, 2: 30~59% of epithelial cells which were positive reaction, 3: 60~100% of epithelial cells which were positive reaction, **: No of small intestine of piglets detected/No. of total small intestine of piglets tested.

대조군은 공격집중 후 1일째부터 10일째까지 총 91예의 분변재료 중 20예에서 PEDV, 39예에서 TGEV 검출되어 각각 21.9% 42.8%의 검출률을 보였고 폐사한 2두의 소장에서 PEDV와 TGEV가 검출되었다.

TGEV와 PEDV의 검출율은 실험군이 대조군에 비해 낮게 검출되었다.

형광항체검사결과

폐사나 실험종료시에 소장의 PEDV와 TGEV에 대한 형광항체법에 의한 결과는 Table 4와 같다. 실험군의 10두 포유자돈은 십이지장, 공장, 회장에서 PEDV가 검출되지 않았다(Fig 4).

대조군의 포유자돈은 십이지장에서 2두가 약한 반응을 보였고 공장에서는 2두에서 강한 반응을, 회장에서는 2두에서 약한 양성 반응을 보였다(Fig 5).

난황항체를 경구투여한 실험군의 소장조직에서 TGEV에 대한 형광항체검사시에 양성률은 6.7% (2/30)인데 비해 대조군에서는 십이지장에서 2두, 공장에서 2두, 회장에서 2두로 20.0% (6/30)의 양성률을 보여 실험군에 비하여 훨씬 높게 나타났다.

고 찰

감염방어에 관여하는 주요한 항체는 IgM, IgG, IgA 등이 있는데 IgM은 감염 후 가장 빨리 생산되어 감염의 초기방어에 관여하며, IgG는 혈청항체의 80% 이상으로 가장 많고 감염면역에서 중요한 역할을 하며, IgA는 혈청중에 존재할 뿐만 아니라 점액이나 유즙에 분비되어 점막의 감염방어나 유즙면역에 큰 역할을 한다²⁰⁾. IgA는 위장관내에서 강한 염산과 트립신의 작용에 의해서도 쉽게 분해되지 않으며 자돈에서 장관감염에 대해 IgA는 IgG보다 효과적으로 방어한다¹⁰⁾.

돼지는 태아시기에는 태반을 통하여 모체로부터 항체가 직접 이행되지 않고 유즙을 통하여 이행되며 초유 중에는 다량의 IgG가 포함

되어 전신감염방어에 효과적으로 작용하지만 소화관이나 호흡기의 국소감염의 방어에는 제한적이라고 보고되었다^{20,21)}. IgA의 생성조직은 호흡기계, 소화기계, 소화관, 유선 등의 국소면역계에 분포하며 단량체 IgA는 전신성의 면역계에서 생산되어 혈액중에 순환하고 이량체 IgA는 국소면역계에서 생산되어 혈액 중에 순환하며 점막상피세포에서 분비성분과 결합하여 sIgA가 된다^{20,22)}. sIgA는 바이러스가 숙주세포에 부착하거나 혹은 세포내로 침입하는 능력을 차단함으로써 바이러스 중화를 일으키며 독소와 효소의 중화, 점막표면에 병원체의 흡착저지 등의 작용을 통하여 장관에서 효과적인 방어작용을 한다고 알려져 있다²¹⁾.

TGE와 PED의 설사증에서 국소면역형성이 방어에 중요한데 IgA는 점막상피세포에서 생성되는 secretory components와 결합되어 분비형 IgA (sIgA)를 만들며 장점막에서 분비되는 sIgA는 두 개의 7S monomer가 J-chain에 의해 연결되어 있으며 위산과 소화효소에 의해 소화되지 않고 소장의 음와부위에서 장점막상피세포를 통해서 장점막표면으로 이동되어 바이러스와 세균의 흡착과 증식을 억제한다. IgM과 IgG는 장점막고유층에 존재하면서 상피세포층의 하단부에서 2차 방어기능을 수행한다^{21,22)}. Yokoyama 등²⁴⁾은 IgY가 장관내 수용체에 부착하는 대장균의 국소 편모(fimbriae)의 부착을 방해하여 세균의 장관내 부착과 독소분비를 억제한다고 보고하였다. 이와 같은 원리를 이용하여 특이난황항체를 출생 후 포유자돈에 경구투여하여 고역가의 항체가 형성되어 PEDV의 공격에 대한 예방효과를 보고자 본 실험을 진행하였다.

PEDV와 TGEV의 혈청학적진단에는 정제된 바이러스 입자를 항원으로 한 ELISA 혹은 blocking ELISA등이 항체측정에 이용되어 왔지만 항원의 조제가 어려워 보편화시키기 어려웠다. 하지만 최근에는 배양세포에서 바이러스 배양이 가능하게 되어 S protein 항원으로 한 ELISA, 고정된 바이러스 감염 Vero 세포를 항원으로 한 IFA등이 개발되어 항체의 검

출이 용이하게 되었다. 본 연구에서는 난황항체를 투여하기 전과 후의 혈청항체가와 형광항체검사를 토대로 비교하였다. 혈청항체가 검사에서는 난황항체를 투여하지 않고 PEDV와 TGEV를 공격접종한 대조군에서 공격전의 혈청항체는 0.66 ± 0.17 와 0.75 ± 0.34 였다.

접종 후 7일과 10일에는 PEDV는 각각 0.59 ± 0.07 와 0.59 ± 0.08 이었고 TGEV는 0.72 ± 0.33 와 0.72 ± 0.11 로 나타났다. 난황항체를 투여한 실험군은 PEDV와 TGEV를 공격접종 전보다 후가 높은 혈청항체를 나타낸 것으로 보아 난황항체의 투여가 PEDV와 TGEV와 같은 돼지 설사병에 효과적으로 방어하는 것으로 사료된다.

Kim 등²⁵⁾은 PEDV, TGEV를 각각 10두씩의 3일령 포유자돈에 공격접종 후 12시간, 24시간, 48시간, 60시간, 72시간에 각각 2두씩 안락사시킨 뒤 분변과 소장에서 RT-PCR에 의한 검출결과는 9두의 분변과 10두의 소장에서 바이러스가 각각 검출되었다고 보고하였다. 본 연구에서 RT-PCR을 이용한 분변과 소장에서 공격접종한 PEDV와 TGEV의 검출결과는 난황항체를 경구투여한 실험군의 포유자돈에서 각각 3.0%와 26.0%의 검출율을 보였으나 난황항체를 투여하지 않은 대조군의 포유자돈에서는 21.9%와 42.8%으로 실험군에 비해 높은 검출율을 보였다. 대조군에서의 검출률은 난황항체를 경구투여한 실험군에 비해서는 현저하게 높아 난황항체투여에 따른 바이러스의 증식이 억제되었다고 생각된다.

본 실험의 형광항체검사에서는 난황항체를 투여하지 않고 PEDV와 TGEV를 공격접종한 포유자돈은 형광항체검사를 실시한 결과 40.0% (12/30)의 혼합양성률을 보였고 난황항체를 경구투여한 실험군의 혼합 양성률은 6.7% (2/30)를 보여 대조군에 비해 매우 낮게 나타났다.

본 실험에서 얻어진 혈청항체가, 분변과 소장에서 RT-PCR, 형광항체법에 의한 바이러스 검출에 의한 소장에서의 바이러스 검출결과와 난황항체를 경구투여 함으로서 고역가 항체를 얻을 수 있는 유즙대체 수동면역을 형성

하여 PEDV와 TGEV의 장벽에 흡착 및 증식이 억제되거나 바이러스가 중화되어 PEDV와 TGEV에 의한 설사를 효과적으로 방어되는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과를 토대로 앞으로 야외 양돈장에서 난황항체요법을 효율적으로 활용한다면 PED와 TGE의 설사증을 효과적으로 예방하여 양돈산업에 경제적인 손실을 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

결론

출생직후 포유자돈에 난황항체를 경구투여하여 자돈에 유즙대체 수동면역을 형성시킨 후 PEDV와 TGEV의 공격접종에 따른 방어효과를 관찰하고자 혈청내 항체검사, RT-PCR검사, 형광항체검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 난황항체를 포유자돈에 경구투여하여 높은 혈청내 항체가가 형성되었고 실험종료시까지 유지되었다.
2. RT-PCR에 의한 분변과 소장에서 PEDV, TGEV의 검출율은 난황항체를 경구투여한 실험군이 대조군에 비하여 낮았다.
3. 형광항체법에 의한 소장에서 PEDV, TGEV의 검출시에 PEDV 난황항체를 경구투여한 실험군이 대조군에 비하여 낮은 검출률을 보였다.

이상의 결과를 통하여 포유자돈에 난황항체를 경구투여하였을 시에 유즙대체 수동면역을 형성하여 PED와 TGE를 효과적으로 방어하였음을 알 수 있었다.

감사의 글

This work was supported by the Ministry of Commerce, Industry and Energy (MOCIE) / Korea Institute of Industrial Technology Evaluation and Planning (IT-EP) Through the Regional Animal Industry Center at Jinju National University, Jinju, Korea.

참고문헌

1. Pensaert MB. 1999. *Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus*. In: Disease of swine, 8 eds. Iowa State Univ Press, Ames, Iowa, USA : 295-325.
2. 강영배, 권창희, 권병준 등. 1994. 돼지유행성설사(porcine epidemic diarrhea): 발생 피해, 병리진단 및 방역대책. 대한수의사회지 34(2) : 38-56.
3. Callebaut P, Pensaert MB, Hooyberghs J. 1989. A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with the TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Vet Microbiol* 20(1) : 9-19.
4. Cox E, Pensaert MB, Callebaut P, et al. 1990. Intestinal replication of a porcine respiratory coronavirus closely related antigenically to the enteric transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol* 23(1-4) : 237-243.
5. Laude H, Rasschaert D, Delams B, et al. 1990. Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol* 23(1-4) : 147-154.
6. Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, et al. 1992. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun* 60(5) : 998-1007.
7. Yokoyama H, Peralta RC, Sendo S, et al. 1993. 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(6) : 867-872.
8. 津田知幸. 1999. 豚流行性下痢. 豚病學, 第四版, 近代出版, 東京 : 260-266.
9. Kweon CH, Kwon BJ, Woo SR, et al. 2000. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *J Vet Med Sci* 62(9) : 961-964.
10. Bohl EH and Saif LJ. 1975. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect Immun* 11(1) : 23-32.
11. Bohl EH, Frederick GT, Saif LJ. 1975. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: Intramuscular injection of pregnant swine with a modified live-virus vaccine. *Am J Vet Res* 36(3) : 267-271.
12. Kaji T and Shimizu Y. 1978. Passive immunization against transmissible gastroenteritis virus in piglets of ingestion of milk of sows inoculated with attenuated virus. *Natl Inst Anim Health Q(Tokyo)* 18(6) : 43-52.
13. Pensaert MB, Ed F. Bricout, R. Scherrer. 1979. Immunity in TGE of swine after infection and vaccination. In viral enteritis in humans and animals. *INSERM(Paris)* 90(7) : 281-293.
14. Voets MT, Pensaert M, Rondhuis PR. 1980. Vaccination of pregnant sows against transmissible gastroenteritis with two attenuated virus strains and different inoculation routes. *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 105(20) : 211-219.
15. Moxley RA, Olson LD. 1989. Clinical

- evaluation of transmissible gastroenteritis virus vaccination procedures for inducing lactogenic immunity in sows. *Am J Vet Res* 50(1) : 111-118.
16. Saif LJ, Van Cott JL, Brim TA. 1994. Immunity to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus infections in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 43 : 89-97.
 17. Leslie, GA. Clem, LW. 1969. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med* 130(6) : 1337-1352.
 18. Patterson, R. Youngner, JS. Weigle, WO. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J Immunol* 89(1) : 272-278 .
 19. Gardner, PS. Kayes, S. 1982. Egg globulins in rapid virus diagnosis. *J Virol Methods* 4(4-5) : 257-262.
 20. 清水實詞, 兒玉義勝. 1999. 免疫機構. 豚病學, 第四版, 近代出版, 東京 : 69-79.
 21. Halliwell RE, Gorman NT. 1989. Veterinary clinical immunology. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. USA : 164-192.
 22. Abou-MH, Miodrag R. 1972. Distribution of antibodies to transmissible gastroenteritis virus in serum and milk of sows: Isolation and identification of the immunoglobulin classes of swine serum and milk. *Am J Vet Res* 33(6) : 975-979.
 23. Walker WA. 1976. Host defense mechanisms in the gastrointestinal tract. *Pediatrics* 57(6) : 901-916.
 24. Yokoyama H, Hashi T, Umeda K, et al. 1973. Effect of oral antibody in experimental F18⁺ *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *J Vet Med Sci* 59(10) : 917-921.
 25. Kim O, Choi B, Kim B. et al. 2000. Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR. *Vet Rec* 146(5) : 637-640.