

IgY 투여에 따른 포유자돈의 설사에 미치는 예방효과 II. 임상증상, 병리조직학적 검사 및 면역조직학적 검사

김 문, 윤병일, 한정희*

강원대학교 수의학(부)대학
(접수 2008. 3. 4, 게재승인 2008. 3.25)

Protective effects of IgY against diarrhea in suckling piglets II. Clinical sign, histopathological lesion and immunohistochemical finding

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 25 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 the IgY. The piglets were divided into two groups: test and control group. The former (n=10) were administered orally with IgY for three days from one-day-old and experimentally challenged with PEDV and TGEV at four-day-old. The latter (n=10) were administered with saline solution and challenged with same methods. Several tests were studied and summarized as follows;

In clinical signs, the piglets of the control group showed the typical signs such as severe watery diarrhea, depression and anorexia but those of the test group recovered progressively. Control group showed 20% in mortality, but there were no death in the other. The gross lesions in the test were milder than those in the control, and there were typical findings as like congestion and distension of lumen in the control group.

In histopathological study, the piglets of the control group had shortened and fused intes-

* Corresponding author

Phone : +82-33-250-8691, Fax : +82-33-256-3722
E-mail : hanjh@kangwon.ac.kr

tinal villi and a marked loss of epithelium, whereas the others showed milder changes. It could be concluded that oral administration of IgY, specific yolk-antibody against PEDV and TGEV is effective to prevent PEDV and TGEV infection in suckling piglets.

Key words : PEDV, TGEV, IgY, Protective effect

서 론

돼지 유행성 설사(porcine epidemic diarrhea; PED)는 돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV)의 감염에 의해 발병하며 어린 자돈 뿐만 아니라 육성돈, 비육돈에서도 심한 수양성 설사를 일으키는 급성 바이러스성 장염이다. PED는 모든 연령에서 100%의 발병률을 보이며 포유자돈에서는 50% 이상의 폐사율을 야기하는 질병으로 급성의 심한 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하 등의 임상증상을 보이거나 자돈에서의 느린 전파와 낮은 폐사율을 제외하고는 TGE와 매우 유사하다¹⁻⁴⁾.

PED는 최근에 들어 유럽에서는 별로 발생하지 않으므로 중요한 돼지질병으로 인식되고 있지 않으나, 빈번하게 발생되고 있는 한국, 일본, 중국 등의 아시아 양돈국가에서는 PED에 대한 생백신을 개발하여 예방대책으로 활용하고 있다^{1,2,5)}. 국내에서는 Kweon등⁶⁾에 의하여 처음으로 PEDV가 분리 보고된 이래 세계 최초로 PED 생백신이 개발되었고, 일본에서도 PED 생백신이 개발되어 실용화되고 있다⁷⁾. 임신돈에 분만 5-6주 전에 1차, 분만 2-3주 전에 2차에 걸쳐 근육접종을 실시하여 초유 및 상유를 통하여 고역가의 모체이행항체를 포유자돈에 부여하여 점막면역을 형성함으로써 PEDV를 방어하고 있다⁷⁾. PED에 의해 많은 포유자돈이 폐사를 보이는 양돈장에서는 일시적으로 피해를 줄이기 위하여 분만예정인 2주 이상 남아 있는 임신돈을 대상으로 전형적인 병변을 보이는 감염자돈의 신선한 설사변이나 장유체액을 경구로 인공감염시켜 유증면역을 자극하는 방법이 있지만 양돈장 전체가 오염될 수도 있고 모돈이 심하게 감염되면 유산과 같

은 번식장애와 유방염 또는 무유증에 걸릴 수도 있다^{1,2,5)}.

돼지 전염성 위장염 (transmissible gastroenteritis; TGE)은 구토, 설사 등을 주된 증상으로 하는 급성 바이러스성 전염병이다. 모든 일령의 돼지가 감수성이 있지만 어린 일령일수록 발병률과 치사율이 높으며 특히 2주령 이하의 포유자돈이 감염되면 매우 심한 흡수불량성 설사와 구토를 일으켜서 탈수를 유발하며 폐사율이 거의 100%에 달하여 양돈산업에 막대한 경제적 손실을 주고 있다⁸⁻¹¹⁾.

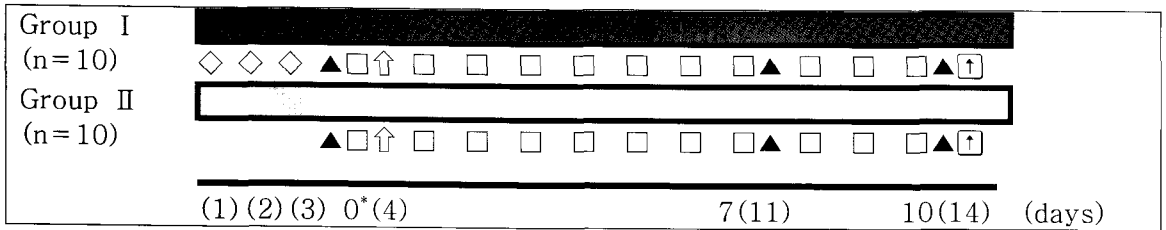
TGE는 주로 분만 2주 이내에 발병하여 자돈에 많은 피해를 야기하므로 분만하자마자 충분한 면역항체의 공급이 요구되는데 강독백신, 약독화백신, 불활화백신, subunit 백신 등의 백신을 경구, 비강, 근육, 피하, 유방에 접종하여 국소면역항체 및 혈중항체를 높여 주는 방법을 많이 이용되고 있다¹²⁻¹⁸⁾. 임신 모돈에 생바이러스를 경구감염시키면 TGEV에 대한 IgA가 유즙에 형성되어 분만 후 포유자돈에 효과적인 유증면역을 형성하여 면역원성이 좋으나 생바이러스의 병원성이 강할 때에는 감염을 일으킬 수 있는 단점이 있다¹⁹⁾.

난황 중의 항체는 포유류의 IgG 분류의 항체에 해당되나 단백질화학적 성분이 약간 다르고 또한 난황 유래의 항체이므로 IgY (Immunoglobulin yolk)라 칭한다²⁰⁾. 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 난황으로만 축적된다²¹⁾. 최근에는 산란계에 백신을 접종하여 생산된 난황으로부터 항체를 분리하여 이용하는 유증대체 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.

IgY의 장점은 토끼와 같은 소동물을 과면역시켜 그 혈액을 채취해 특이적인 항체를 획득하는 기존의 이용하던 항체에 비해 IgY는 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(complement), protein A에 전혀 반응하지 않아서 진단의 오차를 감소시키며 포유동물에서 유래한 항원에 대해 반응도(sensitivity)가 높은 장점을 지니고 있다²²⁾.



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

본 연구는 국내 양돈산업에서 신생자돈, 포유자돈 및 이유자돈에 설사증을 유발하여 경제적으로 많은 피해를 주고 있는 PED와TGE의 설사증에 대한 방어대책으로 포유자돈에 IgY를 투여하여 효과적인 수동면역을 형성시켜 PEDV와 TGEV의 공격에 대한 방어효과를 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시험동물 및 시험설계

산차를 고려하여 분만중인 모돈의 초유를 섭취하지 않은 동복의 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 실험돈방에 넣어 24시간 동안 적응시킨 후 4일령에 공격접종을 실시하였고 열흘간 관찰하였다. 실험자돈은 시기별로 채혈하고 체중을 측정하였다(Fig 1).

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

Table 1. Composition of commercial IgY used in this study

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

*: content(mg) per 1g of egg powder

시험 난황항체 (Immunoglobulin yolk)

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

PEDV와 TGEV 공격접종

공격접종시 사용된 PED와 TGE 바이러스 역가는 각각 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml이었다. 접종당일 각각 1.5ml와 1.5ml 나누어 모두 투여하였다.

임상검사 및 병리학적 검사

임상증상

실험자돈은 공격접종하기 전부터 실험종료까지 체중, 구토, 설사, 발열, 식욕부진 등의 임상증상을 매일 일정한 시간에 관찰하여 기록하였다.

체온변화

공격접종하기 전부터 실험종료까지 매일 직장에서 체온을 측정하였다.

육안검사

실험도중 폐사되거나 실험종료 시 2.2mg/kg ketamine (Katala[®], 유한양행)과 3.5mg/kg xylazine (Rompun[®], 한국바이엘)으로 안락사시킨 후 부검을 실시하여 육안소견을 관찰하였다.

병리조직학적 검사

육안소견으로 병변을 보이는 십이지장, 공장, 회장의 조직은 10% neutral buffered formalin에 고정하여 파라핀포매 과정을 거친 뒤 4 μ m 두께로 조직절편을 제작한 다음 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학적 검사

출생 직후 포유자돈에 난황항체를 경구투여한 후 PEDV와 TGEV를 공격접종시 효과적인 방어에 대한 국소면역의 형성 여부를 알아보기 위하여 소장에서 IgA와 IgG의 분포를 ABC 방법으로 1,000배 희석된 goat anti-pig IgG (Koma Biotech, Korea) 또는 goat anti-pig IgA (Koma Biotech)를 primary antibody로 면역조직화학적 검사를 하였다.

통계학적 처리

Ig Y를 경구 투여한 시험군과 투여하지 않은 대조군간의 통계처리 Statistical Analysis Software (Ver. 6.12, USA)를 이용하여 Duncan's new multiple t-test에 의하여 ($P < 0.05$) 수준에서 유의성 검정을 진행하였다.

결 과

임상검사와 병리학적 검사

임상증상

실험기간 동안 실험군의 포유자돈의 분변 상태, 원기, 식욕, 구토, 폐사 등 관찰된 임상증상은 Table 2와 같다. 실험군의 포유자돈은 공격접종 후 1일째 또는 2일째부터 설사변 또는 수양성 설사를 나타내어 1~3일간 지속된 후 공격접종 후 3일째 또는 4일째부터 설사변 혹은 연변으로 완화되기 시작하였고 4일째 또는 6일째부터 정상으로 회복되었다. 원기소실과 식욕감퇴는 공격접종 후 1일째부터 나타내었고 3두에서 구토 증상도 나타났으며 7두의 포유자돈은 3~4일간 지속된 후 정상으로 회복되었다. 1두는 초기에 심한 수양성 설사와 지속적인 설사변, 원기소실 및 식욕감퇴를 보이다가 공격접종 후 8일째에 원기 회복하여 정상으로 돌아왔다.

대조군의 포유자돈은 공격접종 후 1일째부터

심한 수양성 설사를 나타내어 2~9일간 지속 되었으며 생존한 8두에서는 8일째부터 연변으로 완화되는 경향을 보였다. 구토, 원기소실, 식욕절폐는 공격접종 후 1일째부터 심하게 나

타났으며 공격접종 후 5일째와 8일째에 2두가 폐사하여 20.0% (2/10)의 폐사율을 보였으며 난황항체를 경구투여한 실험군에 비하여 뚜렷한 임상증상과 실험자돈의 폐사가 일어났다.

Table 2. Summarized results of challenge tests in each piglet

Group	Piglet No	Clinical Signs											Mortality (%)	Body weight (kg)		Difference (kg)
		Days postchallenge												(DPC ^d)		
I ^{a)}	1	- ^{b)} 0 ^{c)}	-	-	++	++	++	+	-	+	-	-	-	2.95 (0)	3.50 (10)	0.55
	2	-	-	++ ii @	+++	+++	++	++	++	-	-	-	-	2.70 (0)	2.80 (10)	0.10
	3	-	-	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	2.10 (0)	2.20 (10)	0.10
	4	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+	-	+	1.45 (0)	1.90 (10)	0.45
	5	-	-	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	2.85 (0)	3.10 (10)	0.25
	6	-	-	+++ ii @	++	+++	+	-	-	-	-	-	-	2.50 (0)	2.90 (10)	0.40
	7	-	-	-	ii	++	i	-	-	-	-	-	-	3.30 (0)	3.50 (10)	0.20
	8	-	-	-	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	2.70 (0)	3.20 (10)	0.50
	9	-	-	-	+++ ii @	+++	++	+++	++	++	++	++	-	2.70 (0)	2.80 (10)	0.10
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.85 (0)	3.30 (10)	0.45
II	1	-	-	-	+++	+++	++	+++	+++	++	-	-	4.70 (0)	4.90 (10)	0.20	
	2	-	-	+++ iii @	++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	2.10 (0)	2.0 (10)	-0.10	
	3	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	2.70 (0)	2.30 (10)	-0.40	
	4	-	-	+++	+++	+++	+++	+	+	++	-	-	2.70 (0)	2.40 (10)	-0.30	
	5	-	-	-	+++	+++	+	++	++	++	-	-	2.10 (0)	2.25 (10)	0.15	
	6	-	-	++	+++	+++	++	+	+	++	-	-	1.90 (0)	1.50 (10)	-0.40	
	7	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	++	-	-	2.10 (0)	2.25 (10)	0.15	
	8	-	-	-	++ ii @	+++	+++	+++	+++	++	+	++	-	2.50 (0)	2.75 (10)	0.25
	9	-	-	+++	+++	+++	+++	D					1.50 (0)	1.25 (12)	-0.25	
	10	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	++	D		1.80 (0)	1.45 (15)	-0.35	

a) Group I : piglets were administrated with IgY but challenged with PEDV and TGEV

Group II : piglets were not administrated with IgY but challenged with PEDV and TGEV

b) feces= - ; normal, + ; mild diarrhea, ++ ; moderate diarrhea, +++ ; severe diarrhea.

c) depression and anorexia=0 ; normal, i ; mild, ii ; moderate, iii ; severe. @ ; vomiting, D ; died.

d) DPC=days postchallenge. e) : No of died piglets/No of tested piglets. ↓ : PEDV and TGEV challenge.

공격접종전과 실험종료까지의 체중을 시기별로 측정하였던 결과는 Table 3과 같다. 실험

군에서 증체는 0.10~0.55kg, 이는 두당 평균 증체 12.7±8.87%만큼 증가하였다. 대조

군에서는 -0.40~0.25kg, 두당 평균 증체는 -5.9±12.07%을 나타냈다. 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 높은 증체효과를 보였다($P < 0.05$).

체온변화

실험기간동안 매일 일정한 시간에 실험자돈의 직장에서 체온을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 난황항체를 경구투여하고 PEDV와

TGEV를 공격접종한 실험군의 포유자돈은 공격접종 전에는 39.15~40.30℃이었지만 공격접종 후 1일째에는 39.01~39.90℃로 낮아지는 경향을 보였으나 2일째에는 39.40~40.01℃로 높아지기도 하였으나 3일째부터 대부분 38.18~39.6℃를 유지하였다.

대조군의 포유자돈은 공격접종전 38.84~40.57℃이었지만 공격접종 후 1일째에는 38.60~39.62℃로 낮아졌으며 3일째와 6일째에 폐사된 2두의 포유자돈은 3일째 또는 4일째에 37.82~

Table 3. Comparison of the results between two groups¹⁾

Group	Experimental index			
	Weight gain(%)	Anorexia score	Diarrhea score	Mortality(%)
I	12.69 ± 8.87 ^{a(2)}	0.46 ± 0.28 ^b	0.83 ± 0.56 ^b	0/10 ³⁾ (0.0)
II	-5.86 ± 12.09 ^b	0.99 ± 0.29 ^a	1.71 ± 0.30 ^a	2/10 (20.0)

1) Values are mean ± SD, n = 10.

2) a, b: Values between groups are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's new multiple t-test.

3) No of dead piglets/No of tested piglets.

Table 4. Body temperature of piglets challenged with PEDV and TGEV

Group	Piglet No	Body temperature (°C)										
		Days post-challenge										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	1	39.58	39.01	39.80	39.70	39.50	40.04	39.29	39.00	39.31	39.01	38.82
	2	39.70	39.33	39.84	39.06	39.60	39.38	40.04	38.47	39.25	38.97	38.18
	3	39.91	38.92	39.03	39.22	38.84	39.15	39.84	38.87	39.07	38.74	38.76
	4	39.75	39.70	39.69	39.66	39.94	39.95	39.81	38.78	39.12	38.91	38.20
	5	39.73	39.55	39.40	39.27	39.22	39.77	39.43	39.09	39.48	39.03	38.31
	6	39.81	39.90	40.01	39.31	39.42	39.51	39.54	39.54	39.24	38.94	38.22
	7	39.15	39.20	39.75	39.73	39.15	39.57	40.13	38.93	39.60	39.30	38.60
	8	39.56	39.45	40.80	39.48	39.10	39.57	39.25	39.32	39.22	38.87	38.40
	9	39.42	39.41	39.50	39.75	38.78	39.30	39.07	38.96	38.91	38.91	38.61
	10	40.30	39.55	39.75	39.72	39.58	39.66	40.22	39.64	39.42	39.02	38.22
II	1	39.46	39.34	39.93	39.48	39.37	39.54	39.93	39.46	39.44	39.55	38.95
	2	39.17	39.15	39.11	38.95	39.00	39.40	39.18	38.47	38.91	38.95	38.93
	3	39.19	39.20	39.40	39.43	39.07	39.61	39.87	38.97	39.47	38.97	38.00
	4	38.84	39.01	39.22	39.04	39.25	39.19	39.60	38.63	39.13	38.63	38.62
	5	40.57	39.62	39.69	39.37	39.56	39.20	39.45	39.30	39.17	39.01	38.28
	6	39.40	39.37	40.10	39.11	39.21	39.49	39.08	38.40	39.19	38.54	38.34
	7	39.10	39.20	39.55	39.50	39.64	39.43	39.40	38.71	39.15	39.14	39.11
	8	38.82	38.91	39.38	39.07	38.83	39.34	39.12	38.23	28.35	38.72	38.31
	9	38.58	38.60	39.32	37.82	37.37	D	--	--	--	--	--
	10	38.84	39.26	39.37	38.44	39.07	38.51	38.19	38.10	D	--	--

a) Group I: piglets were administrated with IgY but challenged with PEDV and TGEV

Group II: piglets were not administrated with IgY but challenged with PEDV and TGEV

b) D=died. ↓ : PEDV and TGEV challenge.

37.37℃로 낮아졌다가 폐사하였고 생존된 8두의 포유자돈은 3일째부터 38.0~39.93℃로 나타났다.

전반적으로 실험군은 PEDV와 TGEV를 공격 접종 후 대조군보다 체온이 낮게 측정되었다.

육안검사소견

실험종료시에 부검을 실시하여 육안소견을 관

찰하였던 결과는 실험군의 공격접종 포유자돈은 소장의 장막면 혈관의 가벼운 충혈 이외에는 특이적인 육안소견이 관찰되지 않았다(Fig 2).

대조군은 실험 도중 폐사된 2두의 포유자돈은 전반적으로 소장이 암자적색으로 충혈되어 있었고 가스가 차있어 심하게 팽만되어 장내용물이 관찰될 정도로 장막이 얇아져 있었고, 장간막 림프절의 출혈, 장간막 혈관의 충혈, 맹장과 결장 내에는 수양성 내용물이 다량 차 있었다.



Fig 2. The piglet in the test showed congestion of serosal surface in small intestine.



Fig 3. The piglet in the control had congestion of serosal surface and distention of lumen contained with gas.

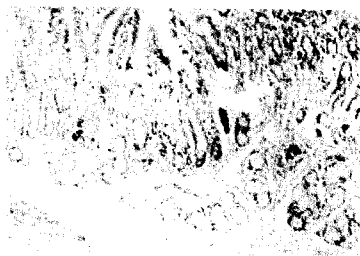


Fig 4. Duodenum of the piglet in the test showed normal appearance of villi. H&E, ×100.

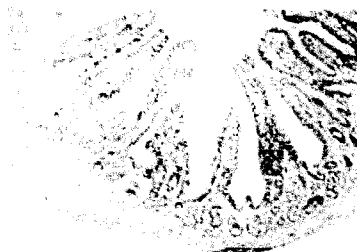


Fig 6. Jejunum of the piglet in the test showed mild atrophy and edema of villi. H&E, ×100.

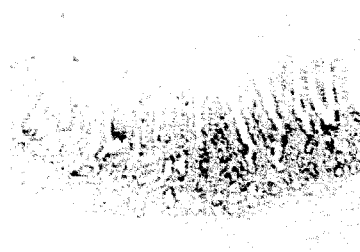


Fig 8. Ileum of the piglet in the test showed mild atrophy and fusion of villi. H&E, ×100.

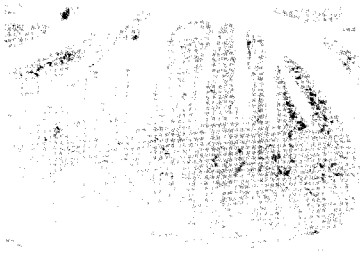


Fig 5. Duodenum of the piglet in the control showed severe atrophy of villi with loss of cilia and desquamation of epithelial cells. H&E, ×100.

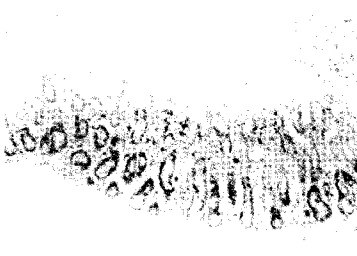


Fig 7. Jejunum of the piglet in the control showed severe atrophy of villi with desquamation of epithelial cells. H&E, ×100.

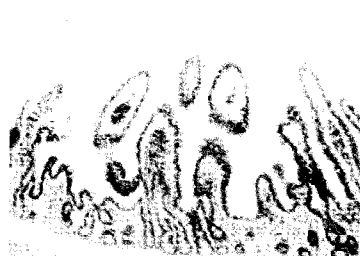


Fig 9. Ileum of the piglet in the control showed severe atrophy and fusion of villi. H&E, ×100.

Table 5. Histopathological findings in the small intestine of piglets challenged with PEDV and TGEV

Group	Piglet No	Small intestine	Vili			Epithelial cell					
			Atrophy	Fusion	Congestion	V:C ratio)	Desquamation	Vacuolation	Squamation	Loss of cilia	Proliferation of crypt
I	1	Duodenum	-	-	+	6:7:1	-	-	-	-	-
		Jejunum	-	-	-	5:6:1	+	-	-	-	-
		Ileum	+	-	+	3:4:1	-	-	+	+	+
	2	Duodenum	+	+	-	5:6:1	+	-	+	+	+
		Jejunum	+	-	+	2:3:1	+	-	-	-	+
		Ileum	+	-	+	3:4:1	-	-	+	-	+
	3	Duodenum	+	+	+	2:3:1	-	-	+	-	+
		Jejunum	+	-	+	1:3:1	-	-	-	-	+
		Ileum	+	-	+	3:4:1	-	-	-	-	+
	4	Duodenum	++	-	+	1:2:1	++	-	-	-	-
		Jejunum	+	-	-	2:3:1	-	-	+	+	++
		Ileum	+	-	-	3:5:1	+	-	+	+	+
	5	Duodenum	-	-	-	5:6:1	-	-	-	-	-
		Jejunum	+	-	-	3:4:1	-	-	-	+	-
		Ileum	+	+	+	2:3:1	+	-	-	+	+
	6	Duodenum	++	+	-	2:3:1	-	-	+	-	-
		Jejunum	+	+	-	2:3:1	+	-	+	+	+
		Ileum	+	+	+	1:3:1	-	-	-	-	+
	7	Duodenum	-	+	-	2:3:1	-	-	+	-	-
		Jejunum	+	+	+	2:3:1	+	-	+	+	+
		Ileum	++	+	+	1:3:1	-	-	-	-	+
	8	Duodenum	++	+	-	2:3:1	-	-	+	-	-
		Jejunum	+	+	+	2:3:1	+	-	+	+	+
		Ileum	+	+	-	1:3:1	-	-	-	-	+
	9	Duodenum	++	+	-	2:3:1	-	-	+	-	-
		Jejunum	+	+	+	2:3:1	+	-	+	+	+
		Ileum	+	+	-	2:3:1	-	-	-	-	+
	10	Duodenum	+	-	-	5:6:1	-	-	+	-	-
		Jejunum	+	-	+	4:5:1	+	-	+	+	+
		Ileum	+	+	+	5:6:1	-	-	-	-	+
II	1	Duodenum	+	+	++	2:3:1	+	-	++	++	-
		Jejunum	+	+	++	1:3:1	++	-	++	++	+
		Ileum	++	-	++	1:3:1	++	-	+++	+++	-
	2	Duodenum	++	+	+	1:3:1	+	-	++	+++	-
		Jejunum	++	+	++	1:3:1	++	-	++	++	+
		Ileum	+	++	++	1:3:1	++	-	++	+++	++
	3	Duodenum	+	-	-	3:5:1	+	-	-	+	+
		Jejunum	++	++	++	1:3:1	++	-	++	+++	+++
		Ileum	++	+	+	2:3:1	+	-	+	-	-
	4	Duodenum	+	++	+	1:3:1	+	-	+	+	+
		Jejunum	++	++	+	1:3:1	++	-	++	+++	-
		Ileum	+	++	-	2:3:1	++	-	++	++	+
	5	Duodenum	+	+	++	2:3:1	++	-	+	+	+
		Jejunum	++	++	+	2:3:1	++	-	++	+++	-
		Ileum	+	+++	-	2:3:1	++	-	++	++	+
	6	Duodenum	++	++	+	3:5:1	++	-	+	+	+
		Jejunum	++	+	+	2:3:1	++	-	++	+++	-
		Ileum	+	+	-	4:5:1	++	-	++	++	+
	7	Duodenum	+	++	+	5:6:1	+	-	+	+	+
		Jejunum	+	+	+	4:5:1	++	-	+++	+++	-
		Ileum	++	++	-	4:5:1	+	-	++	++	+
	8	Duodenum	++	++	+	2:3:1	++	-	+	+	-
		Jejunum	++	++	++	1:3:1	++	-	++	+++	-
		Ileum	+++	++	-	2:3:1	+++	-	+	++	+
	9	Duodenum	++	++	+	1:2:1	++	-	+	+	+
		Jejunum	+++	+++	+	1	++	-	+++	+++	-
		Ileum	+++	+++	-	7:1	+++	-	++	++	+
	10	Duodenum	++	++	+	1:2:1	++	-	+	+	+
		Jejunum	+++	+++	++	1	+++	-	+++	+++	-
		Ileum	+++	++	-	7:1	+++	-	++	++	+

a) Group I : piglets were administrated with IgY but challenged with PEDV and, TGEV

Group II: piglets were not administrated with IgY but challenged with PEDV and TGEV

b) : - ; without normal limits, + ; mild, ++ ; moderate, +++ ; severe.

c) : length of vili : length of crypt ratio

실험종료시까지 생존된 8두의 포유자돈은 소장
의 일부에 가스가 차 있어 팽만된 것 이외에는
특징적인 육안소견이 관찰되지 않았다(Fig 3).

병리조직학적 검사소견

실험군과 대조군의 포유자돈의 십이지장,
공장, 회장을 병리조직학적으로 검사한 결과
는 Table 5와 같다. 실험군 10두 포유자돈의
십이지장은 용모화가 보였다(Fig 4).

출생 후 대조군의 공격접종 후 5일째와 8일째
에 폐사한 2두의 포유자돈은 십이지장에서 용모
의 중등도 위축과 심한 융합, 용모상피세포의 탈
락, 심한 편평상피세포화와 섬모소실, 가벼운 음
외상피세포의 증식을 보였다(Fig 5). 공장은 용
모의 심한 위축과 융합, 중등도 충혈, 상피세포의
심한 탈락, 편평상피세포화, 심한 섬모소실과 가
벼운 음외상피세포의 증식을 보였다(Fig 7). 회
장은 용모의 심한 위축과 융합, 상피세포의 심한
탈락, 일부 공포화, 중등도 편평상피 세포화와 심
한 섬모소실을 보였으며 점막층에서 술잔세포의
증식이 관찰되었다(Fig 9). 실험종료시까지 실험
군 포유자돈의 십이지장은 용모의 가벼운 위축,
상피세포의 가벼운 탈락과 섬모소실, 음외상피세
포의 가벼운 증식을 보였고(Fig 4), 공장은 용모
의 심한 위축과 융합, 중등도 충혈, 상피세포의
심한 탈락과 중등도 편평상피세포화, 심한 섬모

소실과 음외상피세포의 증식을 보였다(Fig 6).
회장은 용모의 중등도 위축과 가벼운 융합, 충혈,
상피세포의 가벼운 탈락과 중등도 공포화, 가벼
운 편평상피세포화를 보였다(Fig 8).

전반적으로 PEDV와 TGEV에 의해 용모상
피세포의 공포변성과 괴사에 의한 전형적인
탈락과 위축소견은 드물다. 그러나 재생과 괴
사가 반복되어 관찰되는 경향이 있다.

면역조직화학적 검사소견

포유자돈에 특이난황항체(IgY)를 경구투여한
후 소장에서 공격접종한 PEDV와 TGEV의 항
원을 검출하고 IgA와 IgG를 생성하는 세포의
분포를 알아보려 십이지장, 공장, 회장을 면역
IgY를 경구투여에 따른 소장에서 TGEV의
항원분포는 10두 중에서 2두의 십이지장 점
막고유층에서 미약한 반응 내지 약한 반응을,
4두의 공장점막고유층에서 미약한 반응내지
약한 반응을, 2두의 회장 점막고유층과
Peyer's patch의 중심부에서 미약한 반응 에
서 약한 반응을 보였다(Fig 16, 18, 20). 대
조군에서는 10두 중에서 3두의 십이지장 점
막고유층에서 약한반응을, 4두의 공장에서는
중등도 반응을, 3두의 회장의 점막고유 층과
Peyer's patch의 중심부에서 약한 반응을 보
였다(Table 6, Fig 17, 19, 21).

Table 6. Immunohistochemical results of small intestine of piglets challenged with PEDV and TGEV

Group	PEDV antigen			TGEV antigen		
	Duodenum	Jejunum	Ileum	Duodenum	Jejunum	Ileum
I ^{a)}	+ ^{b)} ~(1/10) ^{c)}	-~+(1/10)	-~+(1/10)	-~+(2/10)	-~+(4/10)	-~+(2/10)
II	++(2/10)	+(2/10)	+(1/10)	++(3/10)	+(4/10)	+(3/10)
Group	IgA			IgG		
	Duodenum	Jejunum	Ileum	Duodenum	Jejunum	Ileum
I ^{a)}	+ ^{b)} ~++(7/10) ^{c)}	+++ (8/10)	++ (8/10)	+(2/10)	+(4/10)	+(3/10)
II	+(7/10)	++(7/10)	++(7/10)	-~+(2/10)	-~+(3/10)	-~+(3/10)

a) Group I: piglets were administered with IgY and challenged with PEDV and TGEV

Group II: piglets were not administered with IgY but challenged with PEDV and TGEV

b) : - ; without normal limits, ± ; slight, + ; mild, ++ ; moderate, +++ ; intensive.

c) : No of pigs with immunohistochemical lesions/No. of tested pigs.

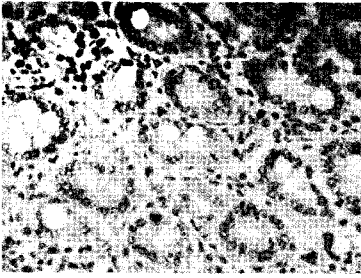


Fig 10. Duodenum of the piglet in the test showed showed a amount of PEDV positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

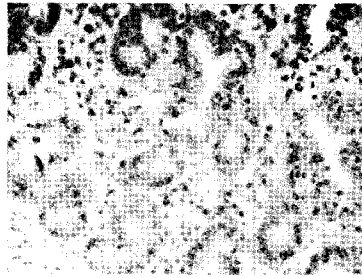


Fig 12. Jejunum of the piglet in the test showed showed many numbers of PEDV positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

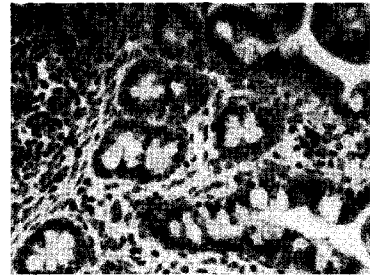


Fig 14. Ileum of the piglet in the test showed showed many numbers of PEDV positive cells in the lamina propria and Peyer's patch. ABC, $\times 100$.



Fig 11. Duodenum of the piglet in the test showed showed a few of PEDV positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

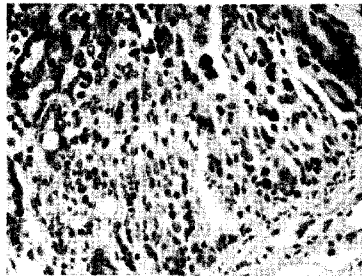


Fig 13. Jejunum of the piglet in the test showed showed a few of PEDV positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

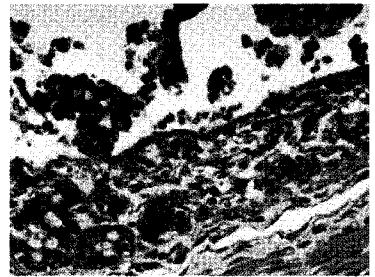


Fig 15. Ileum of the piglet in the test showed showed a few of PEDV positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

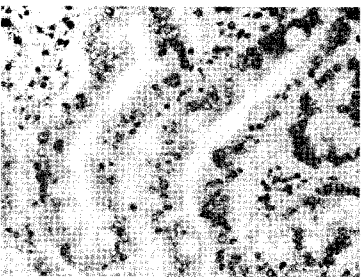


Fig 16. Duodenum of the piglet in the test showed showed a amount of TGEV positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

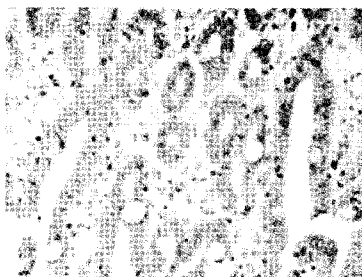


Fig 18. Jejunum of the piglet in the test showed showed a amount of TGEV positive cells in the lamina propria and crypt. ABC, $\times 100$.

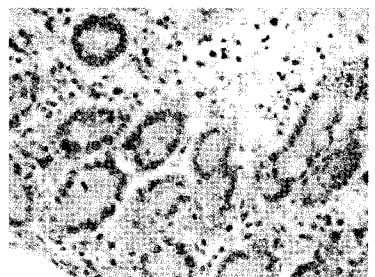


Fig 20. Ileum of the piglet in the test showed showed a amount of TGEV positive cells in the lamina propria and Peyer's patch. ABC, $\times 100$.

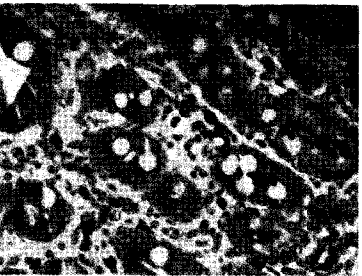


Fig 17. Duodenum of the piglet in the test showed showed a few of TGEV positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

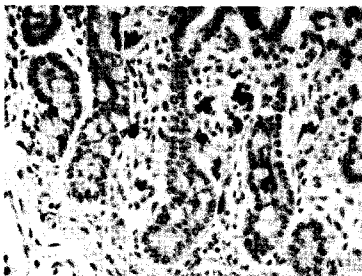


Fig 19. Jejunum of the piglet in the test showed showed a few of TGEV positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

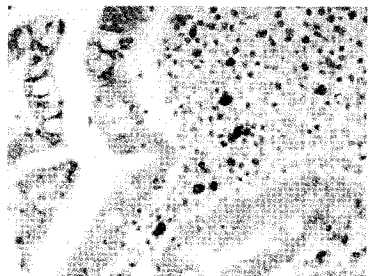


Fig 21. Ileum of the piglet in the test showed showed a few of TGEV positive cells in the lamina propria and villi. ABC, $\times 100$.

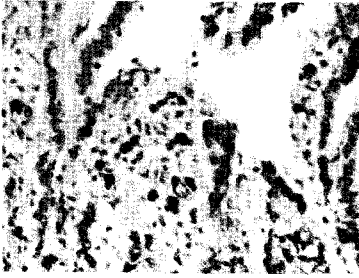


Fig 22. Duodenum of the piglet in the test showed showed a amount of IgG positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

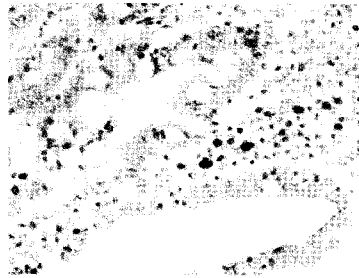


Fig 24. Jejunum of the piglet in the test showed showed many numbers of IgG positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

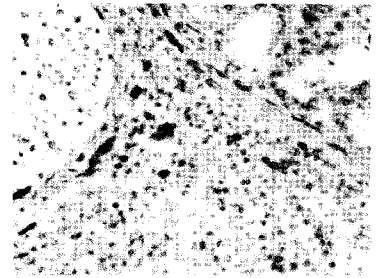


Fig 26. Ileum of the piglet in the test showed showed many numbers of IgG positive cells in the lamina propria and Peyer's patch. ABC, $\times 100$.

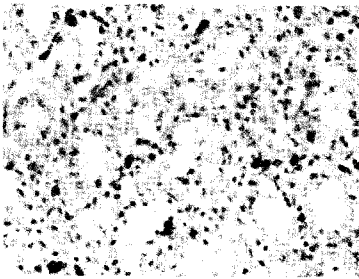


Fig 23. Duodenum of the piglet in the test showed showed a few of IgG positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

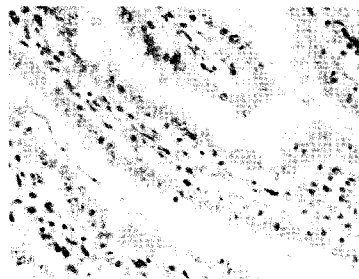


Fig 25. Jejunum of the piglet in the test showed showed a few of IgG positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

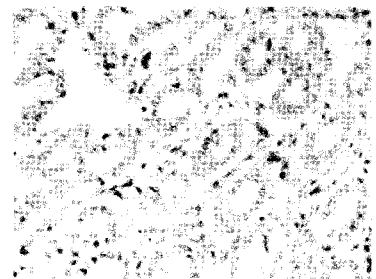


Fig 27. Ileum of the piglet in the test showed showed a few of IgG positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

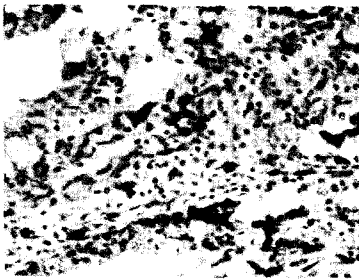


Fig 28. Duodenum of the piglet in the test showed showed a amount of IgA positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

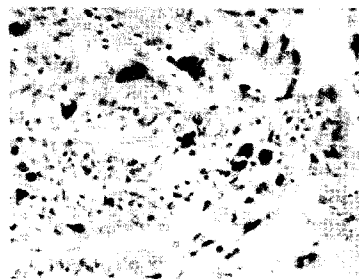


Fig 30. Jejunum of the piglet in the test showed showed a amount of IgA positive cells in the lamina propria and crypt. ABC, $\times 100$.

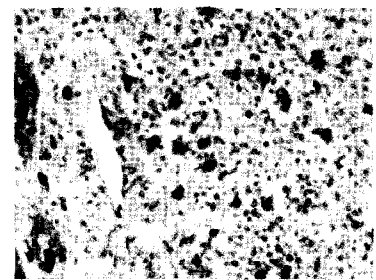


Fig 32. Ileum of the piglet in the test showed showed a amount of IgA positive cells in the lamina propria and Peyer's patch. ABC, $\times 100$.

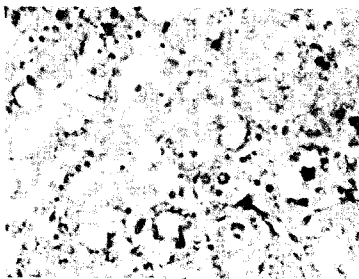


Fig 29. Duodenum of the piglet in the test showed showed a few of IgA positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

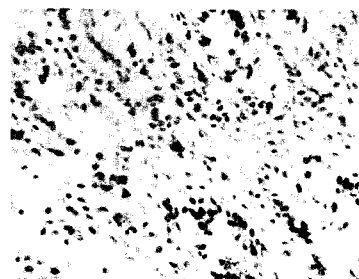


Fig 31. Jejunum of the piglet in the test showed showed a few of IgA positive cells in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

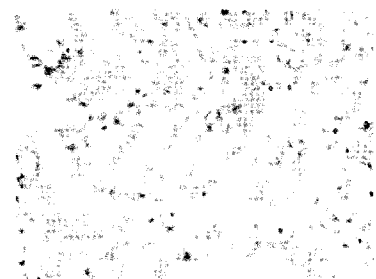


Fig 33. Ileum of the piglet in the test showed showed a few of IgA positive cells in the lamina propria and villi. ABC, $\times 100$.

전반적으로 실험군의 포유자돈의 소장에서 PEDV의 항원분포는 대조군의 포유자돈의 소장보다 약한 양성반응을 보였다.

IgY를 경구투여한 후에 공격접종한 포유자돈의 소장에서 전신면역과 깊은 관련이 있는 IgG의 분포를 관찰하였던 결과는 10두 중에서 2두의 십이지장 점막고유층에서 약한 반응을, 4두의 공장 점막고유층에서 약한 반응을, 3두의 회장 점막고유층과 Peyer's patch의 중심부에서 약한 양성 반응을 보였다(Fig 22, 24, 26). 대조군의 포유자돈에서는 10두 중에서 2두의 십이지장 점막고유층에서 미약한 반응에서 약한 양성 반응을, 3두의 공장 점막고유층에서도 미약한 반응 내지 약한 반응을, 3두의 회장의 점막고유층과 Peyer's patch의 중심부에서 미약한 반응 내지 약한 반응을 보였다(Table 6, Fig 23, 25, 27).

IgY를 경구투여한 후에 공격접종한 포유자돈의 소장에서 점막면역과 깊은 관련이 있는 IgA의 분포를 관찰한 결과 10두 중에서 7두의 십이지장 점막고유층에서 약한 반응에서 중등도 반응을, 8두의 공장 점막고유층에서 강한 반응을, 8두의 회장 점막고유층과 Peyer's patch의 중심부에서 중등도의 양성 반응을 보였다(Fig 28, 30, 32). 대조군의 포유자돈에서는 10두 중에서 7두의 십이지장 점막고유층에서 약한 반응에서 중등도 양성반응을, 7두의 공장 점막고유층에서는 중등도 반응을, 7두의 회장의 점막고유층과 Peyer's patch의 중심부에서 중등도 반응을 보였다(Table 6, Fig 29, 31, 33).

소장에서 IgA의 분포를 관찰하였던 결과는 십이지장에서는 장샘의 상피세포와 용모상피세포 등의 점막고유층에서, 공장에서는 용모의 기저부, 음와상피세포등의 점막고유층에서, 회장에서는 Peyer's patch의 중심부와 음와상피세포에서 강한 양성반응을 관찰할 수 있었다.

실험군의 포유자돈의 소장에서 IgA 생성세포의 분포는 대조군포유자돈 소장보다 강한 양성반응을 보였음을 알 수 있었고 실험군의 포유자돈의 소장에서 IgG 생성세포의 분포는

대조군의 포유자돈 십이지장과 회장보다 다소 뚜렷하게 양성반응을 보였다.

또한 전반적으로 소장에서 IgA 생성세포의 분포가 IgG의 생성세포의 분포에 비해 강한 양성반응을 보였다(Table 6).

따라서 포유자돈에 PEDV에 대한 특이난항 항체(IgY)를 경구투여는 소화기 질병의 중요한 방어기전인 유즙대체 수동면역인 국소면역을 주관하는 IgA가 소장점막에서 많이 형성되어 방어하는 것을 알 수 있었다.

고 찰

돼지는 태아시기에는 태반을 통하여 모체로부터 항체가 직접 이행되지 않고 유즙을 통하여 이행되며 초유 중에는 다량의 IgG가 포함되어 전신감염방어에 효과적으로 작용하지만 소화관이나 호흡기의 국소감염의 방어에는 제한적이라고 보고되었다^{23,24}). IgA 생성조직은 호흡기계, 소화기계, 소화관, 유선 등의 국소면역계에 분포하며 단량체 IgA는 전신성의 면역계에서 생산되어 혈액중에 순환하고 이량체 IgA는 국소면역계에서 생산되어 혈액 중에 순환하며 점막상피세포에서도 분비성분과 결합하여 sIgA가 된다^{24,25}). sIgA는 바이러스가 숙주 세포에 부착하거나 혹은 세포내로 침입하는 능력을 차단함으로써 바이러스 중화를 일으키며 독소와 효소의 중화, 점막표면에 병원체의 흡착저지 등의 작용을 통하여 장관에서 효과적인 방어 작용을 한다고 알려져 있다²³).

TGE와 PED의 설사증에서 국소면역형성이 방어에 중요한데 IgA는 점막상피세포에서 생성하는 secretory components와 결합되어 분비형 IgA (sIgA)를 만들며 장점막에서 분비되는 sIgA는 두 개의 7S monomers가 J-chain에 의해 연결되어 있으며 위산과 소화 효소에 의해 소화되지 않고 소장의 음와부위에서 장점막상피세포를 통해서 장점막표면으로 이동되어 바이러스와 세균의 흡착과 증식을 억제하며, IgM과 IgG는 장점막고유층에 존재하면서 상피세포층의 하단부에서 2차 방

어기능을 수행한다^{23,26)}. 이와 같은 원리를 이용하여 난황항체를 출생 후 포유자돈에 경구 투여하여 고역가의 항체가 형성되어 PEDV와 TGEV의 공격에 대한 예방효과를 보고자 본 실험을 진행하였다.

PEDV는 야외에서 생후 12~24시간이면 설사를 시작한다고 보고되었다^{27,28)}. PED는 모든 연령에서 100%의 발병률을 보이며 급성의 심한 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하 등의 임상증상을 나타내며 7일령 미만의 포유자돈에서는 50~100%의 폐사율을 야기한다고 알려져 있다³⁾. TGEV에 감염된 포유자돈은 12~24시간의 잠복기를 거친 다음 심한 수양성 설사를 나타내며 구토는 설사를 시작하기 직전부터 나타나는데 포유후에는 더욱 심해진다¹⁾. 설사와 더불어 급속한 탈수가 동반되어 체중이 감소되며 7일령 이하의 포유자돈은 발병후 2~7일 내에 대부분 폐사한다²⁴⁾.

본 연구에서 실험군의 포유자돈에서는 PEDV와 TGEV를 공격접종 후 24시간부터 원기소실, 식욕감퇴와 더불어 수양성 설사를 보이기 시작하였으며 공격접종 후 실험전기간 동안 설사증세를 보이지 않은 1두를 제외한 모든 실험군에서 수양성 설사를 보인 뒤 시간이 경과함에 따라 설사변, 연변을 보이다가 실험 종료시에는 정상으로 회복되었다. 이에 반해 대조군의 포유자돈은 PEDV와 TGEV를 공격접종 후 24시간부터 원기소실과 식욕절폐, 구토와 심한 수양성 설사를 지속적으로 보였으며 2두가 폐사하여 20.0%의 폐사율을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 난황항체 투여는 PEDV와 TGEV에 대하여 완벽하게 방어할 수는 없었지만 대조군에 비해 원기소실, 식욕절폐, 설사변 등의 임상증상의 현저한 경감과 폐사가 일어나지 않으므로 난황항체투여에 의해 임상증상과 폐사율을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

PED에 감염된 포유자돈을 육안적으로 검사하면 위내에는 소화되지 않은 응유괴로 팽만되어 있고 소장내에도 소화되지 않은 응유괴를 함유한 수양성 장내용물로 충만되어 장

벽이 심하게 얇아져서 장내용물이 보인다고 하였다^{27,28)}. TGE의 전형적인 육안소견은 위에 소화되지 않은 유백색의 응유가 가득 차 점막이 충혈되고 얇아져 있으며 3일이내에 폐사된 약 50%의 포유자돈은 횡격막부위에 출혈소견을 보이며, 소장에는 황색의 악취가 심한 포말성의 수양성 내용물이 차 있으며 소장벽은 용모의 탈락과 위축으로 인하여 얇아져 투명하다^{3,29,30)}.

본 연구에서 대조군에서는 2두가 폐사하였는데 육안소견으로 심한 충혈, 출혈과 장내에는 황색의 수양성 내용물이 다량 차 있고 소장벽이 심하게 얇아졌으며 일부는 가스가 들어차 팽만되어 전형적인 감염소견을 나타내었고 전반적으로 실험군에 비해 높은 발병률과 심한 육안소견을 보였다. 난황항체를 경구 투여한 실험군의 포유자돈에서는 특징적인 소견을 보이지 않았다. 이러한 결과는 난황항체 경구투여에 의해 PEDV와 TGEV에 대한 방어효과가 나타난 것으로 사료되었다.

설사의 전형적인 병리조직학적 소견으로 소장용모의 위축이 특징적이며 용모:음와 길이의 비율이 7:1에서 3:1로 되나 심한 경우에는 1:1까지도 되며 용모상피세포는 공포화가 심하게 형성되거나 편평상피세포화 되고 때로는 완전히 탈락되며 점막고유층에는 림프구의 침윤이 나타난다고 보고되었다^{5,27,31)}.

본 연구에서 대조군의 포유자돈은 십이지장, 공장, 회장 등의 소장 전반에 걸쳐 용모의 위축과 융합, 용모상피세포의 탈락과 편평상피세포화, 섬모소실이 심하였으며 용모:음와 길이의 비율이 약 1:1로 아주 심한 소견을 보였고 공장에서 상피세포의 탈락이 가장 심하게 관찰되어 전형적인 병리조직학적 소견과 유사함을 알 수 있었다. 실험군의 포유자돈 1두에서 공장내 변성 및 괴사에 의한 상피세포 탈락 및 재생으로 섬유화 소견을 보인 외에 나머지 9두에서는 정상에 가까운 병리조직학적 소견을 보여 난황항체 경구 투여에 의해 PEDV와 TGEV가 유발할 수 있는 소장점막의 용모상피세포의 파괴가 저지

된 것으로 사료된다.

본 연구에서 난황항체를 출생직후 자돈에 경구투여함으로써 유즙대체 수동면역 형성을 유도하여 난황항체의 PEDV와 TGEV의 소장벽 흡착과 증식을 억제하거나 바이러스를 중화시켜 PEDV와 TGEV에 의한 설사를 효과적으로 방어하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과를 토대로 앞으로 야외 양돈장에서 난황항체요법을 효율적으로 활용한다면 PED와 TGE 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 방어 효과를 관찰하고자 임상검사와 병리학적 검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

임상증상에서 실험군은 경미하여 빠르게 회복되었으나 대조군은 심한 임상증상을 나타내었다.

병리학적 검사에서 대조군은 전형적이고 특징적인 병리학적 소견을 보였으나 실험군은 가벼운 소견을 보였다.

이상의 결과를 통하여 포유자돈에 난황항체를 경구투여하였을 시에 유즙대체 수동면역을 형성하여 PED와 TGE의 설사증을 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. 2000. *Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory corona virus*. In: Disease of swine, 8 eds. Iowa State Univ Press, Ames, Iowa, USA : 295-325.
2. Pensaert MB. 1999. *Porcine epidemic diarrhea*. In: Disease of swine, 8 eds. Iowa State Univ Press, Ames, Iowa, USA : 179-185.
3. Pijpers A, van Nieuwstadt AP, Terpstra C, et al. 1993. Porcine epidemic virus as a cause of persistent diarrhea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet Rec* 132(6) : 129-131.
4. 우승룡, 김종만, 권창희 등. 2003. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제기법 개발 I. 대장균 pilus 항원과 LT로 면역시킨 닭의 면역반응. *대한수의학회지* 38 : 829-836.
5. 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.
6. Kweon CH, Kwon BJ, Jung TS, et al. 1993. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea. *Korean J Vet Res* 33 : 249-254.
7. 桑原博義. 1997. PED生ワクチンの開発と使用法. *臨床獣醫* 15(3) : 45-51.
8. Cook DR, Hill HT, Taylor JD. 1991. Oral transmission of transmissible gastroenteritis virus by muscle and lymph node from slaughtered pigs. *Aust Vet J* 68(2) : 68-70.
9. Siegel JP, Hungerford LL, Hall WF. 1991. Risk factors associated with transmissible gastroenteritis in swine. *JAVMA* 199(11) : 1579-1583.
10. Saif LJ, Wesley RD. 1999. *Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus*. In: Diseases

- of swine, 8 eds, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA : 295-325.
11. 조광현, 박최규, 김영환 등. 2001. 경북지방 돼지의 전염성 위장염에 대한 혈청학적 역학조사. *한가위지* 24(3) : 271-277.
 11. Bohl EH, Saif LJ. 1975. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculation virus by different routes. *Infect Immun* 11(1) : 23-32.
 12. Bohl EH, Frederick GT, Saif LJ. 1974. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: Inter-muscular injection of pregnant swine with a modified live-virus vaccine. *Am J Vet Res* 36(3) : 267-271.
 13. Kaji T, 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(2) : 43-52.
 14. Pensaert MB. 1979. Immunity in TGE of swine after infection and vaccination. In: viral enteritis in humans and animals. Ed Bricout F, Scherrer R. *INSERM(Paris)* 90 : 281-293.
 15. Voets MT, Presaert M, Rondhuis PR. 1980. Vaccination of pregnant sows against transmissible gastroenteritis with two attenuated virus strains and different inoculation routes. *Vet Q* 105 (20) : 211-219.
 16. Moxley RA, Olson LD. 1989. Clinical evaluation of transmissible gastroenteritis virus vaccination procedures for induction lactogenic immunity in sows, *Am J Vet Res* 50(1) : 111-118.
 17. Saif LJ, van Cott JL, Brim TA. 1994. Immunity to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory co-ronavirus infections in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 43(1-3) : 89-97.
 18. Fuller DA. 1971. Field observations of the efficacy of TGE vaccine. *Vet Med Small Anim Clin* 66(12) : 1206-1208.
 19. Leslie GA, Clem LW. 1969. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med* 130(6) : 1337-1352.
 20. Patterson R, Youngner, JS, Weigle, WO, et al. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J Immunol* 89 : 272-278.
 21. Gardner PS, Kayes S. 1982. Egg globulins in rapid virus diagnosis. *J Virol Method* 4(4-5) : 257-262.
 22. Halliwell RE, Gorman NT. 1989. *Veterinary clinical immunology*. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. USA : 164-192.
 23. 清水實詞, 兒玉義勝. 1999. 免疫機構, 豚病学, 第四版, 近代出版, 東京 : 69-79.
 24. Abou-Youssef 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(5) : 975-979.
 25. Walker WA. 1976. Host defense mechanisms in the gastrointestinal track. *Pediatrics* 57(6) : 901-916.
 26. DeBouck P, Pensaert M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777. *AM J VET RES* 41(2) : 219-223.
 27. Coussement W, Ducatelle R, DeBouck

- P. 1982. Pathology of experimental CV-777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet Pathol* 19(1) : 46-56.
28. Drolet R, Morin M, Fontaine M. 1984. Hypoglycemia: A factor associated with low survival rate of neonatal piglets infected with transmissible gastroenteritis virus. *Can J Comp Med* 48(3) : 282-285.
29. Hooper BE. 1969. Lesions of the gastrointestinal tract of pigs infected with transmissible gastroenteritis. *Can J Comp Med* 33(1) : 29-36.
30. Sueyoshi M, Tsuda T, Yamazaki K, et al. 1995. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhea. *J Comp Path* 113(1) : 59-67.