

송아지 설사병 주요원인체인 소로타바이러스와 소코로나바이러스에 대한 난황항체 생산 및 면역특이성 분석

이 성* · 우승은** · 이상래*** · 김정우*

단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과*, (주)단바이오텍 생명과학연구소**,

한국생명공학연구원 국가영장류센터***

Immuno-specificity of Egg Yolk Antibodies against Bovine Rotavirus and Bovine Coronavirus causing Calf Diarrhea

Seong Lee*, Seung Eun Woo**, Sang Rae Lee*** and Jung Woo Kim*

Department of Animal Resources and Science, Dankook University*, Institute of Life Science, Danbiotech Ltd.**,

National Primate Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology***

ABSTRACT

This study was performed to produce specific egg yolk antibodies against bovine rotavirus (BRV) and bovine coronavirus (BCV) that are major pathogens causing diarrhea in calves. Chickens were immunized with BRV and BCV intramuscularly in the breast muscle by injection 5 times at two weeks interval. At 6 weeks after the first immunization of BRV or BCV, cross reactivity of each serum derived from BRV- or BCV-immunized hens was tested. Each serum antibody against BRV or BCV was reacted with only specific BRV or BCV antigens. Serum and egg yolk-antibody titers of hens against BRV or BCV were highest at 8~12 weeks after first immunization. Specific serum and egg yolk-antibody titers against BRV were about 104,000 and 107,000, respectively, and those against BCV were about 145,000 and 155,000, respectively. Hemagglutination inhibition titers in the immunized egg yolk antibodies against BRV and BCV were 5,120 and 1,280, respectively, and were ≥ 8 times higher than that in non-immunized control. These results suggested that the immunized egg yolk antibodies could effectively neutralize BRV and BCV.

(Key words : Egg yolk antibody, BRV, BCV, Neutralization)

I. 서 론

소로타바이러스 (bovine rotavirus; BRV)는 어린 가축에서 위장염을 유발하는 주요 원인으로 전세계적으로 질병이 유발되고 있다. BRV의 송아지 감염시 수양성 설사, 침울, 탈수 등의 증상이 나타나며 바이러스가 함유된 분변의 오염물을 통하여 경구감염하는 것으로 알려져 있다 (Kuroki 등, 1994; Kuroki, 1999; Ciarlet 등, 2002; Yang 등, 2008).

소코로나바이러스 (bovine coronavirus; BCV) 또한 가축에서 위장염을 유발하는 주요 원인의 하나로, 3~21일령의 어린 송아지 감염으로 많은 경제적 손실을 유발한 뿐만 아니라 성우에서도 Winter dysentery (WD)라고 하는 설사병을 유발하여 전세계적으로 많은 나라에서 막대한 경제적 피해를 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히 낙농 성우

에서 폐사율은 1~2%로 낮지만 전염율이 50~100%로 그 피해가 큰 것으로 알려져 있다 (Ikemori 등, 1997; 안과 강, 1998; Kuroki 등, 1999; Kovacs-Nolan and Mine, 2004).

BRV와 BCV는 모두 주로 경구를 통하여 체내에 침입하여 소화기 감염을 유발한다. 이러한 소화기 감염증 예방을 위해서는, 여러 가지 방법들이 시도되어 왔는데, 대표적으로 병원체에 대한 백신을 모체에 면역하여 초유내 항체를 높이는 방법이나 닭에 면역을 하여 얻어진 난황항체를 초유와 혼합 또는 초유 대용으로 이용하는 방법 등의 수동면역이 유효한 것으로 알려져 있고 이중에서도 특히 난황항체의 방어 효과에 대하여 다수 보고가 되어 왔다 (Kuroki 등 1994; Ikemori 1997; Kuroki, 1999; Bertolotti-Ciarlet 등, 2003; Kovacs-Nolan and Mine, 2004; Kim 등, 2008).

Corresponding author : Professor Jung Woo Kim, Department of Animal Resources and Science, Dankook University, San 29, Anseo, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea. Tel: +82-41-550-3651, Fax: +82-41-555-8652, E-mail: kijuw@dankook.ac.kr

난황항체는 모체가 획득한 면역항체가 난황 중에 이행한 것으로 조류를 비롯하여 양서류, 파충류 및 폐어에서도 발견되었으며, 닭을 이용한 난황항체의 생산성이나 경제성, 그리고 중간 특이성으로 인한 교차반응이 적은 잇점들로 인하여 최근 항체 생산은 물론 가축에서 감염성 질병 예방 및 치료 등에 이용하려는 시도가 많이 되고 있다(우 등, 1998; 신 등, 2000; 이 등, 2004; Kovacs-Nolan and Mine, 2004). 더욱이 근래 가축의 질병 치료나 예방을 목적으로 사용되는 항생제의 오남용과 슈퍼박테리아 출현 등 항생제 내성균 문제가 부각되고 있는 상황에서 항생제를 대체하여 치료 및 예방 효과를 발휘하는 난황항체의 이용 가능성이 부각되고 있다(이 등, 2004; Kovacs-Nolan and Mine, 2004; Lee 등, 2009; Li 등, 2009; Mathew 등, 2009).

따라서, 본 연구는 국내에서도 빈번하게 발생하고 있는 어린 송아지에서의 BRV 및 BCV 감염증에 대한 방어책 강구의 일환으로, BRC와 BCV에 대한 특이 난황항체를 생산하고 이들의 면역특이성을 분석하여 그 이용 가능성을 알아보고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 바이러스

BRV 및 BCV는 국립수의과학검역원으로 분양을 받아 실험에 이용하였다. BRV와 BCV 배양을 위하여 각각 MA104 세포주(Rhesus monkey kidney cell line)와 Madin-Darby bovine kidney (MDBK) 세포주를 사용하여 Eagle's minimum essential medium (EMEM)에 10% Fetal bovine serum (FBS)을 첨가하여 배양하였다. 바이러스를 감염시킨 후 2~3 일경에 세포변성이 확인되면 얼리고 녹이는 과정을 3회 반복하여 바이러스를 유리시키고 원심분리를 통하여 얻어진 상청액을 모아 바이러스 역가를 측정하여 면역에 이용하였다(Khattar and Pandey, 1990; 안과 강, 1998).

2. 시험동물 및 면역방법

본 연구를 위하여 36주령 Hyline Brown 품종의 산란계를 이용하였다. 외관상 건강한 개체를 1차 선별하였고 2차적으로 BRV 및 BCV에 대한 혈청 항체가를 측정하여 항체 형성이 되지 않은 30수를 시험동물로 공시하였다. 시험구의 배치는 완전 임의로 15 마리씩 2개 군으로 나누어 BRV와 BCV 면역을 실시하였다. 시험동물은 개별 케이지에 한 수씩 사육하였으며, 시험 전 기간 동안 일일 16시간 점등하였고, 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 사료와 물은 자유섭식토록 하였다.

산란계에 면역은 다음과 같이 실시하였다. 각각 1×10^8 PFU/ml의 BRV 및 BCV를 0.15M PBS에 유화시킨 0.5 ml 을 동량의 Freund's adjuvant와 혼합하여 충분히 교반한 다음 면역원으로 사용하였으며, 이를 산란계의 흉근 4군데에 각각 0.25 ml씩 근육주사를 실시하였다. 이러한 면역을 2주 간격으로 5회 수행하였다(김 등, 2000).

3. 혈청 및 난황에서 항체의 분리

혈청 항체가 측정을 위하여, 산란계의 날개정맥으로부터 혈액 2 ml을 채취하여 30분간 정치하여 응고시킨 다음, 3,000 rpm으로 원심분리하고 상청의 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 -70°C 에 보관하였다가 교차반응 시험 및 항체가 측정을 위한 실험에 사용하였다. 매일 수거된 계란으로부터 난황항체의 분리는 김 등(2000)의 방법에 따라 실시하였다. 채집한 난으로부터 난황만을 분리한 후 증류수(pH 5.0)로 10배 희석하고 다시 희석액을 pH 5.0로 적정한 후 -20°C 에서 24시간 동결하였다. 동결된 난황희석액을 해동시킨 다음, 15°C , 10,000g로 30분간 원심분리를 실시하여 상청액을 수거하였고, 다시 수거액을 8°C 에서 Whatman No. 1으로 여과하여 수용성 난황항체를 분리하여 항체가 측정 및 혈구응집억제반응 시험에 사용하였다.

4. 혈청 항체의 교차반응 시험

BRV와 BCV antigen을 산란계에 2주 간격으로 5번 면역을 실시하는 동안, 실험 6주째에 혈청 중 항체형성 유무를 확인하고 이들 항체의 각 항원에 대한 면역 특이성 검사를 실시하였다. 송아지에서 설사병을 유발한다고 알려져 있는 일부 대장균종(F4, F5, F6, F41)과 살모넬라균종(*S. typhimurium*, *S. dublin*), 그리고 각각 BRV 및 BCV 항원과의 교차반응 유무를 확인하기 위하여 indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 시험을 실시하였는데, 그 측정방법은 다음과 같다(김 등, 2000). Carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)에 각각의 항원을 혼합한 다음, MicrotestIII flexible Assay plate (Falcon, USA)에 100 μl 씩 분주하여 4°C 에서 하룻밤 동안 정치하였다. 항원이 피복된 plate를 PBS-T (0.02 M NaH_2PO_4 , 0.13 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.2)로 3회 세척하였으며, blocking buffer (5% skim milk, pH 7.3, Difco)를 175 μl 씩 분주하여 2시간 동안 25°C 에서 정치시켰다. Blocking buffer와 PBS-T를 동량으로 섞은 희석용액을 이용하여 측정에 이용될 면역한 산란계의 혈청을 각각 3배수씩 단계 희석하였으며 이를 각 well에 100 μl 씩 분주한 후 37°C 에서 1시간 30분간 반응시켰다. 2차 항체로는 alkaline phosphatase가 conjugation

되어있는 AffiniPure rabbit IgG anti-chicken IgY (Jackson, USA)를 5,000배로 희석하여 사용하였으며, 이를 각 well에 100 μ l씩 분주 후 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 이후 phosphate substrate tablets (p-nitrophenyl phosphate) (Sigma, USA)를 0.5 mM MgCl₂가 함유된 10% diethanolamine (pH 9.8) 용액에 용해시킨 기질을 plate에 가하여 37°C에서 20분간 발색반응을 시켰다. 5 M NaOH를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, Microplate reader (Molecular Devices; E Max)를 사용하여 405 nm에서 흡광도 (optical density)를 측정하였다. 이 결과를 이용하여 항체가 산출하였으며 모든 실험은 3반복 실시하였다.

5. 혈청 및 난황내 항체역가 측정

BRV 및 BCV에 대한 혈청 및 난황내 항체가 측정은 실험 0, 2, 4, 6, 8, 12 주차에 ELISA법으로 실시하였으며, 앞서 서술한 교차반응 시험과 동일한 수순으로 진행하였다 (김 등, 2000). 항원으로 각각 1×10^8 PFU/ml의 BRV 및 BCV 배양액을 사용하였으며, 면역한 산란계의 혈청 및 난황항체를 각각 3배수씩 단계 희석하여 실험에 사용하였으며 모든 실험은 3반복 실시하였다.

6. 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition test)

혈구응집반응 (Hemagglutination; HA) 및 혈구응집억제반응 (Hemagglutination inhibition; HI) 시험은 Park 등 (2007)의 방법을 변형하여 실시하였다. HA 시험은 BRV 및 BCV 각각의 배양액을 96-well V bottom plate (Falcon)에서 PBS로 2배수씩 단계 희석을 한 다음, VAD buffer (0.15M NaCl, 0.3M Na₂HPO₄, 0.15M NaH₂PO₄, pH 6.0)에 0.5%로 희석한 돼지 적혈구 용액을 동일부피로 첨가하여 혼합하고 4°C에서 정치하여 혈구응집반응을 유도하였다. HI 시험을 위하여, 우선 실험 12주차에 획득한 난황항체 수용액을 2배수씩 단계 희석하여 50 μ l씩 분주한 다음, 동일 부피의 바이러스 배양액 (4 HA units/50 μ l)을 첨가하여 혼합하고 상온에서 1시간 동안 정치하였다. 이후, 동일 부피의 0.5% 돼지 적혈구 희석액을 가한 다음, 4°C에서 12시간 응집억제반응을 유도하였다. 모든 시험은 독립실험으로 2반복 실시하였다.

III. 결 과

1. BRV와 BCV를 면역한 산란계에서 혈청 항체의 면역특이성

BRV와 BCV antigen을 산란계에 2주 간격으로 5번의 면

역을 실시하는 동안, 실험 6주째에 혈청 중 항체형성 유무를 확인하고 이들 항체의 각 항원에 대한 면역 특이성을 조사하기 위하여 일부 대장균종 (F4, F5, F6, F41)과 살모넬라균종 (*S. typhimurium*, *S. dublin*), 그리고 각각 BRV 및 BCV 항원과의 교차반응 시험을 실시하였다. 그 결과, BRV 및 BCV를 면역한 혈청은 각각 BRV 항원과 BCV 항원과 특이적인 결합반응 보였으며, 시험에 사용한 대장균종과 살모넬라균 종과는 전혀 반응하지 않는 것으로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Cross reactivity test of serum antibodies against BRV and BCV in laying hens

Antigens	Serum antibodies*	
	Anti-BRV	Anti-BCV
<i>E. coli</i> F4 (K88)	-	-
<i>E. coli</i> F5 (K99)	-	-
<i>E. coli</i> F6 (987P)	-	-
<i>E. coli</i> F41	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
<i>Salmonella dublin</i>	-	-
BRV	++	-
BCV	-	+++

* Range of titer, +++: > 100,000; ++: > 50,000 < 100,000; +: < 50,000; - : < 1,000

2. 산란계 혈청과 난황내 BRV와 BCV에 대한 항체 역가의 변화

BRV와 BCV antigen을 산란계에 2주 간격으로 5회 면역한 다음, 실험 0, 2, 4, 6, 8, 12주에 각각의 항원에 대한 혈청 및 난황내 항체 역가를 측정하였다. 그 결과, BRV 및 BCV에 대한 혈청 및 난황내 항체역가는 면역한 후 2주 경부터 증가되기 시작하여 8~12주경에는 최고의 수준에 도달하였다 (Fig. 1). BRV에 대한 항체의 경우, 혈청과 난황내에서 면역 후 12주째에 각각 약 104,000과 107,000의 역가 수준을 보였으며 (Fig. 1A), BCV의 경우, 8주째에 각각 약 145,000과 155,000의 수준을 보였다 (Fig. 1B). 그리고, BRV와 BCV를 면역한 산란계 모두에서 BRV 및 BCV 항원 면역 첫 접종부터 4주경까지는 혈청항체 역가의 수준이 난황항체 역가의 수준보다 높았으나 8주 이후부터는 난황항체의 역가 수준이 더 높은 것으로 나타났다 (Fig. 1).

2. BRV 및 BCV에 대한 난황항체의 특이 중화반응

BRV 및 BCV를 면역한 산란계로부터 획득한 난황항체가 각 바이러스 항원을 중화할 수 있는 능력 유무를 확인

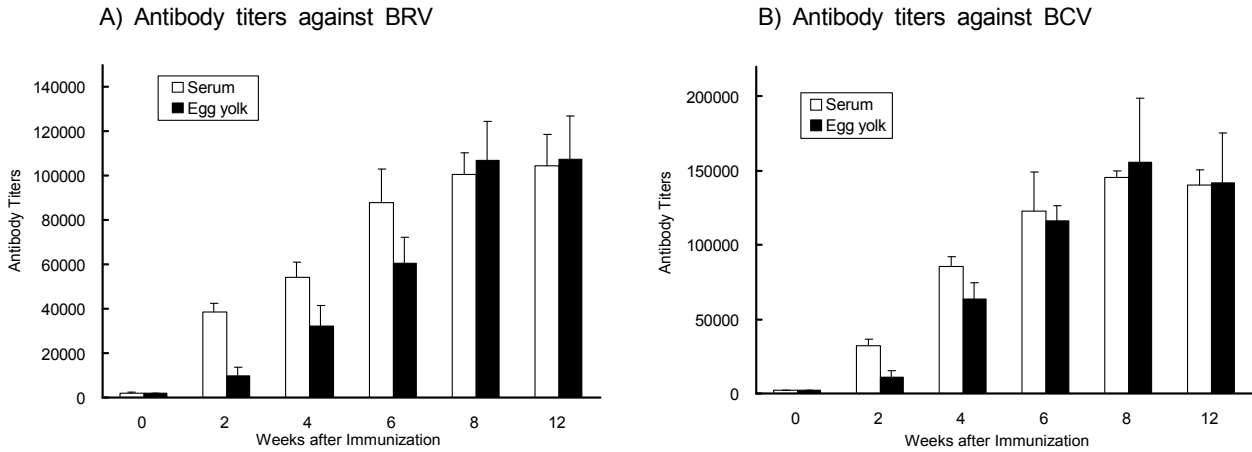


Fig. 1. Developmental changes of serum- and egg yolk-antibody titers of hens immunized with different viral antigens.

Serum; serum antibody titer, Egg yolk; egg yolk antibody titer.

하기 위하여 혈구응집억제반응시험 (HI test)을 실시하였다. 그 결과, BRV 항원을 면역한 산란계로부터 얻어진 난황항체의 HI unit는 5,120로 비면역 대조군의 난황항체 역가 160에 비해 월등히 높은 것으로 나타났으며 (Table 2), BCV 항원을 면역한 산란계의 난황항체도 역시 HI unit가 1,280으로 대조군에 비하여 높은 중화력을 나타내는 것으로 조사되었다 (Table 3).

Table 2. Hemagglutination inhibition activity of egg yolk-antibodies of hens immunized with BRV

Group	HI titers of WSF* against BRV
Non-immunized hens	160
BRV-immunized hens	5,120

* Water soluble fraction (WSF) obtained from egg yolk at 12 weeks after the first immunization.

Table 3. Hemagglutination inhibition activity of egg yolk-antibodies of hens immunized with BCV

Group	HI titers of WSF* against BCV
Non-immunized hens	160
BRV-immunized hens	1,280

* Water soluble fraction (WSF) obtained from egg yolk at 12 weeks after the first immunization.

IV. 고 찰

난황항체는 다클론성 항체이나 종특이적인 면역체계에 인하여 교차반응이 적은 항체 생산이 가능한 것으로 알려져 있다 (Knecht 등, 1996; Kovacs-Nolan and Mine, 2004). 본 연구에서도 BRV와 BCV 항원을 면역한 산란계의 혈청

을 이용하여 가축에서 질병을 유발하는 일부 대장균종 (F4, F5, F6, F41)과 살모넬라균종 (*S. typhimurium*, *S. dublin*), 그리고 각각 BRV 및 BCV 항원과의 교차반응 시험을 실시한 결과, BRV 및 BCV를 면역한 혈청은 각각 BRV 및 BCV 항원과만 특이적인 결합반응 보였다. 이러한 결과는, BRV와 BCV antigen을 면역한 산란계로부터 BRV 및 BCV 특이적인 항체 생산이 가능하며, 이 난황항체를 이용하여 수동면역 유도 시, 특이적인 항원항체 결합반응이 유발될 가능성이 큰 것으로 사료되었다. 또한 혈구응집억제반응 시험에서 BRV 및 BCV 항원을 면역하여 획득한 난황항체의 중화능력이 면역하지 않은 대조군에 비하여 8배 이상으로 월등히 높은 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여, 면역에 의하여 획득된 난황항체가 실질적으로 바이러스를 중화할 수 있는 활성이 있다는 것을 재확인하였다. 따라서, 본 연구에서 생산된 BRV, BCV에 대한 특이 난황항체를 현장에 적용할 경우, BRV 및 BCV의 증식을 효과적으로 억제시킬 수 있을 것으로 사료된다.

산란계에서 각각의 항원을 접종한 후 주별 난황항체가의 변화수준은 혈청항체가의 변화와 비슷한 양상을 보였으나 그 변화 양상이 혈청항체가 보다 2주 정도 뒤에 나타났다. 이러한 결과는 이미 보고된 바와 같은 결과와 동일한 현상으로, 혈중에 존재하는 항체가 난황으로 이전되는데 1~2주 정도가 소요되는 데서 기인된 것으로 판단된다 (Brown 등, 1989; Silim and Venne, 1989; Svendsen 등, 1996; 우 등, 1998; 신 등, 2000)

전세계적으로 BRV와 BCV는 송아지 설사병의 주요원인에 포함되며, 국내에서도 실제로 신생송아지 설사분변에서 분리가 되고 있다 (Ikemori 등, 1997; 안과 강, 1998; Kuroki, 1999; Yang 등, 2008). 이러한 BRV 및 BCV 감염증을 예방하기 위하여 여러 가지 노력들이 진행되고 있는

데, 대표적인 것이 난황항체를 이용한 수동면역이며 그 유용성이 보고되어 왔다(Kuroki 등, 1994; Ikemori 등, 1997; Kuroki, 1999; Kovacs-Nolan 등, 2001). 따라서, 국내에서도 이와 같은 시도를 할 필요성이 있으며, 더불어 난황항체의 이용을 확대할 필요성이 있다. 결론적으로 본 실험을 통하여, 송아지 설사병의 주요 원인체인 BRV 및 BCV에 대한 특이적인 난황항체를 생산하여 *in vitro*에서 그 중화 활성을 확인하였으며, 이러한 특이 난황항체를 실제 임상에 적용하기 위해서는 송아지 적용 시험이 추가적으로 이루어져야 할 것이다.

V. 요약

본 연구는 송아지 설사병의 주요원인체 중 소로타바이러스(bovine rotavirus; BRV)와 소코로나바이러스(bovine coronavirus; BCV)에 대한 난황항체를 생산하고 이의 면역 특이성을 확인하고자 실험을 실시하였으며, BRV 및 BCV를 2주 간격으로 5회 산란계에 근육주사를 실시하여 혈청과 난황내의 특이 항체 형성 유무를 확인하였다. 실험 6주차에 면역한 산란계로부터 획득한 혈청을 이용하여 교차반응 시험을 실시한 결과, BRV 및 BCV를 면역하여 얻은 혈청은 각각 BRV 및 BCV 항원과만 특이적인 결합반응을 보였다. 면역에 따른 혈청항체 및 난황항체의 수준은 실험 8-12주차에 최고도에 달했고, BRV에 대한 항체의 경우 혈청과 난황내에서 면역 후 12주째에 각각 약 104,000과 107,000의 역가 수준을 보였으며, BCV의 경우 8주째에 각각 약 145,000과 155,000의 수준을 보였다. BRV 및 BCV에 대한 중화능력 유무 확인을 위하여 분리된 난황항체를 이용하여 혈구응집억제반응 시험을 실시한 결과, BRV 및 BCV에 대한 혈구응집억제 희석비가 각각 5,120 및 1,260으로 면역하지 않은 대조군에 비하여 8배 이상 높은 중화력을 나타냈다. 이러한 결과를 종합하면, 산란계에 BRV 및 BCV를 면역하여 얻어진 난황항체는 BRV 및 BCV에 대한 면역 특이성을 가지고 중화할 수 있는 능력이 있으며, 이러한 난황항체는 BRV 및 BCV의 증식을 효과적으로 억제시킬 수 있어 임상에 적용할 경우 유용할 것으로 사료된다.

VI. 사 사

이 연구는 2007년도 농촌진흥청 농업특정연구사업의 지원(과제번호: 20070101033075)으로 이루어졌으며 이에 깊이 감사를 드립니다.

VII. 인용 문헌

1. 김정우, 김도균, 김 철. 2000. 장관독성 대장균 K99 (F5)의 섬모항원에 대한 특이 난황항체의 생산. 한국동물자원과학회지. 42:371-378.
2. 신나리, 김종만, 유한상. 2000. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한 연구 1. bordetella bronchiseptica, pasteurella multocida 및 actinobacillus pleuropneumoniae의 주요 면역원 분석 및 IgY의 생산. 대한수의학회지. 40(3):551-561.
3. 안재문, 강신영. 1998. 소 코로나바이러스에 대한 단클론항체 생산과 특성. 대한수의학회지. 38(3):581-588.
4. 우승룡, 김종만, 권창희, 이희수, 임숙경, 김종업. 1998. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제기법 개발 1. 대장균 pilus 항원과 LT로 면역시킨 닭의 면역반응. 대한수의학회지. 38(4):829-836.
5. 이희수, 김종만, 우승룡, 정병열, 조운상, 유한상, 윤용덕, 허원, 문영식, 오진식. 2004. 난황면역제를 이용한 개 주요 소화기 및 호흡기질환의 방제에 관한 연구 II. 난황면역제의 실험동물과 개에 있어서의 질병방제 효과. 대한수의학회지. 44(3):415-420.
6. Bertolotti-Ciarlet, A., Ciarlet, M., Crawford, S. E., Conner, M. E. and Estes, M. K. 2003. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. Vaccine. 21:3885-3900.
7. Brown, J., Resurreccion, R. S., Dickson, T. G. and Horne, A. 1989. The relationship of egg yolk and serum antibody. I. Infectious bursal disease virus. Avian Dis. 33(4):654-656.
8. Ciarlet, M., Hyser, J. M. and Estes, M. K. 2002. Sequence analysis of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 gene products of the bovine rotavirus WC3. Virus Genes. 24:107-118.
9. Ikemori, Y., Ohta, M., Umeda, K., Icatlo, F. C., Kurok, M., Yokoyama, H. and Kodama, Y. 1997. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. Vet. Microbiol. 58(2-4):105-111.
10. Khattar, S. and Pandey, R. 1990. Cell culture propagation of calf rotavirus and detection of rotavirus specific antibody in colostrum and milk of cows and buffaloes. Rev. Sci. Tech. 9(4):1131-1138.
11. Kim, D. S., Lee, T. J., Kang, J. H., Kim, J. H., Lee, J. H., Ma, S. H., Kim, S. Y., Kim, H. M. and Shin, S. M. 2008. Immunogenicity and safety of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine in healthy infants in

- Korea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27:177-178.
12. Knecht, W., Kohler, R., Minet, M. and Loffler, M. 1996. Anti-peptide immunoglobulins from rabbit and chicken eggs recognize recombinant human dihydroorotate dehydrogenase and a 44-kDa protein from rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 236:609-613.
 13. Kovacs-Nolan, J. and Mine, Y. 2004. Passive Immunization Through Avian Egg Antibodies. *Food Biotechnology.* 18(1):39-62.
 14. Kuroki, M. 1999. Oral passive immunization using chicken egg yolk immunoglobulins against bovine rotavirus and coronavirus infections. *Recent research developments in virology.* 1(1):95-106.
 15. Kuroki, M., Ohta, Y., Ikemori, Y., Peralta, R. C., Yokoyama, H. and Kodama, Y. 1994. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Arch. Virol.* 138:143-148.
 16. Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Park, D. W., Jang, S. I., Morales, A., Garcia, D., Lucio, E., Larios, R., Victoria, G., Marrufo, D. and Lillehoj, E. P. 2009. Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. *Vet. Parasitol.* 163(1-2):123-126.
 17. Li, X. Y., Jin, L. J., Uzonna, J. E., Li, S. Y., Liu, J. J., Li, H. Q., Lu, Y. N., Zhen, Y. H. and Xu, Y. P. 2009. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): *in vivo* evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 129(1-2): 132-136.
 18. Mathew, A. G., Rattanabtimtong, S., Nyachoti, C. M. and Fang, L. 2009. Effects of in-feed egg yolk antibodies on Salmonella shedding, bacterial antibiotic resistance, and health of pigs. *J. Food Prot.* 72(2):267-273.
 19. Park, J. S., Choi, B. K., Vijayachandran, L. S., Ayyappan, V., Chong, C. K., Lee, K. S., Kim, S. C. and Choi, C. W. 2007. Immunodetection of Canine Parvovirus (CPV) in clinical samples by polyclonal antisera against CPV-VP2 protein expressed in *Escherichia coli* as an antigen. *J. Virol. Methods.* 146(1-2):281-287.
 20. Silim, A. and Venne, D. 1989. Comparison of egg-yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme-linked immunosorbent assay using paired field samples. *Avian Dis.* 33(4):643-648.
 21. Svendsen, B. L., Crowley, A., Stodulski, G. and Hau, J. 1996. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J. Immunol. Methods.* 191(2):113-120.
 22. Yang, D. K., Kim, B. H., Lee, K. W., Kim, Y. H., Song, J. Y., Park, J. W. and Son, S. W. 2008. Genetic characterization of bovine rotavirus isolates in Korea. *Korean J. Vet. Res.* 48(4):423-429.
- (접수일자 : 2009. 8. 19. / 수정일자 : 2009. 10. 15. / 채택일자 : 2009. 10. 16.)