

이유자돈의 실험적 enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 감염에 의한 설사증에 대한 박테리오파지의 예방과 치료에 대한 효능 평가

김성재 · 김진동¹ · 양시용¹ · 김남희 · 이창희 · 양돈식 · 한정희*

강원대학교 수의과대학 · 동물종합연구소, ¹CJ 제일제당(주) 바이오사업부

(접수 2011. 9. 15; 수정 2011. 11. 3; 게재승인 2011. 11. 8)

Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection of weaned piglets

Sung-Jae Kim, Jin-Dong Kim¹, Si-Yong Yang¹, Nam-Hee Kim, Chang-Hee Lee, Don-Sik Yang, Jeong-Hee Han*

College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Bio Business Unit, CJ CheilJedang Corp., Seoul 157-724, Korea

(Received 15 September 2011; revised 3 November 2011; accepted 8 November 2011)

Abstract

Colibacillosis in pigs remain a major swine industry burden worldwide. Although some progress has been made in treating colibacillosis in pigs by using biosecurity and antimicrobials, it still remain a considerable problem. The use of host-specific bacteriophages as a biocontrol is one possible alternative. The purpose of this study was to evaluate the effect of bacteriophage against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 infection in piglets. Twenty-eight piglets were randomly divided into four groups and each group was allocated with 7 pigs. Group B, C and D were inoculated with 5 ml of ETEC K88 (1×10^8 CFU/ml) per head of piglet via oral. Group C and D were fed with bacteriophages (Group C, 1.0×10^6 PFU/g; Group D, 1.0×10^8 PFU/g; CJ CheilJedang Corp., Korea) orally as treatment. In piglets administered bacteriophages and challenged with ETEC K88 (Group C and D), Clinical signs and the growth performance were improved and antibody titers were maintained low level compared with piglets challenged with ETEC K88 (Group B, $P < 0.05$). Group B were shown high pH in the alimentary tracts compared with other piglets ($P < 0.05$). In quantitative analysis by real-time PCR, the results of Group C and D were lower than those Group B in faecal and intestinal samples ($P < 0.05$). Severe villus atrophy and crypt hyperplasia were observed in Group B consequently V/C ratio increased, compared with other piglets. These results indicate that feeding with bacteriophage has effect to prevent ETEC K88 infection in piglets and suggest that use of bacteriophage can be considered a valid antibiotic alternative.

Key words : Bacteriophage, Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), Quantitative real-time PCR, Gastrointestinal pH, V/C ratio

*Corresponding author: Jeong-Hee Han, Tel. +82-33-250-8650, Fax. +82-33-256-3722, E-mail. hanjh@kangwon.ac.kr

서 론

Bacteriophage는 1910년도에 Twort와 d'Herelle에 의해서 최초로 발견되었으며 세균성 질병의 예방과 치료법으로 사용되었으나 초기 bacteriophage에 대한 연구는 체계적인 실험이 수행되지 않았으며 결과도 만족스럽지 않았다. 이후, 항생제를 포함한 화학요법의 빠른 발전으로 bacteriophage 치료법에 대한 연구가 지속하지 못했다(Barrow와 Soothill, 1997). 최근 항생제에 내성을 가진 병원성 세균의 출현 및 증가가 문제가 되고 있으며, 이런 문제를 해결하기 위해 항생제가 개발되기 전의 치료법에 대한 관심이 높아지고 있다. 막대한 연구 비용을 들여 항생제 내성균에 작용하는 새로운 항생제를 개발한다고 해도 새로운 항생제에 내성을 가진 병원체가 출현할 가능성이 있어, 이런 악순환의 고리를 끊기 위해 항생제를 대체할 치료 전략이 필요한 실정이다(Matsuzaki 등, 2005). 이런 치료 전략 중에서 bacteriophage를 이용하는 기법이 매우 유용한 것으로 나타나 다시 관심을 받고 있으며 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Biswas 등, 2002).

Bacteriophage는 세균만을 숙주로 하여 기생하는 바이러스로 life cycle에 따라서 lytic cycle과 temperate cycle로 구분할 수 있다. Lytic cycle은 감염된 phage DNA가 phage (progeny phage)로 복제되고 세포막을 뚫고 나오면서 숙주세포를 용해한다. 배출된 progeny phage들은 주변의 세균들에 재감염된다(Barrow 등, 1998). Temperate cycle은 침투한 phage DNA가 세균의 DNA에 삽입되어 안정된 prophage를 형성하여 세균의 DNA와 함께 복제되며, 충격에 의해 prophage가 숙주 세균의 염색체에서 분리되어 lytic cycle로 변화되기도 한다. 숙주세포의 용해는 phage 복제 말기의 2가지 phage-factor가 관여하는데 lysin은 세포벽의 peptidoglycan을 분해하는 효소이며, holin은 세포막에 lysin이 접촉할 수 있는 구멍을 형성하는 물질이다(Matsuda 등, 2005; Sulakvelidze 등, 2001). 치료 목적에는 lytic life cycle을 가지는 phage를 사용하며(Guttman 등, 2005), temperate life cycle을 가지는 phage는 숙주세포로부터 불필요한 DNA를 다른 세포로 전달할 수 있기 때문에 치료 목적으로 사용하지 않고 있다(Bertani, 1953; Johnson 등 2008). 또한, bacteriophage를 치료 목적으로 사용하기 위해서는 숙주세포와 phage 간의 적절한 감염률을 나타내어야 하며 숙주세포와 phage 간에 특이성(specificity)을 나타내어야

한다(Fiorentin 등, 2005; Higgins 등, 2005; O'Flynn 등, 2006).

최근 가축 세균성 질병에 대한 bacteriophage 치료법의 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 특히 *Salmonella*, *Escherichia(E.) coli*와 *Campylobacter* 등과 같은 전 세계적으로 축산산업에 큰 피해를 주며, 인간에게도 전염되어 공중보건상 문제가 되는 세균에 대해서 bacteriophage 치료법에 대한 연구가 많이 보고되었다(Barrow 등 1998; Gill 등, 2006; Goode 등, 2003; Higgins 등 2005; Johnson 등, 2008; Loc Carrillo 등, 2005).

*E. coli*는 돼지에서 이유기의 자돈에서 설사를 일으키는 가장 중요한 원인으로 postweaning enteric colibacillosis라고도 하며 전 세계적으로 발생하고 있으며, *E. coli*에 의한 설사는 폐사, 이환, 성장률의 저하와 치료의 비용으로 경제적 손실을 일으킨다. 신생자돈이나 이유자돈에서 공통적으로 문제화되는 것은 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)에 의한 설사이다(Moon 등, 1980; Moon과 Bunn, 1993). ETEC 중 자돈설사증에서 문제 되는 항원은 F4, F5, F6, F41 등 4개의 섬모항원으로 국내에서 발생하는 ETEC 중 가장 많이 발생하는 것은 ETEC K88 (F4)이다(Kwon 등, 1999; Mainil 등, 1990). ETEC는 주로 이유 후에 문제가 되는데 LT와 ST, 2가지 장독소를 분비한다(Fairbrother 등, 1995). LT는 A subunit과 B subunit으로 구성되어 있는데 B subunit이 장세포의 솔변연에 부착하여 A subunit이 세포질로 들어갈 수 있게 하여 A subunit이 세포 내 cyclic adenosin 5'-monophosphate (cAMP)를 증가시켜 삼투압의 변화를 일으켜 수용성 설사를 일으키게 한다(Levine, 1983). 또한, ST는 STa와 STb가 있는데 STa는 사람과 돼지에게 STb는 돼지에게만 영향을 미친다. STa는 LT인 B subunit과 마찬가지로 장세포의 특이 단백질 수용체에 결합하는데 STa는 세포 내 cyclic guanosine 5'-monophosphate (cGMP)를 증가시켜 장세포의 흡수를 감소시키고 분비를 증가시켜 설사를 일으킨다(Rao, 1985).

따라서 이 연구는 양돈 산업에 막대한 경제적인 피해를 주는 돼지 설사병의 원인체 중 하나인 ETEC K88의 이유자돈 감염증에 대한 bacteriophage의 방어 효과를 확인하기 위해 진행되었다. ETEC K88에 특이성을 가진 bacteriophage를 사료에 첨가하여 사용하였으며 ETEC K88 감염과 bacteriophage 투여에 따른 임상증상, 소화기별 pH, ETEC K88에 대한 항체반응, 분변과 장기에서의 ETEC K88 검출 및 소장 병리 조직학적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

ETEC K88 특이성 bacteriophage 분리

양돈장의 분뇨처리장에서 ETEC K88에 특이적으로 작용하는 용균성 bacteriophage를 분리하였다. 시료를 4,000 rpm으로 원심 분리한 후, 0.45 µm 필터를 이용하여 전처리하였다. ETEC K88과 전처리된 시료를 37°C에서 18시간 동안 혼합배양한 뒤, 4,000 rpm으로 원심 분리 후, 0.45 µm 필터를 이용하여 상층액을 분리하였다. 이 상층액을 ETEC K88을 깔아둔 plate에 떨어뜨려 bacteriophage plaque 유무를 확인하였다. 확인된 plaque는 분리하여 동일한 과정을 3회 수행하여 단일 plaque로 정제하였다. 정제된 bacteriophage는 SM buffer (0.1 M NaCl, 1 mM MgSO₄, 0.2 M Tris (pH 7.5, 0.01% gelatin)로 희석하여 4°C에 보관하였다.

Bacteriophage 증폭 및 준비

분리된 bacteriophage는 ETEC K88을 이용하여 증폭하였다. ETEC K88을 OD=0.8까지 배양한 후, bacteriophage를 MOI 0.0001의 농도로 접종하였다. 접종한 배양액을 37°C에서 5시간 동안 추가 배양하였다. 배양액을 4,000 rpm으로 원심 분리한 후, 상층액을 0.2 µm 필터를 이용하여 정제하였다. 정제된 bacteriophage 용액은 spray drying 과정을 통해 분말화하였으며, 실험을 위해서 10⁶ PFU/g, 10⁸ PFU/g으로 준비하였다.

실험동물 및 실험설계

생후 28일령의 이유자돈(Landrace×Yorkshire) 28두를 4개 실험군으로 분류하여(Table 1) 14일간 실험을 진행하였다. 실험자돈들은 시험 개시 전 항생제 처리를 하였고 분변에서 PCR을 통해 ETEC가 검출되지 않는 것을 확인하였다. 실험 개시일부터 bacteriophage 투여군은 사료 1 kg당 bacteriophage를 1 g 혼합하여

먹이를 주었으며 실험군 C에는 1.0×10⁶ PFU/g, 실험군 D에는 1.0×10⁸ PFU/g의 bacteriophage를 투여하였다. ETEC K88을 LB broth에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 사용하였다. 배양액을 PBS (pH 7.2)로 희석하여 1.0×10⁸ CFU/ml로 조정된 다음 실험 개시일로부터 7일째에 ETEC K88을 실험돈에 경구접종하였다. 임상증상 확인을 위해 직장을 통해 체온을 측정하였으며, ETEC K88을 공격 접종한 후 매일 설사 정도를 측정하여 지수화하였다. 설사지수는 Sherman 등 (1983)의 방법에 의하여 fecal consistency (FC) score (정상적인 분, 0; 연변, 1; 묽은 설사, 2; 심한설사, 3)를 측정하였다. 항체가 조사를 위하여 시험 개시일로부터 7일, 9일, 12일 그리고 14일에 채혈을 하였다. 성장률 조사를 위해 ETEC K88 공격접종 전(-7, 실험 시작 시점), 공격접종일(0) 및 실험종료 시점(7)에 개체별 체중을 측정하여 평균일당증체(ADG, average daily gain)와 사료요구율(FCR, feed conversion rate)을 계산하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Ho 등(1992)의 indirected ELISA 방법에 따라 혈청에서 ETEC K88에 대한 IgA와 IgG 항체반응을 분석하였다. ETEC K88 LB broth에 배양하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 coating buffer (KPL, USA)에 희석하여 UV spectrophotometer (HP, USA)에 280 nm 조건에서 OD 값이 1이 되도록 하였다. 균희석액은 microplate (Costar[®] 3590 96 well assay plate)에 100 µl씩 분주하여 4°C에서 16시간 이상 coating 하였다. Coating된 plate는 PBST (0.15 M PBS, 0.05% Tween 20)로 3회 세척한 후 2% bovine serum albumine이 포함된 PBST 용액을 200 µl씩 분주하여 실온에서 2시간 동안 blocking하였다. 7회 washing한 후 비동화된 혈청을 dilution buffer로 희석하여 37°C에서 2시간 반응시키고, 혈청에 대한 secondary antibody는 각각 anti-swine IgG-HRP conjugate (KPL, USA)와 anti-swine IgA-HRP conjugate (Novus, USA)를

Table 1. Experimental group design for effect of bacteriophage against ETEC K88 in piglets

Groups	No. of heads	Inoculation of bacteria (CFU/ml)	Administration of bacteriophage (PFU/g)
A	7	-	-
B	7	1.0×10 ⁸	-
C	7	1.0×10 ⁸	1.0×10 ⁶
D	7	1.0×10 ⁸	1.0×10 ⁸

1:2,000의 비율로 PBST에 희석하여 사용하였다. 반응이 끝난 plate는 TMB solution (KPL, USA)을 사용하여 10분간 상온 암조건에서 발색반응을 수행한 후 stop solution (KPL, USA)으로 반응을 억제시키고 microplate reader (Bio-rad, USA)를 이용하여 450 nm 조건에서 측정하였다.

ETEC 검출

Conventional PCR과 real-time PCR: ETEC K88의 DNA 추출은 QIAamp DNA mini kit (Quiagen, Netherlands)를 사용하여 제조사의 실험방법에 따라 실시하였다. 공격접종 할 ETEC K88의 *LT* gene을 conventional PCR을 이용하여 증폭된 PCR products를 sequencing한 후, 분석한 염기서열을 토대로 real-time PCR용 primer (Solgent, Korea)를 제작하였다. Probe (Solgent, Korea)는 5' 말단에 FAM (6-carboxy-fluorescein), 3' 말단에 BHQ-1 (Black hole quencher-1)을 달았다(Table 2).

ETEC K88 *LT* gene 검출을 위한 conventional PCR은 DNA template 10 µl에 100 pM의 forward와 reverse primer 각각 2 µl, SolGent® Smart Taq Pre-Mix 25 µl (Solgent, Korea), nuclease free water 11 µl를 첨가한 반응액 50 µl를 initial denaturation은 95°C에서 5분간 1회 시행한 후 denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 57°C에서 30초, extension은 72°C 1분의 반응조건에서 30회 반복하였고, post extension은 72°C 5분간 1회 시행하였다. 증폭된 PCR products의 확인은 2% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, 40 mM ethidium bromide 용액에서 gel을 염색하여 UV transilluminator (Vilberlourmart, France)로 생성된 band를 확인하였다.

Real-time PCR은 DNA template 2 µl에 100 pM forward와 reverse primer 그리고 probe 0.5 µl, Premix EX Taq™ (Takara, Japan) 12.5 µl, nuclease free water 9 µl를 첨가한 반응액 25 µl를 initial denaturation은 95°C

에서 10분, 1회 시행 후, denaturation은 95°C에서 15초 annealing/extension은 60°C에서 60초, 45회 반복하였다.

Real-time PCR을 이용한 ETEC K88 정량분석: 각 실험군의 분변 내 ETEC K88 배출량을 조사하기 위해 실험자돈의 직장에서 분변을 공격접종일, 접종 2일째, 접종 5일째, 접종 7일째에 채취하였으며, 실험 종료 후 실험자돈에서의 ETEC K88의 조직 내 항원 양을 측정하기 위해 부검 후 십이지장, 공장, 회장, 결장, 장간막 림프절을 채취하였다. ETEC의 항원 양 측정은 1.0×10^8 CFU/ml의 ETEC K88 배양액에서 추출한 DNA를 십진 단계희석한 후 Smartcycler software (Cepheid, USA)를 이용하여 standard curve (Fig. 1)를 제작하였으며, 각 장기와 분변의 항원 양은 standard curve를 이용하여 계산하였다.

위장관별 pH 측정

실험 종료 후, 부검을 하여 위기저부, 십이지장, 공장 중간부, 회장 중간부, 맹장 끝 부분의 점막에서 pH 측정 리트머스(Thomas scientific, USA)를 이용하여 측정하였다.

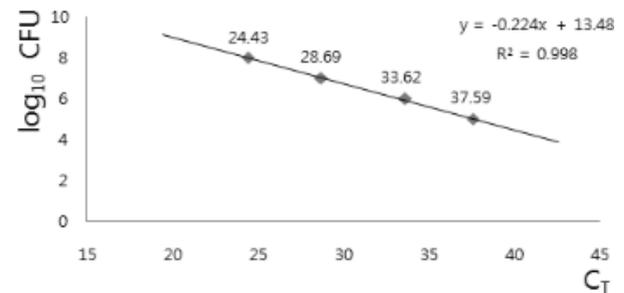


Fig. 1. Standard curve of the real-time PCR for *LT* gene of ETEC K88. The results of the real-time PCR were determined using decimal dilution of *E. coli* K88 DNA. The threshold values (C_T) were plotted against the corresponding bacterial cell number (\log_{10} CFU).

Table 2. The polymerase chain reaction primers used in the present study

PCR	Target gene		Oligonucleotide sequence (5'→3')	Product size (bp)	Reference
Conventional	<i>LT</i>	Foward	GGTTTCTGCGTTAGGTGGAA	605	Lee et al, 2008
		Reverse	GGGACTTCGACCTGAAATGT		
Real-time	<i>LT</i>	Foward	CCACCGGATCACCAAGCTT	84	This study
		Reverse	TGTGATTGTTCTTGATGAATTTCCA		
		Probe	FAM-AGAACCCTGGATTCATCATGCACCACA-BHQ1		

장조직의 형태학적 분석

실험 종료 후, 실험자돈의 십이지장, 공장, 회장, 결장 일정한 부위의 조직을 각각 3 cm씩 채취한 후 10% 중성포르말린에 넣어 48시간 고정하였다. 일반적인 조직 처리 과정을 거친 후 조직을 파라핀에 포맷하고, 3 µm 두께로 박절한 후 조직 절편을 탈파라핀화하여 재함수 과정을 거친 다음 hematoxylin과 eosin (H&E) 염색을 하였다. 장의 형태학적 분석은 용모의 높이, 음와의 깊이를 측정하여 분석하였다. 용모의 높이와 음와의 깊이는 십이지장, 공장, 회장의 상, 하, 좌, 우 네 부위를 spot diagnostic insight (Olympus, USA)를 이용하여 촬영 후 용모(V)의 높이, 음와(C)의 깊이를 측정하고, 용모의 높이:음와의 깊이의 비(V/C ratio)를 측정하였다.

통계 처리

실험 결과는 SAS ver 9.1 (SAS institute, Inc., USA)을 이용하여 통계처리를 하였다. 정규성 검정을 거쳐 비모수 실험 결과는 Kruskal-Wallis 검정을 하였으며, 모수 실험결과는 분산의 동질성 검정을 거쳐 분산이 동질한 실험결과는 LSD 검정을 하였으며, 분산이 동질하지 않은 실험결과는 Welch 검정을 하였다.

결 과

임상증상

각 실험군의 직장 체온 측정 결과는 Fig. 2와 같다.

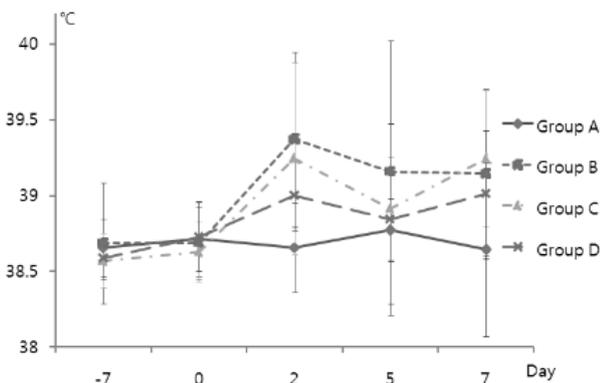


Fig. 2. Rectal temperature change of piglets according to challenge with ETEC K88.

ETEC K88 공격접종 후 2일부터 공격접종군의 체온이 약간 증가하는 경향을 보였으나 정상범위 내의 체온으로 고열 증상은 보이지 않았다. ETEC K88 공격접종 후, 일간 설사 지수를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. ETEC K88 공격접종군들은 공격접종 후 2일째부터 4일째까지 설사 지수가 증가하다가 7일까지 감소하는 경향을 보였다. 공격접종 후 7일동안 phage 투여군인 실험군 C와 D는 ETEC만 공격접종한 실험군 B군보다 낮은 설사지수를 유지하였으며, 공격접종 후 1일, 2일, 3일, 7일에서 유의차를 보였다($P < 0.05$).

성장률

실험군들의 공격접종 전 기간(Phase I), 공격접종 후 기간(Phase II)과 실험전체기간(Overall) 성장률 측정 결과는 Table 3과 같다. Phase II에서 phage 투여군인 실험군 C와 D의 ADG는 185 g, 208 g으로 ETEC K88만 공격접종한 B군의 평균증체인 166g보다 높았으며, FCR은 실험군 C가 3.456, 실험군 D가 2.463으로 실험군 B의 3.66보다 낮은 수치를 보였으나 유의차는 없었다.

항체 반응

ETEC K88 공격접종군들의 IgG OD value는 공격접종 후 2일부터 항체가가 증가하기 시작하였으며 7일까지 항체가가 증가하는 추세를 보였다. ETEC K88 공격접종군들의 IgA의 OD value는 IgG와 마찬가지로 공격접종 후 2일부터 항체가가 증가하기 시작하

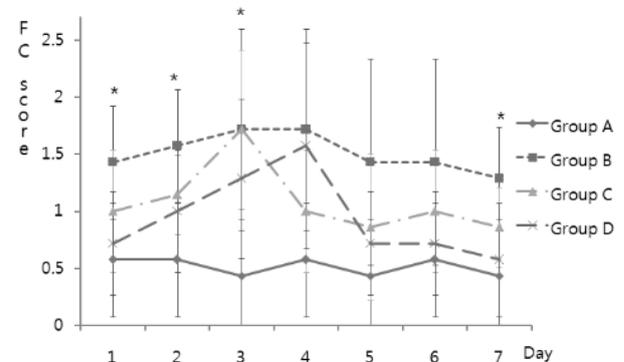


Fig. 3. FC score of piglets according to challenge with ETEC K88. Asterisks indicate significant difference among experimental groups. There was significant difference in 1 day, 2 day, 3 day and 7 day post challenge with ETEC K88 ($P < 0.05$).

Table 3. Growth performance of piglets according to administration of bacteriophage and challenge with ETEC K88

Groups	A	B	C	D	SEM*
Phase I (d 1~7)					
ADG (g)	197 [†]	216 [†]	226 [†]	207 [†]	0.023
FCR	2.35 [†]	2.35 [†]	2.00 [†]	2.316 [†]	0.291
Phase II (d 8~14)					
ADG (g)	247 [†]	166 [‡]	185 ^{†,‡}	208 ^{†,‡}	0.029
FCR	2.05 [†]	3.66 [†]	3.456 [†]	2.463 [†]	0.609
Overall (d 1~14)					
ADG (g)	222 [†]	191 [†]	206 [†]	214 [†]	0.021
FCR	2.21 [†]	2.96 [†]	2.67 [†]	2.38 [†]	0.346

*Standard error mean, ^{†, ‡}Means of within rows not followed by common letter differ significantly.

Table 4. Gastrointestinal pH of piglets according to challenge with ETEC K88

Organ	Group				P value
	A	B	C	D	
Stomach	2.2±0.40*	3.8±0.71	3.5±0.67	3.1±0.68	0.0112
Duodenum	6.0±0.20	6.1±0.29	6.1±0.15	6.1±0.19	0.38
Jejunum	6.0±0.08	6.1±0.15	6.2±0.17	6.1±0.15	0.2719
Ileum	6.3±0.39	7.1±0.54	6.6±0.21	6.4±0.30	0.006
Cecum	5.9±0.28	6.9±0.25	6.6±0.20	6.6±0.29	0.0017

*Each value is mean±standard deviation.

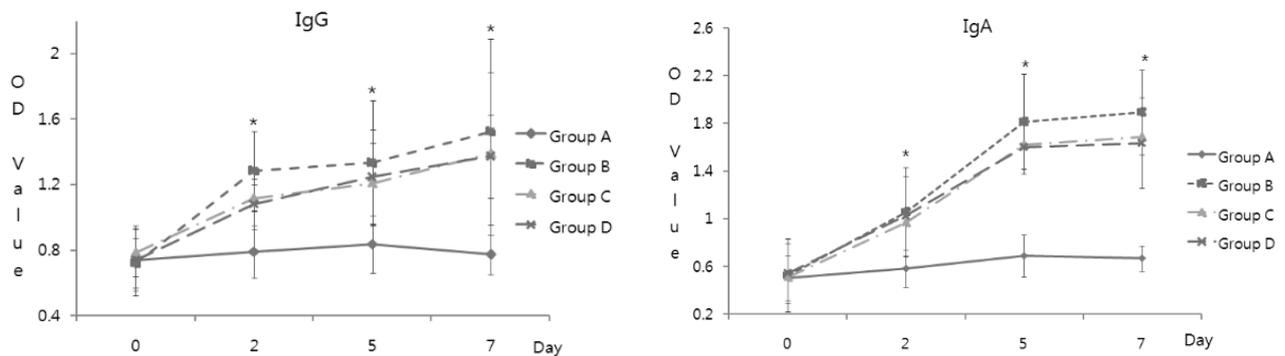


Fig. 4. Antibody (IgG and IgA) response of piglets according to challenge with ETEC K88. Asterisks indicate significant difference among experimental groups. There was significant difference in 2 day, 5 day and 7 day post challenge with ETEC K88 ($P < 0.05$).

였으며, 2일에서 5일 사이에 항체가가 급격히 증가하였다. Phage 투여군들의 IgG 및 IgA OD value는 공격 접종 2일에서 7일까지 ETEC K88만 공격접종한 B군의 OD value보다 유의적으로 낮게 유지되었으며($P < 0.05$), 실험군 C와 실험군 D의 OD value는 비슷하게 유지되었다(Fig. 4).

위장관별 pH

실험 종료 후, 각 실험군의 자돈별 위장관 pH를 측

정하였다. 위장관 전체에서 대조군(실험군 A)이 ETEC K88 공격접종군들보다 낮은 pH를 보였다. 위기저부의 pH는 bacteriophage 투여군인 실험군 C와 D가 각각 3.5, 3.1로 ETEC K88만 공격접종한 실험군 B의 3.8보다 낮은 수치를 보였다($P < 0.05$). 회장의 pH는 실험군 C와 D가 각각 6.6, 6.4, 실험군 B는 7.1이었고, 맹장의 pH는 실험군 C와 D가 각각 6.6, 6.6, 실험군 B는 6.9로 phage 투여군들이 ETEC만 공격접종한 실험군 B보다 낮은 pH를 보였다($P < 0.05$). 십이지장과 공장에서는 각 실험군 간 위장관별 pH의 유의

차가 없었다(Table 4).

분변과 조직 내 ETEC K88 정량분석

실험 종료 후, 실험군 자돈의 조직과 분변으로부터 ETEC K88 검출 및 정량 분석을 하였다. 분변에서 검출된 ETEC K88의 정량 결과는 ETEC K88 공격접종 군들에서 공격접종 후 2일부터 ETEC K88이 분변에서 검출되기 시작하였으며, 5일까지 분변으로 검출되는 양이 늘어나다가 7일에는 감소하는 경향을 보였다. 공격접종 후 2일에서 각 ETEC K88 공격접종군들간의 분변에서의 ETEC K88 정량 결과는 유의차가 없었으나, 5일에서 실험군 C는 4.76±0.42 log CFU, 실험군 D는 4.17±1.85 log CFU로 실험군 B의 5.49±0.64

log CFU보다 유의적으로 낮은 정량 결과를 보였으며 7일에서도 실험군 C가 4.10±1.84 log CFU, 실험군 D가 4.07±1.81 log CFU로 실험군 B의 5.03±0.40 log CFU로 유의적으로 낮은 수치를 보였다($P < 0.05$)(Table 5). 회장의 ETEC K88 정량결과는 bacteriophage 투여 군인 실험군 C와 D가 각각 4.29±1.93 log CFU, 3.48±2.38 log CFU로 ETEC K88만 공격접종 한 실험군 B의 5.81±0.48 log CFU보다 낮은 정량 결과를 보였다($P < 0.05$). 결장에서는 실험군 C와 D군이 각각 3.46±2.38 log CFU, 3.88±1.72 log CFU, 실험군 B는 4.67±2.09 log CFU였으나 유의차는 없었다. 장간막 림프절에서는 실험군 C와 D가 각각 3.48±2.39 log CFU, 3.39±2.35 log CFU로 B군의 5.42±0.47 log CFU보다 낮은 정량 결과를 보였다($P < 0.05$)(Table 6).

Table 5. Quantification and detection rate of ETEC K88 according to administrate with a bacteriophage in fecal samples

Day*	Group	A	B	C	D	P value†	
2	Quantitation	C _T Value	0	31.59±13.6‡	27.63±18.90	27.47±18.78	0.2022
		Log CFU	0	4.45±1.97	3.41±2.34	3.45±2.36	
	Detection rate (%)	0% (0/7)§	85.7% (6/7)	71.4% (5/7)	71.4% (5/7)		
5	Quantitation	C _T Value	0	35.52±2.84	38.76±1.88	32.83±14.5	0.0098
		Log CFU	0	4.45±0.64	4.76±0.42	4.17±1.85	
	Detection rate (%)	0% (0/7)	85.7% (6/7)	100% (7/7)	85.7% (6/7)		
7	Quantitation	C _T Value	0	37.58±1.81	33.15±14.69	33.28±14.71	0.0792
		Log CFU	0	5.03±0.40	4.10±1.84	4.07±1.81	
	Detection rate (%)	0% (0/7)	100% (7/7)	85.7% (6/7)	85.7% (6/7)		

*Day post inoculation with ETEC K88, †P value was calculated from results of log CFU, ‡Each value is mean±standard deviation, §No. of heads detected/No. of heads tested.

Table 6. Quantification and detection rate of ETEC K88 according to administrate with a bacteriophage in tissue samples

Tissue	Group	A	B	C	D	P value*	
Duodenum	Quantitation	C _T Value	-	11.05±18.84‡	16.74±20.90	5.34±14.14	0.6661
		Log CFU	0	1.36±2.34	2.01±2.52	0.72±1.91	
	Detection rate (%)	0% (0/7)‡	28.5% (2/7)	42.8% (3/7)	14.2% (1/7)		
Jejunum	Quantitation	C _T Value	-	26.39±18.15	27.35±18.71	28.29±19.46	0.7448
		Log CFU	0	3.69±2.56	3.47±2.38	3.26±2.29	
	Detection rate (%)	0% (0/7)	71.4% (5/7)	71.4% (5/7)	71.4% (5/7)		
Ileum	Quantitation	C _T Value	-	34.09±2.13	32.29±14.3	27.31±18.6	0.0127
		Log CFU	0	5.81±0.48	4.29±1.93	3.48±2.38	
	Detection rate (%)	0% (0/7)	100% (7/7)	85.7% (6/7)	71.4% (5/7)		
Colon	Quantitation	C _T Value	-	30.62±13.61	27.40±18.76	34.12±15.07	0.1609
		Log CFU	0	4.67±2.09	3.46±2.38	3.88±1.72	
	Detection rate (%)	0% (0/7)	85.7% (6/7)	71.4% (5/7)	85.7% (6/7)		
MLN§	Quantitation	C _T Value	-	35.84±2.11	27.31±18.7	27.71±19.01	0.0468
		Log CFU	0	5.42±0.47	3.48±2.39	3.39±2.35	
	Detection rate (%)	0% (0/7)	100% (7/7)	71.4% (5/7)	71.4% (5/7)		

*P value was calculated from results of log CFU, †Each value is mean±standard deviation, ‡No. of heads detected/No. of heads inspected, §Mesenteric lymph node.

Table 7. Analysis of intestinal morphology in small intestine

Item	Group				SEM*
	A	B	C	D	
Duodenum					
Villi height (μm)	540.9 [†]	305.6 [‡]	334.5 [‡]	322.9 [‡]	27.4
Crypt depth (μm)	287.0 [†]	345.3 [‡]	343.5 [‡]	316.2 [‡]	35.8
V/C ratio	1.957 [†]	0.921 [‡]	1.097 [‡]	1.108 [‡]	0.153
Jejunum					
Villi height (μm)	414.6 [†]	221.4 [‡]	243.8 [‡]	351.1 [†]	29.4
Crypt depth (μm)	233.9 [†]	258.0 [†]	264.0 [†]	210.8 [†]	24.3
V/C ratio	1.798 [†]	0.885 [‡]	1.013 [‡]	1.747 [†]	0.152
Ileum					
Villi height (μm)	406.0 [†]	228.0 [‡]	282.7 [‡]	402.0 [†]	21.5
Crypt depth (μm)	256.0 [†]	307.2 [†]	244.4 [†]	222.3 [†]	28.7
V/C ratio	1.640 [†]	0.804 [‡]	1.235 [‡]	1.868 [†]	0.130

*Standard error mean, ^{†,‡}Means within a row without a common superscript are significant differently.

실험군별 자돈의 장조직의 형태학적 분석

각 실험군 자돈별 장조직에서의 형태학적 분석은 Table 7과 같다. 십이지장의 용모가 ETEC K88 공격접종군들이 대조군(실험군 A)보다($P < 0.05$) 짧았으며, 십이지장의 V/C ratio는 ETEC K88 공격접종군들이 대조군에 비해 높은 비율이었다. 또한, ETEC K88의 공격접종군들의 십이지장 음와 깊이가 대조군보다 증가하였지만, 유의차는 없었다. 공장 용모는 bacteriophage 투여군인 실험군 D가 351.1 μm 로 ETEC K88만 공격접종한 실험군 B의 221.4 μm 보다 길었으며($P < 0.05$), 음와 깊이는 시험군 모두 유의차가 없었다. 공장의 V/C ratio는 실험군 D가 1.747로 실험군 B의 0.885보다 유의적으로 높은 비율을 보였다($P < 0.05$). 회장의 용모는 실험군 D가 402 μm 로 실험군 B군의 228 μm 보다 길었다($P < 0.05$). 회장의 V/C ratio는 실험군 C가 1.235, 실험군 D가 1.868로 실험군 B의 0.804보다 유의적으로 높은 비율을 보였다($P < 0.05$). bacteriophage 투여군들 간에도 결과 차이가 있었는데, 1×10^8 PFU/g의 bacteriophage를 투여한 실험군 D의 공장 및 회장의 용모는 1×10^6 PFU/g의 bacteriophage를 투여한 실험군 C의 용모보다 길었으며, 두 소장의 V/C ratio 또한 실험군 D가 실험군 C보다 높은 비율을 보였다(Table 7).

고 찰

1980년대, Smith에 의해 쥐를 비롯한 다양한 가축

의 *E. coli* 감염에 대한 bacteriophage 치료에 대한 연구가 진행되었으며(Smith와 Huggins, 1982), 그 이후 다양한 동물 모델을 이용한 항생제 내성균주에 대한 많은 유용한 phage 치료법들이 보고되었다(Barrow 등, 1998; Berchieri 등, 1991; Merrill 등, 1996; Ramesh 등, 1999; Xie 등 2005). 따라서 이 실험에서는 bacteriophage의 투여가 자돈의 ETEC K88 감염에 방어 효과가 있는지 확인하였다.

F4, LT와 STb같은 독성 인자를 가진 대장균 균주를 실험적으로 감염시킨 이유자돈에서 공격접종 후 1~2일에 설사가 폭발적으로 시작되었으며, 일부 자돈은 폐사하고 살아남은 자돈들은 3~4일간 설사가 지속되었다고 하였다(Sarmiento 등, 1988). 이 실험에서 ETEC K88을 공격접종한 자돈들은 대조군과 비교하여 2일째부터 설사 증상을 보이기 시작했으며 3~4일까지 설사 정도가 심해지다가 회복하는 경향을 보였다. ETEC K88 공격접종군들 내에서는 bacteriophage를 투여한 자돈들은 공격접종 후 기간 동안 ETEC K88만 공격접종한 자돈들보다 유의적으로 낮은 설사지수를 보였다($P < 0.05$). 최근 가축에서 bacteriophage 외에 건조혈장(dried plasma), 산화아연(ZNO)과 유산균(*Lactobacillus*) 등의 다양한 물질들을 사료첨가제로 사용한 시험이 수행되었으며, 세균성 질병의 감염에 대한 임상증상 및 증체량 개선에 효과가 있다고 보고되었다(조 등, 2008; Bosi 등, 2004; Johnson 등, 2008; Li 등, 2006; Toro 등, 2005; Yin 등, 2009). 이 실험에서 공격접종 후 기간(Phase II)에서 phage를 투여한 자돈들의 일당평균증체(ADG)가 ETEC K88만 공격접종한 자돈들보다 향상되었다. 하지만

유의적인 차이를 확인할 수 없었는데 실험기간이 짧아 개선 효과가 뚜렷이 나타나지 않은 것으로 생각한다.

IgG는 혈관 내에 가장 많이 포함되어 있는 immunoglobulin으로 큰 포식세포와 림프구의 반응으로 B세포가 분화하여 immunoglobulin 형성을 유도하게 된다(Sasaki 등, 1987; Moon과 Bunn, 1993; Demicheli와 Gefferson, 1996). IgA는 IgG 다음으로 혈청 내 많이 존재하는 항체로 특히 secretory IgA (sIgA)는 소화기, 호흡기, 비노기와 같이 미생물에 노출되기 쉬운 부위에서 중요한 점막 면역에 관여하는 면역글로블린이며 sIgA는 두 개의 IgA 단량체가 joining chain으로 연결된 이량체의 형태를 보이는 중합체이다(Brandtzaeg, 2003). Broeck 등(1999)은 돼지에서 F4 fimbriae를 경구접종하였을 때, 처음 접종한 돼지에서 IgG는 접종 후 5일에 IgA는 9일에 반응이 나타났지만 두 번째 접종한 돼지에서는 IgG와 IgA가 접종 후 5일에 이미 항체반응이 나타났다고 보고하였으며, ETEC K88에서 분리한 F4 접종방법에 따라 IgG와 IgA의 항체반응양이 달랐는데 근육접종의 경우 IgG가 IgA보다 많이 생성되었지만 경구접종의 경우 IgA가 IgG보다 많이 생성되었다고 보고하였다. 이 실험에서 항체반응이 빨리 일어났는데 이것은 실험자돈들이 이전에 이미 ETEC에 노출되었기 때문으로 생각된다. 또한 공격접종 후 5일부터는 IgA가 IgG보다 높게 유지되었으며 항생반응도 급하게 나타났다. 전체적으로 Bacteriophage를 투여한 자돈들의 IgG와 IgA 항체가 ETEC K88만 공격접종한 군의 자돈들보다 낮게 유지되었으며($P < 0.05$), 이것은 *E. coli*가 소장의 점막상피에 부착하여 colony 생성하는 것을 막으면 IgA의 생성이 감소하는데(Bosi 등, 2004) bacteriophage가 감염된 ETEC K88에 기생하여 세균을 파괴하는 과정에서 장점막에 ETEC K88이 colony를 생성하는 것을 방해했기 때문이라고 생각된다.

돼지의 위 정상 pH는 2.5 정도이며, 소장과 맹장의 정상 pH는 6.0 정도이다(Argenzio와 Southworth, 1975). 이 실험에서 ETEC K88을 공격접종하지 않은 자돈들은 위장관 pH가 정상 범위에 속했지만 ETEC K88을 공격접종 한 자돈들은 정상 pH보다 높았으며, phage를 투여한 자돈들이 ETEC K88만 공격접종 한 자돈들보다 소장과 맹장에서 낮은 pH를 보였다($P < 0.05$). 갓 태어난 신생자돈의 위에는 *E. coli*, streptococci, lactobacilli와 *Clostridium welchii*가 다수 존재하고 있지만 돼지가 성장하게 되면서 위의 pH가 급격

히 감소하며 위장관에서 lactobacilli를 제외한 다른 세균들이 급격하게 감소하게 된다(Smith, 1971). Lactobacilli에서 생산되는 젖산은 위장관의 pH를 낮추는 작용을 하여 항 미생물효과가 있으며 병원체를 주입한 실험에서 lactobacilli는 항체형성과 지연성 과민반응에서 T림프구가 활성화하는데, 보조역할을 하며 대식세포를 활성화하고 보체계를 활성화해 면역반응을 증진하게 한다(Lee 등, 1994). 위에서 산을 생성하는 메커니즘은 소장의 세균총 구성에 중요한 역할을 하는데 만성적으로 앓고 있는 돼지에서 이 메커니즘이 제 기능을 못하면서 소장 내 lactobacilli를 제외한 다른 세균, 특히 *E. coli*수가 증가한다(Smith, 1971). ETEC의 STa toxin은 장의 pH를 증가시키는데 STa toxin이 cGMP를 증가시켜 소장의 분비 증가와 전해질 흡수불량을 야기하는 것과 관련이 있다(McEwan 등, 1988).

ETEC는 소장의 장상피에 있는 ETEC에 대한 수용체나 장상피를 덮고 있는 점액에 부착하여 집락을 형성하여 중간 공장부위에서 회장순으로 빠르게 증식하며, 감염에 의한 집락 형성 정도에 따라 질병을 일으키게 된다(Bertschinger 등, 1990). 또한 장병원성 세균은 장상피를 통과하여 혈류나 림프절, 간, 비장 등의 다른 장기로 전파될 수 있는데 대장균 같은 항생제 내성이 있는 장내 세균이 위장관 특히 맹장에 비정상적으로 높은 집단을 형성하면 높은 수준으로 장간막 림프절에 감염된다(Steffen과 Berg, 1983). 이 실험에서 ETEC K88을 공격접종한 자돈들은 공장, 회장, 결장 및 장간막 림프절에서 ETEC K88가 높은 수준으로 검출되었으며, 특히 회장에서 높은 검출률과 정량 결과를 보였다. 군간 비교에서 Bacteriophage를 투여한 자돈들은 ETEC K88만 공격접종한 자돈들에 비해 회장과 장간막 림프절에서 낮은 정량 결과를 보였다($P < 0.05$). 분변에서도 공격접종 후 5일과 7일에 낮은 정량결과를 보였는데($P < 0.05$), bacteriophage가 소장 내 ETEC K88의 감염을 효과적으로 방어했음을 확인할 수 있다.

장병원성 세균의 감염은 소장 점막을 손상하는데 손상된 소장 점막은 용모의 위축과 음와의 증생으로 나타나며, 즉시형 또는 지연성 과민반응과 점막 염증의 원인이 된다(Li 등, 1990). 이 과정에서 심한 성장을 감소, 면역 억압과 지속적인 설사의 원인이 된다(Lallés, 1993). Rose 등(1987)은 어린 돼지에서 ETEC에 의해 분비되는 내열성 독소인 STb toxin에 의해 용모의 위축이 일어날 수 있다고 보고하였다. Yi 등

(2005)은 ETEC K88을 공격접종한 이유자돈에서 소장의 용모가 위축되었으며, 용모의 위축은 소장의 흡수 면적과 용량의 감소시킨다고 하였다. 이 실험에서 ETEC K88만 공격접종한 자돈들은 십이지장, 공장 그리고 회장을 포함한 세 소장의 용모가 정상보다 심하게 위축되었으며 음와의 증생도 뚜렷하였다. 용모 끝의 상피세포는 계속 박리되며 음와로부터 이동한 새로운 세포로 대체된다(Bosi 등 2004). ETEC K88을 공격접종한 자돈 소장의 음와 증생은 손상된 용모 회복을 위한 것으로 생각된다. 1.0×10^8 PFU/g의 bacteriophage를 투여한 자돈들은 ETEC K88만 공격접종한 자돈들에 비해 십이지장, 공장 그리고 회장을 포함한 세 소장의 용모가 정상 수준이었으며($P < 0.05$), 회장의 음와의 깊이가 낮았다($P < 0.05$). 또한, 높은 villus height : crypt depth ratio(V/C ratio)를 보였다($P < 0.05$). 하지만 1.0×10^6 PFU/g의 bacteriophage를 투여한 자돈들은 회장을 제외한 소장 부위에서 뚜렷한 개선 효과를 보이지 못하였다. 소장조직의 형태학적 분석에서 bacteriophage의 PFU에 따라 ETEC K88에 대한 방어 효능차이가 있었지만 임상증상, 성장률, 항체반응, 장관별 pH와 ETEC K88의 정량 결과에서는 큰 차이가 없었다.

위의 결과를 바탕으로 bacteriophage의 자돈에서의 ETEC K88 감염에 대한 방어 효능을 확인할 수 있었으며, 기존의 항생제 치료를 대체할 유효한 치료법으로 적용 가능할 것으로 생각한다.

결 론

ETEC K88을 공격접종한 이유자돈에서의 박테리오파지의 예방과 치료에 대한 효능 평가에서 다음과 같은 결과를 얻었다. 박테리오파지를 급여한 자돈들은 급여하지 않은 자돈들에 비해 설사증이 감소하는 경향을 보였으며, ETEC K88에 대한 항체가도 낮게 나타났다. 위장관별 pH에서도 박테리오파지를 급여한 자돈들이 급여하지 않은 자돈들에 비해 낮게 나타났으며, 장조직에서의 ETEC K88 검출률과 정량 결과도 낮게 나타났다. 또한, 박테리오파지를 급여한 자돈들은 급여하지 않은 자돈들에 비해 용모의 손상과 음와의 증생이 덜하여 높은 V/C ratio를 보였다. 위의 결과를 바탕으로 bacteriophage의 자돈에서의 ETEC K88 감염에 대한 방어 효능을 확인할 수 있었으며, 기존의 항생제 치료를 대체할 유효한 치료법으

로 적용 가능할 것으로 생각한다.

감사의 글

이번 연구는 CJ 제일제당(주)와 강원대학교 동물의학종합연구소의 지원에 의해 수행되어 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 조미선, 한성경, 유지숙, 최지현, 구분철, 신명숙, 안종석, 이완규. 2008. 양돈사료 첨가용 김치 유산균의 효능. 한국임상수의학회지 25: 67-72.
- Argenzio RA, Southworth M. 1975. Sites of organic acid production and absorption in gastrointestinal tract of the pig. Am J Phys 228: 454-460.
- Barrow P, Lovell M, Berchieri A Jr. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin Vaccine Immunol 5: 294-298.
- Barrow PA, Soothill JS. 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. Trends Microbiol 5: 268-271.
- Berchieri A Jr, Lovell MA, Barrow PA. 1991. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. Res Microbiol 142: 541-549.
- Bertschinger HU, Bachmann M, Mettler C, Pospischil A, Schraner EM, Stamm M, Sydler T, Wild P. 1990. Adhesive fimbriae produced in vivo by *Escherichia coli* O139: K12 (B): H1 associated with enterotoxaemia in pigs. Vet Microbiol 25: 267-281.
- Bertani G. 1953. Lysogenic versus lytic cycle of phage multiplication. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 18: 65-70.
- Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merrill CR. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect Immun 70: 204-210.
- Bosi P, Casini L, Finamore A, Cremokolini C, Merialdi G, Trevisi P, Nobili F, Mengheri E. 2004. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. J Anim Sci 82: 1764-1772.
- Brandtzaeg P. 2003. Role of secretory antibodies in the defence against infections. Int J Med Microbiol 293: 3-15.
- Demicheli V, Jefferson T. 1996. Economic aspects of vaccination. Vaccine 14: 941-943.
- Fairbrother JM, Nadeau É, Gyles CL. 2005. *Escherichia coli* in

- postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 6: 17-39.
- Fiorentin L, Vieira ND, Barioni W Jr. 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol* 34: 258-263.
- Gill JJ, Pacan JC, Carson ME, Leslie KE, Griffiths MW, Sabour PM. 2006. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2912-2918.
- Goode D, Allen VM, Barrow PA. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 69: 5032-5036.
- Guttman B, Raya R, Kutter E. 2005. Basic phage biology. pp. 29-66. In: Kutter E, Sulakvelidze A(ed.). *Bacteriophages: biology and applications*. CRC press, Boca Raton.
- Higgins JP, Higgins SE, Guenther KL, Huff W, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM. 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poult Sci* 84: 1141-1145.
- Ho DW, Field PR, Sjogren-Jansson E, Jeansson S, Cunningham AL. 1992. Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). *J Virol Methods* 36: 249-264.
- Johnson RP, Gyles CL, Huff WE, Ojha S, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM. 2008. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Anim Health Res Rev* 9: 201-215.
- Kwon D, Kim O, Chae C. 1999. Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and of O serogroups in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *J Vet Diagn Invest* 11: 146-151.
- Lallés JP. 1993. Nutritional and antinutritional aspects of soybean and field pea proteins used in veal calf production: a review. *Livest Prod Sci* 34: 181-202.
- Lee CH, Adler-Nissen J, Barwald G. 1994. Importance of lactic acid bacteria in non-dairy food fermentation. pp. 8-25. In: Lee CH, Adler-Nissen J, Barwald G(ed.). *Lactic acid fermentation of non-dairy food and beverages*. Harn Lim Won, Seoul.
- Lee SI, Kang SG, Kang ML, Yoo HS. 2008. Development of multiplex polymerase chain reaction assays for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli* and their application to field isolates from piglets with diarrhea. *J Vet Diagn Invest* 20: 492-496.
- Levine MM. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155: 377-389.
- Li DF, Nelssen JL, Reddy PG, Blecha F, Hancock JD, Allee GL, Goodband RD, Klemm RD. 1990. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. *J Anim Sci* 68: 1790-1799.
- Li X, Yin J, Li D, Chen X, Zang J, Zhou X. 2006. Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-I and IGF-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *J Nutr* 136: 1786-1791.
- Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, Connerton IF. 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 71: 6554-6563.
- Mainil JG, Bex F, Jacquemin E, Pohl P, Couturier M, Kaeckenbeeck A. 1990. Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am J Vet Res* 51: 187-190.
- Matsuda T, Freeman TA, Hilbert DW, Duff M, Fuortes M, Stapleton PP, Daly JM. 2005. Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and improves survival in a murine peritonitis model. *Surgery* 137: 639-646.
- Matsuzaki S, Rashed M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* 11: 211-219.
- Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3188-3192.
- McEwan GT, Daniel H, Fett C, Burgess MN, Lucas ML. The effect of *Escherichia coli* STa enterotoxin and other secretagogues on mucosal surface pH of rat small intestine. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 234: 219-237.
- Moon HW, Bunn TO. 1993. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine* 11: 213-220.
- Moon HW, Kohler EM, Schneider RA, Whipp SC. 1980. Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types, and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect Immun* 27: 222-230.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
- O'Flynn G, Coffey A, Fitzgerald G, Ross R. 2006. The newly isolated lytic bacteriophages st104a and st104b are highly virulent against *Salmonella enterica*. *J Appl Microbiol* 101: 251-259.
- Ramesh V, Fralick JA, Rolfe RD. 1999. Prevention of *Clostridium difficile*-induced ileocolitis with bacteriophage. *Anaerobe* 5: 69-78.
- Rao MC. 1985. Toxins which activate guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins. *Ciba Found Symp* 112: 74-93.
- Rose R, Whipp SC, Moon HW. 1987. Effects of *E. coli* heat stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits and lambs. *Vet Pathol* 24: 71-79.
- Sarmiento JI, Casey TA, Moon HW. 1988. Postweaning diarrhea

- in swine: Experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. Am J Vet Res 49: 1154-1159.
- Sasaki T, Fukami S, Namioka S. 1994. Enhancement of cytotoxic activity of lymphocytes in mice by oral administration of peptidoglycan (PG) derived from bifidobacterium thermophilum. J Vet Med Sci 56: 1129-1133.
- Sherman DM, Acres SD, Sadowski PL, Springer JA, Bray B, Raybould TJ, Muscoplat CC. 1983. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. Infect Immun 42: 653-658.
- Smith HW. 1971. The bacteriology of the alimentary tract of domestic animals suffering from *Escherichia coli* infection. Ann N Y Acad Sci 176: 110-125.
- Smith HW, Huggins MB. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: Its general superiority over antibiotics. J Gen Microbiol 129: 307-318.
- Steffen E, Berg R. 1983. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. Infect Immun 39: 1252-1259.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. 2001. Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents Chemother 45: 649-659.
- Toro H, Price S, McKee S, Hoerr F, Krehling J, Perdue M, Bauermeister L. 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. Avian Dis 49: 118-124.
- Van den Broeck W, Cox E, Goddeeris B. 1999. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. Vaccine 17: 2020-2029.
- Xie H, Zhuang X, Kong J, Ma G, Zhang H. 2005. Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. J Gen App Microbiol 51: 159-163.
- Yi GF, Carroll JA, Allee GL, Gaines AM, Kendall DC, Usry JL, Toride Y, Izuru S. 2005. Effect of glutamine and spray-dried plasma on growth performance, small intestinal morphology, and immune responses of *Escherichia coli* K88⁺-challenged weaned pigs. J Anim Sci 83: 634-643.
- Yin J, Li X, Li D, Yue T, Fang Q, Ni J, Zhou X, Wu G. 2009. Dietary supplementation with zinc oxide stimulates ghrelin secretion from the stomach of young pigs. J Nutr Biochem 20: 783-790.