

전북지역 양돈장에서의 돼지 부종병 항체 및 독신 양성률 조사

조선영^{1*} · 유정희^{2*} · 유영주² · 이한준¹ · 허진^{2*}

전라북도 동물위생시험소 서부지소¹, 전북대학교 수의과대학 수의공중보건학실²

Prevalence of antibody and toxin against edema disease from pig farms in Jeonbuk province

Sun-Young Cho^{1†}, Jeong Hee Yu^{2†}, Yeong Ju Yu², Han-Jun Lee¹, Jin Hur^{2*}

¹Jeollabuko Veterinary Service Laboratory West Branch, Jeongeup 56134, Korea

²Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Korea

Received December 10, 2023

Revised December 12, 2023

Accepted December 12, 2023

Corresponding author:

Jin Hur

E-mail: hurjin@jbnu.ac.kr

https://orcid.org/0000-0003-2658-0747

[†]These first two authors contributed equally to this work.

Edema disease (ED) in pigs is enterotoxemia caused by Shiga toxin type 2e (Stx2e)-producing *Escherichia coli* (STEC) and frequently occurs in young piglets. Therefore, ED causes enormous economic losses in pig farms. In this study, a modified Stx2e (mStx2e) antigen was expressed and purified using commercial *E. coli* expression system. Monoclonal antibody was serviced by Ynto Ab Inc., using Phage Display Technique. Anti-Stx2e antibodies in piglets were measured by indirect ELISA using mStx2e antigens. Naive Stx2e in piglets were detected by Sandwich ELISA using Stx2e-mono-clonal antibodies and commercial Stx2e-polyclonal antibodies. Among 3,480 piglets, anti-Stx2e antibodies were observed in 2,573 piglets. The 49.4% among 830 piglet serum samples possessed 0.625 µg/mL or more of Stx2e proteins. The 18.3% of 830 sera had 0.313 µg/mL of Stx2e proteins. The 32.3% of 830 samples held 0.156 µg/mL or less of Stx2e proteins. These results show that indirect ELISA using mStx2e antigen and Sandwich ELISA using Stx2e-mono-clonal and polyclonal antibodies can be useful to detect ED in piglets.

Key Words: Porcine edema disease, Recombinant modified Stx2e, Indirect ELISA, Sandwich ELISA, Pigs

서론

시가 독소(Stxs)는 단량체 효소 활성 A 서브유닛에 비공유 결합으로 연결된 오량체 B 서브유닛으로 구성된 AB₅ 독소의 일종이다. 이 독소는 세포 표면의 특정 수용체인 글리코스핑고지질(GSLs) 글로보트리아오실세라마이드(Gb3)에 결합한다(Johannes와 Römer, 2010; Joseph 등, 2020). 시가 독소는 면역학적으로 서로 다른 두 가지 유형인 Stx1과 Stx2로 존재하며 동일한 구조와 기능을 공유한다. 10가지 아형(Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a~Stx2g)이 있지만, 각각 50% 정도만 상동성을 갖고 있어 이종항체에 의해 교차중화되지 않는 특성을 보인다(Joseph 등, 2020). 특히 Stx2 중 Stx2e는 대부분 돼지 부종

환과 관련이 있는 반면, 다른 아형들은 사람의 질병과 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다(Boerlin 등, 1999; Orth 등, 2007; Joseph 등, 2020).

돼지에서 설사와 부종병을 유발하는 원인균은 Stx2e를 생산하는 대장균(Shiga toxin producing *Escherichia coli*: STEC)으로(Baldo 등, 2020), STEC에 감염된 돼지는 신체의 다양한 부위, 특히 결장, 위, 소장, 눈꺼풀 및 뇌 등에서 부종을 나타낼 수 있으며(Seo 등, 2022), 특히 뇌에서의 부종으로 인해 운동 실조, 발작 및 마비 등의 증상을 나타낸다(Imberechts 등, 1997; Seo 등, 2022). 또한, 돼지가 보균자 역할을 함으로써 심각한 인수공통감염병을 유발할 위험성이 있기 때문에, 돼지에 감염되는 STEC의 분리 및 특성 조사가 필요하다(Meng 등,

2014; Tseng 등, 2014; Baldo 등, 2020).

STEC를 검출하기 위한 진단법은 여러 가지가 있다. 전통적으로 선택배지를 통해 대장균을 분리한 후 특이 프라이머를 이용한 PCR이나 qPCR을 통해 시가독소를 확인하는 방법이 있다(Bettelheim 등, 2003; Kim 등, 2009). 또한, Stx1 및 Stx2에 대한 단클론 및 다중클론 항체가 개발되어 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 법 등을 통해 검출이 가능하다고 알려져 있다(Nataro와 Kaper, 1998; Gehring 등, 2017). 즉, 최근 개발된 STEC ELISA 키트는 Stx1 독소와 Stx2 독소를 구별하고 특정 단일클론 항체를 사용하여 일부 아형을 검출할 수는 있지만(Gehring 등, 2017), 상업적으로 생산된 Stx 항체 기반 면역분석법은 Stx2c, Stx2e, Stx2f 및 Stx2g와 같은 STEC의 다양한 혈청형에 의해 생성된 Stxs의 모든 하위 유형을 검출할 수는 없는 것으로 알려져 있다(Feng 등, 2011; Seo 등, 2016; Gehring 등, 2017).

qPCR은 STEC 감염성 질환의 실험실 진단에 있어 자주 사용되고 있는 진단법이기도 하지만, 높은 수준의 숙련과 정교한 장비에 매우 의존적이며, 특히 많은 가검물을 진단함에 있어 시간이 많이 소요되기 때문에 항체 검출과 같은 혈청학적 시험이 PCR에 대한 대안으로 사용되고 있다(Kim 등, 2009; Ahmed 등, 2015).

ELISA는 거대분자 단백질, 박테리아, 바이러스를 검출하는 가장 편리하고 일반적인 방법이라고 알려져 있다(Wang 등, 2021). 이 방법은 매우 민감하고 특이성이 높으며 안정적인 시약과 저렴한 장비를 사용하여 높은 재현성과 정확한 결과를 제공할 수 있어 대단위 검사가 필요한 동물 질병 진단 등에 주로 사용되고 있다(Fan 등, 2020; Wang 등, 2021). 특히 최근에는 STEC, 혹은 그에 특이적인 숙주 항체를 검출하기 위해 다양한 진단 방법이 사용되고 있다고 보고되고 있다(Wang 등, 2021).

이에 돼지에서 STEC 감염 후 형성된 Stx2e에 대한 특이 항체 검출을 위한 재조합 변형 Stx2e 단백질을 활용한 간접 ELISA 및 자체 개발된 Stx2e 단클론 항체와 상업용 다중클론 항체를

활용하여 STEC 감염 후 생산된 Stx2e 독소의 혈 중 존재 여부 확인을 위한 Sandwich ELISA를 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 균주, 플라스미드 및 균주 배양 조건

부종병 의심 자돈으로부터 분리된 야생형 Stx2e⁺ F18⁺ *Escherichia coli* (STEC) 균주인 STEC150229 및 HJL573을 도전 감염 균주로 준비하였으며, *E. coli* BL21(DE3)를 pMAL-c5x-6xHis-MBP-mStx2eA (Fig. 1A) 및 pET30a-mStx2eB (Fig. 1B) 플라스미드로 형질전환시켜 재조합 HJP2 균주를 제조하였다(Table 1). STEC150229, HJL573 및 HJP2 균주는 LB 액체배지(Luria-Bertani broth; Becton, Dickinson, Sparks, MD, USA) 또는 LB 한천배지에서 37°C로 배양되었다.

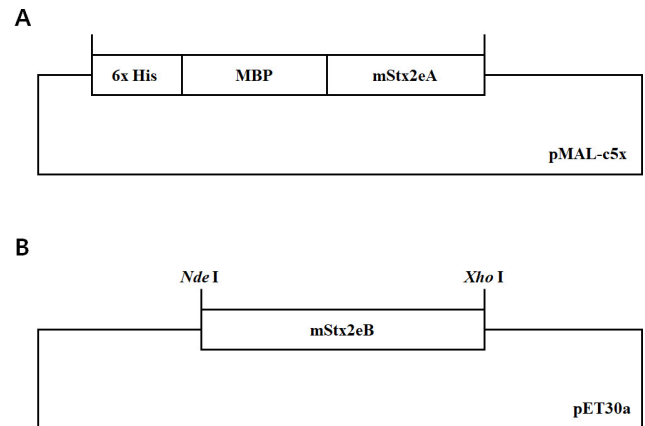


Fig. 1. Construction of recombinant protein of modified Stx2e toxin. (A) pMAL-c5x-6xHis-MBP-mStx2eA plasmid, (B) pET30a-mStx2eB plasmid.

Table 1. Bacteria and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
HJL573	Wild type Stx2e ⁺ LT ⁺ STa ⁺ F18 ⁺ STEC isolate from piglet with edema disease	Lab stock
STEC150229	Wild type Stx2e ⁺ F18 ⁺ STEC isolate from piglet with edema disease	Lab stock
HJP2	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS with pMAL-c5x-6xHis-MBP-mStx2eA and pET30a-mStx2eB	Lab stock
Plasmid		
pMAL-c5x-6xHis-MBP-mStx2eA	pMAL-c5x-6xHis-MBP containing the gene for mStx2eA	This study
pET30a-mStx2eB	pET30a containing the gene for mStx2eB	This study

재조합 HJP2-Stx2eB 단백질의 발현 및 정제

제작된 재조합 HJP2 균주를 암피실린(Ampicillin; Sigma, St Louis, MO, USA) 및 카나마이신(Kanamycin; Sigma, St Louis, MO, USA)이 포함된 10 mL의 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 150 rpm 속도로 하룻밤 동안 배양하였다. 그 후, 배양액 10 mL를 암피실린 및 카나마이신이 포함된 LB 액체배지 1 L에 접종하여 OD₆₀₀값이 0.5가 될 때까지 37°C 온도에서 150 rpm 속도로 배양하였다. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)를 최종농도 0.5 mM이 되도록 첨가한 후 18°C 온도에서 150 rpm 속도로 16시간 동안 배양하여 재조합 6xHis-MBP-mStx2eA-mStx2eB 단백질의 과발현을 유도하였다. 배양된 세포들을 4°C, 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 농축한 다음 20 mL 용균 버퍼(10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.0)로 재부유하고, French press (Operating procedure for high pressure homogenizer [EF-C3]; Avestin Inc. Canada) 방법으로 파쇄하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 25분간 원심분리하여 용출액 중 수용성 단백질을 농축하였고, AKTA Go FPLC system (Cytiva, Marlborough, MA, USA)에 연결되어있는 Ni-NTA 컬럼을 이용하여 1차 정제한 다음, TEV 프로테이나제로 재조합 6xHis-MBP-mStx2eA-mStx2eB 단백질의 TEV를 절단하고, MBP 컬럼으로 2차 정제하여 순수한 재조합 변형 Stx2e 단백질을 얻었다.

순수정제된 재조합 단백질을 15% SDS-PAGE로 분석하였으며, 정제된 표적 단백질은 buffer C (PBS buffer, GE healthcare, USA)를 이용하여 투석한 다음 centricon (cut-off 30 kDa, Amicon, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)을 이용하여 농축하였다. 그 후, 농축된 재조합 변형 Stx2e 단백질의 농도를 단백질 정량법(Bradford protein assay)으로 측정하였으며, 정제된 단백질은 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 이 정제된 항원은 혈청 내 anti-Stx2e 항체 검출을 위한 간접 ELISA coating 항원으로 사용하였으며, 단클론 및 다중클론 항

체를 이용한 혈중 Stx2e 항원 검출용 Standard 항원으로 사용하였다.

실험 가검물

국내 종돈장에서 채취한 돼지 분변으로부터 분리된 대장균을 대상으로 Table 2에서 기술된 특이 프라이머를 사용하여 Stx2e⁺ F18⁺ *Escherichia coli* 및 Stx2e⁺ F4⁺ *E. coli*가 검출되지 않고 Stx2e에 음성인 모돈으로부터 출산한 자돈 25두를 구입하여 생후 5일령에 각 그룹당 5두씩 구분하여 그룹 A는 멸균 PBS를, 그룹 B, C, D는 위에서 정제된 재조합 변형 Stx2e 단백질을 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL씩 각 두당 1 mL씩, 그룹 E는 시판 백신인 HIPRA VEPURED를 제시된 정량에 따라 1차 접종하고, 3주령이 되었을 때 같은 용량으로 2차 접종하였다. 2차 접종 전, 그리고 2차 접종 후 2주 후에 각각 채혈하고 혈청을 분리하여 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 본 실험에서 보고된 동물실험은 Korean Council on Animal Care의 인가를 받은 전북대학교 동물윤리 위원회의 승인(NON2023-070-001)을 받아 진행하였다. 이 재조합 변형 Stx2e 단백질 접종 동물로부터 채취한 혈청은 돼지 부종병 감염 여부 확인을 위한 표준 혈청으로 사용되었다.

전라북도 소재 203개 양돈장에서 정기적으로 채혈된 모돈 및 육성·비육돈 3,480두로부터 채취한 혈청을 대상으로 재조합 변형 Stx2e 단백질에 대한 항혈청 여부를 확인하기 위해 실험에 사용하였다. 이들 혈청 또한 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

Stx2e에 대한 단클론 및 다중클론 항체

Stx2e에 대한 단클론 항체는 국내 성남시 소재 YntoAb Inc.에 의뢰하여 제작되었다. Stx2e에 대한 다중클론 항체는 시판되고 있는 Shiga-like Toxin 2 antibody(Biorbyt Ltd., Orwell Furlong, Cowley Road, Cambridge, UK)를 구매하여 혈청

Table 2. Primers for polymerase chain reaction in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Reference
F4	F TGA ATG ACC TGA CCA ATG GTG GAA CC R GCG TTT ACT CTT TGA ATC TGT CCG AG	484	Seo et al, 2018
F18	F TGG CAC TGT AGG AGA TAC CAT TCA GC R GGT TTG ACC ACC TTT CAG TTG AGC AG	334	Seo et al, 2018
Stx2e	F CGG TAT CCT ATT CCC AGG AGT TTA CG R GTC TTC CGG CGT CAT CGT ATA AAC AG	599	Seo et al, 2018

내 Stx2e 존재 여부 확인을 위한 Sandwich ELISA용 coating 항원 및 캡처 항체로 사용하였다.

재조합 변형 Stx2e 단백질 접종에 따른 유도 항체 역가를 통한 Indirect ELISA의 최적 조건 결정

ELISA용 96 well plate에 재조합 변형 Stx2e 단백질을 다양한 농도로 희석하여 100 μ L씩 분주하여 4°C에서 하룻밤 반응시켜 plate에 흡착시키고, 각 흡착 농도별로 다양한 농도의 skim milk로 blocking 시켰다. 준비된 면역 유도 혈청을 다양한 농도로 희석하여 각 흡착 농도별 well에 분주하여 항원과 반응시켰다. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-pig IgG (Bethyl Lab Inc., Montgomery, TX, USA)로 1시간 반응시킨 후 *o*-phenylenediamine dihydrochloride substrate (OPD; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA)로 15분간 발색시키고, Stop solution (Sulfuric Acid, DUKSAN, Seoul, South Korea)으로 발색을 정지시킨 후 ELISA 분광도기계(Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 492 nm 파장으로 optical density (OD) 값을 측정하였다.

Indirect ELISA를 통한 혈청 내 anti-Stx2e 항체 검출

위 실험을 통해 최종 확정된 간접 ELISA 조건으로 전라북도 소재 양돈장에서 채혈하여 준비된 혈청을 대상으로 간접 ELISA를 수행하였다. 또한, 각 ELISA plate에는 음성 대조군 및 양성 대조군의 혈청을 추가하여 ELISA를 수행하였다.

절대 정량 분석을 통한 Sandwich ELISA의 최적 조건 결정

Sandwich ELISA에서는 재조합 변형 Stx2e 단백질이 표준 항원으로 사용되었다. 본 연구에서 제작된 후보 단클론 항체를 다양한 농도로 ELISA용 96 well plate에 흡착시킨 후 1% skim milk로 blocking 하였다. 재조합 변형 Stx2e 단백질을 2배수로 희석하여 단클론 항체와 반응시킨 후 시판되고 있는 다중클론 Shiga-like Toxin 2 antibody로 2차 반응시켰다. HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (SouthernBiotech, Oxmoor Blvd Birmingham, AL, USA)로 1시간 반응시킨 후 OPD로 15분간 발색시킨 다음 Stop solution (3 M H₂SO₄)으로 발색을 정지시킨 후 ELISA 분광도기계(Multiskan Go)에서 492 nm 파장으로 OD값을 측정하였다.

Sandwich ELISA를 이용한 항원 농도 측정

위 실험을 통해 최종 확정된 Sandwich ELISA 조건으로 전라북도 소재 양돈장에서 채혈하여 준비된 혈청을 대상으로 혈중 Stx2e의 농도를 Sandwich ELISA로 측정하였다. 또한, 각 ELISA plate에 재조합 변형 Stx2e 단백질을 2배수로 단계 희석하여 항원 농도 측정 표준 곡선을 위한 자료로 사용하였다.

결 과

재조합 변형 Stx2e 단백질 정제

정제된 재조합 변형 Stx2e 단백질을 SDS-PAGE로 확인하여 본 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같았다. 즉 mStx2eA와 단량체 mStx2eB가 명확하게 확인되었다.

Indirect ELISA 최적 조건

Anti-Stx2e 항체 검출을 위한 간접 ELISA의 coating 항원 농도는 0.5 μ g/mL이었으며, blocking을 위한 skim milk의 농도는 1%였다. 그리고 최적의 혈청 희석 농도는 1:200으로 희석하여 간접 ELISA를 수행하였을 때 최적의 항체 역가가 관찰되어 전라북도 소재 양돈장에서 채취한 모든 및 육성돈에서의 anti-Stx2e 항체 역가 측정을 위한 간접 ELISA 최적 조건으로 확립하였다. 또한, 재조합 변형 Stx2e 단백질을 접종한 자돈과 비접종 자돈의 혈청을 간접 ELISA 결과를 수행하여 본 결과, 비

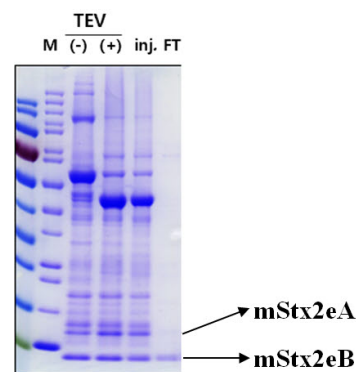


Fig. 2. Confirmation of purified recombinant proteins by 15% SDS-PAGE. M, Molecular marker; TEV, TEV proteinase; (-), Before TEV proteinase treatment; (+), After TEV proteinase treatment; inJ., Before MBP column purification; FT, After MBP column purification.

접종군의 항체 역가는 대부분 0.4에서 0.5 수준이었으며 최고의 OD값은 0.7 미만으로 관찰되었다(data not shown). 더불어 비접종군의 분변 및 부검 후 소장에서 분리된 대장균을 대상으로 Stx2e 독소 유전자를 PCR을 통해 검출하였을 때 모두 음성이었으며, 생존 시 및 부검 시에 부종병 의심 증상이 관찰되지 않았다. 재조합 변형 Stx2e 단백질을 2회 접종한 후 2주째 채혈된 혈청에서는 모두 높은 항체 역가가 관찰되었다. 따라서 음성 대조군 중 최고의 흡광도치를 보인 혈청과 접종군 중 최저의 항체 역가(음성 대조군보다는 높은 수준으로 관찰됨)를 보인 혈청을 표준 혈청으로 각 간접 ELISA를 수행할 때 함께 수행하여 음성 대조군의 흡광도보다 양성 대조군의 흡광도가 높은 ELISA plate 중에서 가검물의 흡광도가 음성 대조군의 흡광도보다 높고, 표준 양성 대조군의 흡광도와 같거나 그 이상의 흡광도를 보일 경우에만 anti-Stx2e 항체 양성으로 판정하였다.

Indirect ELISA를 통한 anti-Stx2e 항체 역가

전라북도 동물위생시험소 서부지소에서 제공받은 전라북도 소재 양돈장에서 분리한 돼지 혈청을 효소면역분석법(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)을 통해 mStx2eB에 대한 IgG 항체 역가를 측정하였다. 제공받은 3,480개의 혈청 중 모돈의 혈청은 627개, 육성돈의 혈청은 2,853개로 모돈과 육성돈을 구분하여 분석하였다. 양성으로 확인된 모돈은 총 530개체로 전체 모돈의 85%에 해당하는 비율이었고, 육성돈에서 양성으로 확인된 개체는 총 2,043개체로 전체 육성돈의 72%에 해당하는 비율이었다(Table 3). 또한, 돼지 농가에서 혈청을 분리한 시기별로 구분하여 분석한 결과, 겨울철에 채혈한 1,034개의 혈청 샘플 중 모돈 혈청 샘플은 34개였고, 그중 82%에 해당하

는 28개체가 양성으로 확인되었으며, 육성·비육돈의 경우 혈청 1,000개 샘플 중 701개 샘플이 양성으로 확인되어 약 70%에 해당하는 수치를 나타냈다(Data not shown). 봄철에 채혈한 1,644개의 혈청 중 모돈 혈청 110개의 86%에 해당하는 95개 샘플이 양성으로 확인되었으며, 육성돈의 혈청 1,150개 중 71%인 818개의 혈청 샘플이 양성으로 확인되었다(Data not shown). 마지막으로 여름철에 채혈한 832개의 혈청 중 110개의 모돈 혈청의 86%에 해당하는 95개의 혈청에서 양성이 확인되었으며, 703개의 육성·비육돈 혈청에서 75%에 해당하는 524개의 혈청에서 양성이 확인되었다(Data not shown).

Sandwich ELISA의 최적 조건 결정

재조합 변형 Stx2e 단백질의 2배수 단계 희석에 대한 표준 곡선에서 R²값이 0.97 이상이며 재조합 변형 Stx2e 단백질이 분주 되지 않은 값이 0.03 이하인 Stx2e 항원 검출을 위한 Sandwich ELISA를 위한 조건은 coating 항원으로는 1T1D2였으며, coating 항원 농도는 0.8 µg/mL이었다. Blocking을 위한 skim milk의 농도는 1%였으며, 최적의 혈청 희석 농도는 혈청 원액을 바로 사용하는 것이었고, Stx2e 항원 검출을 위한 Shiga-like Toxin 2 antibody의 희석 농도는 1:750이었다. 또한, 재조합 변형 Stx2e 단백질을 2배수로 단계 희석하여 얻은 결과를 바탕으로 농도별 표준 곡선을 제작하고 야의 병독성 STEC 균주를 접종한 자돈에서 육안적 및 부검을 통해 확실한 돼지 부종병 임상 증상을 보인 Stx2e 농도를 계산하여 본 결과, 0.6 µg/mL 이상의 농도를 보유했다.

Sandwich ELISA를 이용한 Stx2e 독소 검출

제공받은 3,480개의 혈청 중 항체 IgG 역가가 양성으로 확인된 혈청이 많았던 양돈장과 음성으로 확인된 혈청이 많았던 양돈장을 각각 선별하고, 총 830개 혈청을 대상으로 항원 검출을 위해 Sandwich ELISA를 수행하였다. 0.625 µg/mL 이상 1.25 µg/mL 미만의 농도로 항원이 검출된 혈청이 204개로 전체 830개 혈청 중 25%에 달하는 가장 높은 비율을 차지하였고, 0.313 µg/mL 이상 0.625 µg/mL 미만의 농도로 항원이 검출된 혈청은 152개로 두 번째로 높은 비율을 보였다. 한편 고창군과 정읍시에서는 5 µg/mL 이상, 10 µg/mL 미만의 비교적 높은 농도로 항원이 검출된 혈청 샘플이 각각 3개, 2개가 관찰되었다(Table 4). 항원 검출 시험에 사용된 830개 혈청 중 49%에 해당하는 410개 혈청에서 0.625 µg/mL 농도 이상으로 항원이

Table 3. Seroprevalence of anti-Shiga-toxin antibody in pigs from different regions in Jeonbuk province

Region (no. of farms)	No. of pigs	Prevalence (no. of positive/tested)	
		Sow	Growing pigs
Gochang-gun (31)	573	89 (85/95)	74 (354/478)
Gunsan-si (2)	32	0	88 (28/32)
Gimje-si (15)	242	0	64 (154/242)
Buan-gun (19)	320	93 (52/56)	61 (160/264)
Wanju-gun (2)	32	0	72 (23/32)
Iksan-si (9)	144	0	92 (133/144)
Imsil-gun (1)	16	0	75 (12/16)
Jeongup-si (124)	2,121	83 (393/476)	72 (1,179/1,645)
Total (203)	3,480	85 (530/627)	72 (2,043/2,853)

Table 4. Detection of Stx2e toxin in pigs from different regions in Jeonbuk province

Region (no. of farms)	Number of samples according to antigen concentration (µg/mL)										
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	0.020	0
Gochang-gun (6)	0	3	18	19	23	11	6	1	3	2	26
Gunsan-si (2)	0	0	1	10	10	5	1	1	0	0	4
Gimje-si (6)	0	0	7	25	33	14	7	2	0	1	7
Buan-gun (3)	0	0	0	6	16	10	2	3	0	1	13
Iksan-si (4)	0	0	1	18	21	17	2	0	0	0	4
Jeongup-si (32)	0	2	27	69	101	95	45	33	11	3	90
Total (%)	0 (0)	5 (1)	54 (7)	147 (18)	204 (25)	152 (18)	63 (8)	40 (5)	14 (2)	7 (1)	144 (17)

Table 5. Comparative analysis of antibody and/or antigen positive pigs from different regions in Jeonbuk province

Region (no. of farms)	No. of tested pigs	No. of antibody- and/or toxin-positive pigs (%)		
		Antibody and toxin	Antibody	Toxin*
Gochang-gun (6)	112	70 (63)	15 (13)	11 (10)
Gunsan-si (2)	32	12 (38)	3 (9)	13 (41)
Gimje-si (6)	96	45 (47)	24 (25)	18 (19)
Buan-gun (3)	51	18 (35)	18 (35)	2 (4)
Iksan-si (4)	63	12 (19)	14 (22)	13 (21)
Jeongup-si (32)	476	163 (34)	140 (29)	33 (7)
Total	830	320 (39)	214 (26)	90 (11)

*Sample containing 0.625 µg/mL or higher concentration of the Stx2e toxin without antibody was determined to be toxin-positive sample.

검출되었다(Table 4). 항체검사 결과와 비교 분석해 본 결과, 830 개 혈청 중 항원은 가지고 있지 않고 항체 역가는 양성으로 나온 혈청은 26%인 214개, 항체 역가는 음성이고 0.625 µg/mL 이상 농도의 항원이 검출된 혈청은 11%에 해당하는 90개로 관찰되었다. 또한, 항원 검출 시험에 사용한 혈청 중 320개의 혈청은 항체 역가가 양성이면서 0.625 µg/mL 이상 농도의 항원이 검출되었고 이는 전체 혈청의 39%의 비율을 차지하였다(Table 5).

고 찰

STEC를 확인하는 데에는 여러 가지가 방법이 존재한다. 오래 전부터 사용되어 오는 방법으로는 선택배지를 통해 대장균을 분리한 후 의심 균락을 특이 프라이머를 이용한 PCR이나 qPCR을 통해 시가독소를 확인하는 방법이 있다(Bettelheim 등, 2003; Kim 등 2009; Monaghan 등 2011; Barbau-Piednoir 등 2018). 또한 Stx1 및 Stx2에 대한 단클론 및 다중클론 항체가 개발되어 ELISA를 통한 검출 진단키트가 상용화되어 이를 통해 감별 진단이 가능하다고 알려져 있다(Nataro와 Kaper, 1998; Gehring 등, 2017). 즉, STEC ELISA 키트는 Stx1 및

Stx2 독소를 감별할 수 있으며, 더욱이 특정 단일클론 항체를 사용하여 일부 Stx1 및 Stx2 아형을 검출할 수 있다고 알려져 있다(Gehring 등, 2017). 하지만 상업적으로 생산된 Stx 항체 기반 ELISA 분석법은 모든 하위 유형을 감별 진단할 수는 없는 것으로 보고되고 있다(Feng 등, 2011; Seo 등, 2016; Gehring 등, 2017). 본 연구는 국내에서 돼지 부종병을 혈청학적으로 분석하여 항체 역가 및 항원 농도를 통해 농장 내 돼지에서의 감염률을 조사하는 최초의 연구일 것이다. 즉, 재조합 변형 Stx2e 단백질 발현 및 정제하여 전라북도에서 채취된 혈청에서 Stx2e 단백질에 대한 항체 역가 분포를 조사하였으며, 더불어 제조된 단클론 항체와 시판되고 있는 Stx2e 다중클론 항체를 기반으로 Stx2e 단백질에 대한 Sandwich ELISA를 통해 Stx2e 농도 보유 비율을 조사하였다.

STEC은 돼지에 감염될 경우 감염된 개체의 소장에서 독소를 생산하고, 이 생산된 독소가 장관을 통과하여 혈관 내로 침투하게 되면 돼지 부종병이 야기된다(Sato 등, 2013; Casanova 등, 2018; Yoshimura 등, 2023). Shiga 독소 2 그룹의 구성원인 Stx2e는 독소이드 또는 독소 활성 부위 돌연변이를 통해 유전적으로 변형된 재조합 변형 Stx2e 독소이드로 백신으로 사용될 수 있다고 보고되고 있다(MacLeod와 Gyles, 1990; Gordon 등,

1992; Bosworth 등, 1996; Johansen 등, 1997; Yoshimura 등, 2023). 이들 재조합 변형 Stx2e 독소이드 백신은 돼지에서 부종병에 대한 방어 효과는 우수하지만, 현장에서 요구하는 백신량에 비해 생산량이 여전히 낮은 것으로 알려져 있다 (MacLeod 등, 1990; MacLeod와 Gyles, 1991; Acheson 등, 1993; Mesonero-Escuredo 등, 2021; Yoshimura 등, 2023). 하지만 이들 유전자 변형 기반 변형 Stx2e 독소이드 백신은 여전히 약하게 존재하는 독소 활성으로 인한 부작용의 위험이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Yoshimura 등, 2023). 그럼에도 불구하고 한국동물약품협회 자료에 따르면 2022년도에 돼지 부종병 백신은 국내에서 약 1,863,000두 분량이 판매되었다고 보고되었다.

본 연구에서는 이전에 발표된 방법을 약간 변형하여 재조합 변형 단백질을(mStx2eA 및 Stx2eB)을 발현 및 정제했으며 (Seo 등, 2022), 이 정제된 항원을 기본으로 하여 간접 ELISA를 사용하여 돼지 부종병에 대한 항체 역가를 측정하여 감염률을 조사하고자 하였다. 우선 간접 ELISA를 수행함에 있어 표준 음성 및 양성 기준을 설정하기 위해 양돈장의 과거 병력 및 현재의 병력 정보와 모든 및 양돈장 환경 그리고 자돈 등으로부터 분변 등을 채취하여 pool 또는 개별 colony를 대상으로 균 분리 및 PCR 또는 qPCR 등으로 Stx2e⁺ *E. coli*, F18⁺ *E. coli*, F4⁺ *E. coli* 등을 확인하여 음성으로 판별된 양돈장에서 출생한 자돈을 구입하여 대조군, 그리고 재조합 변형 Stx2e 단백질을 다양한 농도로 접종하여 획득한 혈청을 대상으로 간접 ELISA를 수행하였으며, 2차 접종 후 5일째에 모든 자돈을 희생시켜 육안적 및 조직학적으로 부종병 증상 여부를 확인하여 최종 표준 혈청으로 사용하였다. 음성 자돈에 재조합 변형 Stx2e 단백질을 접종한 자돈과 비접종 자돈의 혈청을 대상으로 간접 ELISA를 수행하여 본 결과, 비접종군의 항체 역가는 대부분 낮은 수준이었지만 한 개체에서 흡광도가 0.6과 0.7 사이의 값을 나타내었다. 또한, 선행 연구 결과 돼지 부종병을 효과적으로 방어했던 자돈 중에서 최저 흡광도 수치를 보인 자돈의 혈청을 표준 혈청으로 사용하였다. 이 수치는 전북지역에서 채취한 돼지 혈청을 대상으로 부종병에 대한 항체 역가 측정을 위한 간접 ELISA 수행 시 표준 혈청으로 사용되었으며 음성 대조군 흡광도와 양성 흡광도가 차이가 있는 경우에만 유효한 결과로 판단하였고, 음성대조군 흡광도보다 높고 양성 대조군 흡광도 수치와 같거나 높은 수치를 기준으로 하였다. 전북 소재 8개 지역 203개 양돈장에서 채취한 3,480 돼지 혈청을 대상으로 간접 ELISA를 수행하여 변형 Stx2e 단백질에 대한 IgG 항체 역가를 측정하였다. 측정 결과 627두의 모돈 중 85%가 본 연구에서 정한 양성 기준에 해당하는 항체 역가

로 관찰되었으며, 2,853두의 육성돈 중 72%가 정해진 양성 기준 이상의 항체 역가로 관찰되었다. 또한, 돼지 농가에서 채혈한 시기를 계절별로 구분하여 분석하여 본 결과, 채혈 시기에 따른 항체 역가에는 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 요약해 보면, 전북지역은 시판되고 있는 돼지 부종병 백신을 접종한 양돈 농가 수가 많거나 이미 자돈 및 육성·비육돈 시기에 돼지 부종병에 감염되었지만 임상 증상 발현을 보이지 않고 회복되어 항체 역가를 보유하는 것으로 생각되었다. 추후 이들 농가에서의 보다 정확한 데이터 분석을 위해서는 돼지 부종병 예방 백신의 접종 여부와 더불어 돼지 부종병 감염 여부에 대한 정보를 획득하여 추가적인 데이터 분석이 필요하다고 생각된다.

최근 고도로 특이적인 단클론 항체(mAbs)를 생성하기 위해 파아지 디스플레이 기술이 널리 사용되고 있다. 이는 실험동물을 사용하지 않으면서 짧은 시간에 단클론 항체를 생산한다는 아주 큰 장점을 가지고 있다 (Bazan 등, 2012; Sulong 등, 2021). 항원 결합 부위를 기반으로 항체 단편, 즉 항원 결합 단편(Fab) 및 싱글체인 가변 영역 단편(scFv)과 같은 형식의 파아지 디스플레이 라이브러리가 구축된다 (Papadopoulos 등, 2015; Sulong 등, 2021). 파아지 디스플레이 된 항체는 발현 시스템 대장균에서 발현된 재조합 단백질에 비해 오랫동안 일관성을 유지하는 것으로 알려져 있다 (Aghebbati-Maleki 등, 2016; Farzaneh 등, 2022). 또한, 이렇게 생산된 단클론 항체는 작은 크기를 가지고 있어 세균 발현 시스템에서 항체 생산을 위해 쉽게 대규모로 생산할 수 있다 (Yoshimura 등, 2023). 국내 소재 단클론 제조 회사인 인투랩에 의뢰하여 파아지 디스플레이 기술을 활용하여 제조된 Stx2e에 대한 단클론 항체를 대상으로 돼지 혈청에서 Stx2e 항원 검출용으로 적합한 단클론 항체를 결정하기 위한 실험을 수행하여 재조합 변형 Stx2e 단백질에 대한 2배수 단계 희석 배율에 대한 표준 곡선에서 R²값이 0.97 이상이며 멸균 PBS에 대한 흡광도 값이 0.03 이하인 Stx2e 항원 검출용 단클론 항체는 1T1D2였다. 우선 Sandwich ELISA를 수행함에 있어 부종병 유발 Stx2e 농도를 측정하기 위해 재조합 변형 Stx2e 단백질을 2배수 단계 희석하여 얻은 결과를 농도별 표준 곡선을 제작하고 야외 병독성 STEC 균주를 접종한 자돈에서 육안적 및 부검을 통해 확실한 돼지 부종병 임상 증상을 보인 혈청에서의 흡광도 값을 Stx2e 농도로 계산하였고, 이 이상의 농도를 보인 돼지는 Stx2e 항원을 가지고 있는 것으로 판정하였다. 전북 동물위생시험소 서부지소로부터 제공받은 8개 지역의 203 농가에서 채취한 3,480개의 혈청 중 재조합 변형 Stx2e 단백질에 대한 항체 중 양성률이 높았던 양돈장과 음성률이 높았던 6개 지역의 53개 양돈장에서 채혈한 830개의 혈청에 대한

Sandwich ELISA를 수행하여 Stx2e 항원 농도를 확인하였다. 선행연구 결과 혈청 내에 Stx2e 단백질 농도가 0.6 µg/mL 이상 일 때 뚜렷한 돼지 부종병 임상 증상이 발현되었고, 혈중 Stx2e 농도가 0.3 µg/mL 정도일 경우에는 돼지 부종병 증상이 약하게 발현되었다. 이 결과를 바탕으로 측정된 데이터를 분석하여 보면 뚜렷한 임상 증상이 발현된 0.625 µg/mL 이상의 Stx2e 단백질 항원을 보유한 혈청은 830개 혈청 중 49.4%였으며 미약한 임상 증상이 관찰된 0.313 µg/mL을 보유한 돼지는 18.3%였다. 이는 Berger 등(2023)이 독일의 양돈장에서 35.1%가 STEC 양성을 보였으며 53.5%의 가검물에서 Stx2e 유전자에 대해 양성 이 관찰되었다고 보고한 결과와 유사하다. 비록 독일에서의 연구 결과는 양돈장을 대상으로 한 결과이고, 본 연구 결과는 전라북도 지역의 개체별 양성 비율이지만 두 연구 모두 높은 비율의 양성률이 관찰되었다는 점에서 지속적인 모니터링의 필요성이 요구된다고 생각된다. 더불어 항체 보유 결과와 비교해 보면, 임상 증상을 보일 정도의 항원은 없으면서 항체 역가는 양성으로 나온 돼지는 26%였다. 반면, 항체 역가는 음성이면서 임상 증상을 보일 정도의 농도 이상의 항원이 관찰된 돼지는 11%에 달했다. 또한, 39%는 이 두 ELISA에서 양성에 해당하는 수치로 관찰되었다. 이상의 결과는 전라북도 내 양돈장에 높은 비율로 부종병이 감염되어 있으며, 이의 검출을 위해 간접 ELISA 및 Sandwich ELISA가 유용할 것으로 생각된다.

결론

돼지 부종병을 진단하기 위해서는 전통적으로 균분리 후 PCR이나 qPCR 방법으로 Stx2e 유전자를 검출하는 방법이 주로 사용되고 있다. 하지만 균분리 및 동정을 위해서는 시일이 많이 소요된다는 단점이 있다. 이에 국내에서 돼지 부종병을 혈청학적으로 분석하여 항체 역가 및 항원 농도를 통해 농장 내 돼지에서의 감염률을 조사하고자 하였다. 이를 위해 돼지 부종병 음성 자돈에 재조합 변형 Stx2e 단백질을 접종하여 얻은 혈청을 표준 혈청으로 하여 전라북도 소재 양돈장에서 채취한 3,480 혈청을 대상으로 혈청에서의 항 Stx2e 항체를 검출하여 본 결과, 양성 기준에 해당하는 수치 이상을 보인 돼지혈청은 약 74%였다. 그리고 STEC 감염 후 생산된 Stx2e의 혈중 농도를 측정하기 위해 Stx2e에 대한 단클론 및 다중클론 항체를 활용하여 Sandwich ELISA로 측정하여 본 결과, 측정된 가검물 중 약 50%에서 뚜렷한 돼지 부종병 증상을 유발했던 항원농도 이상을 보유하고 있었다. 이상의 결과를 요약해보면, 전라북도 내 양돈장이 높은 비율로 Stx2e에 노출되었으며, 이로 인해 높은 항체 역가를 보유

하고 있음이 확인되었다. 또한 노출된 항원에 비해 높은 항체 역가는 국내에서 최근 그 수요가 증가한 돼지 부종병 예방 백신의 접종에 의한 결과일 수도 있다고 생각되어 지속적인 모니터링이 필요하며, 이의 확인 방법으로는 재조합 변형 Stx2e 단백질을 활용한 간접 ELISA와 Stx2e에 대한 단클론 항체 및 다중클론 항체를 활용한 Sandwich ELISA 방법이 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 한국정부(MSIT)가 설립한 한국연구재단(NRF)의 교육부 학문균형발전지원사업(보호연구지원사업) 연구비의 지원을 받았습니다(No.2020R111A2074647). 더불어 전라북도 동물위생시험소 서부지소로부터 지원을 받아 연구가 수행되었습니다.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ORCID

Sun-Young Cho, <https://orcid.org/0009-0004-1761-8963>
Jeong Hee Yu, <https://orcid.org/0000-0003-3232-132X>
Yeong Ju Yu, <https://orcid.org/0000-0002-2860-5023>
Han-Jun Lee, <https://orcid.org/0009-0006-5939-0500>
Jin Hur, <https://orcid.org/0000-0003-2658-0747>

REFERENCES

- Acheson DW, Jacewicz M, Kane AV, Donohue-Rolfe A, Keusch GT. 1993. One step high yield affinity purification of shiga-like toxin II variants and quantitation using enzyme linked immunosorbent assays. *Microb Pathog* 14: 57-66.
- Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B, Mortalibnezhad M, Aghebati-Maleki A, Nickho H, Yousefi M, Majidi J. 2016. Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci* 23: 66.

- Ahmed W, Gyawali P, Toze S. 2015. Quantitative PCR measurements of *Escherichia coli* including shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in animal feces and environmental waters. *Environmental science & technology* 49: 3084-3090.
- Baldo V, Salogni C, Giovannini S, D'Incau M, Boniotti MB, Birbes L, Alborali GL. 2020. Pathogenicity of Shiga toxin type 2e *Escherichia coli* in pig colibacillosis. *Front Vet Sci* 7: 545818.
- Barbau-Piednoir E, Denayer S, Botteldoorn N, Dierick K, De Keersmaecker SC, Roosens NH. 2018. Detection and discrimination of five *E. coli* pathotypes using a combinatory SYBR® Green qPCR screening system. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 3267-3285.
- Bazan J, Calkosiński I, Gamian A. 2012. Phage display—A powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Human Vaccin Immunother* 8: 1817-1828.
- Berger PI, Hermanns S, Kerner K, Schmelz F, Schuler V, Ewers C, Bauerfeind R, Doherr MG. 2023. Cross-sectional study: prevalence of oedema disease *Escherichia coli* (EDEC) in weaned piglets in Germany at pen and farm levels. *Porcine Health Manag* 9: 49.
- Bettelheim KA, Beutin L. 2003. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *J Appl Microbiol* 95: 205-217.
- Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 37: 497-503.
- Bosworth BT, Samuel JE, Moon HW, O'Brien AD, Gordon VM, Whipp SC. 1996. Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infect Immun* 64: 55-60.
- Butler JE, Lager KM, Splichal I, Francis D, Kacskovics I, Sinkora M, Ramsoondar J. 2009. The piglet as a model for B cell and immune system development. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 147-170.
- Casanova NA, Redondo LM, Dailoff GC, Arenas D, Miyakawa MEF. 2018. Overview of the role of Shiga toxins in porcine edema disease pathogenesis. *Toxicon* 148: 149-154.
- Fan B, Sun J, Zhu L, Zhou J, Zhao Y, Yu Z, Li B. 2020. Development of a novel double antibody sandwich quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine epidemic diarrhea virus antigen. *Front Vet Sci* 7: 540248.
- Farzaneh M, Derakhshandeh A, Al-Farha AABA, Petrovski, K, Hemmatzadeh F. 2022. A novel phage-displayed MilA ELISA for detection of antibodies against *Myc. bovis* in bovine milk. *J Appl Microbiol* 133: 1496-1505.
- Feng PC, Jinneman K, Scheutz F, Monday SR. 2011. Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Appl Environ Microbiol* 77: 6699-6702.
- Gehring AG, Fratamico PM, Lee J, Ruth LE, He X, He Y, Rubio FM. 2017. Evaluation of ELISA tests specific for Shiga toxin 1 and 2 in food and water samples. *Food Cont* 77: 145-149.
- Gordon VM, Whipp SC, Moon HW, O'Brien AD, Samuel JE. 1992. An enzymatic mutant of Shiga-like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. *Infect Immun* 60: 485-490.
- Imberechts H, Deprez P, Van Driessche E, Pohl P. 1997. Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 54: 329-341.
- Johannes L, Römer W. 2010. Shiga toxins—from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 8: 105-116.
- Johansen M, Andresen LO, Jorsal SE, Thomsen LK, Waddell TE, Gyles CL. 1997. Prevention of edema disease in pigs by vaccination with verotoxin 2e toxoid. *Can J Vet Res* 61: 280.
- Joseph A, Cointe A, Kurkdjian PM, Rafat C, Hertig A. 2020. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. *Toxins (Basel)* 12:

67.
Kim MJ, Kim SH, Kim TS, Kee HY, Seo JJ, Kim E S, Lee J. 2009. Identification of Shiga toxin-producing *E. coli* isolated from diarrhea patients and cattle in Gwangju area, Korea. *J Bacteriol Virol* 39: 29-39.
- MacLeod DL, Gyles CL. 1990 Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. *Infect Immun* 58: 1232-1239.
- Meng Q, Bai X, Zhao A, Lan R, Du H, Wang T, Xiong Y. 2014. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China. *BMC microbiol* 14: 1-14.
- Mesonero-Escuredo S, Morales J, Mainar-Jaime RC, Díaz G, Arnal JL, Casanovas C, Barrabés S, Segalés J. 2021. Effect of edema disease vaccination on mortality and growth parameters in nursery pigs in a Shiga toxin 2e positive commercial farm. *Vaccines (Basel)* 9: 567.
- Monaghan A, Byrne B, Fanning S, Sweeney T, David McDowell D, Bolton DJ. 2011. Serotypes and Virulence Profiles of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Bovine Farms. *Appl Environ Microbiol* 77: 8662-8668.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *CMR* 11: 142-201.
- Oanh TKN, Nguyen VK, De Greve H, Goddeeris BM. 2012. Protection of piglets against Edema disease by maternal immunization with Stx2e toxoid. *Infect Immun* 80: 469-473.
- Orth D, Grif K, Khan AB, Naim A, Dierich MP, Würzner R. 2007. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59: 235-242.
- Papadopoulos KP, Isaacs R, Bilic S, Kentsch K, Huet HA, Hofmann M, Mahipal A. 2015. Unexpected hepatotoxicity in a phase I study of TAS266, a novel tetravalent agonistic Nanobody® targeting the DR5 receptor. *Cancer Chemother Pharmacol* 75: 887-895.
- Sato T, Matsui T, Takita E, Kadoyama Y, Makino SI, Kato KO, Hamabata T. 2013. Evaluation of recombinant forms of the shiga toxin variant Stx2eB subunit and non-toxic mutant Stx2e as vaccine candidates against porcine edema disease. *J Vet Med Sci* 75: 1309-1315.
- Seo BJ, Kim H, Cho HS, Park BY, Kim WI. 2016. Evaluation of two commercial PRRSV antibody ELISA kits with samples of known status and singleton reactors. *J Vet Med Sci* 78: 133-138.
- Seo BJ, Moon JY, Jeong WKKC, Kim S, Kim WI, Hur J. 2018. Virulence-associated Genes and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated From Post-weaning Piglets with Diarrhea in Korea. *J Bacteriol Mycol* 5, 1090.
- Seo BJ, Yu JH, Kim SC, Yu YJ, Park BY, Park JH, Hur J. 2022. Enhanced production of natural shiga toxin by overexpressing A subunit of Stx2e in Stx2e-producing *Escherichia coli* isolated in South Korea. *bioRxiv* 2022-07.
- Sulong P, Anudit N, Nuanualsuwan S, Mariela S, Khantatup K. 2021. Application of phage display technology for the production of antibodies against *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS One* 16: e0258931.
- Tseng M, Fratamico PM, Bagi L, Delannoy S, Fach P, Manning SD, Funk JA. 2014. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) from finishing swine in a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* 80: 6395-6402.
- Wang W, Li J, Fan B, Zhang X, Guo R, Zhao Y, Li B. 2021. Development of a novel double antibody sandwich ELISA for quantitative detection of porcine deltacoronavirus antigen. *Viruses* 13: 2403.
- Yoshimura M, Honda Y, Yonemitsu E, Takahashi R, Suenaga K, Waki T. 2023. Induction of antitoxic antibody and preventive effect against porcine edema disease by the pentameric Stx2eB subunit vaccine. *Vet Res* 54: 29.