

## 항혈청 투여에 따른 돼지 전염성 위장염 예방효과 I. 혈청학적 결과, RT-PCR 검사, 형광항체검사

지영철 · 한정희 · 권혁무 · 한태욱 · 정현규<sup>1</sup> · 박봉균<sup>2</sup>  
강원대학교 수의학과, <sup>1</sup>도드람 양돈조합, <sup>2</sup>서울대학교 수의과대학, 농생명공학부

### Preventive Effects on Transmissible Gastroenteritis(TGE) Using by TGEV Antiserum

#### I. Serological Results, RT-PCR for Fecal and Small Intestine, FA Test

Yongzhe Chi, Jeong-hee Han, Hyuk-moo Kwon, Tae-wook Hahn, Hyun-kyu Jeong<sup>1</sup> and Bong-kyun Park<sup>2</sup>

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

<sup>1</sup>Dodram Pig Farmers' Cooperative

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University

**Abstract:** The purpose of this study was to investigate to protective effects against transmissible gastroenteritis virus (TGEV) infection in piglets by administration of the TGEV antiserum orally at 5 hrs, 24 hrs and 36 hrs after birth. five piglets administered the antiserum were experimentally infected with TGEV at four-day-old. Control group were four piglets infected with TGEV only. Serum antibody titers against TGEV were examined by serum neutralization (SN) test, detection for TGEV or TGEV antigen from feces and small intestines was tested by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and indirect immunofluorescence (IFA). The results obtained were as follows;

1. The piglets administered the TGEV antiserum showed higher antibody titers than those of control group and sustained during the experimental period .
2. The detection rate of TGEV in feces and small intestines by RT-PCR were 24.5% and 20.0% in TGEV antiserum treated group and 44.0% and 75.0% in control group, respectively.
3. The detection rate of TGEV antigen in the small intestine by IFA were 26.7% in TGEV antiserum treated group and 75.0% in control group, respectively.

It was concluded that oral administration of antiserum against TGEV to piglets was effective in preventing TGEV infection.

**Key words :** TGEV antiserum, protective effect, SN test, RT-PCR, IFA.

## I. 서 론

돼지 전염성 위장염(Transmissible gastroenteritis; TGE)은 구토, 설사 등을 주된 증상으로 하는 급성 바이러스성 전염병이다. 모든 일령의 돼지가 감수성이 있지만 어린 일령일수록 발병율과 치사율이 높으며 특히 2주령 이하의 포유자돈이 감염되었을 경우 매우 심한 비흡수성 설사와 구토를 일으켜 탈수를 유발하며 폐사율이 거의 100%에 달하여 양돈산업에 막대한 경제적 손실을 주고 있다.<sup>1-4</sup>

TGE는 1946년에 미국의 Dolye와 Hutchings에 의해 처음 보고된 이래 유럽, 중남미, 북미, 일본, 대만, 한국, 필리핀, 중국 등 현재 전 세계적으로 발생하고 있다.<sup>5-7</sup>

Coronaviridae속의 Coronavirus중으로 분류되는 TGE virus

(TGEV)는 다형태성의 envelope를 가지고 있으며 genome은 single-stranded RNA로 구성되어 있다.<sup>8,9</sup> TGEV의 주요 구조 단백질에는 spike glycoprotein(S), nucleocapsid phosphoprotein(N), transmembrane protein(M)이 함유되고 있으며 S glycoprotein은 envelope에 곤봉모양의 표면돌기(peplomers)를 형성하여 TGEV의 주요 면역원 단백질로 작용하며 바이러스 중화항체를 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>10-12</sup>

TGEV는 소장상피세포와 crypt에 정착, 증식하여 용모상피세포가 변성 또는 괴사되며 용모의 위축과 탈락을 일으킨다.<sup>13</sup> 소장에서 소화와 흡수능력이 현저히 저하되고 lactose 분해효소의 산생능력도 상실되어 장관내의 lactose 농도가 증가하고 삼투압도 따라서 증가되어 체액중의 수분이 장관내로 역류하며 구토, 수양성 설사와 탈수를 일으킨다.<sup>14-16</sup> 생후 2주전

의 포유자돈이 TGEV에 감염되면 거의 100% 폐사율을 나타낸다.<sup>17-19</sup>

유행성 TGE (epizootic TGE)는 잠복기가 18-22시간으로 전파가 빠르고 구토와 수양성 설사로 인한 심한 탈수를 일으켜 1~2일후에 폐사된다.<sup>20,21</sup> TGEV에 대한 면역이 잘 형성된 모돈의 초유와 상유를 충분히 섭취한 포유자돈은 TGEV의 감염 시에도 크게 발병되지 않는다.<sup>22</sup> 지방성 TGE (enzootic TGE)는 감수성이 있는 돼지나 불완전한 면역돈으로 인하여 지속적으로 발병되며 유즙면역의 형성여부와 자돈의 일령에 따라 다른데 분만후 1~4주령에 다발하고 유행성 TGE와 유사하다.<sup>23,24</sup> 이병률이 높고 폐사율은 유행성 TGE보다 낮아 10~20%로 나타나며 돈군에 상재화되어 지속적인 감염을 일으킨다.<sup>4</sup>

TGEV의 진단에는 병리조직학적 검사, 혈청중화반응, 바이러스의 분리와 동정, 전자현미경에 의한 바이러스입자 확인, indirect fluorescent antibody test(IFA), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), in situ hybridization (ISH) 등 방법이 있다.<sup>25-28</sup>

TGE는 분만 2주 이내에 발병하여 자돈에 많은 피해를 야기하므로 분만 즉시 충분한 면역항체의 공급이 요구된다. 현재 강독백신, 약독화 백신, 불활화 백신, 아단위 백신을 경구, 비강, 근육, 피하, 유방에 접종하여 국소면역항체 및 혈중항체를 높여주는 방법을 많이 이용하고 있다.<sup>29-34</sup> 임신모돈을 생독바이러스로 경구감염시키면 TGEV IgA가 milk에 형성되어 포유자돈에 가장 효과적인 유즙면역을 형성할수 있지만 면역원성이 좋은 반면 병원성이 강해 사용하기 어려운 단점이 있다.<sup>35</sup> 유즙을 통한 수동면역은 모돈의 면역능력, 초유항체의 급속한 감소와 섭취불량 등에 따라 다양한 결과를 나타낼수 있는데 이러한 문제를 해결하기 위하여 필요한 시기에 고역가의 항체를 지속적으로 공급할수 있는 유즙대체 수동면역법이 모색되어 왔고 가장 많이 연구 되고 있는 것이 산란계에서 생산된 난황항체를 이용하는 방법이다.<sup>36-39</sup> 3두의 3일령 포유자돈에 TGEV 항혈청을 하루에 3회 경구투여한 뒤 강독 TGEV를 공격접종하였을 시에 모두 생존하여 효과적으로 TGEV를 방어하였다.<sup>40</sup>

일반적으로 TGEV, PEDV 등의 바이러스성 설사병에 대한 예방대책으로 백신의 효과가 상대적으로 낮고 난황항체의 경우 비록 방어효과를 나타내지만 그 특이성에 있어서 고농도 TGEV 항혈청에 비해 떨어지리라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 국내 양돈산업에 많은 피해를 주고 있는 TGE에 대한 방어대책으로 분만된 포유자돈을 3회에 걸쳐 고농도의 TGEV 항혈청을 투여하여 IgA 혹은 IgG를 장점막에 국소적으로 생성하게 하여 효과적인 수동면역을 형성시켜 TGEV의 공격에 대한 국소면역뿐만아니라 체액성면역을 증강시켜 방어효과를 검토하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. TGE 항혈청 준비

자돈 투여용 항혈청은 TGEV에 자연감염되어 전형적인 병변을 보이는 3~5일령의 포유자돈의 혈액을 채취하여 응고시킨 후에 4°C, 3000 rpm에서 15분간 원심하여 상층액을 56°C, 30분간 비동화하여 냉동보관하여 사용하였다. 혈청중화시험을 실시하여 평균 항체가가 1028인 항혈청을 사용하였다.

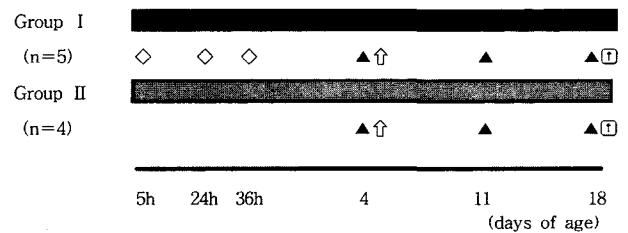
### 2. 공격접종 TGEV의 준비

공격접종용 TGEV는 형광항체법으로 검사하여 TGE 양성반응을 나타낸 전형적인 설사소견을 보이는 3~5일령 포유자돈의 소장을 각각 PBS로 10%되게 유제하여 1,000 rpm, 5분간 원심하여 얻은 상층액을 12,000 rpm, 20분간 고속원심하여 상층액을 membrane filter에 통과시켜 멸균하고 ampicilin (Sigma, USA)과 kanamycin (Sigma, USA) 각각 1%되게 첨가하여 5 ml/두씩 3회 경구투여하였다. 권 등<sup>41</sup>(1998) 등의 방법에 돼지 고환세포(swine testicular cell, STC)를 이용하여 바이러스를 증식시켜 분리하였으며 바이러스 역가는  $3 \times 10^6$  plaque-forming units (PFU)/ml이었다.

### 3. 시험동물 및 시험설계

양돈장에서 TGE에 대한 백신을 실시하지 않고 항체음성인 모돈에서 분만되고 혈청중화검사에 의해 음성인 포유자돈 9두를 선발하여 5두는 분만후 5시간, 24시간, 36시간에 각각 5 ml/두씩 TGEV 항혈청을 경구투여하였고 4두는 TGEV 항혈청을 투여하지 않았다. 실험자돈은 3일령에 실험사육돈방(2.5 m × 2.5 m × 0.5 m)에 이동하여 사육하였으며 보온시설하에서 주위환경과 통제하였고 돈방의 온도와 습도는 일정하게 유지시켰으며 돈사바닥은 매일 청소를 실시하였다.

실험군의 포유자돈은 실험돈방에 넣어 24시간 적응시킨 후 4일령에 공격접종을 실시하였다. 실험 1군은 분만후에 TGEV



Group I: piglets from no vaccinated sows were added TGEV antiserum orally and infected by TGEV.

Group II: piglets from no vaccinated sows were not add TGEV antiserum orally and infected by TGEV.

◇ : administration of TGEV antiserum orally, ▲ : collection of blood, ↑ infection of TGEV, ☐: autopsy.

Fig-text. 1. Experimental design.

항혈청을 경구투여한 5두 포유자돈을 TGEV로 공격접종한 군, 실험 II군은 분만후에 항혈청을 투여하지 않은 4두 포유자돈을 TGEV로 공격접종한 대조군으로 구분하였으며, 자돈에의 TGEV 공격접종은 카테타를 이용하여 경구투여한 후에 2주간 관찰하였다. 실험자돈은 시기별에 따라 채혈하고 체중을 측정하였다(Fig-text. 1).

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

**4. TGEV에 대한 혈청중화시험**

혈청중화시험을 위하여 경정맥에서 혈액을 채취하여 응고시킨 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 eppendorf tube에 옮긴 다음 56°C에서 30분간 비동화시킨 뒤 사용하였다.

Kusanagi 등<sup>42</sup>(1992) 방법을 일부 변경하여 실시하였는데 MEM (Gibco BRL)을 50 µl씩 96 well plate에 분주한 다음 첫 번째 well에 가검혈청을 50 µl 넣고 6번째 well까지 2배수 희석한 다음 100 µl의 200 TCID<sub>50</sub> TGEV(평택주)를 모든 well에 첨가하여 37°C에서 1시간 배양하였다. 각 well에 10<sup>5</sup> swine testicle(ST) cell을 넣은 뒤 3~4 일간 배양하면서 세포변성효과(CPE)가 나타날때까지 기다린후 역가를 확인하였다.

**5. RT-PCR에 의한 TGEV 검사**

공격접종한 TGEV의 분변을 통한 배출 여부를 위하여 매일 1회용 먼봉으로 실험자돈의 직장에서 분변을 채취하였고 실험도중에 폐사한 실험자돈의 소장에서 검출을 확인하기 위하여 소장조직을 분쇄하여 멸균된 500 µl PBS (pH 7.2)에 넣어 충분히 혼합시킨 다음 14,000 rpm에서 20분간 원심하여 상층액을 취하여 -70°C에 보존하여 RT-PCR 검사를 실시하였다.

**1) Primers**

TGEV에 대한 Oligonucleotide primer는 TGEV의 S gene에서 설계한 것으로 TGEV와 돼지 호흡기 코로나바이러스(PRCV)를 감별하여 검출할수 있는 Forward primer는 5'-AGAAC-TATAGGTAACCATTTGG-3', reverse primer는 5'-TTCTAATGT-AGTCGCACGCAT-3'로 572 bp 크기의 fragment가 증폭되도록 합성하였다.<sup>43</sup>

**2) RNA 추출**

분변과 소장조직에서의 RNA 추출은 RNeasy® Mini Kit (QIAGEN 74104, Germany)를 사용하여 실시하였다. Sample 300 µl에 RLT buffer 600 µl와 β-mercaptoethanol 6 µl를 넣고 완전히 풀어질때까지 2분이상 vortexing하였다. 70% ethanol 600 µl 첨가한 후 1분간 vortexing하여 mini column에 반응액 1.5 ml 중 750 µl를 넣고 14,000 rpm에서 1분간 원심한 후 tube 속의 용액을 제거하고 남은 반응액을 넣고 중박하였다. RW1 buffer 700 µl를 column에 넣고 14,000 rpm에서 1분간 원심한 뒤 column을 새로운 collection tube에 넣고 RPE buffer 500 µl

를 넣은 다음 14,000 rpm에서 1분간 원심하여 tube속의 용액을 제거하였다. 다시 RPE buffer 500 µl를 넣고 14,000 rpm에서 1분간 원심한 후 tube속의 용액을 깨끗이 제거하였다. Column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 30 µl RNase-free water를 첨가하여 14,000 rpm에서 2분간 원심하여 RNA를 추출하였다.

**3) 역전사 반응(Reverse transcription; RT)**

역전사 반응은 RNA template 5 µl, 0.2 mM의 reverse primer, DEPC 처리된 증류수 31 µl, 10× RT buffer (MBI, Lithuania), 0.2 mM dNTP(MBI, Lithuania), 40 unit RNasin (Promega, USA), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, USA)를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시킨 뒤 200u Molony murine leukemia virus reverse transcriptase (MBI, Lithuania)를 첨가하여 50 µl의 reaction volume으로 42°C에서 1시간, 94°C에서 5분으로 1 cycle을 시행하여 cDNA를 합성하였다.

**4) 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)**

역전사 반응에서 합성된 5 µl cDNA에 0.2 µM의 primer, 10 ×PCR buffer, 2.5 unit Taq polymerase (Promega, USA), 0.2 mM dNTP (MBI, Lithuania), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, USA), 멸균된 증류수 32 µl를 첨가하여 50 µl의 reaction volume으로 95°C 5분, 52°C 45초, 72°C 1분의 반응조건에서 1회 시행한 다음 계속하여 95°C 45초, 52°C 45초, 72°C 1분의 반응 조건에서 30회 반복하였고 52°C 45초, 72°C 5분간 반응조건에서 1회 시행하였다.

증폭된 PCR산물의 확인은 1×buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 전해질로 사용한 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, 40 mM etidium bromide용액에서 gel을 염색하여 UV transilluminator (Seoulin Bioscience, USA)로 생성된 band를 확인하였으며 DNA marker로는 100 bp DNA ladder (MBI, Lithuania)를 사용하였다.

**6. 형광항체검사**

실험도중에 폐사하였거나 실험종료시에 포유자돈은 부검을 실시하여 십이지장, 공장, 회장의 조직을 10 µm 두께로 절편하여 슬라이드에 부착시킨 뒤 실온에 5분간 정치시킨 후 건조시키고 냉동아세트론으로 4°C에서 10분동안 냉장상태로 고정시켰다. 고정된 조직에 TGEV monoclonal antibodies (MoAb) (국립수의과학검역원 분양)를 첨가하고 37°C의 습상에서 45분간 배양하였다. 슬라이드상의 MoAb를 제거하고 냉장보관된 PBS (pH 7.2)로 5분간 3회 세척하였다. 흡착지로 여분의 용액을 제거한 다음 FITC conjugated anti-mouse IgG (국립수의과학검역원 분양)를 조직에 첨가한 다음 37°C의 습상에서 30분 동안 배양시켰다. 슬라이드의 용액을 제거하고 냉장보관된 PBS로 5분간 3회 세척한 다음 Mounting buffer를 슬라이드에 떨

어뜨린 다음 형광현미경(Olympus BX50, Japan)하에서 검검하였다.

**7. 통계학적 처리**

TGEV 항혈청을 경구투여한 실험군과 투여하지 않은 대조군간의 통계학적 유의성 검사는 SAS package (Ver. 6.12, USA)를 이용한 Mann-Whitney U test를 실시하였다.

**III. 결 과**

양돈산업에 막대한 경제적 손실을 주고 있는 바이러스성 소화기질병인 TGE에 대한 TGEV 항혈청요법의 예방효과를 관찰하기 위하여 TGEV에 대한 항체음성인 포유자돈을 대상으로 TGEV 항혈청 경구투여를 하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

**1. TGE 바이러스에 대한 혈청중화시험**

TGE에 대한 백신을 실시하지 않고 항체음성인 모돈에서 분만되어 TGEV에 대한 항체음성인 3일령의 포유자돈 9두를 시기별로 채혈하여 혈청중화시험을 실시하였다.

TGEV 항혈청을 경구투여한 실험 I군의 1번 포유자돈의 혈청중화항체는 TGEV를 공격접종하기전에는 1024, 공격접종 후 7일에는 512, 공격접종 후 14일에는 256이었다. 2번 포유자돈은 TGEV를 공격접종하기전에는 256, 공격접종 후 7일에 폐사하였는데 혈청중화항체는 256이었다. 3번 포유자돈은 TGEV를 공격접종하기전 혈청중화항체는 512, 공격접종 후 7일에는 256, 공격접종 후 14일에는 128이었다. 3번 포유자돈은 TGEV 공격접종 전에는 256, 공격접종 후 4일에 폐사하였고 혈청중화항체는 256이었다. 5번 포유자돈은 TGEV 공격접종전에는 512, 공격접종 후 7일 및 공격접종 후 14일에 모두 256이었다(Table 1).

TGEV 항혈청을 투여하지 않은 실험 II군의 1번 포유자돈은 TGEV를 공격접종하기전 혈청중화항체는 <2이었고 TGEV를 공격접종 후 7일에는 128, 공격접종 후 14일에는 256이었다. 2번 포유자돈은 TGEV를 공격접종전에는 <2이었고 공격접종 후 3일에 폐사하였는데 혈청중화항체는 64이었다. 3번 포유자돈은 TGEV를 공격접종전에는 <2, 공격접종 후 6일에 폐사하였으며 혈청중화항체는 128이었다. 4번 포유자돈의 혈청중화항체는 TGEV 공격접종 전에는 <2, 공격접종 후 2일에 폐사하였는데 혈청중화항체는 64이었다(Table 1).

분만후 TGEV에 대한 항혈청을 경구투여한 실험 I군은 TGEV를 공격접종하기전 혈청중화항체가 256~1024로 항혈청을 투여하지 않은 실험 II군의 혈청중화항체인 <2에 비하여 유의성있게 높았다(P<0.01). 또한 실험 I군의 혈청중화항체는 시간이 경과하여도 대조군인 실험 II군에 비하여 지속적으로 높게 유지되었다.

**2. RT-PCR에 의한 TGEV 검출**

RT-PCR에 의한 분변과 소장에서 TGEV를 검출하였던 결과는 Table 2와 같다. TGEV 항혈청을 경구투여한 포유자돈에 TGEV를 공격접종한 실험 I군은 공격접종 후 1일부터 14일까지 총 53예의 분변재료 중 13예에서 검출되어 24.5%의 검출률을 보였고 5두 중 1두의 소장에서만 TGEV가 검출되어 20.0%의 검출률을 보였다.

TGEV 항혈청을 투여하지 않은 포유자돈에 TGEV를 공격접종한 실험 II군은 공격접종 후 1일부터 14일까지 총 25예의 분변재료 중 11예에서 검출되어 44.0%의 검출률을 보였고 4두 중 3두의 소장에서 TGEV가 검출되어 75.0%의 검출률을 보였다(Fig. 1.).

**3. 형광항체검사**

형광항체법에 의한 소장에서의 TGEV에 대하여 양성반응을

**Table 1.** Antibody titers by SN test in piglets infected with TGEV

Group	Piglet No.	Antibody titer						
		0 PID*	2 PID	3 PID	4 PID	6 PID	7 PID	14 PID
I	1	1024	NT**	NT	NT	NT	512	256
	2	256	NT	NT	NT	NT	256/D***	
	3	512	NT	NT	NT	NT	256	128
	4	256	NT	NT	256/D			
	5	512	NT	NT	NT	NT	256	256
II	1	<2	NT	NT	NT	NT	128	256
	2	<2	NT	64/D				
	3	<2	NT	NT	NT	128/D		
	4	<2	64/D					

\*: PID=postinfection day.

\*\* : NT=not tested.

\*\*\*: D=died.

**Table 2.** Detection of TGEV by RT-PCR in the feces and small intestine of piglets

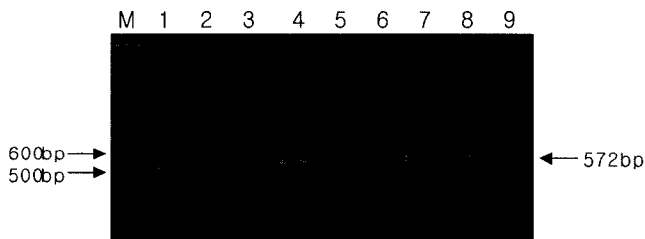
Group	Piglet No.	Fece														Small intestine	Cumulative positivity (%)				
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			14			
I	1	-a0	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	-	+	+	+	+	+	-	D <sup>b)</sup>												
	3	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13/53c)(24.5)	
	4	-	-	+	+	D															+
	5	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	-	+	+	D																+
	3	-	-	+	+	+	+	D													+
	4	-	-	D																	+

a) : -, negative, +; positive.

b) : D=died.

c) : No. fece of piglets detected / No. total fece of piglets tested.

d) : No. small intestine of piglets detected / No. total small intestine of piglets tested.



**Fig. 1.** Detection of TGEV by RT-PCR with fecal samples from piglets infected with TGEV. Lane M, 100bp DNA size ladder. Lane 1, TGEV positive standard; lane 2-6, TGEV antiserum treated group; lane 7-9, TGEV antiserum untreated group.

보인 결과는 Table 3과 같다. TGEV 항혈청을 경구투여한 포유자돈에 TGEV를 공격접종한 실험 I군에서 1번, 3번, 5번 포유자돈은 십이지장, 공장, 및 회장에서 모두 양성반응을 보이지 않았다. 2번 포유자돈은 TGEV 공격접종 후 7일에 폐사하였으며 공장에서 가벼운 반응을 보였고(Fig. 2.), 4번 포유자돈은 공격접종 후 4일에 폐사하였으며 십이지장과 회장에서 가벼운 양성 반응을 보였고 공장에서는 중등도 양성반응을 보였다.

TGEV 항혈청을 투여하지 않은 포유자돈에 TGEV를 공격접종한 실험 II군에서 1번 포유자돈은 십이지장, 공장, 회장에서 모두 양성반응을 보이지 않았다. 2번 포유자돈은 TGEV 공격접종 후 3일에 폐사하였으며 십이지장과 회장에서 가벼운 반응을 보였고 공장에서는 강한 양성반을 보였다. 3번 포유자돈은 TGEV를 공격접종 후 6일에 폐사하였으며 십이지장에서 가벼운 양성반응을 보였고 공장과 회장에서는 중등도 반응을 보였다. 4번 포유자돈은 TGEV를 공격접종 후 2일에 폐사하였으며 십이지장과 회장에서 가벼운 반응을 보였고 공장에서는 강한 양성반응을 보였다(Fig. 3.).

**Table 3.** Detection of TGEV by IFA test in the small intestine of piglets

Group	Piglet No.	fluorescent lesion grading			Cumulative positivity (%)
		duodenum	jejunum	ileum	
I	1	0*	0	0	4/15**(26.7)
	2	0	1	0	
	3	0	0	0	
	4	1	2	1	
	5	0	0	0	
	Mean	0.20	0.60	0.20	
II	1	0	0	0	9/12(75.0)
	2	1	3	1	
	3	1	2	2	
	4	1	3	1	
	Mean	0.75	2.00	1.00	

\*: 0; no lesion, 1 ; mild, 2 ; moderate, 3 ; severe, \*\*: No. small intestine of piglets detected/No. total small intestine of piglets tested.

#### IV. 고 찰

양돈산업에 막대한 경제적 손실을 주는 TGEV는 경구 또는 호흡기를 통해 감염되며 7일령미만의 포유자돈은 발병후 대부분 2~7일 이내에 폐사하고 일령의 증가에 따라 폐사율이 감소하지만 회복후의 돼지는 발육상태가 극히 나빠 위축돈으로 된다.<sup>19,22,29</sup>

TGE의 면역에는 국소면역이 중요한데 소화기나 호흡기에 있어서 국소면역은 액성면역과 세포성면역으로 이루어지며 분



Fig. 2. Jejunal villi of piglet infected with TGEV after treatment of antiserum showing mild fluorescent positive reaction. IFA,  $\times 100$ .

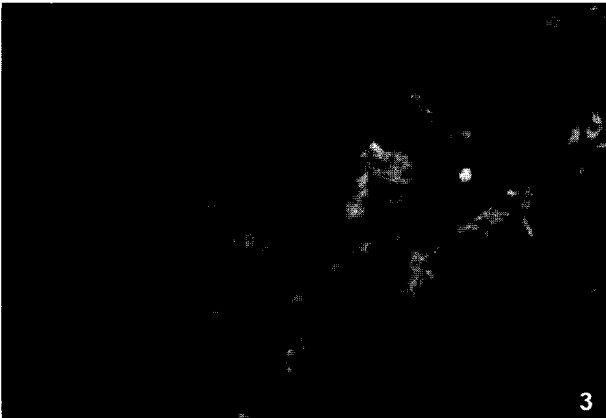


Fig. 3. Jejunal villi of piglet infected with TGEV after no treatment of antiserum showing intensive fluorescent positive reaction. IFA,  $\times 100$ .

비형 IgA가 주요작용을 한다.<sup>44</sup> IgA는 단량체, 2분자의 단량체가 J쇄에서 결합된 이량체, 이량체에 secretory components (SC)가 결합된 분비형 IgA로 구분된다.<sup>45</sup> TGEV에 감염되었을 경우 혈액중에 순환하는 항체는 주로 gut-associated lymphoreticular tissue (GALT)에서 유래한 이량체이며 음와의 분비성분과 친화성을 갖고있기에 분비성분과 결합하여 장점막에 부착되어 바이러스의 흡착, 증식을 억제한다.<sup>46</sup> 초유에 함유된 면역글로블린은 분만후 24~36시간까지는 장관에 직접 흡수되어 임프관에서 혈액중에 이행하며 혈청중 반감기는 IgM의 경우 2.8~4.5일, IgA의 경우 2.7~3.5일, IgG의 경우 9.1~14.2일이다.<sup>47</sup> 본 연구에서 사용된 고농도 TGEV 항혈청은 TGEV에 자연감염된 자돈에서 얻은 항혈청으로서 혈청중 이량체 IgA도 충분히 포함되어 있으리라 사료된다. 고농도 TGEV 항혈청을 분만직후 36시간이내에 3회 경구투여함으로써 혈청중에 함유되어 있는 이량체 IgA가 음와의 분비성분과 결합하여 장관점막에 부착하여 바이러스의 흡착을 억제 또는 중화시키는

작용을 할것으로 사료된다. IgA에 비해 효과는 떨어지지만 IgG도 여러번 경구투여하면 장관에 면역을 형성할수 있다.<sup>48</sup>

6주령의 자돈에 경구와 비강내로 TGEV를 공격접종 후 virus-neutralizing (VN) 항체가는 21일에 144, 56일에는 124로 나타났다.<sup>49</sup> TGEV가 발생한 농장에서 1~2개월 사이에 모든, 후보돈, 주령별 육성돈의 혈청중화시험을 실시한 결과 중화항체가 나타나지 않은 경우는 검사시료 171두 중 1.7%로 나타났으며 중화항체가 4~16인것은 16.9%, 32~128인것은 49.1%, 256 이상은 32.3%로 중화항체가 대부분 32~128 이상으로 높게 나타났다.<sup>4</sup> 본 연구에서 분만후 TGEV 항혈청을 투여하지 않고 TGEV를 공격접종한 대조군은 공격접종전의 혈청중화항체는 모두  $< 2$ 이었으나 공격접종 후 2일이나 6일에는 64~128로 나타났고 실험종료시에는 256으로 나타났던 것은 TGEV 감염에 의한 항체가 형성된 것으로 생각된다. TGEV 항혈청을 경구 투여한 실험군은 TGEV를 공격접종전에는 256~1024의 높은 항체가를 보여 TGEV 항혈청 투여에 따른 수동면역의 형성에 기인하는 것으로 TGEV 공격접종에 대해 효과적으로 방어하는 것으로 사료된다.

TGEV를 10두의 3일령 포유자돈에 공격접종 후 12시간, 24시간, 48시간, 60시간, 72시간에 분변과 소장에서 RT-PCR에 의한 바이러스 검출결과 소장에서는 10두, 분변에서는 9두에서 바이러스가 검출되었다.<sup>50</sup> 본 연구에서 RT-PCR을 이용한 분변과 소장에서 공격접종한 TGEV의 검출결과는 TGEV 항혈청을 경구투여한 실험군의 포유자돈은 24.5%와 20.0% 검출률을 보였으나 TGEV 항혈청을 투여하지 않은 대조군의 포유자돈에서는 44.0%와 75.0%의 높은 검출율을 보여 TGEV 항혈청 경구투여에 의해 소장에서 바이러스 흡착, 억제 또는 중화가 야기되어 방어효과가 나타난 것으로 생각된다.

TGEV의 검사에는 여러가지 방법이 있지만 형광항체법이 가장 많이 이용되며 공장의 상피세포에서 특이적인 형광을 확인할수 있다.<sup>51</sup> TGEV 검사시료는 발병후 1~2일이내의 것을 채취하여 검사하는 것이 좋은데 발병시간이 오래되어 설사가 아주 심할 시기에는 상피세포가 파괴되어 바이러스 손실이 커서 검출률이 낮아진다. 때문에 설사가 폭발직후 자돈을 안락사시켜 TGEV 검사시료를 채취하여야 한다.<sup>22</sup> 본 연구에서 TGEV 항혈청을 투여하지 않고 TGEV를 공격접종한 포유자돈은 형광항체검사를 실시한 결과 75.0%의 양성율을 보였으나 TGEV 항혈청을 경구투여한 포유자돈은 26.7% 양성율을 보여 인위적인 수동면역에 의해 형성된 항체로 인하여 TGEV의 감염을 완전히 방어하지는 못하였지만 소장에서의 TGEV의 흡착과 증식이 억제됨을 알수 있었다. 형광항체에 대한 양성지수를 부위별로 보면 TGEV 항혈청을 경구투여한 실험군의 포유자돈은 십이지장과 회장에서는 0.20, 공장에서는 0.60으로 나타났고 TGEV 항혈청을 투여하지 않은 대조군의 포유자돈은 십이지장에서 0.75, 공장에서 2.00, 회장에서 1.00으로 나타나 공장에서 가장 뚜렷하였는바 형광항체법에 의한 TGEV

검사시 공장부위가 가장 적절함을 확인할수 있었다.

본 실험에서 얻어진 혈청중화항체가, 분변과 소장에서 RT-PCR에 의한 바이러스 검출, 형광항체법에 의한 소장에서의 바이러스 검출 결과를 비교하였시에 TGEV 항혈청을 분만직후 경구투여함으로써 고역가의 항체를 얻을수 있는 유즙대체 수동면역을 형성하여 TGEV의 장벽에 흡착 및 증식이 억제되거나 바이러스가 중화되어 TGEV의 감염을 감소시키는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과를 토대로하여 향후 실제 야의 양돈장에서 많은 돼지를 대상으로 TGEV 항혈청을 활용한다면 효과적으로 예방하여 TGE에 의한 경제적인 손실을 극소화하리라 사료된다.

## V. 결 론

TGEV 항혈청을 분만직후 포유자돈에 3회에 걸쳐 경구투여하여 인위적으로 자돈에 수동면역을 형성시킨 후 TGEV의 공격접종에 대한 방어효과를 관찰하고자 혈청중화항체시험, RT-PCR검사, 형광항체검사를 실시하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TGEV 항혈청을 경구투여하여 높은 혈청중화항체가 형성되었고 실험종료시까지 유지되었다.
2. RT-PCR에 의한 분변과 소장에서 바이러스 검출시에 TGEV 항혈청을 경구투여한 실험군에서는 각각 24.5%와 20.0%로 대조군의 44.0%와 75.0%에 비하여 낮은 검출율을 보였다.
3. 형광항체법에 의한 소장에서 바이러스 검출시에 TGEV 항혈청을 경구투여한 실험군은 26.7%의 양성율을 보였지만 TGEV 항혈청을 투여하지 않은 실험군은 75.0%의 양성율을 보였다.

## 참고문헌

1. Cook DR, Hill HT, et al. Oral transmission of transmissible gastroenteritis virus by muscle and lymphnode from slaughtered pigs. *Aust Vet J*, 68:68-70, 1991.
2. Siegel JP, Hungerford LL, et al. Risk factors associated with transmissible gastroenteritis in swine. *J Am Vet Med Assoc*, 199:1579-1583, 1991.
3. Saif LJ, Wesley RD. Transmissible Gastroenteritis and Porcine Respiratory Coronavirus. *Diseases of swine*, 8th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa. 295-325, 1999.
4. 조광현, 박최규, et al. 경북지방 돼지의 전염성 위장염에 대한 혈청학적 역학조사. *가축위생시험지*, 24:271-277, 2001.
5. Doyle LP, Hutchings LM. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J Am Vet Med Assoc*, 108:257-259, 1946.
6. Underdahl WR, Mebus CA, et al. Recovery of transmissible gastroenteritis virus from chronically infected experimental pigs. *Am J Vet Res*, 36:1473-1476, 1975.
7. Schulman A. First case is TGE in Finland. *Vet Rec*, 107:206, 1980.
8. Siddell SG, Wege H, et al. The biology of coronaviruses. *J Gen Virol*, 64:761-776, 1983.
9. Spaan W, Cavanagh D, et al. Coronaviruses: Structure and genomic expression. *J Gen Virol*, 69:2939-2952, 1988.
10. Garwes DJ, Pocock DH. The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol*, 29:25-34, 1975.
11. Garwes DJ, Lucas MH, et al. Antigenicity of structural components from porcine transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol*, 3:179-190, 1978.
12. Godet M, L'Haridon R, et al. TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, 188:666-675, 1992.
13. Saif LJ, Bohl EH. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. *Am J Vet Res*. 40:115-117, 1979.
14. Callebaut P, Pensaert MB, et al. A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with the TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Vet Microbiol*, 20:9-19, 1989.
15. Cox E, Pensaert MB, et al. Intestinal replication of a porcine respiratory coronavirus closely related antigenically to the enteric transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol*, 23:237-243, 1990.
16. Laude H, Rasschaert D, et al. Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol*, 23:147-154, 1990.
17. Hooper BE, Haelterman EO. Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. *J Am Vet Med Assoc*, 149:1580-1586, 1966.
18. Drolet R, Morin M, et al. Hypoglycemia : A factor associated with low survival rate of neonatal piglets infected with transmissible gastroenteritis virus. *Can J Comp Med*, 48:282-285, 1984.
19. 兒玉義勝. 豚傳染性胃腸炎. 豚病學. 第四版, 東京. pp. 237-247, 1999.
20. Laude H, Van Reeth K, et al. Porcine respiratory coronavirus: Molecular features and virus-host interactions. *Vet Res*, 24:125-150, 1993
21. Pensaert M, Cox E, et al. A sero-epizootiological study of porcine respiratory coronavirus in Belgian swine. *Vet Q*, 15:16-20, 1993.
22. Saif LJ, Wesley RD. Transmissible Gastroenteritis and Porcine Respiratory Coronavirus. *Diseases of swine*, 8th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa. 295-325, 1999.
23. Pritchard GC. Transmissible gastroenteritis in endemically infected breeding herds of pigs in East Anglia, 1981-1985. *Vet Rec*, 120:226-230, 1987.
24. Morin M, Solorzano RF, et al. The postulated role of feeder swine in the perpetuation of the transmissible gastroenteritis virus. *Can J Comp Med*, 42:379-384, 1978.
25. Bohl EH, Kumagai T. The use of cell cultures for study of swine. *Proc US Livest Sanit Assoc*, 69:343-350, 1965.
26. Fuller DA, Welter CJ. TGE of Swine-II: Clinical field trials with an inactivated tissue culture vaccine. *Vet Med Small Ani Clin*, 61:257-260, 1966.
27. Tomas B, Benet JJ. A technique of research on microplate of the

- antibodies neutralizing transmissible gastroenteritis virus of swine. *Rec Med Vet*, 152:565-568, 1976.
28. Tomas FC, Dulac GC. Transmissible gastroenteritis virus: plaques and a plaque neutraliation test. *Can J Comp Med*, 40:171-174, 1976.
  29. Bohl EH, Frederick GT, et al. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: Intramuscular injection of pregnant swine with a modified live-virus vaccine. *Am J Vet Res*, 36:267-271, 1975.
  30. Kaji T, Shimizu Y. Passive immunization against transmissible gastroenteritis virus in piglets of ingestion of milk of sows inoculated with attenuated virus. *Natl Inst Anim Health Q(Tokyo)*, 18:43-52, 1978.
  31. Pensaert MB. Immunity in TGE of swine after infection and vaccination. In *Viral Enteritis in Humans and Animals*. Ed F. Bricout and R. Scherrer. INSERM(Paris) 90:281-293, 1979.
  32. Voets MT, Pensaert M, et al. Vaccination of pregnant sows against transmissible gastroenteritis with two attenuated virus strains and different inoculation routes. *Vet Q*, 2:211-219, 1980.
  33. Moxley RA, Olson LD. Clinical evaluation of transmissible gastroenteritis virus vaccination procedures for inducing lactogenic immunity in sows. *Am J Vet Res*, 50:111-118, 1989.
  34. Saif LJ, Van Cott JL, et al. Immunity to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus infections in swine. *Vet Immunol Immunopathol*, 43:89-97, 1994.
  35. Fuller DA. Field observations of the efficacy of TGE vaccine. *Vet Med Small Anim Clin*, 66:1206-1208, 1971.
  36. Yokoyama H, Peralta RC, et al. Passive protection of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun*, 60:998-1007, 1992.
  37. Yokoyama H, Peralta RC, et al. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *Am J Vet Res*, 54:867-872, 1993.
  38. 김종만, 우승룡, et al. 난황항체를 이용한 돼지 대장균실사증 방제 기법 개발 II. 난황항체의 돼지 대장균증에 대한 치료효과. *대한수의학회지*, 38:837-842, 1998.
  39. Kweon CH, Kwon BJ, et al. Immunoprophylactic Effect of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) against Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) in Piglets. *J Vet Med Sci*, 62:961-964, 2000.
  40. Woods RD, Wesley RD. Efficacy of antiserum produced in goats and pigs to passively protect piglets against virulent transmissible gastroenteritis virus. *Can J Vet Res*, 56:170-172, 1992.
  41. 권혁무, 피재호. 돼지 전염성 위장염 바이러스(국내분리주)의 분자 생물학적 특성 규명. *대한수의학회지*, 38:304-313, 1998.
  42. Kusanagi K, Kuwahara H, et al. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J Vet Med Sci*, 54:313-318, 1992.
  43. 류영수, 박희규, et al. 가축 질병 진단. 초판. 이공월드, 서울. pp. 87-90, 1997.
  44. Edward HB, Paul Gupta RK, et al. Antibody responses in serum, colostrum, and milk of swine after infection of vaccination with transmissible gastroenteritis virus. *Infect Immun*, 6:289-301, 1972.
  45. Halliwell RE, Gorman NT. *Veterinary clinical immunology*. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. USA, pp.164-192, 1989.
  46. Roth JA. *The Immune System. Diseases of swine*, 8th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 799-820, 1999.
  47. Curtis J, Bourne FJ. Half-lives of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the serum of new-born pigs. *Immunol*, 24:147-155, 1973.
  48. Bridger JC, Brown JF. Development of immunity to porcine rotavirus in piglets protected from disease by bovine colostrum. *Infect Immun*, 31:906-910, 1981.
  49. Woods, RD. Humoral and cellular responses in swine exposed to transmissible gastroenteritis virus. *Am J Vet Res*, 40:108-110, 1978.
  50. Kim O, Choi B, et al. Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR. *Vet Rec*, 146:637-640, 2000.
  51. Penraert MB, Haelterman EO, et al. Transmissible gastroenteritis of swine: Virus-intestinal cell interactions. I. Immunofluorescence, histopathology and virus production in the small intestine through the course of infection. *Arch Gesamte Virusforsch*, 31:321-334, 1970.