

## 항혈청 투여에 따른 돼지 유행성 설사병 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 Porcine Epidemic Diarrhea(PED) Using by PEDV Antiserum

### I. Serological Results, RT-PCR for Fecal and Small Intestin, 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 porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in piglets by administration of the PEDV antiserum orally at 2 hrs, 24 hrs and 36 hrs after birth. six piglets administered the antiserum were experimentally infected with PEDV at five-day-old. Control group were four piglets infected with PEDV only. Serum antibody titers against PEDV were examined by serum neutralization (SN) test, detection for PEDV or PEDV 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 PEDV antiserum showed higher antibody titers than those of control group and sustained during the experimental period.
2. The detection rate of PEDV in feces and small intestines by RT-PCR were 26.2% and 16.7% in PEDV antiserum treated group and 48.1% and 75.0% in control group, respectively.
3. The detection rate of PEDV antigen in the small intestine by IFA were 0% in PEDV antiserum treated group and 50.0% in control group, respectively.

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

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

## I. 서 론

돼지 유행성 설사병 (Porcine epidemic diarrhea; PED)는 돼지 전염성 위장염 (transmissible gastroenteritis; TGE)의 병원체와 같은 coronavirus에 속하지만 항원성이 상이한 porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)의 감염에 의해 발병하며 어린 자돈뿐만 아니라 육성돈, 비육돈에서도 심한 수양성 설사를 야기시키는 급성 바이러스성 장염이다.<sup>1-5</sup>

PED는 1976년 벨기에와 1978년 영국에서 최초의 보고가 있는 후에 유럽에서 발생되었으며<sup>6,7</sup> 아시아에서는 1983년에 일본에서 발생보고가 있었고 8 국내에서는 1992년에 PEDV가 최초로 분리되었으며 최근까지 지속적으로 발생하여 막대한 경

제적 피해를 주고 있다.<sup>9,10</sup>

PEDV는 95~190 nm 크기의 RNA 바이러스로 다형태를 나타내며 표면에는 방사상으로 배열된 18-23 nm의 곤봉모양의 표면돌기를 갖고 있다.<sup>11</sup> PEDV는 S 단백질, M 단백질, N 단백질의 3종으로 구성되었으며 돼지의 다른 coronavirus와는 공동항원성은 없으나 고양이 전염성 복막염바이러스의 N 단백질과는 교차반응이 일어나는 것으로 알려져 있다.<sup>12</sup>

PEDV는 주로 소장용모상피세포의 세포질내에서 증식하여 용모상피세포가 변성 또는 괴사되어 용모의 위축과 탈락을 동반하므로써 흡수장애를 초래하여 지속적인 수양성 설사로 인한 전해질의 고갈과 탈수를 보여 폐사한다.<sup>1,13</sup> PED는 모든 연령에서 100%의 발병률을 보이며 포유자돈에서는 50% 이상의

폐사율을 야기하는 질병으로 급성의 심한 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하 등의 임상증상을 보이나 자돈에서의 느린 전파와 낮은 폐사율을 제외하고는 TGE와 매우 유사하다.<sup>5,14,15</sup>

PED는 TGE 또는 로타바이러스성 장염 등의 바이러스성 설사병과 유사하기 때문에 임상증상이나 병변만으로 감별진단하기가 매우 어려우며 역학조사, 임상증상, 특징적인 병변 등의 관찰과 혈청중화반응, indirect fluorescent antibody test(IFA), 간접혈구응집반응법, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 등의 혈청검사, 소장의 동결절편을 이용한 형광항체법, in situ hybridization(ISH), 전자현미경에 의한 바이러스입자 확인, reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR), 바이러스의 분리과 동정 등을 통하여 확진한다.<sup>10,16-20</sup>

PED는 TGE 또는 기타 바이러스성 위장염과 동일하게 면역기전에 있어서는 국소면역이 중요하며 장관과 유즙의 IgA가 주요작용을 한다.<sup>21</sup> 소화기나 호흡기에 있어서 국소면역은 분비형 IgA(secretory IgA, sIgA)에 의한 체액성면역과 국소적으로 세포성 면역이 이루어지는데 그중 분비형 IgA가 중요하게 작용한다.<sup>22</sup> IgA는 위장관내에서 강한 염산과 소화효소와 트립신의 작용에 의해서도 쉽게 제거되지 않으며 자돈에서 IgA 유형의 면역글로블린은 장관감염에 대해 IgG보다 효과적으로 방어한다.<sup>21,23</sup>

PED는 최근들어 유럽에서는 별로 발생하지 않으므로 중요한 돼지질병으로 인식되고 있지 않으나 폭발적으로 발생되고 있는 한국, 일본, 중국 등의 아시아의 양돈국가에서는 약독화 바이러스를 이용한 백신연구가 진행되어 왔으며 한국과 일본에서는 PED에 대한 생독백신을 개발하여 예방대책으로 활용하고 있다.<sup>5,24</sup> PED에 의해 많은 포유자돈의 폐사를 보이는 양돈장에서는 일시적으로 피해를 최대한으로 줄이기 위하여 분만예정인 2주 이상인 임신돈을 대상으로 전형적인 병변을 보이는 감염자돈의 신선한 설사변이나 장내용물을 경구로 인공감염시켜 유즙면역을 자극하는 방법이 있지만 의외로 인공감염으로 양돈장 전체가 오염될 수도 있고 모돈이 심하게 감염되면 유산과 같은 번식장애와 유방염 또는 무유증에 걸릴 수도 있다.<sup>5,24</sup>

최근에는 산란기에 백신을 접종하여 생산된 난황으로부터 항체를 분리하여 이용하는 유즙대체 수동면역방법이 연구되고 있으며 PEDV에 대한 난황항체(IgY)를 신생자돈에 투여하여 면역방어효과를 실시한 결과 바이러스 공격에 대한 자돈의 폐사율에서 유의성있는 차이가 있어 항PEDV-IgY가 모돈의 유즙항체와 유사한 방어효과가 있다.<sup>25-27</sup> Isao 등(2001)<sup>28</sup>은 PEDV로 면역된 암소의 초유를 1~2일령의 자돈에 구강투여한 뒤 PEDV를 접종하였을 시에 소장의 용모상피세포에서 바이러스가 검출되지 않았으며 용모의 위축소견이 관찰되지 않았고 폐사율도 감소시키는 효과를 보였다. 3두의 3일령 포유자돈에 TGEV 항혈청을 하루에 3회 경구투여한 뒤 강독 TGEV를 공격접종하였을 시에 모두 생존하여 효과적으로 TGEV를

방어하였다.<sup>29</sup>

일반적으로 PEDV, TGEV 등의 바이러스성 설사병에 대한 예방대책으로 근육주사에 의한 생독백신의 효과가 상대적으로 낮고 또한 인공감염을 실시하였을 시에 양돈장 전체가 오염되어 상재화되는 위험성이 있으며 난황항체의 경우 비록 방어효과를 나타내지만 그 특이성에 있어서 고농도 PEDV 항혈청에 비해 떨어지리라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 국내 양돈산업에 많은 피해를 주고 있는 PED에 대한 예방대책으로 분만된 포유자돈을 3회에 걸쳐 고농도의 PEDV 항혈청을 투여하여 IgA 혹은 IgG를 장점막에 국소적으로 생성하게 하여 효과적인 수동면역을 형성시켜 PEDV의 공격에 대한 국소면역뿐만아니라 체액성면역을 증강시켜 방어효과를 검토하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. PED 항혈청 준비

자돈 투여용 항혈청은 PEDV에 자연감염되어 전형적인 병변을 보이는 3~5일령의 포유자돈의 혈액을 채취하여 응고시킨 후 4°C, 3000 rpm에서 15분간 원심하여 상층액을 56°C, 30분간 비동화하여 냉동보관하여 사용하였다. 혈청중화시험을 실시하여 평균 항체가 256인 항혈청을 사용하였다.

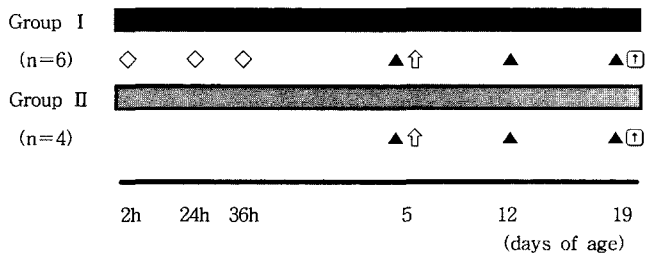
### 2. 공격접종 PEDV의 준비

공격접종용 PEDV는 형광항체법으로 검사하여 PED 양성반응을 나타낸 전형적인 설사소견을 보이는 3~5일령 포유자돈의 소장을 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)을 각각 1%되게 첨가하여 5 ml/두씩 3회 경구투여하였다. Hofmann 등(1988)<sup>18</sup>의 방법에 따라 유제액을 Vero 세포에서 계대배양하여 세포변성효과(CPE)를 관찰하였으며 바이러스 역가는 105.5 TCID<sub>50</sub>/ml이었다.

### 3. 시험동물 및 시험설계

양돈장에서 PED에 대한 백신을 실시하지 않고 항체음성인 모돈에서 분만되고 혈청중화검사에 의해 음성인 포유자돈 10두를 선발하여 6두는 분만후 2시간, 24시간, 36시간에 각각 5 ml/두씩 PEDV 항혈청을 경구투여하였고 4두는 PEDV 항혈청을 투여하지 않았다. 실험자돈은 4일령에 실험사육돈방(2.5 m × 2.5 m × 0.5 m)에 이동하여 사육하였으며 보온시설하에서 주위환경과 통제하였고 돈방의 온도와 습도는 일정하게 유지시켰으며 돈방바닥은 매일 청소를 실시하였다.

실험군의 포유자돈은 실험돈방에 넣어 24시간동안 적응시킨 후 5일령에 공격접종을 실시하였다. 실험 I군은 분만후에 PEDV항혈청을 경구투여한 6두 포유자돈을 PEDV로 공격접종



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

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

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

Fig-text. 1. Experimental design.

한 군, 실험 II군은 분만후에 PEDV항혈청을 투여하지 않은 4두 포유자돈을 PEDV로 공격접종한 대조군으로 구분하였으며, 포유자돈에의 PEDV 공격접종은 카테타를 이용하여 경구 투여한 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. PEDV에 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 등30(1992)의 방법에 준하여 실시하였는데 혈청은 사용전 56°C, 30분간 불활화하여 -20°C에 보관하며 사용하였다. 혈청을 2배수 희석한 다음 100 µl의 200 TCID50 PEDV(PED 생백신, 일생연, Tokyo Japan)를 동량으로 혼합하여 37°C에서 1시간 배양하였다. PBS로 2회 세척한 96-well tissue culture plate의 vero cell에 PEDV-serum 혼합물 0.1 ml을 넣어 37°C에서 1시간 배양한 다음 수거하여 접종물을 제거한 뒤 PBS로 2회에 걸쳐 monolayers를 세척하였다. 2 µg/ml의 trypsin을 함유한 maintenance medium을 각 well에 넣은 뒤 37°C에서 5일간 배양하였다. 혈청중화항체가는 CPE를 나타내는 최고 혈청희석배수의 역으로 계산하였다.

#### 5. RT-PCR에 의한 PEDV 검사

공격접종한 PEDV의 분변을 통한 배출 여부를 위해 매일 1회용 면봉으로 실험자돈의 직장에서 분변을 채취하였고 실험 도중에 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

PEDV에 대한 oligonucleotide primer는 PEDV의 nucleocapsid gene에서 설계한 것으로 PEDV를 특이적으로 검출할 수 있는 forward primer는 5'-ACAAGTCTCGTAACC-AGTCC-3', reverse primer는 5'-GTATCACCACCATCAACA-GC-3'로 691 bp 크기의 fragment가 증폭되도록 합성하였다.<sup>31</sup>

##### 2) RNA 추출

분변과 소장조직에서의 RNA 추출은 RNeasyR 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 중첩하였다. RW1 buffer 700 µl를 column에 넣고 14,000 rpm에서 1분간 원심한 뒤 column을 새로운 collection tube에 넣고 RPE buffer 500 µl를 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 µM의 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 200 u 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°C 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 (Promega, USA)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 냉동아세톤으로 4°C에서 10분동안 냉장상태로 고정시켰다. 고정된 조직에 PEDV 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 30분동안 배양시켰다. 슬라이드의 용액을 제거하고 냉장보관된 PBS로 5분간 3회 세척한 다음 Mounting buffer를 슬라이드에 떨어뜨린 다음 형광현미경(Olympus BX50, Japan)하에서 경검하였다.

## 7. 통계학적 처리

PEDV 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 PED에 대한 PEDV 항혈청요법의 예방효과를 관찰하기 위하여 PEDV에 대한 항체음성인 포유자돈을 대상으로 PEDV 항혈청 경구투여를 하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 1. PEDV에 대한 혈청중화시험

PED에 대한 백신접종을 실시하지 않고 항체음성인 모돈에서 분만되어 PEDV에 대한 항체음성인 4일령의 포유자돈 10두를 시기별로 채혈하여 혈청중화시험을 실시하였다.

PEDV 항혈청을 경구투여한 실험 I군의 1번 포유자돈의 혈청중화항체는 PEDV를 공격접종하기전에는 64, 공격접종 후 7일에는 64, 공격접종 후 14일에는 32이었다. 2번 포유자돈은 PEDV를 공격접종하기전에는 256, 공격접종 후 7일에는 128, 공격접종 후 14일에는 128이었다. 3번 포유자돈은 PEDV를 공격접종하기전과 공격접종 후 7일에 모두 64, 공격접종 후 14일에는 32로 나타났다. 4번 포유자돈은 PEDV를 공격접종하기전과 공격접종 후 7일에 모두 128, 공격접종 후 14일에는 64이었다. 5번 포유자돈은 PEDV를 공격접종하기전과 공격접종 후 7일 및 공격접종 후 14일에 모두 128이었다. 6번 포유자돈은 PEDV를 공격접종하기전 혈청중화항체는 64, 공격접종 후 7일에는 32이었다(Table 1).

PEDV 항혈청을 투여하지 않은 실험 II군인 대조군 1번 포유자돈은 PEDV를 공격접종하기전 혈청중화항체는 <2이었

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

Group	Piglet No.	Antibody titer					
		0 PID*	3 PID	6 PID	7 PID	8 PID	14 PID
I	1	64	NT**	NT	64	NT	32
	2	256	NT	NT	128	NT	128
	3	64	NT	NT	64	NT	32
	4	128	NT	NT	128	NT	64
	5	128	NT	NT	128	NT	128
	6	64	NT	NT	32	32/D***	
II	1	<2	64/D				
	2	<2	NT	32/D			
	3	<2	NT	NT	32	NT	32
	4	<2	64/D				

\*: PID=postinfection day, \*\*: NT=not tested, \*\*\*: D=died.

고 PEDV를 공격접종 후 3일에 폐사하였는데 혈청중화항체는 64이었다. 2번 포유자돈은 PEDV를 공격접종하기전 <2, PEDV 공격접종 후 6일에 폐사하였으며 혈청중화항체는 32이었다. 3번 포유자돈의 혈청중화항체는 PEDV를 공격접종하기전에는 <2, 공격접종 후 7일 및 14일에는 모두 32이었고 4번 포유자돈의 혈청중화항체는 공격접종하기전에는 <2, 공격접종 후 3일에 폐사하였으며 혈청중화항체는 64이었다 (Table 1).

분만후 PEDV에 대한 항혈청을 경구투여한 실험 I군은 PEDV를 공격접종하기전 혈청중화항체가 64~256으로 항혈청을 투여하지 않은 실험 II군의 혈청중화항체인 <2에 비해 유의성있게 높았다(P<0.01). 또한 실험 I군의 혈청중화항체는 시간이 경과하여도 대조군인 실험 II군에 비하여 지속적으로 높게 유지되었다.

### 2. RT-PCR에 의한 PEDV 검출

RT-PCR에 의한 분변과 소장에서 PEDV를 검출하였던 결과는 Table 2과 같다. PEDV항혈청을 경구투여한 포유자돈에 PEDV를 공격접종한 실험 I군은 공격접종 후 1일부터 14일까지 총 84예의 분변재료 중 22예에서 검출되어 26.2%의 검출률을 보였고 6두 중 1두의 소장에서만 PEDV가 검출되어 16.7%의 검출률을 보였다.

PEDV항혈청을 투여하지 않은 PEDV를 공격접종한 실험 II군은 공격접종 후 1일부터 14일까지 총 27예의 분변재료 중 13예에서 검출되어 48.1%의 검출률을 보였고 4두 중 3두의 소장에서 PEDV가 검출되어 75.0%의 검출률을 보였다(Fig. 1).

실험 I군이 대조군에 비하여 분변과 소장에서의 PEDV 검출률이 각각 21.9%와 58.3% 낮게 검출되었다.

### 3. 형광항체검사

형광항체법에 의한 소장에서의 PEDV에 대하여 양성반응을

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

Group	Piglet No.	Feces														Cumulative positivity (%)	Small intestine	Cumulative positivity (%)			
		Days postinfection																			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				14		
I	1	- <sup>a)</sup>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22/84 <sup>c)</sup> (26.2)	1/6 <sup>d)</sup> (16.7)
	2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	3	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	4	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	6	-	+	-	+	+	+	-	+	-	D <sup>b)</sup>								+		
II	1	-	-	+	D													+	13/27(48.1)	3/4(75.0)	
	2	-	+	+	+	+	+	D	+									+			
	3	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	4	-	+	+	D	+												+			

<sup>a)</sup>: -, negative, +; positive, <sup>b)</sup>: D=died, <sup>c)</sup>: No. feces of piglets detected/No. total feces of piglets tested, <sup>d)</sup>: No. small intestine of piglets detected/No. total small intestine of piglets tested.

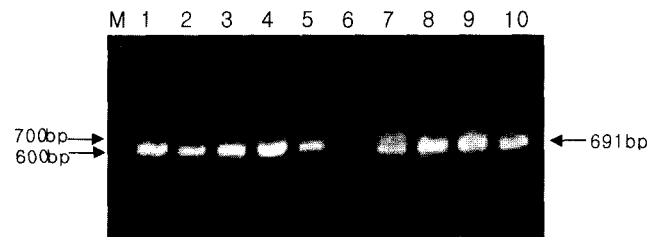
**Table 3.** Detection of PEDV by IFA test in the small intestine of piglets

Group	Piglet No.	fluorescent lesion grade			Cumulative positivity (%)
		duodenum	jejunum	ileum	
		1	0*	0	
2	0	0	0		
3	0	0	0		
4	0	0	0		
5	0	0	0		
6	0	0	0		
Mean		0	0	0	
II	1	1	3	0	6/12(50.0)
	2	0	3	0	
	3	1	1	1	
	4	0	0	0	
Mean		0.50	2.33	0.25	

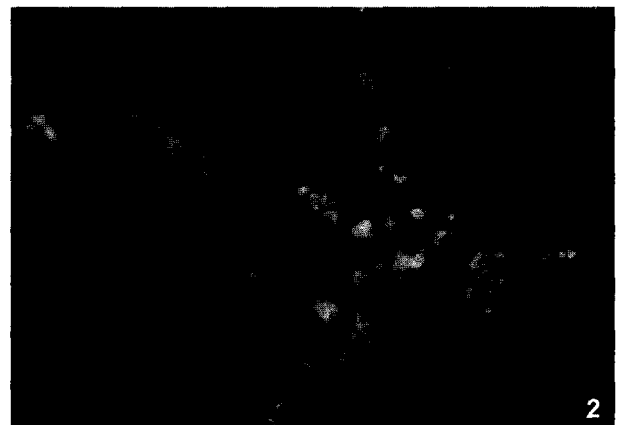
\*: 0; no lesion, 1; mild, 2; moderate, 3; severe, \*\*: No. small intestine of piglets detected / No. total small intestine of piglets tested.

보인 결과는 Table 3과 같다. PEDV 항혈청을 경구투여한 포유자돈에 PEDV를 공격접종한 실험 I군의 6두 포유자돈은 십이지장, 공장, 회장에서 모두 PEDV가 검출되지 않았다.

PEDV 항혈청을 투여하지 않은 포유자돈에 PEDV를 공격접종한 실험 II군에서 1번 포유자돈은 공격접종 후 4일에 폐사하였으며 십이지장에서 약한 반응을 보였고 공장에서는 강한 반응을 보였으나 회장에서는 양성반응을 보이지 않았다. 2번 포유자돈은 공격접종 후 6일에 폐사하였으며 십이지장과 회장에서는 양성반응을 보이지 않았지만 공장에서는 강한 양성반응



**Fig. 1.** Detection of PEDV by RT-PCR with fecal samples from piglets infected with PEDV. Lane M, 100 bp DNA size ladder. Lane 1, PEDV positive standard; lane 2-6, PEDV antiserum treated group; lane 7-10, PEDV antiserum untreated group.



**Fig. 2.** Jejunal villi of piglet infected with PEDV after no treatment of antiserum showing intensive fluorescent positive reaction. IFA, ×100.

을 보였다(Fig. 2). 3번 포유자돈은 십이지장, 공장, 회장에서 가벼운 반응을 보였고, 4번 포유자돈은 공격접종 후 4일에 폐사하였으며 십이지장, 공장, 회장에서 모두 양성반응을 보이지 않았다.

PEDV 항혈청을 경구투여한 실험 I 군의 소장조직에서 PEDV에 대한 형광항체검사에 양성율은 0%(1/18)인데 반해 대조군에서 십이지장은 2두, 공장은 3두, 회장은 1두로 50.0%(6/12)의 양성율을 보여 실험 I 군에 비하여 훨씬 높게 나타났다.

#### IV. 고 찰

PED는 수양성 설사를 주된 증상으로 하는 급성 바이러스성 전염병으로 모든 일령의 돼지에서 설사를 유발하지만 발병률과 폐사율은 농장이나 발생상황에 따라 다르며 신생자돈에 있어 폐사율이 매우 높아 TGE와 함께 양돈산업에 큰 경제적 손실을 주는 중요한 소화기질병이다.<sup>1,32,33</sup>

TGE와 같이 PED의 경우 국소면역형성이 방어에 중요한데 IgA는 점막상피세포에서 생성하는 secretory components(SC)와 결합되어 분비형 IgA를 만들며 장점막에서 분비되는 sIgA는 두 개의 7S monomers가 J-chain에 의해 연결되어 있으며 위선과 소화효소에 의해 소화되지 않고 소장의 음외부위에서 장점막상피세포를 통해서 장점막표면에 이송되어 바이러스의 흡착, 증식을 억제하며, IgM과 IgG는 장점막고유층의 세포간내역에 존재하면서 상피세포층하단부에서 2차 방어기능을 수행한다.<sup>34,35</sup> 돼지에서는 모체로부터의 항체는 반드시 초유와 상유를 통해서 신생자돈에 이행하는데 초유를 빨리 포유하면 항체가 장관을 통해서 순환계로 이행되며 이행된 항체는 다시 장관점막을 따라 높은 수준으로 농축되어 장점막의 면역반응을 형성하게 된다.<sup>36</sup> 이와 같은 원리를 이용하여 고농도 항혈청을 분만직후 신생자돈에 경구투여하여 고역가의 항체를 이행하게 하여 PEDV의 공격에 대한 예방효과를 보고자 본 실험을 진행하였다.

PED의 혈청학적진단에는 정제된 바이러스 입자를 항원으로 한 ELISA 혹은 blocking ELISA 등이 항체측정에 이용되어 왔지만 항원의 조제가 어려워 보편화시키기 어려웠지만 최근에는 배양세포에서 바이러스 배양이 가능하게 되어 S 단백을 항원으로 한 ELISA, 고정된 바이러스 감염 Vero 세포를 항원으로 한 IFA 등이 개발되어 항체의 검출이 용이하게 되었으며, 트립신에 의존하지 않고 증식할 수 있는 바이러스주가 확립되어 중화시험에 의한 항체측정도 가능하게 되어 발병기와 회복기의 혈청항체를 측정하여 회복기 항체의 유의한 상승을 통하여 감염여부를 판정할 수 있다.<sup>24,37-41</sup> 본 연구에서 분만후 고농도 PEDV항혈청을 투여하지 않고 PEDV를 공격접종한 대조군은 공격전의 혈청중화항체는 모두 <2이었으나 공격접종 후 3일이나 6일에는 32~64로 나타났고 실험종료시까지 지속적으로 32를 유지하였던 것은 PEDV 감염에 의한 항체가 형성된 것이며 PEDV 항혈청을 경구투여한 실험군은 PEDV 공격접종전에는 64~256의 비교적 높은 항체를 보여 PEDV 항혈청의 경구투여에 따른 수동면역의 형성에 기인하는 것으로 PEDV 공격접종에 대해 효과적으로 방어하는 것으로 사료된다.

PEDV를 10두의 3일령 포유자돈에 공격접종 후 12시간, 24시간, 48시간, 60시간, 72시간에 분변과 소장에서 RT-PCR에 의한 바이러스 검출결과 소장에서는 10두, 분변에서는 9두에서 바이러스가 검출되었다.<sup>20</sup> RT-PCR을 이용한 분변과 소장에서 공격접종한 PEDV의 검출결과는 PEDV 항혈청을 경구투여한 실험군의 포유자돈은 26.2%와 16.7% 검출률을 보였으나 PEDV 항혈청을 투여하지 않은 대조군의 포유자돈에서는 48.1%와 75.0%의 높은 검출율을 보였다. 대조군에서 검출률은 Kim 등의 연구결과에 비해 낮았지만 PEDV 항혈청을 경구투여한 실험군에 비해서는 뚜렷이 높아 항혈청투여에 따른 바이러스의 억제로 생각된다.

PED는 TGE와의 감별진단이 필요한바 Debouck 등<sup>42</sup>(1981)은 직접면역형광항체법이 가장 신속하고 특이성이 높은 유용한 진단법이라고 하였다. 설사가 시작된 뒤 6시간이내에는 공장과 회장의 용모상피세포 90~100%에서 형광항체에 대한 강한 양성반응이 나타나고 12~45시간에서는 반응이 급격히 떨어지며 24~45시간에서는 1~10%의 장용모의 상피세포에서만 형광항체 양성반응을 확인할 수 있었으나 재생된 상피세포에 재감염을 일으켰을 시 용모상피세포의 90~100%에서 형광항체 양성반응이 나타난다.<sup>1,43</sup> 본 연구에서 PEDV 항혈청을 투여하지 않고 PEDV를 공격접종한 포유자돈은 형광항체검사를 실시한 결과 50.0%의 양성율을 보였으나 PEDV항혈청을 경구투여한 포유자돈은 0% 양성율을 보여 인위적인 수동면역에 의해 형성된 항체로 인하여 소장에서의 PEDV의 흡착 및 증식이 억제되어 장내 병변형성이 충분히 이루어지지 않았다. 대조군인 포유자돈에서 형광항체에 대한 양성지수를 부위별로 보면 십이지장에서는 0.50, 공장에서는 2.33, 회장에서는 0.25로 나타나 공장에서 가장 뚜렷하였는바 이는 PED 감염시 공장과 회장에서 형광항체반응이 가장 잘 관찰된다는 보고 44,45와 일치하였으며 회장이 십이지장보다 양성지수가 낮았던 것은 1두의 소장용모가 심하게 탈락되어 형광이 나타나지 않은 것으로 추정된다.

본 실험에서 얻어진 혈청중화항체가, 분변과 소장에서 RT-PCR에 의한 바이러스 검출, 형광항체법에 의한 소장에서의 바이러스 검출결과 PEDV 항혈청을 분만직후 경구투여함으로써 고역가의 항체를 얻을 수 있는 유즙대체 수동면역을 형성하여 PEDV의 장벽에 흡착 및 증식이 억제되거나 바이러스가 중화되어 PEDV에 의한 설사를 효과적으로 방어되는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과를 토대로하여 향후 실제 야외 양돈장에서 많은 돼지를 대상으로 PEDV 항혈청을 활용한다면 효과적으로 예방하여 PED에 의한 경제적인 손실을 극소화하리라 사료된다.

#### V. 결 론

PEDV 항혈청을 분만직후 포유자돈에 3회에 걸쳐 경구투여

하여 인위적으로 자돈에 수동면역을 형성시킨 후 PEDV의 공격적증에 대한 방어효과를 관찰하고자 혈청중화항체시험, RT-PCR검사, 형광항체검사를 실시하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PEDV 항혈청을 경구투여하여 높은 혈청중화항체가 형성되었고 실험종료시까지 유지되었다.
2. RT-PCR에 의한 분변과 소장에서 바이러스 검출시에 PEDV 항혈청을 경구투여한 실험군에서는 각각 26.2%와 16.7%로 대조군의 48.1%와 75.0%에 비하여 낮은 검출율을 보였다.
3. 형광항체법에 의한 소장에서 바이러스 검출시에 PEDV 항혈청을 경구투여한 실험군은 0%의 양성율을 보였지만 PEDV 항혈청을 투여하지 않은 실험군은 50.0%의 양성율을 보였다. 이상의 결과를 통하여 포유자돈에 있어서 PEDV 항혈청을 경구투여하였을 시에 유즙대체 수동면역을 형성하여 PED를 효과적으로 방어하였다.

### 참고문헌

1. Debouck P, Pensaert MB. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777. *Am J Vet Res*, **41**: 219-223, 1980.
2. Turgeon DC, Morin M, et al. Coronavirus-like particles associated with diarrhea in baby pigs in Quebec. *Can Vet J*, **21**: 100-101, 1980.
3. Dea S, Vaillancourt J, et al. An outbreak of diarrhea in piglets caused by a coronavirus antigenically distinct from transmissible gastroenteritis virus. *Can Vet J*, **26**: 108-111, 1985.
4. Timoney JF, Gillespie JH, et al. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th ed. Comstock Publishing Associates, Ithaca, U.S.A. pp. 897-898, 1988.
5. Pensaert MB. Porcine epidemic diarrhea. disease of swine 8th ed. Iowa State Univ Press. Ames, Iowa. pp. 179-185, 1999.
6. Chasey D, Cartwright SF. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea. *Res Vet Sci*, **25**: 255-256, 1978.
7. Pensaert MB, Debouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol*, **58**: 243-247, 1978.
8. Takahashi K, Okada K, et al. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Jpn J Vet Sci*, **45**: 829-832, 1983.
9. 권창희, 이종명, et al. 돼지 유행성 설사바이러스의 국내분리주 작성에 관한 연구. *대한수의학회지*, **32**: 16, 1992.
10. 박남용, 조경오, et al. 돼지 유행성 설사 바이러스의 분리동정. *대한수의학회지*. **29**: 360-365, 1993.
11. Egberink HF, Ederveen J, et al. Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhea virus, strain CV777. *Am J Vet Res* **49**: 1320-1324, 1988.
12. Yaling Z, Ederveen K, et al. Porcine epidemic diarrhea virus (CV777) and feline infectious peritonitis virus (FIPV) are antigenically related. *Arch Virol*, **102**: 63-71, 1988.
13. Ducatelle R, Coussement W, et al. J. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. *Vet Pathol*, **19**: 57-66, 1982.
14. Pijpers A, Nieuwstadt AP, et al. Porcine epidemic virus as a cause of persistent diarrhea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet Rec*, **132**: 129-131, 1993.
15. 강영배, 권창희, et al. 돼지유행성설사(porcine epidemic diarrhea): 발생 피해, 병리진단 및 방역대책. *대한수의학회지*, **31**: 38-56, 1994.
16. Pensaert MB, Debouck P, et al. An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent CV777 and several coronaviruses. *Arch Virol*, **68**: 45-52, 1981.
17. Callebaut P, Debouck P, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the corona virus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. *Vet Microbiol*, **7**: 295-306, 1982.
18. Hofmann M, Wyler R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol*, **26**: 2235-2239, 1988.
19. 박남용, 이석운. In situ hybridization에 의한 돼지 유행성 설사증의 국내발생 역추적 진단. *대한수의학회지*, **37**: 809-816, 1997.
20. Kim O, Choi B, et al. Detection of a differentiation of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR. *Vet Rec*, **146**: 637-640, 2000.
21. Bohl EH, Saif LJ. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect Immun*, **11**: 23-32, 1975.
22. Roth JA. The immune system. disease of swine 8th ed. Iowa State Univ Press. Ames, Iowa. pp. 799-820, 1999.
23. Hiroshi NA, Paul K NA, et al. Breast milk IgA binds to jejunal epithelium in suckling rats. *J Immun*, **120**: 1333-1339, 1978.
24. 津田知幸. 豚流行性下痢. 豚病学, 第四版, 近代出版, pp. 260-266, 1999.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Isao SH, Masaaki ON, et al. Passive protection against porcine epidemic diarrhea(PED) virus in piglets by colostrum from immunized cows. *J Vet Med Sci*, **63**: 655-658, 2001.
29. 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.
30. Kusanagi K, Kuwahara H, Katoh T, Nunoya T, Ishikawa Y, Samjima T and Tajima M. 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.
31. 류영수, 박최규, 장정호. 가축 질병 진단. 초판. 이공월드, 서울. pp. 87-90, 1997.
  32. Wood EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea. *Vet Rec*, **100**: 243-244, 1977.
  33. 岩下幸二, 渡?學. 國內における豚流行性下痢の發生. *臨床獸醫*, **13**: 24-25, 1995.
  34. Walker WA. Host defense mechanisms in the gastrointestinal tract. *Pediatrics*, **57**: 901-916, 1976.
  35. Halliwell RE, Gorman NT. *Veterinary clinical immunology*. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. USA, pp.164-192, 1989.
  36. 윤용덕. 장관점막면역에 대한 지견. *대한수의사회지*, **20**: 450-457, 1984.
  37. Prager D, Witte KH. Die serologische Diagnose der Epizootischen virusdiarrhoe(EVD) des Schweines mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik(IFIT). II. Antikörperantwort nach experimenteller Infektion. *Tierarztl Umschau*, **36**: 477-480, 1981.
  38. Callebaut P, Debouck P et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. *Vet Microbiol*, **7**: 295-306, 1982.
  39. Hormann M, Wylter R. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera. *Vet Microbiol*, **21**: 263-273, 1990.
  40. Carvajal A, Lanza I, et al. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J Vet Diagn Invest*, **7**: 60-64, 1995.
  41. 박봉균, 한경수, et al. 돼지 유행성 설사병(porcine epidemic diarrhea)의 상재화에 대한 혈청학적 증명. *대한수의학회지*, **38**: 818-822, 1998.
  42. Debouck P, Calleaut P, et al. The diagnosis of coronavirus-like agent(CVLA) diarrhea in suckling pigs. *Curr Top Ver Med Anim Sci*, **13**: 59-61, 1981.
  43. Coussement W, Ducatelle R, et al. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet Pathol*, **19**: 46-56, 1992.
  44. Blood DC, Radostits OM. *Veterinary medicine*. 7th ed. Baillere Tindall, London, England, pp. 858-863, 1989.
  45. 황의경, 김재훈, et al. 돼지 유행성 설사증의 최근 발생 동향. *농업 논문집*, **36**: 587-596, 1994.