

발간등록번호

11-1541000-000864-01

보안과제(), 일반과제(0)

과제번호 109003-2

SoltoB를 이용한 송아지 호흡기 및 소화기질병 예방효과 규명

(Efficacy of SoltoB against respiratory and
intestinal disease in calves)

(주)서봉바이오베스텍

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “SoltoB를 이용한 송아지 호흡기 및 소화기 질병예방효과 규명” 과제의 보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제: SoltoB의 세균의 흡착력 및 면역증강 효과 규명

제1협동연구과제: 송아지의 세균성 설사 및 세균성 호흡기증에 대한 SoltoB의 방어효과 규명

제2협동연구과제: 송아지의 바이러스성 설사 및 바이러스성 호흡기증에 대한 SoltoB의 방어효과 규명

2011 년 5 월 11 일

주관연구기관명 : 서봉바이오베스텍

주관연구책임자 : 정 연 권

연 구 원 : 이 창 기

제1협동연구기관명 : 서 울 대 학 교

제1협동연구책임자 : 유 한 상

연 구 원 : 정 명 환

제2협동연구기관명 : 전 남 대 학 교

제2협동연구책임자 : 이 봉 주

연 구 원 : 정 복 기

요 약 문

I. 제 목

SoltoB를 이용한 송아지 호흡기 및 소화기 질병 예방 효과 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

• 국내 송아지 폐사의 가장 중요한 원인은 바이러스나 세균에 의한 폐렴과 설사이다. 이러한 질병은 송아지의 면역기능이 감소하여 발생하게 되는데, 면역증강 기능이 있는 SoltoB를 사료에 첨가하여 급여함으로써 송아지 설사와 호흡기 질병에 대한 저항력을 증강시킬 수 있을 것으로 판단된다. 하지만 송아지 설사와 호흡기 질병예방을 위한 SoltoB의 적용에 관한 연구는 전무한 실정이다. 이에 SoltoB 급여를 통한 송아지 면역증강 효과를 확인하고 이를 통한 바이러스성, 세균성 폐렴과 설사에 대한 질병예방 효과를 확인하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 1차 년도

가. SoltoB의 면역기능증강 효과를 규명

(1) 마우스 비장 세포배양법으로 면역 유도 활성평가

나. 송아지에서 세균성 및 바이러스성 설사에 대한 SoltoB의 방어효과를 확인

(1) 국내 송아지 세균성 설사 원인체 분석 및 인공감염을 위한 균주 선발

(가) 국내 송아지 세균성 설사 원인체 분석

(나) 송아지 인공감염을 위한 균주 선발

(2) 송아지 바이러스성 설사 원인체 검출 기법 확립

(3) 송아지에 세균성 및 바이러스성 설사 원인체 동시 인공감염 후, 임상 증상 및 분변 내 인공감염 원인체 분리정도 평가

(가) 세균성 (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*) 및 바이러스성 (Bovine rota virus, Bovine corona virus) 설사 원인체 동시 인공감염 실시

(나) 임상 증상 및 원인체 검출

2. 2차 년도

가. SoltoB의 설사유발 세균에 대한 SoltoB의 흡착효과를 확인

(1) 송아지 설사 유발 세균성 병원체에 대한 SoltoB의 흡착력과 성장 억제력 평가

나. 송아지에서 세균성 및 바이러스성 호흡기 질병에 대한 SoltoB의 방어효과

(1) 송아지에 세균성 및 바이러스성 호흡기 질병 원인체 동시 인공감염 후, 임상 증상 및 분변 내 인공감염 원인체 분리정도 평가

(가) 세균성 (*Mannheimia haemolytica* serotype A1, *Pasteurella multocida* type A) 및 바이러스성 (Bovine herpesvirus 1) 설사 원인체 동시 인공감염 실시

(나) 임상 증상 및 원인체 검출

IV. 연구개발결과

1. 1차 년도

가. SoltoB의 면역기능증강 효과를 규명

(1) Splenocyte에 SoltoB를 처리한 시, TNF- α 의 유도 확인

나. 송아지에서 세균성 및 바이러스성 설사에 대한 SoltoB의 방어효과를 확인

(1) 설사 원인체에 의한 폐사율의 감소

(2) 설사 임상증상의 완화

(3) 세균성 (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*) 및 바이러스

스성 (Bovine rota virus, Bovine corona virus) 설사 원인체
에 대한 청소율 증가

- (3) 부검 소견 완화
- (4) 조직학적 소견 완화

2. 2차 년도

가. SoltoB의 설사유발 세균에 대한 SoltoB의 흡착효과를 확인

- (1) 균 성장억제력 시험에서는 *S. derby*, *S. Typhimurium* 09-2b
와 *E. coli*에서 SoltoB처리에 의해서 대조군에 비해 균성장이 억
제되는 것을 확인

나. 송아지에서 세균성 및 바이러스성 호흡기 질병에 대한 SoltoB의 방어효과

- (1) 세균성 (*Mannheimia haemolytica* serotype A1, *Pasteurella
multocida* type A) 및 바이러스성 (Bovine herpesvirus 1) 호
흡기 질병 원인체에 대한 청소율 증가
- (2) 호흡기 임상증상의 완화
- (3) 부검 소견 완화
- (4) 조직학적 소견 완화

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구를 통해 SoltoB의 면역강화기능에 의하여 송아지의 소화기 질병과
호흡기 질병에 대한 효과가 입증되면 송아지 설사와 호흡기 전용사료 첨가제
로 제품화하여 판매할 계획임.
- SoltoB는 이미 세계 여러 나라에 수출되고 있지만 송아지의 호흡기와 소
화기질병에 효과를 입증하게 된다면 더 많은 국가에 더 많은 양을 수출하여
국가경제에 공헌할 것임.
- SoltoB에 의해 송아지의 호흡기와 소화기질병을 예방할 수 있게 되어 이
에 따른 인력 및 경비 절감으로 축산농가에 막대한 생산성 향상을 추구할 수
있음.

SUMMARY

I. Title

Efficacy of SoltoB against respiratory and intestinal disease in calves

II. Objectives and Requirements of Research and Development

- Bovine respiratory and diarrhea diseases, caused by bacteria and virus, are major economic problems in the cattle industry in Korea. These disease occur mainly relevance to immunosuppression. SoltoB, known as immune stimulator, could be used as feed supplement for controlling these disease. However, SoltoB has not been studied for its prophylactic effect against bovine respiratory and diarrhea diseases when it is used as a feed supplement. In this study, the first analysis of the prophylactic effects of SoltoB against bovine respiratory and diarrhea diseases in experimentally infected calves were conducted.

III. Reserch coverage and scopes

1. The first year

A. Immunostimulating effects of SoltoB

(1) Analysis of immunostimulating effects of SoltoB through mouse splenocyte primary culture

B. Prophylactic effects of SoltoB against bacterial/viral diarrhea pathogens in calves

- (1) The pathogen analysis of bacterial diarrhea of calves in Korea and Selection of challenging bacterial pathogens for experimentally infecting calves and establishment of infection model of calves
 - (A) The pathogen analysis of bacterial diarrhea of calves in Korea
 - (B) Selection of challenging bacterial pathogens for experimentally infecting calves
- (2) Establishment of detecting method of viral diarrhea pathogens in calves
- (3) Following co-infection of bacterial/viral pathogens, monitoring of clinical signs and quantification of challenging bacterial/viral pathogens in calves
 - (A) Co-infection of bacterial (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*) and viral (Bovine rota virus, Bovine corona virus) pathogens
 - (B) Monitoring of clinical signs and the quantification of shedding diarrhea pathogens in experimental co-infected calves

2. The second year

A. Absorption efficacy of SoltoB against bacterial diarrhea pathogens

- (1) Analysis of efficacy of SoltoB as bacterial diarrhea pathogens absorbent and growth inhibitor

B. Prophylactic effects of SoltoB against bacterial/viral respiratory pathogens in calves

(1) Following co-infection of bacterial/viral pathogens, monitoring of clinical signs and quantification of challenging bacterial/viral pathogens in calves

(A) Co-infection of bacterial (*Mannheimia haemolytica* serotype A1, *Pasteurella multocida* type A) and viral (Bovine herpesvirus 1) pathogens

(B) Monitoring of clinical signs and the quantification of shedding respiratory pathogens in experimental co-infected calves

IV. Results of Research and Development

1. The first year

A. Immunostimulating effects of SoltoB

(1) TNF- α expression in mouse splenocytes following stimulation of SoltoB significantly increased compared with the non-treatment group.

B. Prophylactic effects of SoltoB against bacterial/viral diarrhea pathogens in calves

(1) SoltoB decreases mortality in calves experimentally co-infected with diarrhea pathogens

(2) SoltoB alleviates diarrhea symptom in calves experimentally co-infected with diarrhea pathogens

(3) SoltoB enhances the clearance against bacterial (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*) and viral (Bovine rota virus, Bovine corona virus) pathogens in calves experimentally

co-infected with diarrhea pathogens

2. The second year

A. Absorption efficacy of SoltoB against viral and bacterial diarrhea pathogens

- (1) SoltoB inhibits growth of *S. derby*, *S. Typhimurium* 09-2b and *E. coli*

B. Prophylactic effects of SoltoB against bacterial/viral respiratory pathogens in calves

- (1) Solto B alleviates respiratory symptom in calves experimentally co-infected with respiratory pathogens
- (2) SoltoB enhances the clearance against (*Mannheimia haemolytica* serotype A1, *Pasteurella multocida* type A) and viral (Bovine herpesvirus 1) pathogens in calves experimentally co-infected with respiratory pathogens
- (3) Mild gross lesions was evident in the SoltoB-fed group compared with the control group
- (4) Mild histopathological lesions was evident in the SoltoB-fed group compared with the control group

V. Research Performance and Plan of Research Performance use

- Commercializaion and sale of SoltoB as feed supplement for controlling calf diarrhea and respiratory diseases caused by bacteria and virus
- An increase of SoltoB exportation and contribution to the national economy
- An increase of productivity in livestock farm through reduction of

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	14
Section 1. The necessity of Research Project	14
Chapter 2. Result of Research Project	18
Section 1. Result of Research Project at the First Year	18
Section 1. Result of Research Project at the Second Year	55
Chapter 3. Goal Achievement and Contribution in This Field	79
Section 1. Goal achievement	79
Section 2. Contribution in this field	80
Chapter 4. Research Performance and Plan of Research Performance use	81
Section 1. Development and industrialization	81
Section 2. Use plan on further study	81
Chapter 5. References	82

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	14
제 1 절	연구의 필요성	14
제 2 장	연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1 절	1차년도 연구개발 수행 내용 및 결과	18
제 2 절	2차년도 연구개발 수행 내용 및 결과	55
제 3 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	79
제 1 절	연구개발목표 달성도	79
제 2 절	관련분야에의 기여도	80
제 4 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	81
제 1 절	산업화 계획	81
제 2 절	추가연구, 타연구에 활용 계획	81
제 5 장	참고문헌	82

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 필요성

최근 축산업은 국민소득 증가와 식생활의 서구화로 비약적인 성장을 하여 우리 농업에 매우 중요한 부문으로 자리 잡고 있음. 하지만 최근 가축 전염병이 빈번히 발생하여 큰 문제가 되고 있으며, 국제 교역이 점차 증대되고 밀집사육이 보편화됨에 따라 우리나라에도 가축질병의 발생빈도가 점차 늘어나는 추세임. 가축질병으로 인한 경제적 손실을 축산물 생산액의 약 20%라고 가정할 경우 그 액수는 2조 원에 육박할 정도이므로 가축질병이 경제에 미치는 양상은 매우 큼.

소 산업은 그동안 비약적인 발전을 하였으며, 사양 방식도 예전의 영세성에서 현재 대단위 집단 사육화 되고 있음. 하지만 대단위 집약사육에서 문제점은 악성 전염병이 발생하면 농장 전체에 걸쳐 만연화 되어 막대한 경제적 피해가 발생한다는 것임. 따라서 개방화 시대에서 우리 축산업이 살아남기 위해서는 소의 전염성 질병을 근절시킴으로써 생산능력을 향상시켜야 함.

송아지의 주요 질병에 관한 국립수의과학검역원 조사 자료에 의하면 송아지 사육에 있어 가장 치명적인 질병은 설사병과 호흡기병으로 송아지에서 발병하는 질병의 대부분을 차지함 (Figure 1).

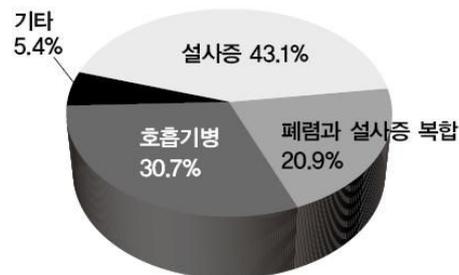


Figure 1. Major diseases of calves

소의 경우에 2005년 기준 한육우 및 젖소 총생산액은 각각 3조 1,479억원과 1조 5,831억원이었으며, 설사를 유발한 신생송아지의 15-30%가 폐사하였음. 폐사로 인한 직접적인 손실액은 2,760억원으로 추정되고 있음(Table1).

Table 1. Economic loss by death of calves with diarrhea

구분	피해액	산출근거
바이러스성 설사	1,680억	100만두×70%발생×12%폐사×200만원=1,680억
세균성 설사	1,080억	100만두×30%발생×18%폐사×200만원=1,080억
합계	2,760억	

(가축질병의 경제적 영향 분석, 2006년, 한국농촌경제연구원)

국내에서 송아지 설사가 크게 문제되고 있어서 막대한 경제적 피해를 유발하고 있다고 보고 되었음. 설사병은 송아지의 체액상실로 인한 치명적인 질병이며 폐사의 주원인이 되며 회복되어도 성장장애 등을 일으켜 경제적 손실이 큰 질병임. 국내 송아지 사육농가 대부분에서 송아지 장염이 발생하고 있으며, 더욱이 송아지 폐사의 70%가 세균성과 바이러스성 장염에 의한다고 함. 이러한 송아지 장염의 주요 원인체로 세균성으로는 대장균증 및 살모넬라증 그리고 바이러스성으로는 소 코로나바이러스와 로타바이러스 등이 알려져 있음. 어린 송아지는 체온조절 능력이 아직 완전하게 발달하지 않았기 때문에 외부 온도에 대한 방어기전이 미흡하여 소화기전이 위축되어 설사증을 쉽게 유발 함. 송아지때 설사가 발생하면 면역에 관계되는 흉선(Thymus)이 위축되고 싸이토카인(Cytokine)의 방출이 증가되어 체력이 약화되고 면역력이 떨어져 호흡기 발병율이 높아지고, 성장율도 현저하게 저하됨.

신생송아지에 있어서 대장균과 로타 및 코로나 바이러스 설사병이 주로 문제가 됨. 로타바이러스와 코로나바이러스는 소장의 용모 위축을 통한 소화불량 및 흡수부전으로 설사가 발생됨. 대장균, 살모넬라 설사증은 이들 균주에서 생산되는 내독소에 의해서 전해질이 과다 분비하게 되어 설사가

발생됨. 송아지 설사의 원인체 중 단독감염과 복합 감염 시의 폐사율을 보면, 로타바이러스와 코로나 바이러스 함께 대장균이 감염되면 90%이상 폐사를 보임 (Table2)

Table 2. Single or complex infection of calves diarrhea pathogens

단독감염		복합감염(2개)		복합감염(3개)	
	폐사율(%)		폐사율(%)		폐사율(%)
로타바이러스	5	로 타 + 대장균	55	로타+코로나+ 대장균	90
코로나바이러스	30	로 타 + 코로나	35	로타+코로나 +IBR	85
대장균	50	코 로 나 + 대 장 균	80		

(미국수의사회지 Vol. 173 No. 5)

신생송아지에 있어서 호흡기 질병은 세균성인 *Pasreurella multocida*와 *Mannheimia haemolytica*와 소의 허피스바이러스에 의한 전염성 비기관염(IBR)이 가장 중요한 원인체임. 송아지에서 폐렴이 발생하는 이유는 여러 복합적인 원인에 의해 면역력이 감소하게 되면 호흡기내에 정상적으로 서식하고 있던 파스튜렐라와 같은 세균이 급격하게 증식하면서 폐렴이 발생하게됨.이렇게 증식된 세균에 의해서 기관지 점막이 파괴되고 면역력이 감소하게되면 호흡기 바이러스 (IBR 바이러스)가 점막에 부착하여 증식하면서 심각한 폐렴증상이 발생하게됨.

상술한 바와 같이 송아지의 설사증과 호흡기 질병은 국내에서 아주 중요한 질병이며, 향후 뚜렷한 대책이 없는 한 더욱 기승을 부릴 것으로 예상 됨. 특히 어린 연령에서 다발하고 있는 설사증과 호흡기 질병은 1)증체율과 면역기능을 저하시켜, 2)결국 이유 후에도 충분한 면역기능이 형성되지 않아, 3)지속적으로 전염성 질환에 감염되는 악순환을 유발케 됨.

문제는 이러한 바이러스성 설사증과 호흡기증의 경우 발생하면 특별한 치료제가 없어 수액공급과 항생제투여가 일반적인 치료법임. 설사 치료제로 대부분 사용되는 항생제는 세균에는 효과를 발휘하지만, 바이러스에는 효과를 나타내지 못함. 뿐만 아니라, 근래에 들어 사료첨가제로 항생제의 사용이 그 부작용에 의해 꺼려지고 있어, 현실적으로 항생제의 사료 첨가제로서의 사용 또한 한계가 있음. 치료 목적으로서의 항생제의 사용 또한 내성균의 발생이나 3일 이상의 장기간 사용 시 신(腎)부전과 같은 부작용을 불러 올 수 있음. 바이러스성 설사와 호흡기질병 발생 시 원인적 치료법이 없이 대증치료법에 의존하여 결국 폐사가 일어나고 있음. 바이러스 질병치료법은 동물이 스스로 바이러스와 싸워 이길 수 있도록 면역력을 향진 시켜주는 것이 최선의 방법임. 그러한 측면에서 면역증강효과가 있는 SoltoB는 아주 효과적인 송아지 설사 치료제로 사용할 수 있도록 연구가 필요함.

가축에서 소화기계 질병을 야기는 원인체의 주요 감염 경로는 경구 감염으로 사료나 음수를 통한 감염이 됨. 이러한 이유로 오래전부터 점토 광물(clay mineral)을 사료 첨가제로 혼합하여 병원균을 흡착시켜 배출시킴으로써 감염을 억제하기 위한 시도들이 행해지고 있음. 따라서 SoltoB는 주로 면역증강효과가 있지만 부수적으로 병원균의 흡착효과를 확인할 필요가 있음.

최근 전 세계적으로 가축의 성장 촉진(GPAs : Growth-promoting antibiotics)용 항생제 사용을 금지하는 규제가 강화되면서 그 대안으로 천연물질을 이용한 면역증강효과를 규명하는 다양한 연구가 진행되고 있음. 면역증강 기능이 있는 SoltoB를 사료에 첨가하여 급여함으로써 동물 체내에서 여러 면역세포들의 면역기능이 강화된다면 송아지 설사와 호흡기 질병에 대한 저항력을 증강시킬 수 있을 것임. 하지만 SoltoB를 급여하여 송아지 설사와 호흡기 질병에 대한 연구는 전무한 실정임. 따라서 본 연구에서는 SoltoB를 사료첨가제로 사용하여 송아지 설사와 호흡기 질병 예방효과를 입증하고자 함.

제 2 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 1차년도 연구개발수행 내용 및 결과

가. SoltoB의 면역증강 효과 규명

(1). 마우스 splenocyte에서 SoltoB에 의한 cytokine 생성

면역 세포에서 SoltoB에 의한 cytokine 생성을 측정하여 SoltoB의 면역세포 자극 효과를 규명하기 위해 5주령의 마우스의 비장을 적출한 후, homogenizer로 분쇄하고 RBC lysis buffer를 처리하여 적혈구를 제거하였다. L-glutamine이 포함된 RPMI 1640배지 (10% FBS, penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 g/ml))에 비장에서 유리된 splenocyte를 부유한 후 cell수를 1×10^5 cell/ml로 희석하고, 6 well plate의 각 well에 2ml씩 분주하였다. 위에 준비된 splenocyte에 SoltoB (0.1mg/ml)을 첨가하고, positive control 군으로 *E. coli* LPS (0.1mg/ml)를 처리하였다. 12시간 별로 각 그룹 당 3 well씩 세포배양액을 수거하고 4° C, 13000 rpm에서 10분간 원심 분리하여, 수거된 세포배양 상층액을 이용, mouse IL-1 β , IL-6, TNF- α (eBioscience)에 대한 ELISA를 각각 수행하였다. Figure 2에서 처럼 SoltoB는 면역 세포를 자극하여 TNF- α 는 유도되었으나, IL-1 β 와 IL-6 는 유도 되지 않았다. 이를 통해 SoltoB가 면역세포에 직접적으로 노출되었을 경우 면역세포를 활성화하여 염증반응을 유도하고 세포성 면역을 유도하는 TNF- α 를 분비를 촉진 시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 2).

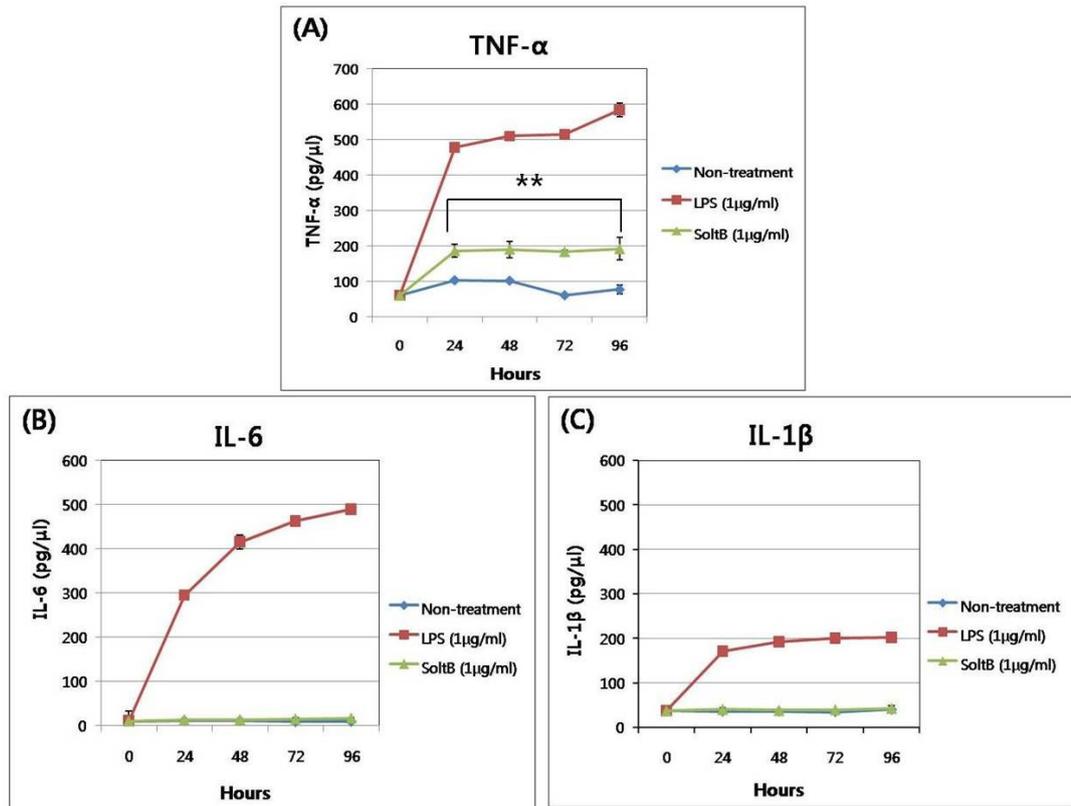


Figure 2. Cytokine expression in mouse splenocytes following stimulation of SoltoB. TNF- α expression significantly increased compared with the non-treatment group from 24 hr (**p < 0.01, non-treatment group vs. SoltoB stimulation). There are no differences in expressions of IL-6 and IL-1b between non-treatment and SoltoB groups.

(2). SoltoB 급여 후 마우스 splenocyte에서 cytokine 생성

3주령의 마우스를 두 개의 실험군으로 나누어 8주간 대조군은 일반 마우스용 사료를 제공하고, SoltoB 섭취군은 사료 내 0.5% (w/w) SoltoB를 첨가하여 자유 급식의 형태로 제공하였다. 이후 각 마우스의 비장을 채취하여 마우스 splenocyte 배양하였다. 마우스 splenocyte의 배양 방법은 상기에 언급된 바와 같은 방법으로 실시하였다. 배양된 splenocyte에 각각 저농도의 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여, 일정 시간 간격으로 세포 배양 상층액을 수거해 IL-6 (점막면역 관련 cytokine)의 생성 정도를 확인하였다. LPS 처리시 control 군에서는 IL-6의 생성이 ELISA에 의해 관찰되지 않았으나 SoltoB 첨가군의 마우스 비장세포에서는 IL-6의 생성이 확인되었다. (Figure 3) 이를 통해 SoltoB의 경구투여를 통해 면역계를 일부 자극할 수 있음을 확인할 수 있었다.

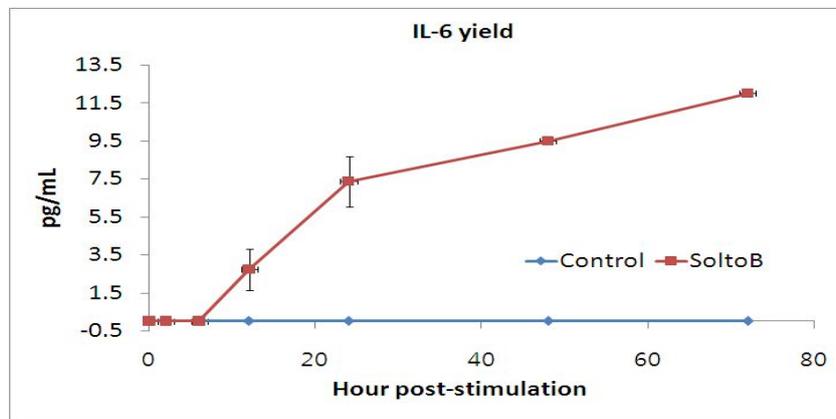


Figure 3. IL-6 expression in splenocytes of SoltoB primed mouse by oral rout. splenocytes. The high expression level of IL-6 is observed in the SoltoB primed mouse group, compared with the control group.

나. 송아지 세균성 및 바이러스성 설사에 대한 SoltoB의 방어효과

(1) 국내 송아지 세균성 설사 원인체 분석 및 인공감염을 위한 균주 선발

(가) 국내 송아지 유래 대장균의 성상 및 주요 병원성 인자 분석

1) 야외 송아지 가검물로부터 대장균 분리 동정 및 항생제 감수성 검사

㉠ 대장균 분리 동정 현황

야외 송아지 설사 가검물로부터 MacConkey 및 EMB 배지에서 특이적인 집락 형성 등 배양 성상, IMViC 및 VITEK 등을 통하여 대장균 총 118개주를 분리 동정하였으며, 분리 균주 중 26개주에서 용혈성이 확인하였다.

㉡ 항생제 감수성 검사

용혈성이 파악된 균주를 위주로 하여 총 22개의 균주를 대상으로 일반적으로 많이 상용화 되어 있는 항생제에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 항생제에 대한 감수성 판정은 감수성 반응이 Intermediate 이상일 경우 실험한 항생제에 대한 감수성이 있다고 판정하였다. 항생제 감수성 검사에서 사용한 항생제 디스크 종류와 농도, 각 항생제에 대한 저항성을 나타낸 균주의 수를 조사하였다 (Table 3, Table 4). 국내 설사 송아지 분변에서 분리된 대장균의 경우 Penicillin에 대한 저항성이 높았으며 Amikacin(광범위 항생제)이나 Norfloxacin에 대한 저항성은 높지 않은 것을 확인할 수 있었다.

㉢ 야외 송아지 설사 가검물로부터 바이러스성 원인체 검색

송아지 설사 가검물에 대하여 바이러스성 원인체의 혼합감염여부를 조사하기 위하여 추가적으로 바이러스성 설사 유발 원인체인 Coronavirus를 PCR을 통해 검색을 실시하였다 (Table 5). Positive control로 시중에 판매되는 live vaccine주를 이용하였으며 가검 샘플은 분변을 PBS에 충분히 부유한 뒤 원심으로 분변의 이물질을 제거한 상층액을 이용하였다. 대장균을 분리한 송아지에서는 모두

coronavirus 음성의 결과가 나와 송아지 설사 분변에 Coronavirus 혼합 감염되어 있지는 않은 것을 확인하였다 (Figure 4).

Table 3. Kinds of antibiotic disc and its concentration.

Ampicillin (10 μ g)	Nalidixic acid (30 μ g)
Amikacin (30 μ g)	Norfloxacin (10 μ g)
Colistin (10 μ g)	Penicillin (10 IU/IE/UI)
Erythromycin (15 μ g)	Chloramphenicol (30 μ g)
Gentamycin (10 μ g)	Sulfamethoxazole/Trimethoprim (23.75 μ g / 1.25 μ g)
Kanamycin (30 μ g)	Bacitracin (10 IU/IE/UI)
Neomycin (30 μ g)	Tetracyclin (30 μ g)

Table 4. The number of antibiotic resistant *E.coli*.

Antibiotics	Quantity	Antibiotics	Quantity
Ampicillin	17	Nalidixic acid	15
Amikacin	3	Norfloxacin	9
Colistin	12	Penicillin	19
Erythromycin	18	Chloramphenicol	10
Gentamycin	13	Sulfamethoxazole /Trimethoprim	14
Kanamycin	15	Bacitracin	17
Neomycin	11	Tetracyclin	17

Table 5. Corona virus detection condition

Primer	Sequence	Product size
Primer fwd	5'-GCAATCCAGTAGTAGAGCGT-3'	730bp
Primer rev	5'-CTTAGTGGCATCCTTGCCAA-3'	

Synthesis of cDNA					
RNA sample	10 μ l	70 $^{\circ}$ C 5min	5X RT buffer	4 μ l	37 $^{\circ}$ C 5min
			0.1M DTT	2 μ l	
100pmole R-primer	2 μ l	4 $^{\circ}$ C 10min	10mM dNTPs	2 μ l	42 $^{\circ}$ C 60min
			20unit RNase Inhibitor	0.5 μ l	70 $^{\circ}$ C 10min
DW	4 μ l	4 $^{\circ}$ C 10min	200unit M-MLV	1 μ l	4 $^{\circ}$ C 5min
			DEPC	10.5 μ l	

PCR condition			
Sample	5 μ l	94 $^{\circ}$ C 5min	
10X PCR buffer	5 μ l	94 $^{\circ}$ C 1min	35 cycles
10mM dNTPs	2 μ l	58 $^{\circ}$ C 1min	
100mM F-primer	1 μ l	72 $^{\circ}$ C 2min	
100mM R-primer	1 μ l		
5unit/ μ l Tag	0.5 μ l	72 $^{\circ}$ C 7min	
DW	35.5 μ l		
Total vol.	50 μ l	4 $^{\circ}$ C ∞	

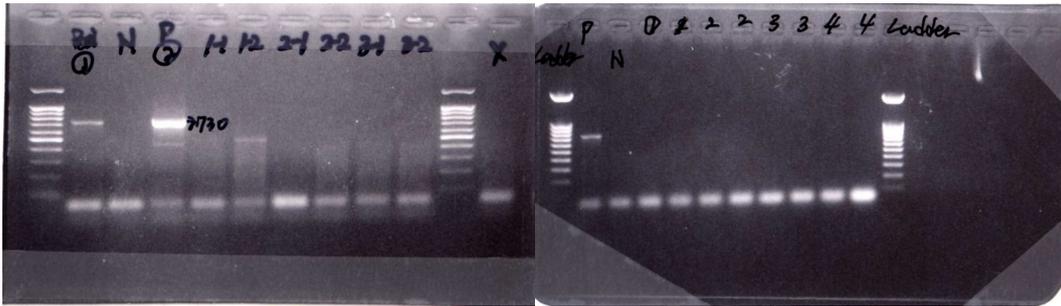


Figure 4. PCR results of corona virus detection (P: positive control; N: negative control)

㉔ 야외 분리 대장균에서 병원성 인자 검색

송아지의 설사를 유발할 수 있는 대장균에서의 병원성인자 분포를 분석하기 위하여 기 발표된 논문 등 자료를 바탕으로 병원성 대장균중 하나인 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)에서 fimbrial adhesin과 enterotoxin 의 분포를 조사하였다.

- Fimbrial adhesins : ETEC의 병원성 인자로 ETEC가 소장의 상피세포내의 미세융모에 부착하고 점막 상피에서 증식을 하는데 중요한 역할을 하며 알려진 것으로 F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18, F41 가 있음.
- Enterotoxin : ETEC의 또 다른 병원성 인자로 일반적으로 heat-stable(STa, STb)와 heat-labile(LT)로 나뉘며 shiga toxinogenic *E. coli* (STEC)의 STX2e, enteroaggregative *E. coli* (EAEC)의 enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1)도 병원성 인자로 알려져 있음.
- 송아지 분리 대장균에서 밝혀진 병원성 인자 및 진단법
 - 여러 대장균의 병원성 인자 중 현재까지 송아지에서 문제시 되며, 송아지 분리 대장균에서 밝혀진 병원성 인자로는 Table 6 과 같음.

- 현재 가장 널리 사용되는 병원성 인자 확인 방법은 각 병원성 인자를 발현하는 유전자를 PCR을 통해 확인하는 것이며, 각 병원성 인자의 유전자를 확인하는데 가장적합한 PCR 조건은 Table6와 같음.

Table 6. PCR detection condition of virulence factor of *E.coli*.

Target genes	Oligonucleotide sequences (5`-3`)	Product size
F5	TTGGGCAGGCTGCTATTAGT TAGCACCACCAGACCCATTT	222 bp
F41	GGAGCGGGTCATATTGGTAA CTGCAGAAACACCAGATCCA	941 bp
STa	GAAACAACATGACGGGAGGT GCACAGGCAGGATTACAACA	229 bp

PCR condition of F5 and F41			
Sample	2 μ l	94 $^{\circ}$ C 10min	
10X PCR buffer	5 μ l	95 $^{\circ}$ C	35 cycles
10mM dNTPs	1 μ l	30sec	
20pmole F-primer	1 μ l	61 $^{\circ}$ C	
20pmole R-primer	1 μ l	30sec	
5unit/ μ l Tag	1 μ l	72 $^{\circ}$ C	
DW	39 μ l	30sec	
Total vol.	50 μ l	72 $^{\circ}$ C 10min	
		4 $^{\circ}$ C ∞	

PCR condition of Enterotoxin (Sta)			
Sample	2 μ l	94 $^{\circ}$ C 10min	
10X PCR buffer	5 μ l	95 $^{\circ}$ C	35 cycles
10mM dNTPs	1 μ l	30sec	
20pmole F-primer	1 μ l	57 $^{\circ}$ C	
20pmole R-primer	1 μ l	30sec	
5unit/ μ l Tag	1 μ l	72 $^{\circ}$ C	
DW	39 μ l	30sec	
Total vol.	50 μ l	72 $^{\circ}$ C 10min	
		4 $^{\circ}$ C ∞	

(2) 송아지 바이러스성 설사 원인체 검출 기법 확립

(가) Bovine rotavirus

1) 접종실험하기 위한 소 로타바이러스 배양액 확보

㉠ Bovine rotavirus

: Reoviridae에 속하며, 심각한 설사를 동반하는 송아지 급성 장염의 주요 원인체이다. 외피를 갖지 않는 분절형 RNA virus로 주요 항원으로 캡시드 외 단백질인 VP4와 VP7, 캡시드 내 단백질인 VP6 등이 있다. 본 연구에서는 야외 분리주 (NCDV)를 사용하였다.

㉡로타바이러스 배양은 TF-104 (African green monkey kidney cell)에 trypsin을 처리한 후 배양하여 사용함.

- TF-104 cell을 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum) 와 1% (v/v) antibiotics 가 첨가 되어있는 alpha-MEM배지를 이용하여 monolayer 로 배양하였음.
- Bovine Rotavirus (BRV)는 10ul/ml 농도의 trypsin으로 세포에 접종 전에 30분간 감작시킨다.
- Trypsin에 미리 감작된 BRV를 0.1 MOI로 Monolayer confluent로 성장한 TF-104에 접종한다.
- 1시간동안 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하며 10분 간격으로 rocking을 실시한다.
- 1ul/ml 농도의 trypsin과 1% (v/v) antibiotics가 함유된 alpha-MEM 배지를 첨가하고 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하여 virus를 증식시킨다.

㉢ 바이러스 농도를 1×10^8 PFU/ml 이상 되도록 배양하여 총 2L의 배양액 확보

2) Plaque assay 법 확립

㉣ 송아지에 rotavirus를 인공 감염시킨 후 분비되는 바이러스수를

조사하기 위하여 plaque assay 법을 확립하였음

- TF-104를 24 well tissue culture plate에 배양한다.
- Alpha-MEM 배지로 각 well을 washing 한 후, 1ul/ml 농도의 trypsin과 1% (v/v) antibiotics가 함유된 alpha-MEM배지를 이용해 10-fold serial dilution한 BRV를 0.1ml씩을 각 well에 접종한다.
- 1시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하며, 10분 간격으로 rocking 해준다.
- Virus 접종액을 제거하고, 1ug/ml trypsin과 0.003% Netral red 가 함유된 alpha-MEM배지에 0.8% (v/w) Sea-plaque agar를 첨가한 용액을 virus를 흡착시킨 세포위에 올려놓고 7°C, 5% CO₂에서 3~4일간 배양한다.
- 3~4일 후, 투명하게 나타난 BRV plaque의 수를 개수하고 단위를 pfu (plaque form unit)/ml로 나타낸다.

㉞ plaque assay법의 적용실험을 위해서 송아지 분변에 로타바이러스를 혼합한 후 항생제 함유배지에 희석하고 원심 분리하여 상층액을 plaque assay에 사용하여 분변으로 분비되는 바이러스양을 측정하였음.

3) Real-time PCR법 확립

㉞ 분변에서 분비되는 바이러스 농도측정을 위해서 Real-time PCR법을 확립

· Plasmid DNA standard 구성

- BRV로부터 viral RNA 추출이후, 아래 primer set으로 PCR 증폭을 실시하였다.

Rotavirus fwd:

5'-TTTAAAACGAAGTCTTCRACATGGAKGTYCTGTA-3'

Rotavirus rev:

5'-TAATTGGTAGATTACCAATTCCTCCAGTTTG-3'

Amplicon length: 189bps

- 증폭된 PCR product를 pGEM-T easy vector에 TA cloning을 실시하여 삽입하였다.
- 재구성된 plasmid를 10^6-10^0 copies으로 10-fold dilution하여 real-time PCR의 standard로 사용하였다.

· Real-time PCR amplification

- 분변 시료에서 분리해낸 viral RNA를 이용하여 Real-time PCR을 실시한다.
- primer와 probe의 sequence는 다음과 같다.

Rotavirus fwd1:

5'-GGATGTCCTGTACTCCTTGTCAAAA-3'

Rotavirus fwd2:

5'-GGAGGTTCTGTACTCATTGTCAAAA-3'

Rotavirus rev1:

5'-TCCAGTTTGGAACTCATTTCCA-3'

Rotavirus rev2:

5'-TCCAGTTTGAAAGTCATTTCCATT-3'

Rotavirus probe1 (VIC):

5'-ATAATGTGCCTTCGACAAT-3'

Rotavirus probe2 (VIC):

5'-AATATAATGTACCTTCAACAAT-3'

- Real-time PCR thermal cycling condition은 다음과 같다.
: 2min at 50°C, 10min at 95°C, and 40 cycles of 15s at 95°C and 1min at 60°C

- ㉔ 분변에서 RNA를 추출하여 real-time PCR을 이용하여 분변에서 분비되는 바이러스양을 측정함.

(나) Bovine Coronavirus

1) 접종실험하기 위한 소 코로나바이러스 배양액 확보

㉠ Bovine coronavirus

: Coronaviridae에 속하며, 신생 송아지의 설사, 성우의 겨울철 적리 (Winter dysentery) 등의 원인체이다. 외피를 갖는 비분절형 RNA virus로 주요 항원으로는 nucleocapsid (N) protein, transmembrane (M) protein, hemagglutinin/esterase (HE) protein, spike (S) protein, small membrane (E) protein 등이 있다. 본 연구에서는 야외 분리주 (KWD4)를 사용하였다.

㉡ 코로나바이러스 배양은 HRT-18G (Human rectal tumor cell)에 pancreatin을 처리한 후 배양하여 사용함

- HRT-18G (Human rectal tumor cell)를 DMEM (10% FBS, 1% Antibiotics)을 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양한다.
- Bovine Coronavirus (BCV)를 DMEM (1% Antibiotics)으로 희석하여 0.1 MOI로 HRT-18G monolayer에 접종한다.
- 1시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하며, 15분 간격으로 rocking 해준다.
- DMEM (5ug/ml Pancreatin, 1% Antibiotics)를 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 배양하여 virus를 증식시킨다.

㉢ 코로나바이러스 농도를 1X 10⁸ PFU/ml 이상 되도록 배양하여 총 2L의 배양액 확보

2) Plaque assay 법 확립

㉠ 송아지에 코로나바이러스를 인공 감염시킨 후 분비되는 바이러스수를 조사하기 위한 plaque assay 법 확립

- HRT-18G를 24 well tissue culture plate에 배양한다.

- 각well을 DMEM으로 washing 한 후, DMEM (1% Antibiotics) 으로 계단 희석된 BCV를 0.1ml씩 접종한다.
 - 1시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하며, 10분 간격으로 rocking해준다.
 - 1시간 후, DMEM (0.6% agar, 5ug/ml Pancreatin, 1% Antibiotics) 1ml를 첨가한다.
 - 37°C, 5% CO₂에서 3~4일간 배양한 후, 10% Formalin으로 고정한다.
 - 1% Crystal violet으로 염색하여 plaque 수를 개수하고 단위를 pfu (plaque form unit)/ml로 나타낸다.
- ㉞ 송아지 분변에 코로나바이러스를 혼합하여 plaque assay 법을 적용실험
- ㉞ 항생제 함유배지에 희석하여 원심분리후에 상층액을 plaque assay에 사용하여 분변으로 분비되는 바이러스양을 측정함.

3) Real-time PCR법 확립

- ㉞ 분변에서 분비되는 코로나바이러스 농도측정을 위해서 real-time PCR을 확립

· Plasmid DNA standard 구성

- BCV로부터 viral RNA 추출이후, 아래 primer set으로 PCR 증폭을 실시하였다
- BCV 28380F
:5'-TCTTAGCTGTTGACTTTATTACCTGG-3'
- BCV 29298R
:5'-ACATAAACAGCAAAACCACTAGTATCGCC-3'
- Amplicon length: 919bps
- 증폭된 PCR product를 pGEM-T easy vector에 TA cloning을 실시하여 삽입하였다.

- 재구성된 plasmid를 10^6-10^0 copies으로 10-fold dilution하여 real-time PCR의 standard로 사용하였다.

· **Real-time PCR amplification**

- 분변 시료에서 viral RNA를 분리해낸 후 cDNA로 합성하였으며, 이를 이용하여 Real-time PCR을 실시한다.

- primer와 probe의 sequence는 다음과 같다.

- BCoV-F: 5'-CTGGAAGTTGGTGGAGTT-3'

- BCoV-R: 5'-ATTATCGGCCTAACATACATC-3'

- BCoV-pb

: FAM-CCTTCATATCTATACACATCAAGTTGTT-BHQ1

- Real-time PCR thermal cycling condition은 다음과 같다.

: 10min at 95°C, and 45 cycles of 15s at 95°C

and 1min at 60°C

㉔ 분변에서 RNA를 추출하여 real-time PCR을 이용하여 분변에서 분비되는 코로나바이러스 양을 측정함.

(3). 송아지에 세균성 및 바이러스성 설사 원인체 동시 인공감염 후, 임상 증상 및 폐사율 확인

(가) 실험 동물 및 실험군 분류

3개월령 국내 사육 holstein 송아지 6두를 공시동물 (Figure 5)로 하여 공격접종 실험 전 설사에 관련된 임상증상과 분변 내 정상세균총 외 병원성 *E.coli* 및 *Salmonella*가 동정되지 않음을 확인하였다 (Figure 6). 또한 real-time PCR을 통해 rotavirus 및 coronavirus 음성을 확인하였다. 각각의 공시동물은 3마리씩 분류하여 무처치 대조군과 SoltoB 첨가군으로 분류하였으며, 각 군은 격리되어 상호 감염을

예방하였다. 추가적으로 *Salmonella*의 경우 증균과정을 통해 장내 *Salmonella* 감염을 2차적으로 확인하였고 실험에 사용된 총 5마리의 송아지는 모두 음성 판정을 받았다 (Figure 7). 증균을 통해서 *Salmonella*가 동정된 송아지는 설사관련 증상이 관찰되지 않았고, 반면 직접 도말시 *Salmonella*가 동정되지 않았으므로 실험을 진행하였다. 본 공격 접종 실험은 전남대학교 용봉캠퍼서 동물실험윤리위원회의 승인을 얻어 실시함 (승인번호: CNU IACUC-YB-2010-1).

(나) 실험군의 사료 급여

대조군 (3두) 및 SoltoB 첨가군 (3두)는 모두 사료 및 음수에 접근이 자유롭도록 사육시설을 설비하였으며, 대조군의 경우 항생제가 포함되지 않은 일반사료와 수도수를 실험 전(全)기간 동안 자유 급여하였으며, SoltoB 첨가군은 0.5% (w/w) SoltoB를 첨가한 사료와 수도수를 실험 전(全)기간 동안 자유급여 하였다. 대조군과 SoltoB 첨가군은 각 군의 사료에 1주일간 적응 기간을 거치고 인공 감염 실험 실시하였다.



Figure 5. 실험군의 분류. (A) 대조군 3마리, (B) SoltoB 첨가군 3마리

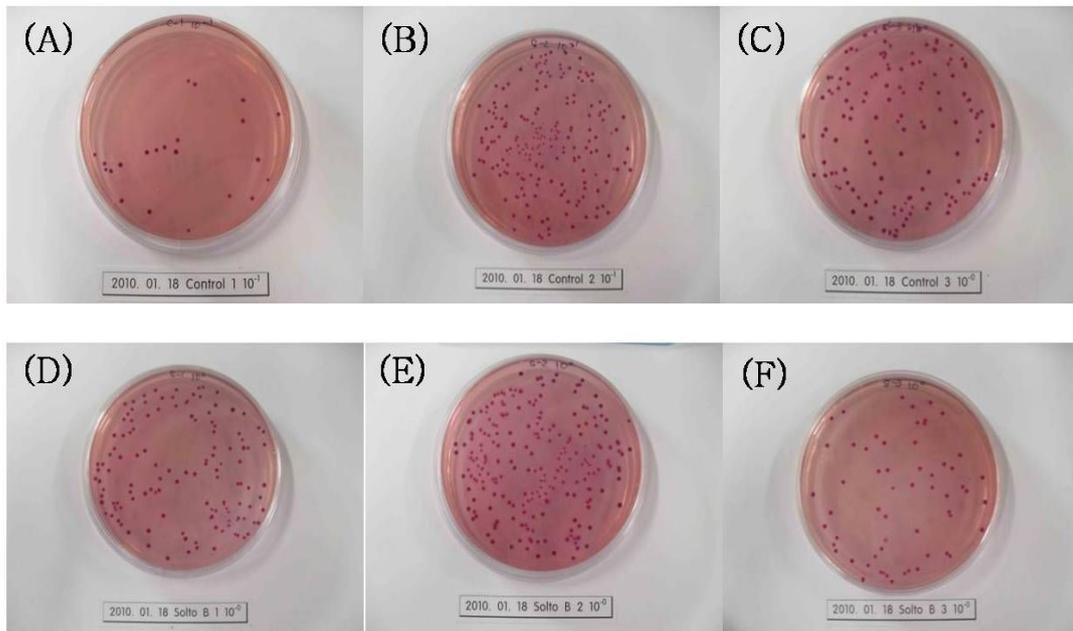


Figure 6. Normal flora in calves intestine before challenge. MacConkey agar used in this figure did not contain kanamycin. (A)–(C): control group; (D)–(F): SoltoB group.

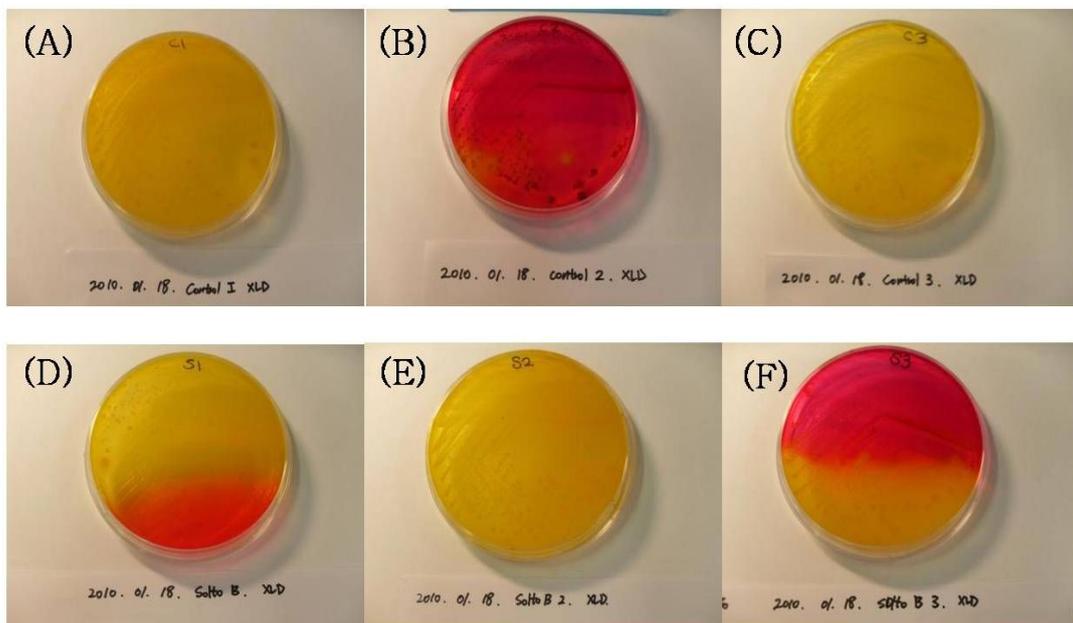


Figure 7. The morphology of *Salmonella Typhimurium* on XLD agar following enrichment of *Salmonella*. Black colony indicate *Salmonella* spp on XLD agar. There are no black colony on XLD agar. (A)–(C): control group; (D)–(F): SoltoB group.

(다) 공격 접종 세균 및 바이러스 (세균 동시 공격 접종)

- Bovine Rotavirus (1×10^8 pfu/ml): 100ml
- Bovine Coronavirus (1×10^8 pfu/ml): 50ml
- *Salmonella typhimurium* 09-2b (3×10^{10} CFU/ml): 100ml
- *Escherichia coli* (5×10^{10} CFU/ml): 100ml
- 우유에 혼합하여 경구투여
- 접종 경로 : 4가지 병원체 동시 구강 접종 (Figure 8)



Figure 8. 공시동물에 대한 경구투여. 투여물질은 우유와 혼합하여 투여.

(라) SoltoB의 세균성 설사 방어효과 확인

① 임상 증상 및 생존율 (Figure 9, Figure 10)

대조군의 송아지에서는 공격 접종 1일 이후부터 심한 설사증상 유발 되었으며 공격 접종 1일 이후부터 폐사발생하였다 (2일째 추가로 2두 폐사). SoltoB 첨가군의 송아지에서는 대조군에 비해 가벼운 설사가 관찰되었으며 SoltoB 첨가군의 송아지에서는 대조군에 비해 완만한 폐사율을 보였다. SoltoB 첨가군의 송아지 중 한 마리는 공격접종 8일째 에 시행한 부검때까지 생존하였다.



Figure 9. After three day challenge, calf deaths was observed in control group. (A)–(D) Control No.2 and 3

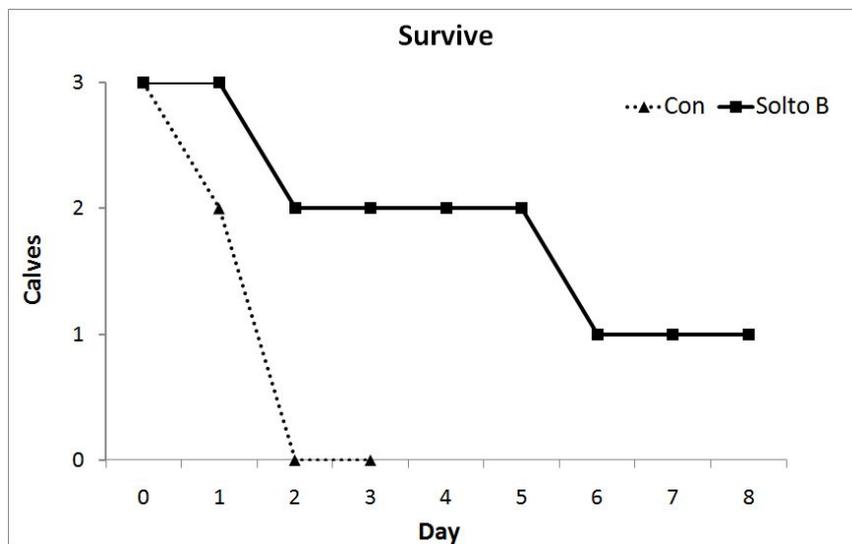


Figure 10. Survival present situation of calves after challenge. Day of 0 indicates challenge day. SoltoB group shows high survival rate compared with control group.

② 분변 내 공격 접종 균주 변화

인공감염 직전 (0일째)의 분변에서 확인된 *E.coli*의 수는 비슷하였으나 인공감염 후 송아지 분변 내 *E.coli* 수는 급속히 증가하였다 (Figure 11). 감염 직후 증가 정도는 무처치군과 SoltoB 첨가군 사이에서 큰 차이점이 없어 SoltoB의 초기 감염 예방효과는 확인할 수 없었으며, 인공감염 시킨 후 3일째 되는 날에 분변 내 *E.coli* 수가 가장 높게 나타났다, 이때의 분변 내 *E.coli* 수 역시 무처치군과 SoltoB 첨가군 사이에서 큰 차이점을 확인할 수 없었다. 인공 감염 이후 4일째 되는 날부터 분변 내 *E.coli* 수는 감수하기 시작하였으며, 부검을 시행한 6일째까지 생존한 SoltoB 첨가군3의 개체에서는 인공 감염 직후 증가한 균수만큼을 회복하였다.

Salmonella 인공 감염을 실시하기 전 송아지의 단계 희석한 분변에서는 *Salmonella* 형상의 집락이 전혀 관찰되지 않았으나 감염 직후 분변에서 *Salmonella*의 수가 급속히 증가하였다 (Figure 12, Figure 13). 초기 감염 후 증가 정도는 무처치군과 SoltoB 첨가군 사이에서 큰 차이를 관찰하기 힘들었으며, 3~4일 뒤에 분변내 *Salmonella*의 수가 가장 많이 발견되었는데, 이때에도 무처치군과 SoltoB 첨가군 사이의 차이는 확인할 수 없었다. 부검 시까지 생존한 SoltoB 첨가군 3의 경우 3일째부터 분변 내 *Salmonella*의 수가 감소하기 시작하여 부검 시까지 지속적으로 분변 내 *Salmonella*의 수가 감소하였다.

*E.coli*와 *Salmonella* 인공감염 실험에서 분변 내 인공감염 시킨 균주의 분리 정도는 대조군이 모두 공격접종 후 2일째 폐사하여 두 실험군 사이에서 큰 차이점을 확인할 수 없었다. SoltoB 첨가군의 생존율이 대조군에 비해 높음을 확인할 수는 있었다. 대조군의 폐사로 분변 내 인공감염 시킨 균주의 분리 정도는 초기 감염 때까지만 비교가 가능했으며, 초기 감염 및 공격 균주의 분리 정도는 대조군과 SoltoB 첨가군 사이에서 큰 차이점을 보이지 않았지만, 인공 감염 후 방어하는 능력은 SoltoB 첨가군이 대조군에 비해 높음을 확인할 수 있었다.

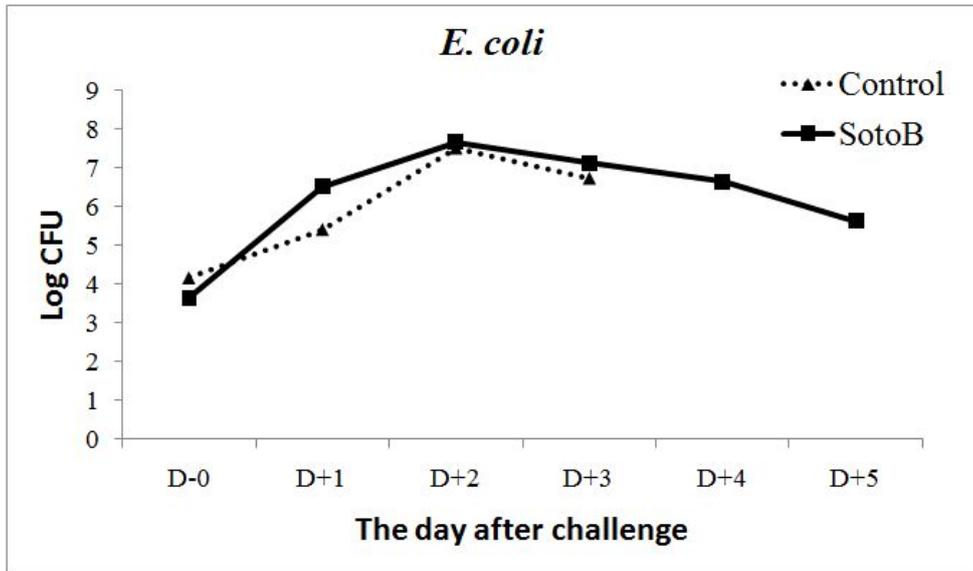


Figure 11. The change of number of *E. coli* in experimentally infected calves. No difference is observed between control and SoltoB groups. There were not result of control group at D+4 and D+5, because of calf deaths.

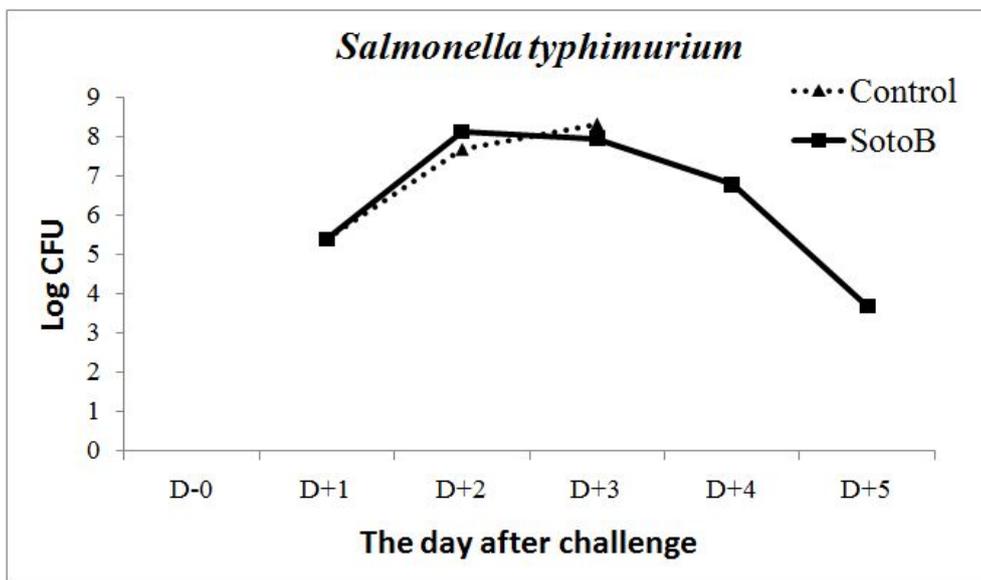


Figure 12. The change of number of *Salmonella Typhimurium* in experimentally infected calves. No difference is observed between control and SoltoB groups. There were not result of control group at D+4 and D+5, because of calf deaths.

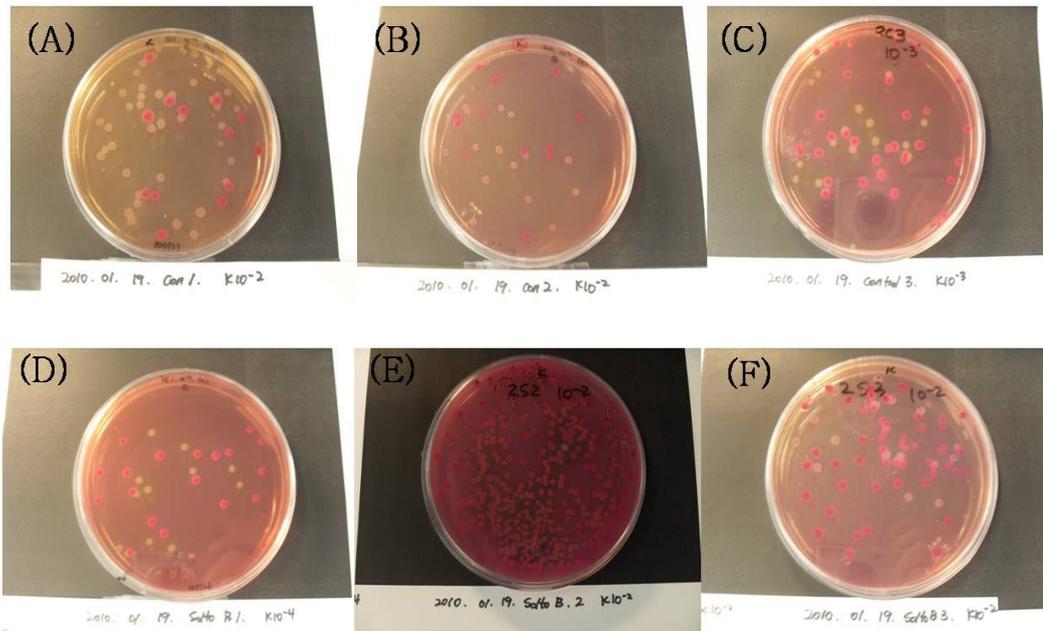


Figure 13. The white colonies are observed on MacConkey agar containing Kanamycin. The white colonies indicate *Salmonella typhimurium*. Note that there was no white colony on MacConkey agar at D-0.

(4) 송아지에 세균성 및 바이러스성 설사 원인체 동시 인공감염 후, 임상 증상 및 분변 내 인공감염 원인체 분리정도 평가

(가) 실험 동물 및 실험군 분류 (고농도 투여와 같은 조건)

3개월령 국내 사육 holstein 송아지 6두를 공시동물로 하여 공격접종 실험 전 설사에 관련된 임상증상과 분변 내 정상세균총 외 병원성 *E.coli* 및 *Salmonella*가 동정되지 않음을 확인하였다 (Figure 14). 또한 real-time PCR을 통해 rotavirus 및 coronavirus 음성을 확인하였다. 각각의 공시동물은 3마리씩 분류하여 무처치 대조군과 SoltoB 첨가군으로 분류하였으며, 각 군은 격리되어 상호 감염을 예방하였다. 추가적으로 *Salmonella*의 경우 증균과정을 통해 장내 *Salmonella* 감염을 2차적으로 확인하였고 실험에 사용된 총 6마리의 송아지는 모두 음성 판정을 받았다 (Figure 15).

(나) 실험군의 사료 급여

대조군 (3두) 및 SoltoB 첨가군 (3두)는 모두 사료 및 음수에 접근이 자유롭도록 사육시설을 설비하였으며, 대조군의 경우 항생제가 포함되지 않은 일반사료와 수도수를 실험 전(全)기간 동안 자유 급여하였으며, SoltoB 첨가군은 0.5% (w/w) SoltoB를 첨가한 사료와 수도수를 실험 전(全)기간 동안 자유급여 하였다. 대조군과 SoltoB 첨가군은 각 군의 사료에 1주일간 적응 기간을 거치고 인공 감염 실험 실시하였다. 본 공격 접종 실험은 전남대학교 용봉캠퍼서 동물실험윤리위원회의 승인을 얻어 실시함 (승인번호: CNU IACUC-YB-2010-1).

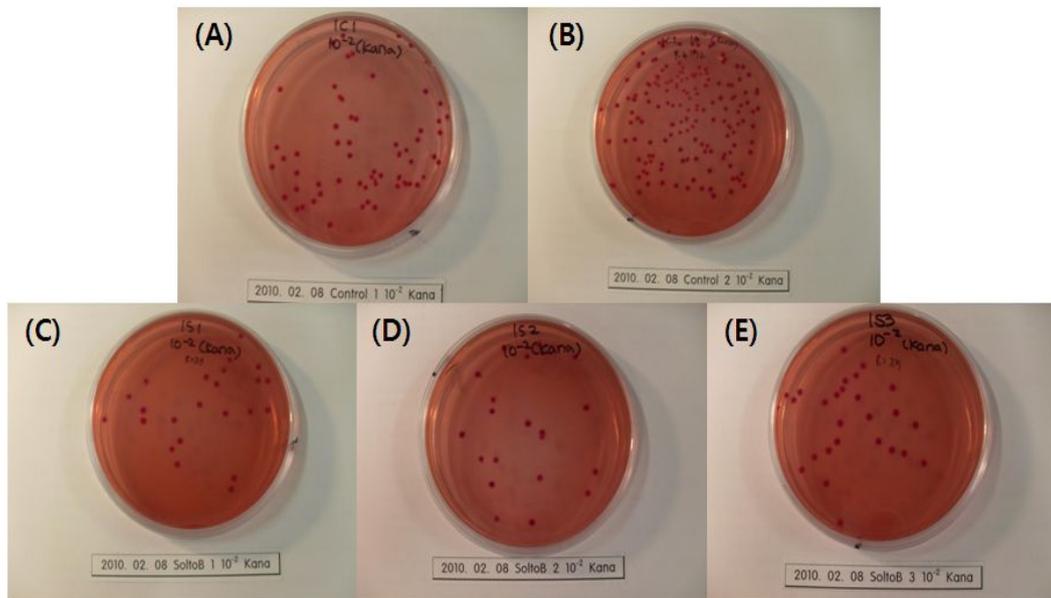


Figure 14. Normal flora in calves intestine before challenge. MacConkey agar used in this figure contains kanamycin. (A)–(B): control group; (C)–(E): SoltoB group.

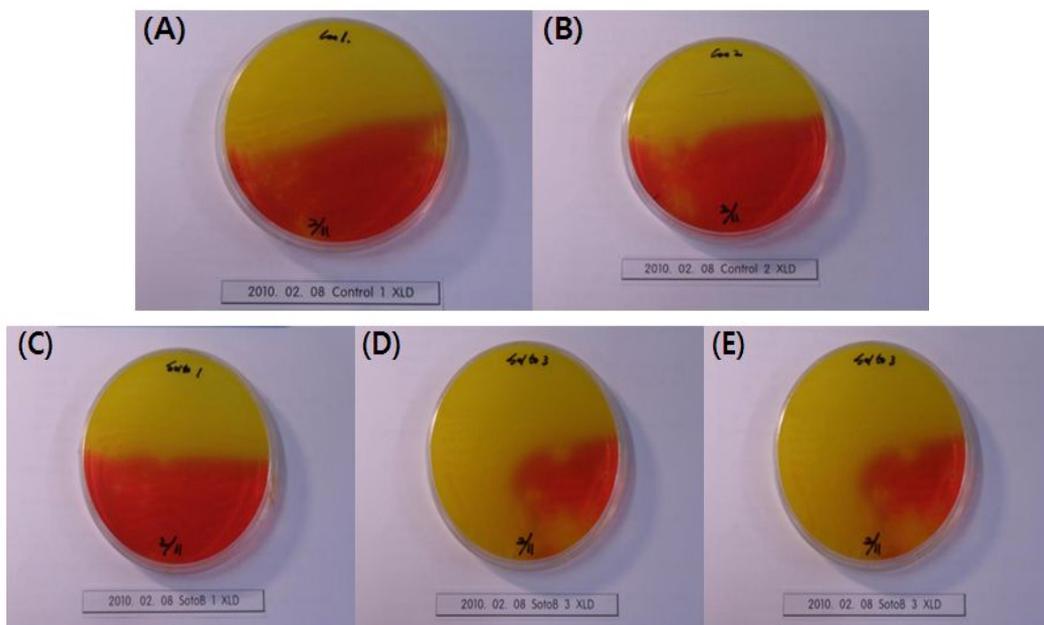


Figure 15. The morphology of *Salmonella Typhimurium* on XLD agar following enrichment of *Salmonella*. Black colony indicate *Salmonella* spp on XLD agar. There are no black colony on XLD agar. (A)–(B): control group; (C)–(E): SoltoB group.

(다) 공격 접종 세균 및 바이러스 (세균 동시 공격 접종)

- Bovine Rotavirus (1×10^8 pfu/ml): 50ml
- Bovine Coronavirus (1×10^8 pfu/ml): 50ml
- *Salmonella typhimurium* 09-2b (8.8×10^8 CFU/ml): 100ml
- *Escherichia coli* (3×10^8 CFU/ml): 100ml
- 우유에 혼합하여 경구투여
- 접종 경로 : 4가지 병원체 동시 구강 접종 (Figure 16)

(라) SoltoB의 세균성 설사 원인체 감염 정도 및 청소율 확인

① 임상 증상 및 분변 내 수분 함유량

공격 접종 후 모든 실험군의 송아지에서 설사가 유발되었으며, 설사의 임상증상은 다음과 같이 점수화하였다.

- Normal : 1 / mild : 2 / moderate : 3 / Severe : 4

감염 직후 초기 설사 정도는 SoltoB군과 대조군에서 차이가 없었으며 (Figure 17, Figure 18) SoltoB 첨가군의 경우 공격 접종 후 유발된 초기 설사 증상에서 더 이상 증상이 악화되지 않고 지속적으로 임상증상이 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 반면 대조군의 경우 공격 접종 후 설사 증상이 유발되고 나서 6 일째까지 임상증상이 호전되지 않다가 이후 점차적으로 호전되는 양상을 보였다. 공격접종 후 12일이 지난 이후로는 SoltoB 첨가군과 대조군 모두 설사 증상을 회복하였다. 이를 통해 SoltoB 첨가군과 대조군 사이에서 초기 설사 회복 능력 정도에서 차이를 확인할 수 있었다. 공격 접종 후 두 실험군에서 분변 내 수분 함유량 차이는 거의 없었으며, (Figure 19) 대조군의 설사 증상이 6일째까지 회복되지 않음에 따라 분변 내 수분 함유량은 SoltoB 첨가군에 비해 높게 관찰되나 이후 회복됨에 따라 분변 내 수분 함유량이 빠르게 감소함을 확인할 수 있었다.



Figure 16. Rear condition of calves before challenge and oral injection of diarrhea pathogens



Figure 17. Monitoring of clinical signs. (A)–(C): Caudal of calves looks dirty because of diarrhea. (D): watery diarrhea

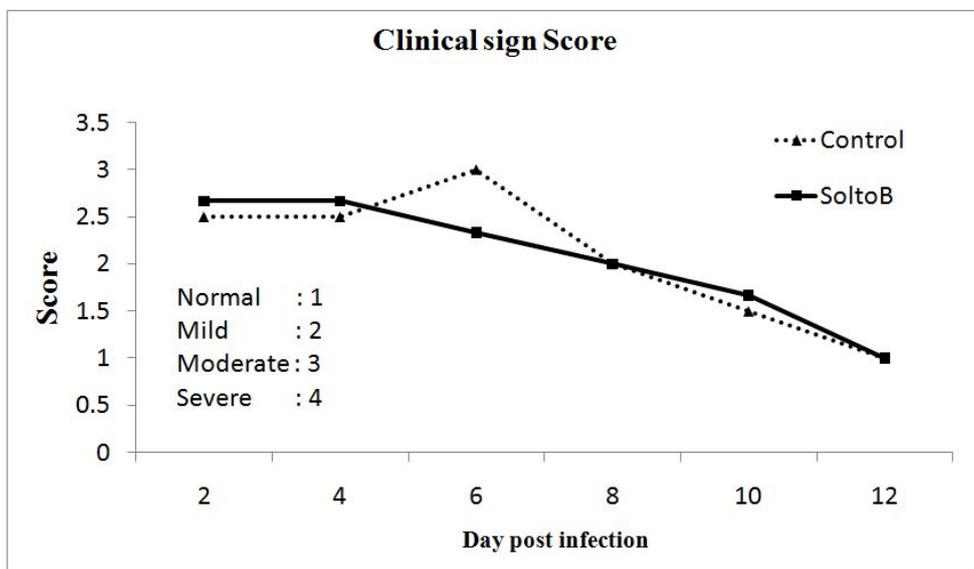


Figure 18. Clinical sign score. The SoltoB shows lower score than the control group. There are, however, no significant difference between control and SoltoB groups.

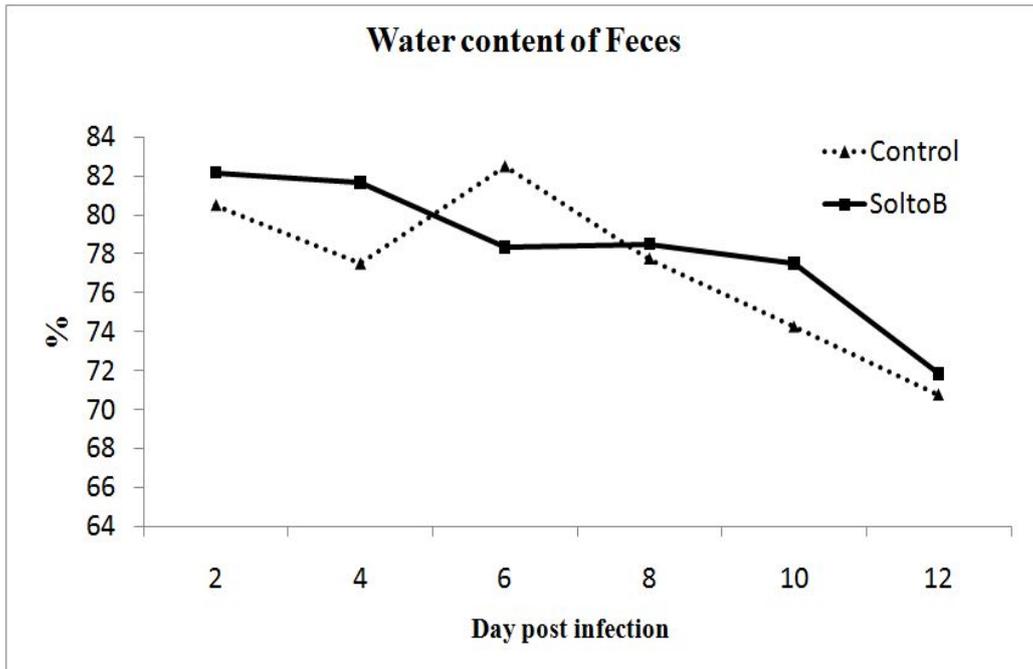


Figure 19. Water content of feces. The percentage of water content could be indicator of degree of diarrhea. Note correlation with clinical sign score.

② 분변 내 공격 접종 세균 및 바이러스의 변화 (청소율, Figure 20)

공격 접종한 후 분변 내 공격 균주의 분리 정도를 조사하여 장내 청소율을 조사하였다. 장내 청소율은 공격 접종 전에 분리되는 *E. coli*의 CFU를 기준 (100%)로 하여 공격 접종 후 각 균주의 분리 정도를 %로 조사하였다. *Salmonella*의 경우 공격 접종전의 분변에서 분리되지 않았으므로 분변내에서 분리된 균수의 CFU를 상용로그로 변환하여 그 변화를 확인하였다.

E. coli 공격 접종 후 2일이 경과한 뒤 채취한 분변내에서 공격 접종 전 보다 SoltoB 첨가군의 경우 15배, 대조군의 경우 5배 정도의 장내 *E. coli*가 분리되었다. 대조군과 비교 시 SoltoB 첨가군의 초기 감염 방어능을 확인하기 어려웠다. (Figure. 20 (A))

*E. coli*의 경우 SoltoB 첨가군에서는 공격 접종 2일 이후에 가장 많은 균수가 분리되고 이후 지속적으로 감소하는 경향을 확인하였다. 반면 대조군의 경우 초기 감염정도는 SoltoB 첨가군에 비해 낮지만, 이후 지속적으로 분변 내 분리되는 공격 균주가 증가하여 6일째에 가장 많은 균수가 분리되고 이후 감소하였다.

E. coli 인공 감염 실험을 통해 SoltoB가 초기 감염에 대한 방어는 대조군과 큰 차이를 보이지 않으나 이후 설사 유발 *E. coli*의 증식을 억제하여 설사 증상을 호전시킴을 알 수 있었다. 대조군의 경우 초기 감염 이후 지속적으로 병원균이 증식하여 공격 접종 후 6일째까지 높은 수의 *E. coli*가 분리되었다. 대조군에서 공격 접종 이후 6일째까지 많은 수의 균이 분리되는 반면에 SoltoB 첨가군에서는 4일째부터 정상적으로 회복하였음을 알 수 있다.

Salmonella 인공 감염 실험에서 SoltoB 첨가군은 대조군에 비해 낮은 균수로 감염이 되었으며, SoltoB 첨가군은 공격 접종 2일째부터 분변

내에서 분리되는 *Salmonella*의 수가 감소하기 시작하였으나, 대조군의 경우 공격집중 4일 뒤부터 균수가 감소하기 시작하였다. 또한 공격 집중 후 분리되는 균수도 SoltoB의 첨가군은 대조군에 비해 낮음을 알 수 있었다. *Salmonella* 인공 감염된 송아지는 SoltoB 첨가군과 대조군에서 모두 6일째 되는 날부터 분변내에서 균이 분리되지 않았다.

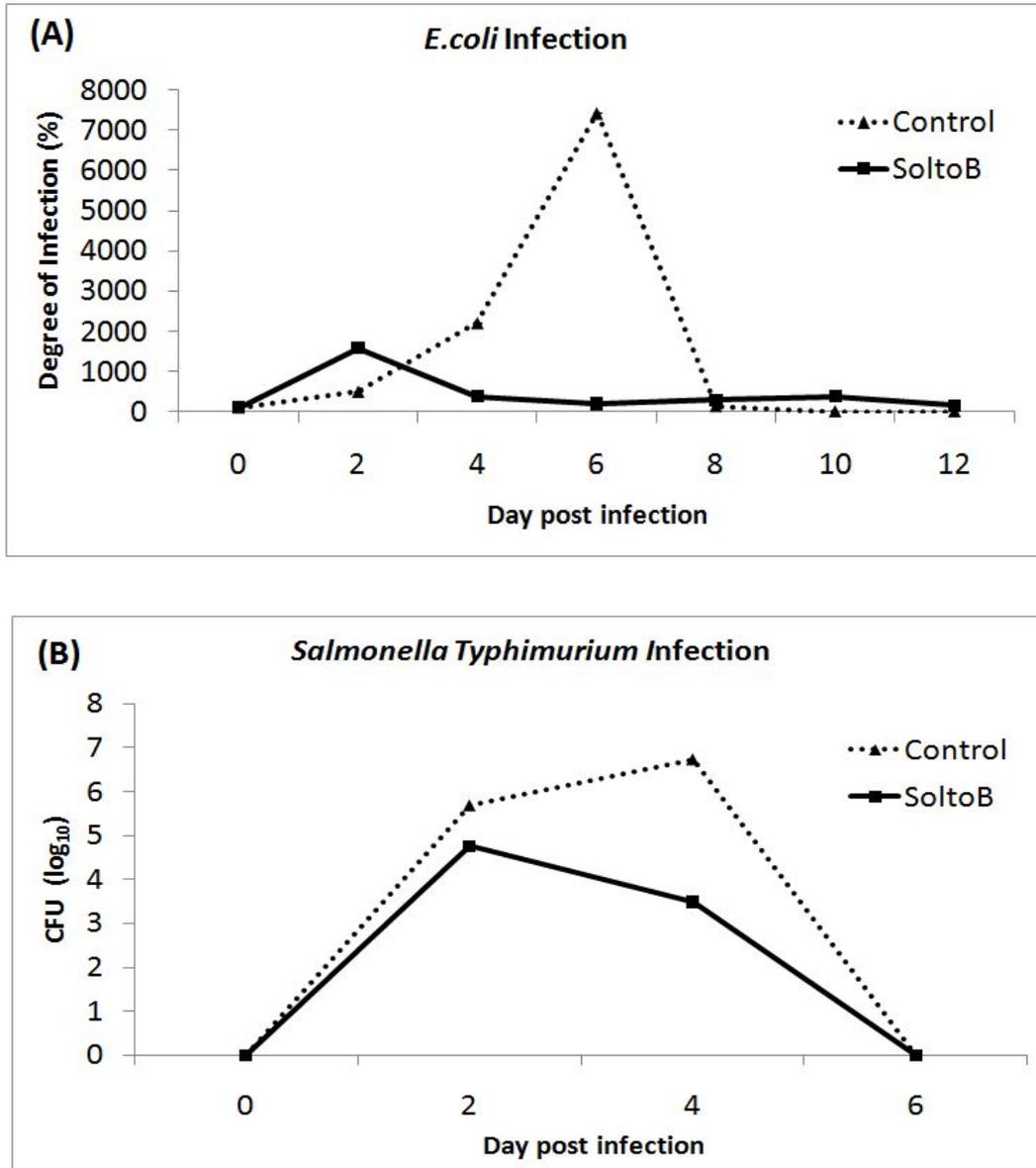


Figure 20. (A) *E. coli* infection degree. (B) Change of number of isolated *Salmonella Typhimurium* in feces. The SoltoB group shows low AUC, compared with the control group.

- 이틀간격으로 전(全) 개체의 분변을 채취하여 Real-time PCR을 통해 바이러스의 분비 정도를 측정하였다. 바이러스 분비 정도의 결과는 다음 그래프와 같다 (Figure 21).

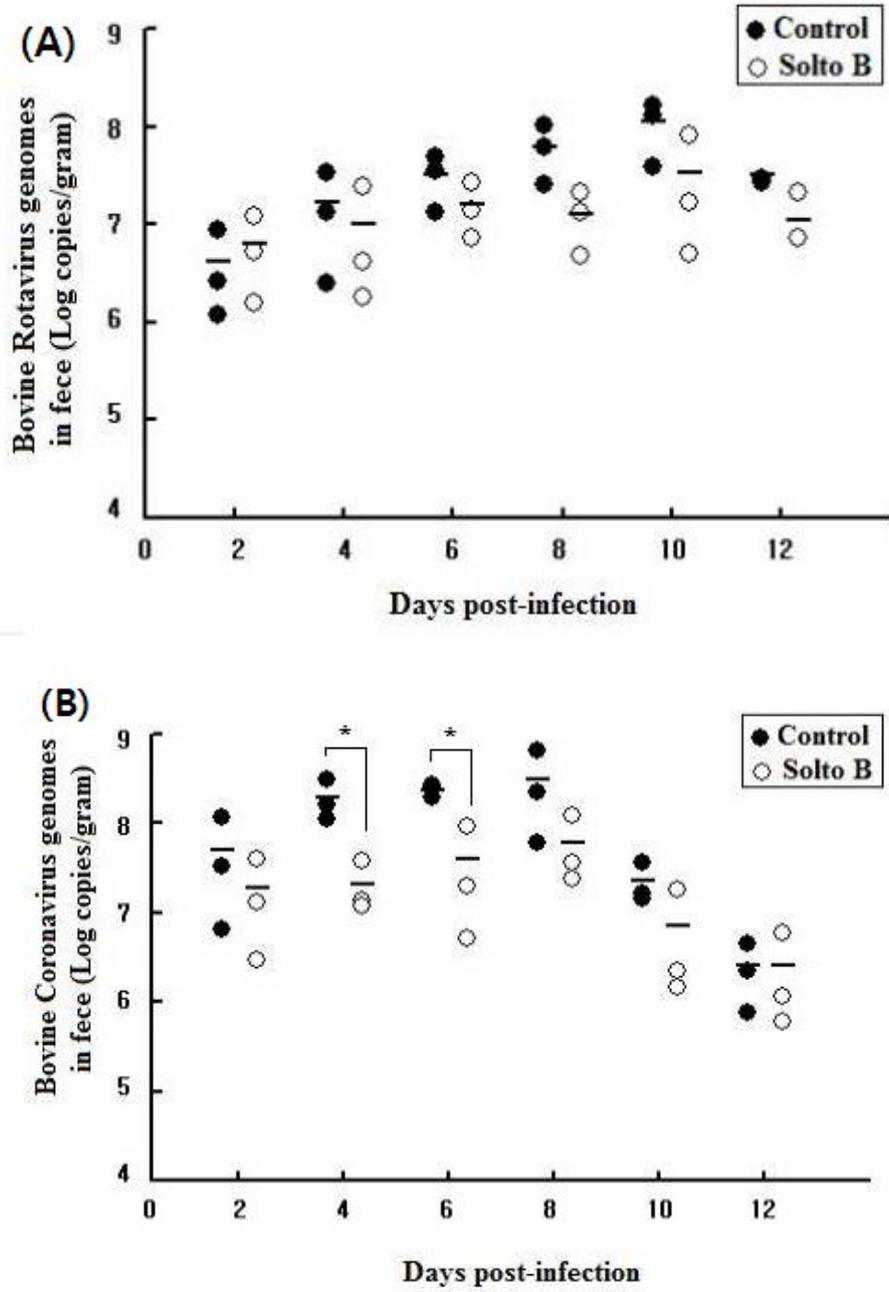


Figure 21. (A) Bovine Rotavirus 공격 접종 후 바이러스 분비 정도, (B) Bovine Coronavirus 공격 접종 후 바이러스 분비 정도.

· Bovine Rotavirus와 Bovine Coronavirus 모두 SoltoB 급여 군에서 대조군에 비해 감소된 경향을 보여주었다. 특히 Bovine Coronavirus의 경우, 공격 접종 4일과 6일째에 통계적으로 유의성 있게 바이러스가 감소되었다. 이러한 결과들을 보았을 때, 송아지에서 Solto B의 급여가 Bovine Rotavirus와 Bovine Coronavirus의 제거에 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다.

(마) 조직학적 소견

대조군의 소화기관 부검 결과. 대조군 송아지의 부검 후 H&E 염색을 통해 소화기관 조직의 변화를 확인하였다. 대조군의 소화기 조직학적 검사 결과 공격 접종에 의한 용모의 파괴 및 점막 손상이 관찰된다 (Figure 22).

SoltoB 첨가군의 소화기관 부검 결과. SoltoB 첨가군 송아지의 부검 후 H&E 염색을 통해 소화기관 조직의 변화를 확인하였다. 대조군의 조직염색 결과와 달리 SoltoB 첨가군은 소화기관 장점막 및 용모의 손상이 관찰되지 않는다. 특히 맹장과 대장에서 두드러진 방어 효과를 확인할 수 있었다 (Figure 23).

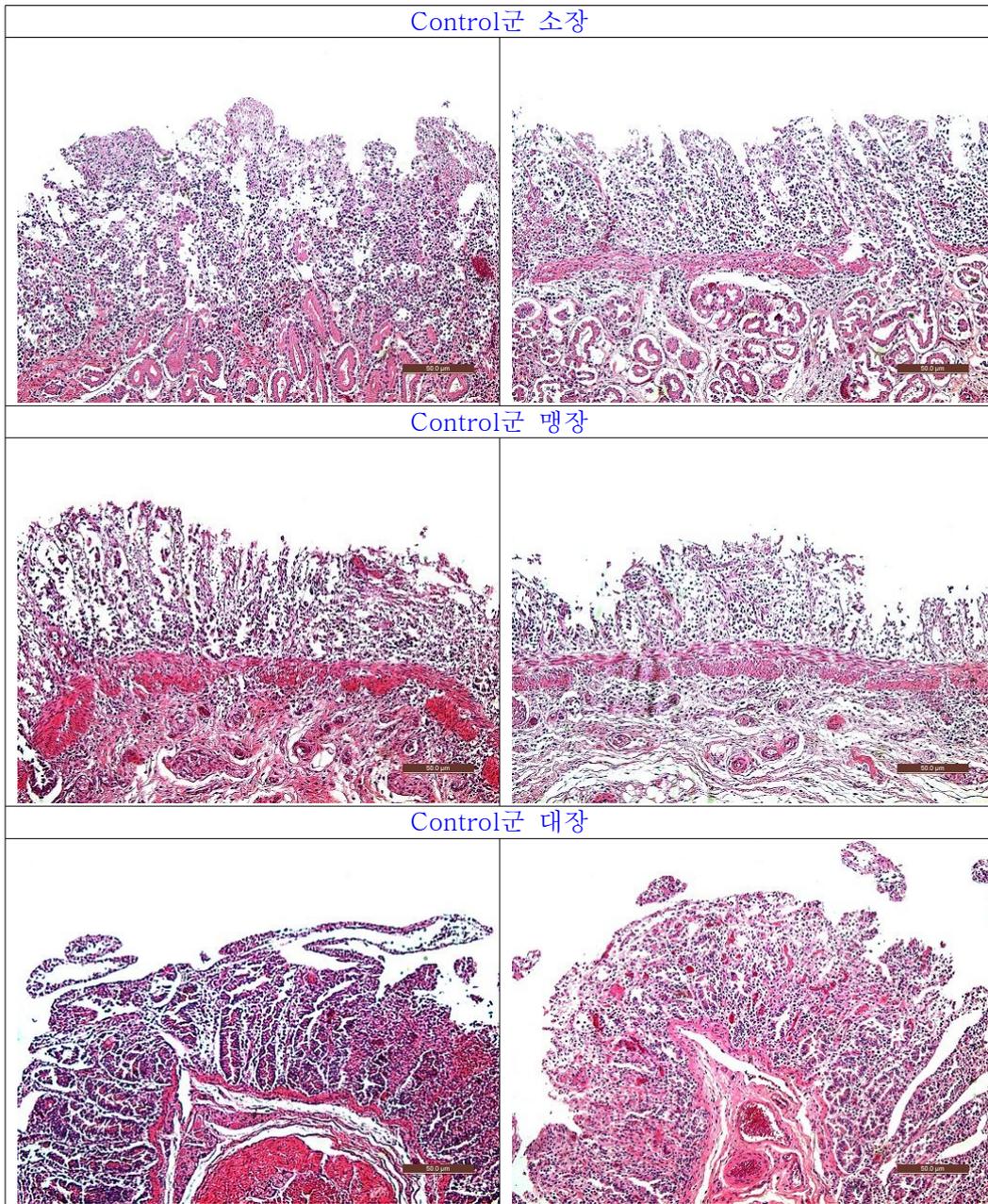


Figure 22. 대조군의 소화기관 부검 결과. 대조군 송아지의 부검 후 H&E 염색을 통해 소화기관 조직의 변화를 확인하였다. 대조군의 소화기 조직학적 검사 결과 공격 집중에 의한 용모의 파괴 및 점막 손상이 관찰된다.

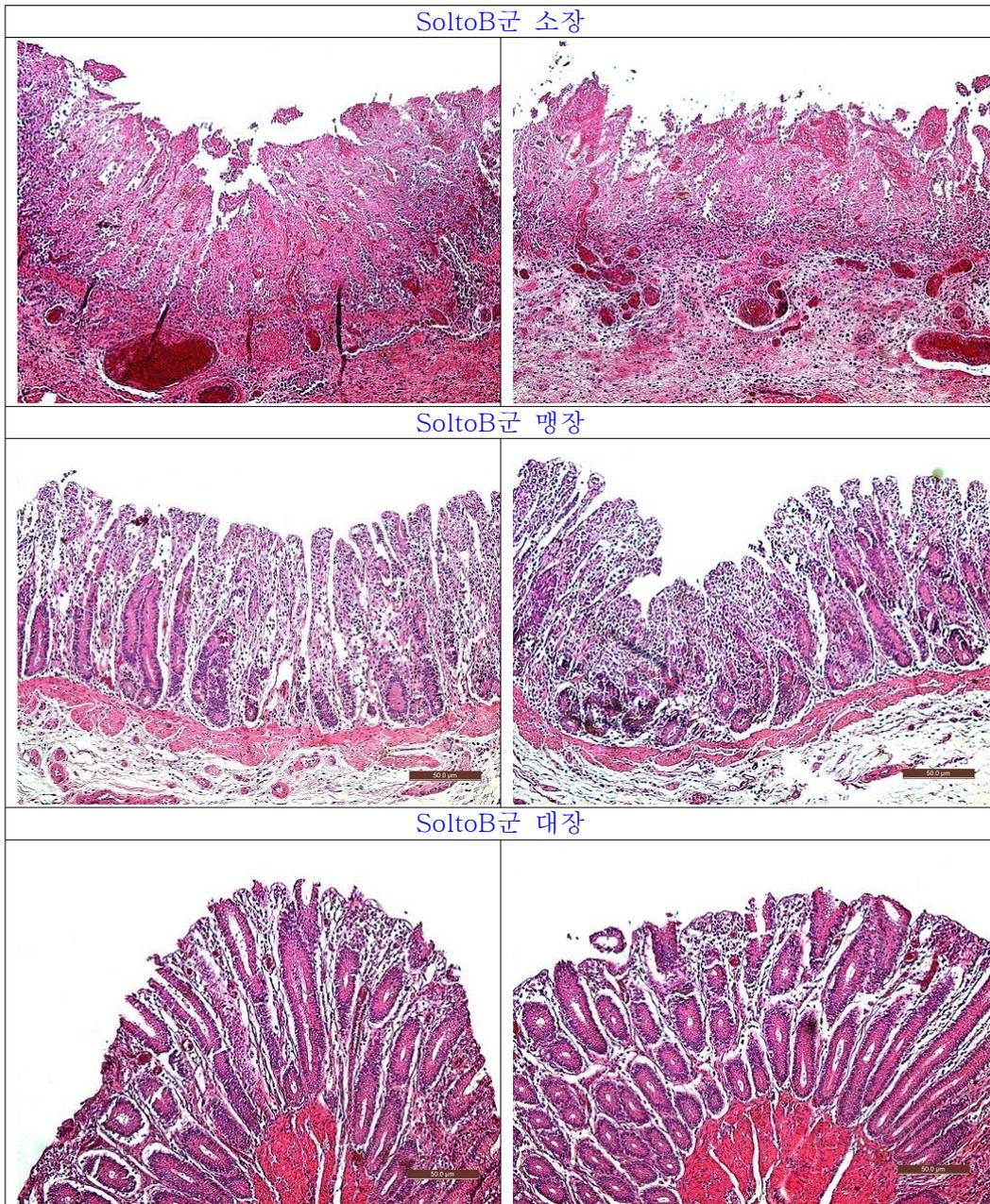


Figure 23. SoltoB 첨가군의 소화기관 부검 결과. SoltoB 첨가군 송아지의 부검 후 H&E 염색을 통해 소화기관 조직의 변화를 확인하였다. 대조군의 조직염색 결과와 달리 SoltoB 첨가군은 소화기관 장점막 및 용모의 손상이 관찰되지 않는다. 특히 맹장과 대장에서 두드러진 방어 효과를 확인할 수 있었다.

제 2 절 2차년도 연구개발수행 내용 및 결과

가. 설사유발 세균에 대한 SoltoB의 흡착효과 확인

(1) 송아지 설사 유발 세균성 병원체에 대한 SoltoB의 흡착력과 성장 억제력 평가

(가) 균수 측정을 위한 O.D. 값과 Colony Forming Unit (CFU) 의 상관관계 설정

설사유발 세균에 대한 흡착력을 평가하기 앞서 본 연구 수행 시 필수적인 균수측정을 위하여 colony forming unit (CFU) 와 600nm에서 O.D. 값을 측정하여 이들과의 상관관계를 분석하였다. 설사유발 대표적인 세균으로 송아지 설사 분변에서 분리 동정된 *Salmonella derby*, *S. Typhimurium* 09-2b, *S. Typhimurium* 09-51, *S. Typhimurium*, *E. coli* 및 hemolytic *E. coli* 의 병원균주를 흡착력 시험 대상 균주로 선정하여 각기의 균주들의 CFU와 O.D. 값의 상관관계를 Figure 29과 같이 확립하였다. 실험 결과 각각의 균주는 서로 다른 CFU와 O.D. 값의 상관관계를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. CFU의 값은 각기 균주의 배양액을 10진 단계희석하여 Tryptic soy agar plate (TSA)에 희석액 50 μ l 씩을 접종하고 균질 도말 후 16시간 배양된 뒤 형성된 colony의 수를 새어 희석배수를 통해 환산하였다 (Figure 24).

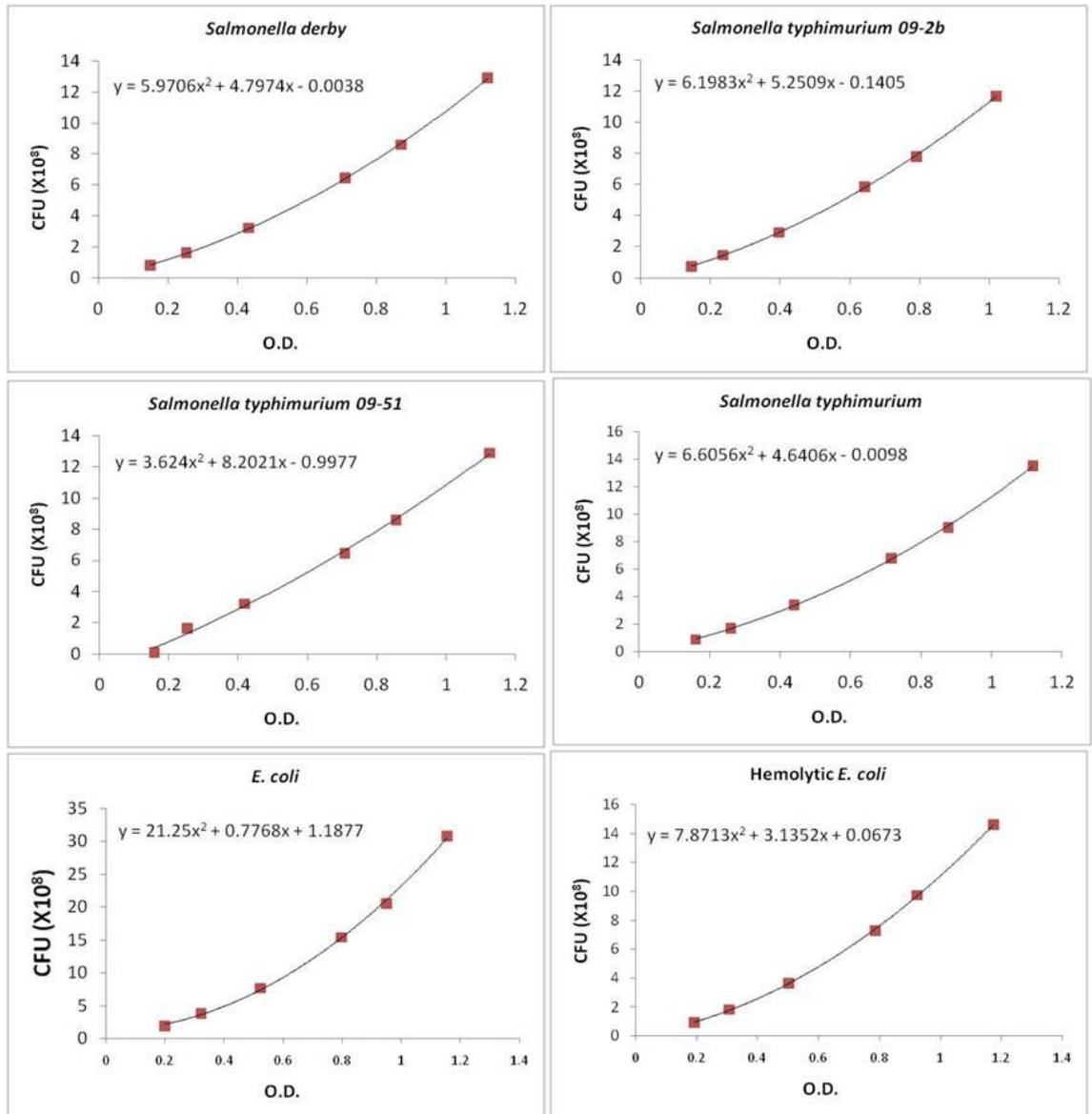


Figure 24. Correlation of Colony forming unit with O.D.

(나) SoltoB 에 의한 균주의 흡착력 및 성장 억제력 분석

각 실험균주의 균수를 5×10^8 CFU/ml로 통일하기 위해 Blood agar plate(BAP)에 선발 균주를 도말 접종하여 37°C 5% CO_2 incubator에서 18시간 배양 후, 3 colonies/TSB 21ml로 TSB에 접종하여 37°C 350rpm shaking incubator에서 18시간 배양하였다. 이 후 18시간 배양된 TSB을 기 확립한 CFU와 O.D. 상관관계를 이용하여 각 균주의 CFU를 보정하였다. CFU 보정을 위한 사전 실험을 바탕으로 본 실험에서는 같은 조건으로 배양된 각 균주가 접종된 TSB를 희석하여 5.0×10^8 CFU/ml, 1.0×10^2 CFU/ml로 CFU를 보정하고 균주 배양액 1ml 당 시험물질로 SoltoB와 Kaolinite (양성대조군)를 0.05g씩 넣고 각각 흡착력과 성장억제력을 평가하였다.

Solto B의 균 흡착력과 성장억제력을 평가하기 위해 각 실험 물질이 접종된 TSB를 37°C , 350rpm shaking incubator에서 0시간, 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간 동안 각각을 반응시켰다. 각 반응이 끝난 후 4°C , 1000rpm에서 원심 분리하여 상층액을 수거하고 1/10씩 단계 희석하였다. 단계 희석된 균주를 MacConkey (*E.coli*), XLD (*Salmonella*) 배지에 $50\mu\text{l}$ 씩 도말하여 37°C , 5% CO_2 분압 하에서 18시간 배양한 후 colony수를 계산하였다. 균 흡착력 시험에서는 대조군 및 kaolinite 처치군과 SoltoB 처리에 의한 군 간에 유의적이 차이가 확인되지 못하였다 (Figure 25). 하지만 균 성장 억제력 시험에서는 *Salmonella derby*, *S. Typhimurium* 09-2b 와 *E. coli*에서 SoltoB처리에 의해서 대조군에 비해 균성장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. (Figure 26).

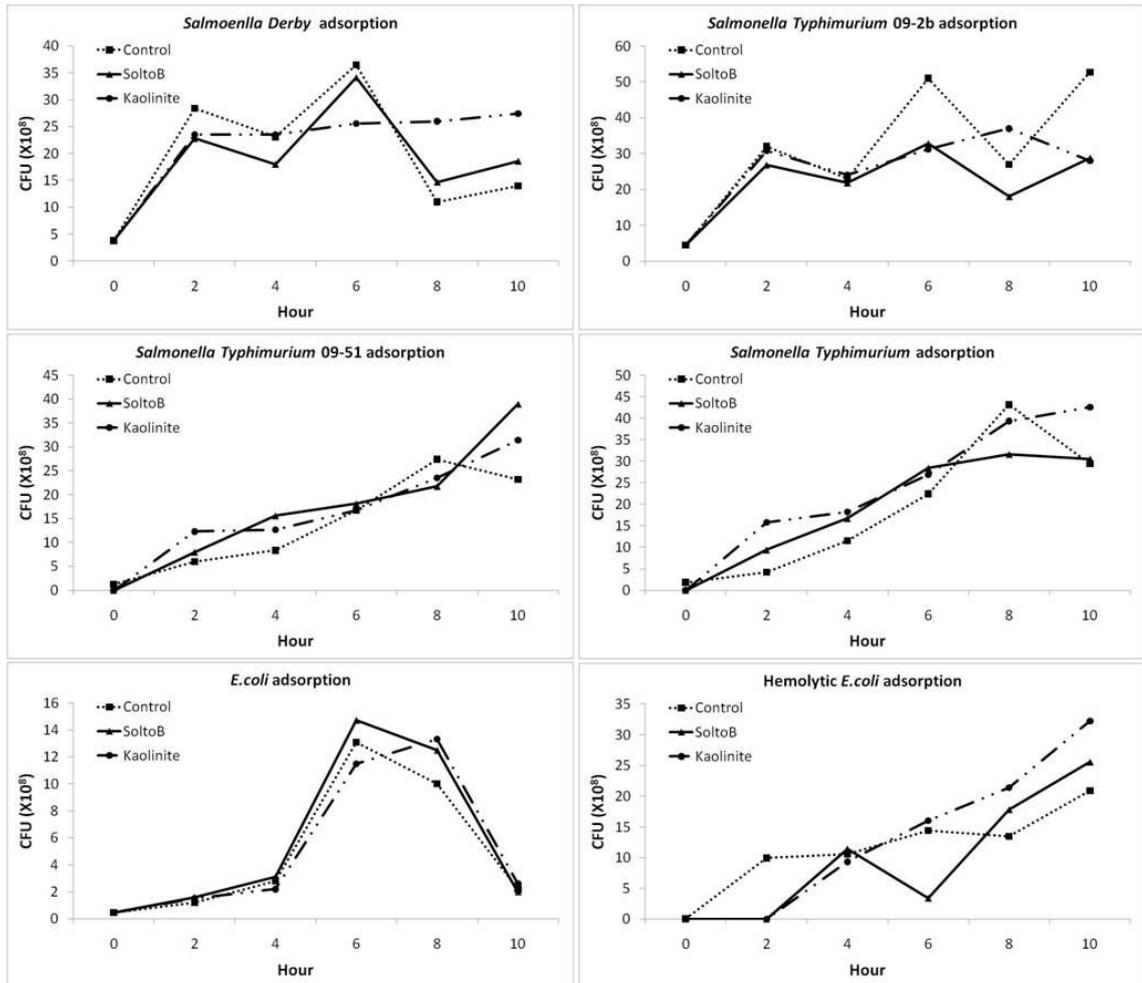


Figure 25. Adsorptive effect of SoltoB against bacterial diarrhea pathogens.

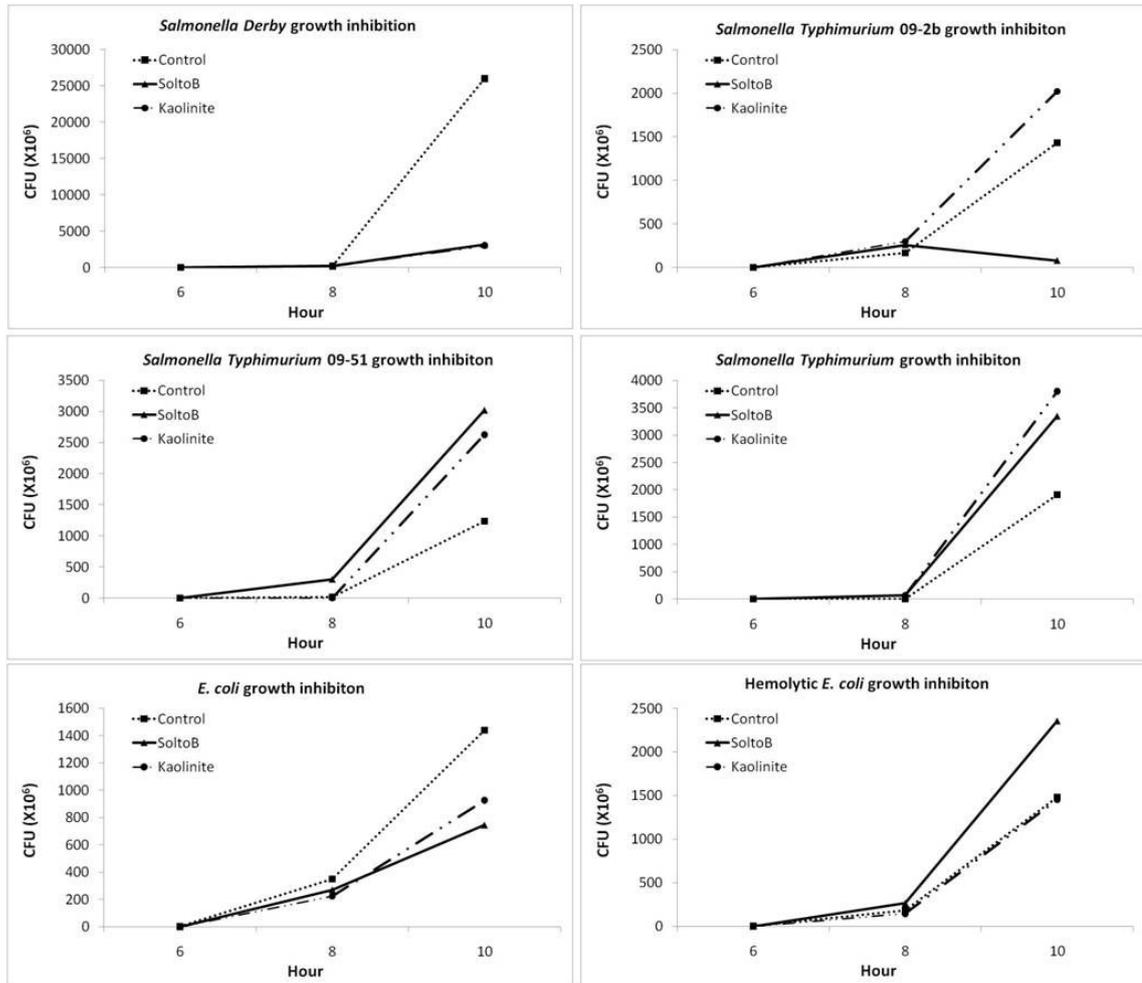


Figure 26. Growth inhibiting effect of SoltoB against bacterial diarrhea pathogens.

나. 송아지 세균성 및 바이러스성 호흡기 질병에 대한 SoltoB의 방어효과

(1) 세균성 병원체 공격 접종 모델 확립 및 공격균주 검출 기법 확립

(가). 공격 균주 모델 확립

송아지 호흡기 세균성 질병의 주원인체로 알려진 *Mannheimia haemolytica* serotype A1, *Pasteurella multocida* type A를 공격균주로 선발하였다. *Mannheimia haemolytica* serotype A1는 건강한 소의 호흡기에서도 분리되는 상재균이나 소의 면역력이 약해지거나 다른 질병에 감염되어 감수성이 증가할 경우 호흡기 감염을 일으켜 세균성 폐렴을 유발하는 원인체로 흔히 수송열의 원인체로 알려진 병원균이다. *Pasteurella multocida* type A 역시 일부 건강한 소에서 분리되며, *Mannheimia haemolytica* serotype A1과 같이 여러 가지 이유로 면역력이 약화되거나 질병의 저항성이 감소되는 환경, 또는 급작스런 환경변화로 인한 스트레스가 유발될 경우 호흡기 감염을 일으킨다.

(나) 공격균주 검출 기법 확립

각각 공격균주의 검출은 PCR을 통해서 검출하였다. 공격접종 후 nasal swab을 1ml의 PBS에 충분히 부유하고 부유된 PBS를 샘플로 공격균주를 검출하였다. 부유된 PBS 샘플 200 μ l를 채취하여 16,000 \times g, 3min 조건으로 원심분리하여 pellet에서 공격균주의 DNA를 추출하였다. 원심 분리된 pellet에 lysis buffer 500 μ l와 proteinase K (20mg/ml) 6 μ l를 넣고 55 $^{\circ}$ C, 30min incubation 한 뒤, 16,000 \times g, 3min 조건으로 원심분리하여 상층액을 채취한 뒤, 이후 상층액과 동량의 [phenol : chlorophorm : isoamyl alcoho] 시약을 넣어 균질화한 뒤 다시 16,000 \times g, 3min 조건으로 원심하여 투명한 상층액을 채취한 후 3M sodium acetate와 100% 에틸알코올로 상층액의 DNA를 농축시킨 뒤 이를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 공격균주 검출을 위해 사용된 PCR의 조건은 Table 7. Table 8와 같다.

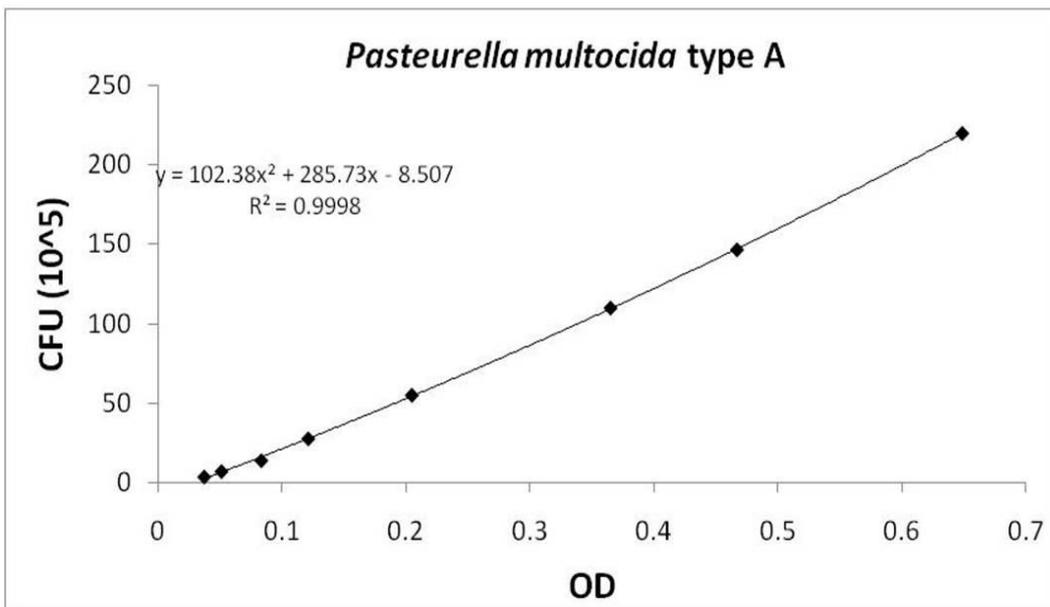
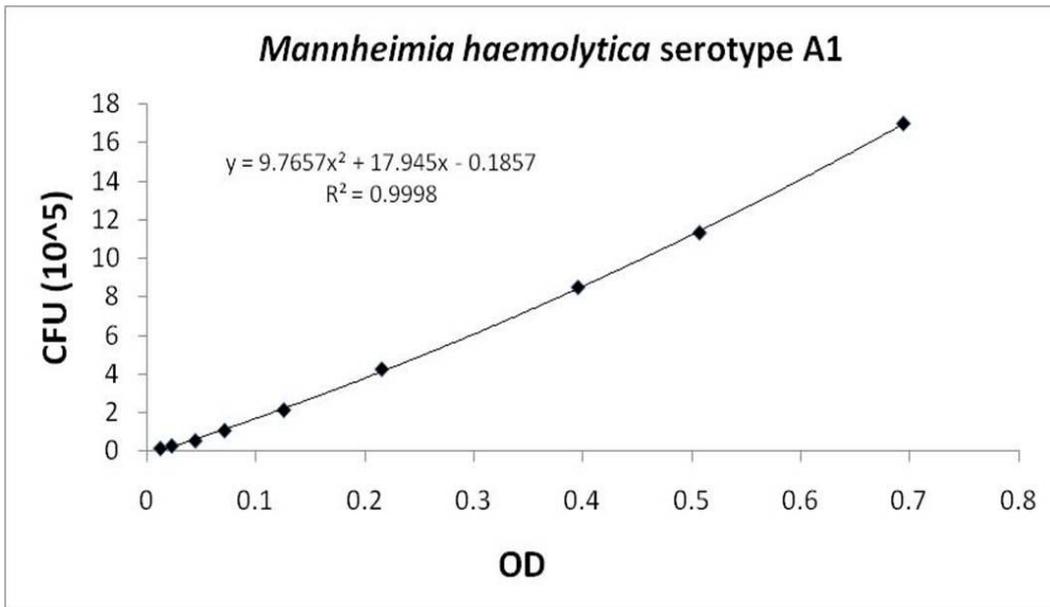


Figure 27. Correlation of Colony forming unit (CFU) with O.D.

Table 7. Multiplex PCR primer and condition for detecting *Mannheimia haemolytica* serotype A1.

Primer			Size
Lkt	F	GCAGGAGGTGATTATTTAAAGTGG	206 bp
	R	CAGCAGTTATTGTCATACCTGAAC	
HP	F	CGAGCAAGCACAATTACATTATGG	90 bp
	R	CACCGTCAAATTCCTGTGGATAAC	
16s	F	GCTAACTCCGTGCCAGCAG	~304 bp
	R	CGTGGACTACCAGGGTATCTAATC	
PCR condition for <i>Mannheimia haemolytica</i> serotype A1			
Template	1 μ l	95°C 15min	
10 \times MgCl ₂ free PCR buffer	2.5 μ l	94°C 30s	40 cycles
10mM dNTPs	1 μ l	60°C 30s	
10 pmol/ μ l each primer (F)	1.5 μ l	72°C 30s	
10 pmol/ μ l each primer (R)	1.5 μ l		
MgCl ₂ 25mM	3 μ l		
5U/ μ l Taq	1 μ l	72°C 10min	
D.W	13.5 μ l		

Table 8. PCR primer and condition for detecting *Pasteurella multocida* type A.

Primer			Size
HyaD–Hya C	F	TGCCAAAATCGCAGTCAG	1,044 bp
	R	TTGCCATCATTGTCAGTG	
PCR condition for <i>Pasteurella multocida</i> type A			
Template	1 μ l	95°C 5min	
10 \times PCR buffer	2.5 μ l	95°C 30s	30 cycles
10mM dNTPs	1 μ l	55°C 30s	
10 pmol/ μ l primer (F)	1 μ l	72°C 30s	
10 pmol/ μ l primer (R)	1 μ l		
5U/ μ l Taq	0.1 μ l	72°C 5min	
D.W	18.4 μ l		

(2). 송아지의 바이러스성 호흡기 원인체의 검출 기법 확립

(가) Bovine herpesvirus 1

① 접종실험하기 위한 소 허피스바이러스 배양액 확보

㉠ 허피스바이러스 배양은 MDBK cell에 배양하여 사용함.

· MDBK cell을 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum) 와 1% (v/v) antibiotics 가 첨가 되어있는 EMEM배지를 이용하여 monolayer로 배양하였음.

· Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1)를 0.1 MOI로 Monolayer confluent로 성장한 MDBK cell에 접종한다.

· 1시간동안 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하며 10분 간격으로 rocking을 실시한다.

· 1% (v/v) antibiotics가 함유된 alpha-MEM배지를 첨가하고 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하여 virus를 증식시킨다.

㉡ 바이러스 농도를 1X 10⁸ PFU/ml 이상 되도록 배양하여 총 2L의 배양액 확보

② Real-time PCR법 확립

㉠ 바이러스 농도측정을 위해서 Real-time PCR법을 확립

· Plasmid DNA standard 구성

- BRV로부터 viral RNA 추출이후, 아래 primer set으로 PCR 증폭을 실시하였다

Rotavirus fwd:

5'-TGT GGA CCT AAA CCT CAC GGT-3'

Rotavirus rev:

5'-GTA GTC GAG CAG ACC CGT GTC-3'

- 증폭된 PCR product를 pGEM-T easy vector에 TA cloning을 실시.

- 재구성된 plasmid를 10^6-10^0 copies으로 10-fold dilution하여 real-time PCR의 standard로 사용하였다.

· Real-time PCR amplification

- 분변 시료에서 분리해낸 viral RNA를 이용하여 Real-time PCR을 실시한다.
- primer와 probe의 sequence는 다음과 같다.
- fwd: 5'-TGT GGA CCT AAA CCT CAC GGT-3'
- rev: 5'-GTA GTC GAG CAG ACC CGT GTC-3'
- probe:
5'-FAM-AGG ACC GCG AGT TCT TGC CGC-TAMRA-3'
- Real-time PCR thermal cycling condition은 다음과 같다.
: 2min at 50°C, 10min at 95°C, and 40 cycles of 15s at 95°C and 1min at 60°C

- ㉞ 비강 swab과 각 조직에서 RNA를 추출하여 real-time PCR을 이용하여 분변에서 분비되는 바이러스양을 측정함.

(3) 공격접종 실험군 분리

- 공시동물 : 3개월령 송아지 (국내 사육 한우), 6두
- 실험 전 특정 질병 조사
 - 호흡기 질병이 관찰되지 않음을 확인
 - 비강 swab 샘플을 통해 공격 접종할 병원체가 동정되지 않음을 확인
 - 무처치 대조군, SoltoB 첨가군으로 분류
- 각 실험군의 송아지는 격리되어 상호 감염을 차단

(3). 송아지에 세균성 및 바이러스성 호흡기 질병 원인체 동시 인공감

(가) 공격접종 실험군 분리 (Figure 28)

- 대조군 (3두) : 일반사료와 수도수를 실험 전(全)기간 동안 자유 급여
- SoltoB 첨가군 (3두) : 0.5% (w/w) SoltoB를 첨가한 사료와 수도수를 실험 전(全)기간 동안 자유급여
- 대조군과 SoltoB 첨가군은 각 군의 사료에 1주일간 적응 기간을 거치고 인공 감염 실험 실시.
- 공격접종은 총 3일에 걸쳐 24시간 주기로 실시하였으며, 실제 야외 감염과 동일한 조건을 구현하기 위하여 비강에 병원체를 분무하는 형태로 공격접종이 이루어 졌다.
- 본 공격 접종 실험은 전남대학교 용봉캠퍼서 동물실험윤리위원회의 승인을 얻어 실시함 (승인번호: CNU IACUC-YB-2010-1).



Figure 28. 입식 첫째날. 입식 후 계류를 시킴

(나) 공격접종 및 공격 접종 후 임상 증상 관찰 및 분석

1) 공격접종 후 임상 증상 관찰 및 분석

공격접종 이후 임상 증상은 24시간을 주기로 측정하였으며 기침 정도, 콧물 분비 정도, 호흡수, 체온을 Table 9을 기준으로 측정하여 각각 점수화 하였다. 공격접종을 실시하기 전에 모든 송아지는 정상 체온을 유지하고, 기침의 증상이 관찰되지 않았으며, 호흡수도 정상범위를 유지하

였다. 하지만 공격접종 이후 전 송아지에서 체온이 증가하고 기침의 횟수가 증가였으며, 호흡수가 증가하는 경향을 나타내었다. SoltoB 투여군은 대조군에 비해 공격접종 이후 체온의 증가가 크지 않았으며, 호흡수 역시 대조군에 비해 낮게 관찰되었다. 특히 호흡수의 경우 SoltoB 투여군은 대조군에 비해 낮게 관찰되었으며, 공격접종을 완료한지 2일이 지난 뒤에는 거의 정상범위를 회복하여, 대조군이 4일이 지난 뒤부터 정상범위를 회복한 것에 비해 빠르게 회복하는 경향을 보여 주었다 (Figure 29).

Table 9. The clinical sign scoring criteria.

Sign	Description	Score
Temperature	38.0–39.5°C	0
	39.5–40.0°C	1
	40.0–40.5°C	2
	40.51–41.0°C	3
	41.0°C>	4
Degree of nasal discharge	Absent	0
	Mild	1
	Moderate	2
	Severe	3
Cough frequency degree	Absent	0
	Mild	1
	Moderate	2
Respiratory rate	< 50	0
	50–60	1
	60–70	2
	70–80	3
	80 >	4

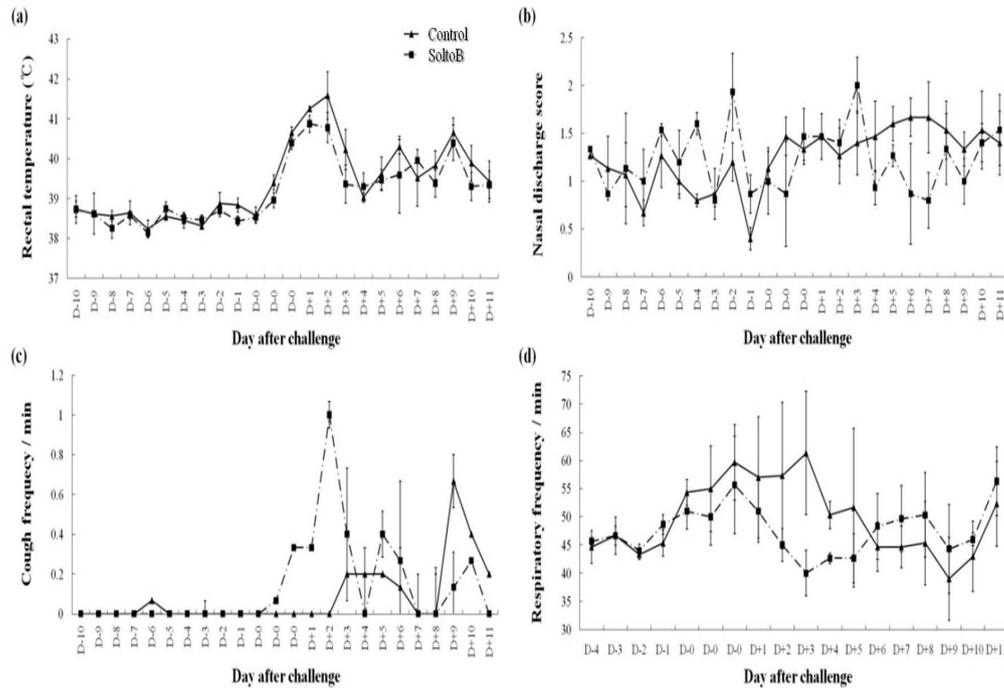


Figure 29. The changes of clinical signs before and after challenge. (a) rectal temperature, (b) nasal discharge score, (c) cough frequency rate (rate/min), (d) respiratory rate (rate/min). All experimentally infected calves showed increasing rectal temperature from D-0 to D+3 and SoltoB group showed lower rectal temperature than control group. The higher respiratory rate than SoltoB group is observed in control group from D-0 to D+5.

(다) 공격 접종 후 호흡기에서 분리되는 공격 병원체 및 total bacteria 측정

공격 접종 후 48시간 주기로 송아지 비강 swab 샘플을 1ml의 멸균 PBS에 부유시킨 후 DNA를 추출하여 PCR을 통해서 *Mannheimia haemolytica* serotype A1 및 *Pasteurella multocida* type A를 동정하였으며 swab 샘플이 부유된 PBS를 10진 단계희석한 후 희석된 샘플을 Blood agar plate (BAP) 및 Chocolate agar plate에 50 μ l 접종한

뒤 균질 도말하여 형성된 CFU를 counting하여 total bacteria CFU를 측정하였다. 공격 접종 이후 SoltoB 투여군의 경우 송아지 1두에서 *Mannheimia haemolytica* serotype A1 감염이 확인되었으며, 반면 대조군의 경우 3두 모든 송아지에서 *Mannheimia haemolytica* serotype A1의 감염이 확인되었다. 이는 면역 증강 효과를 지닌 SoltoB의 투여에 따라 SoltoB 투여군의 송아지가 대조군의 송아지에 비해 면역력이 증가하여 세균감염에 저항성이 유도된 결과로 보아진다. 반면 *Pasteurella multocida* type A의 경우 3차에 걸친 공격 접종 후에도 비강을 통해서 공격 접종 균이 분리 동정되지 않았다. 공격 접종 이후 송아지 비강에서 분리된 total bacteria 수는 SoltoB 투여군과 대조군 사이에 큰 차이는 보이지 않았으나 SoltoB 투여군의 AUC 값이 38.3 ± 0.7 으로 대조군 AUC 값인 41.3 ± 0.5 에 비해 낮게 관찰되었다 (Figure 30).

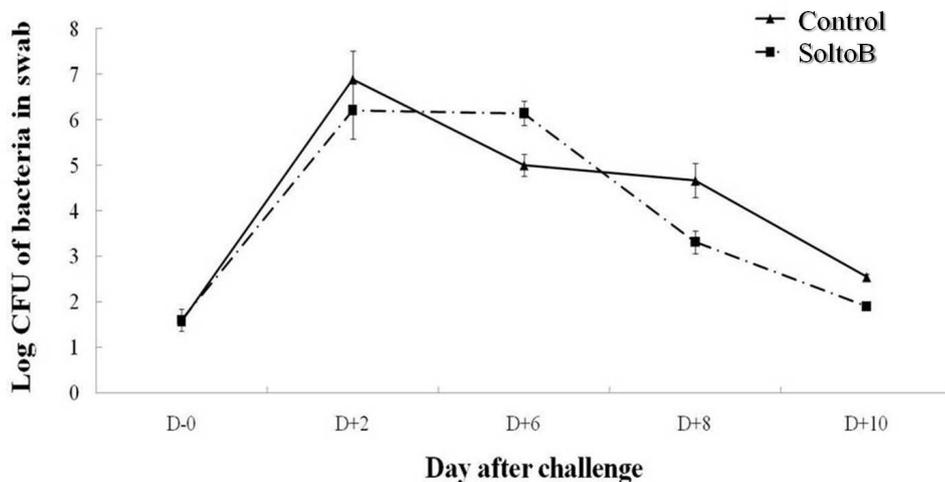


Figure 30 Clearance of total bacteria in experimentally infected calves. Compared with the control group, the number of total bacteria isolated from nasal discharge in the SoltoB group seems to be similar, but higher AUC than in the SoltoB group is observed in the control group. The AUC of control and SoltoB groups was 41.3 ± 0.5 and 38.3 ± 0.7 , respectively.

(라) 공격 접종 이후 호흡기 조직에 분리되는 공격 병원체 측정

공격접종이 완료된 뒤 12일 후 부검을 통해 기관지와 폐를 분리한 뒤 각각의 기관에서 분리되는 *Mannheimia haemolytica* serotype A1과 *Pasteurella multocida* type A를 real time PCR 및 PCR를 통해 분리 동정, 정량화하였다. 부검을 통해 얻어진 각각의 조직 1g을 9ml의 멸균 PBS에 균질화하여, 이를 샘플로 하여 10진 단계 희석한 뒤, 각각 1g에 존재하는 공격 병원체의 양을 정량화하고 병원체를 동정하였다. *Pasteurella multocida* type A의 경우 SoltoB 투여군 및 대조군의 기관지 및 폐에서 동정이 되지 않았으며, *Mannheimia haemolytica* serotype A1의 경우 대조군 중 한 마리의 송아지 폐에서만 동정되었다. 이는 공격 접종 이후 12일이 지나 회복기에 접어들었기 때문으로 보인다. 이러한 결과는 임상증상을 점수화하였을 때 SoltoB 투여군이 대조군에 비해 더 완화된 임상증상을 보였던 것과 일치하는 결과이다.

(마) 공격 접종 후 호흡기에서 분리되는 viral titer 측정

공격 접종 후 48시간 주기로 송아지 비강 swab이 부유된 PBS에서 RNA를 추출하여 real time PCR을 통해 Bovine herpes virus-1 (BHV-1)를 분리 동정하였으며, genome quantification을 수행하였다. BHV-1의 경우 공격접종 이 후 4일째까지는 대조군과 SoltoB 투여군 간의 차이가 보이지 않았으나 공격접종 4일 이 후에는 SoltoB 투여군이 대조군에 비해 낮은 genome quantity를 보이면서 감소하였다 (Figure 31).

(바) 공격 접종 이후 호흡기 조직에 분리되는 viral titer 측정

공격접종이 완료된 뒤 12일 후 부검을 통해 기관지와 폐를 분리한 뒤 각각의 기관에서 분리되는 BHV-1 genome를 real time PCR을 통해 분리 동정, 정량화하였다. 부검을 통해 얻어진 각각의 조직 1g을 9ml의 멸균 PBS에 균질화하여, 이를 샘플로 하여 10진 단계 희석한 뒤, 각각 1g

에 존재하는 공격 병원체의 양을 정량화하고 병원체를 동정하였다. BHV-1의 경우 SoltoB 투여군의 폐에서 대조군보다 높은 genome quantity를 보였으며, 기관지에서는 대조군이 SoltoB 투여군 보다 높은 genome를 보였다 (Figure 32). 이는 SoltoB 투여군의 폐에 대조군보다 많은 virus의 양이 있음에도 대조군보다 더 적은 양의 virus를 기관지로 shedding했기 때문인 것으로 보인다. 선행된 논문에서는 virus shedding과 관련하여 임상증상이 뚜렷이 나타나고 예후가 불량할 경우 virus shedding 양이 증가함을 제시하고 있어 SoltoB 투여군이 대조군보다도 같은 virus 병원체에 노출되고 감염되었을 때 적은 양의 virus를 shedding 하고 임상증상도 더 완화된 나타냄을 간접적으로 제시한다. 이러한 결과는 임상증상을 점수화하였을 때 SoltoB 투여군이 대조군에 비해 더 완화된 임상증상을 보였던 것과 일치하는 결과이다.

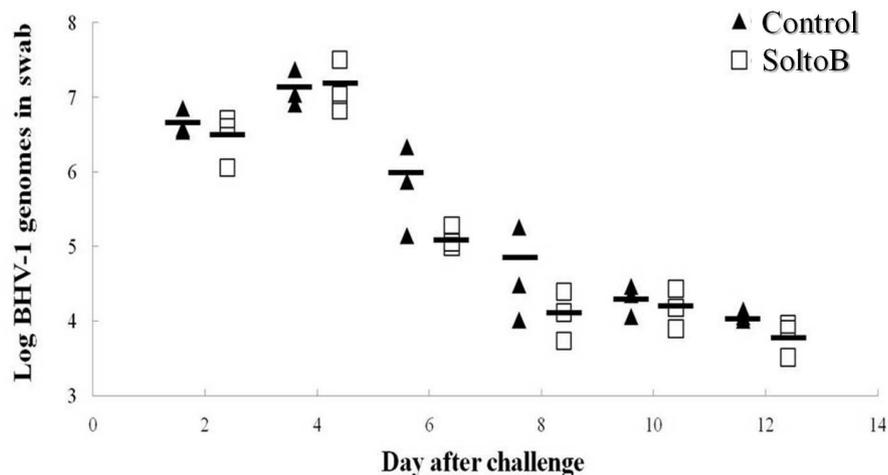


Figure 31. Clearance of BHV-1 in experimentally infected calves. The load of BHV-1 genomes in nasal swab samples gradually decreases from D+4. The SoltoB group shows lower quantity than the control group.

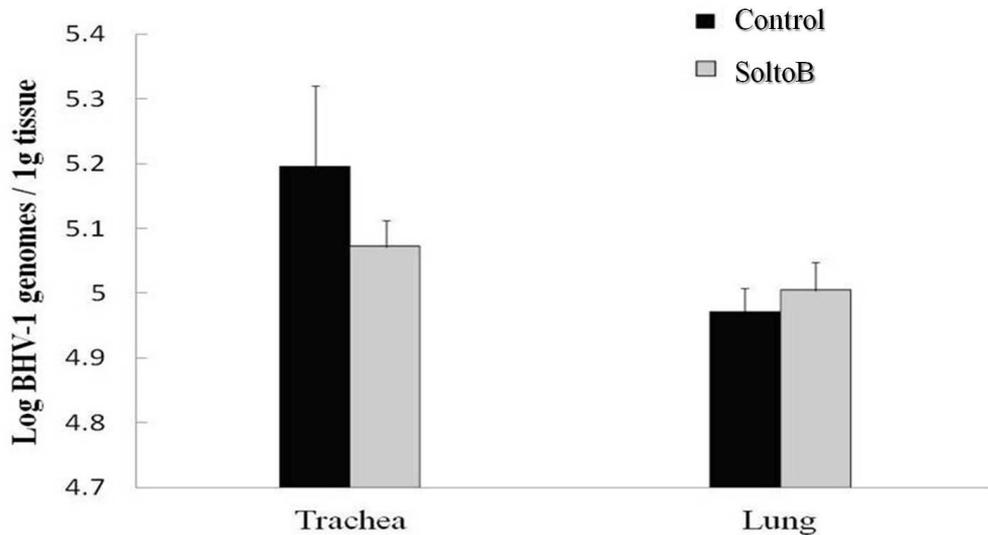


Figure 32. Quantity of BHV-1 genomes in trachea and lung at post-mortem. While SoltoB group shows higher quantity of BHV-1 genomes than control group in lung, a lower quantity than in the control group is observed in trachea of SoltoB group.

(사) 공격 접종 이후 부검 소견

공격접종으로 폐렴이 유발된 각각의 송아지의 병변은 주로 apical lobe 쪽에 집중적으로 관찰되었다 (Figure 33). Apical lobe에서 명확하게 병변이 관찰되었으며 이후 caudal쪽의 폐로 갈수록 병변은 완화되어 관찰되었다. 각 병변은 주로 폐 congestion을 동반하며, 어두운 자주빛에서 연한 갈색을 띠었으며, 축진 시 정상 부위의 폐보다 hepatization으로 인해 견고하게 축진되었다. SoltoB 투여군의 폐의 경우 apical lobe에 공격접종으로 인한 폐렴이 유발되어 병변이 집중되어 있었으며, 전체 폐면적에서 병변이 차지하는 비율이 대조군에 비해 낮게 관찰되었다 (Figure 33). SoltoB 투여군의 경우 전체폐의 면적에서 병변이 차지하는 비율은 $10.2\% \pm 3.0$ 였으며, 대조군의 경우 $34.8\% \pm 4.6$ 로 유의적인 차이를 보였다 (Figure 34) ($p < 0.01$).

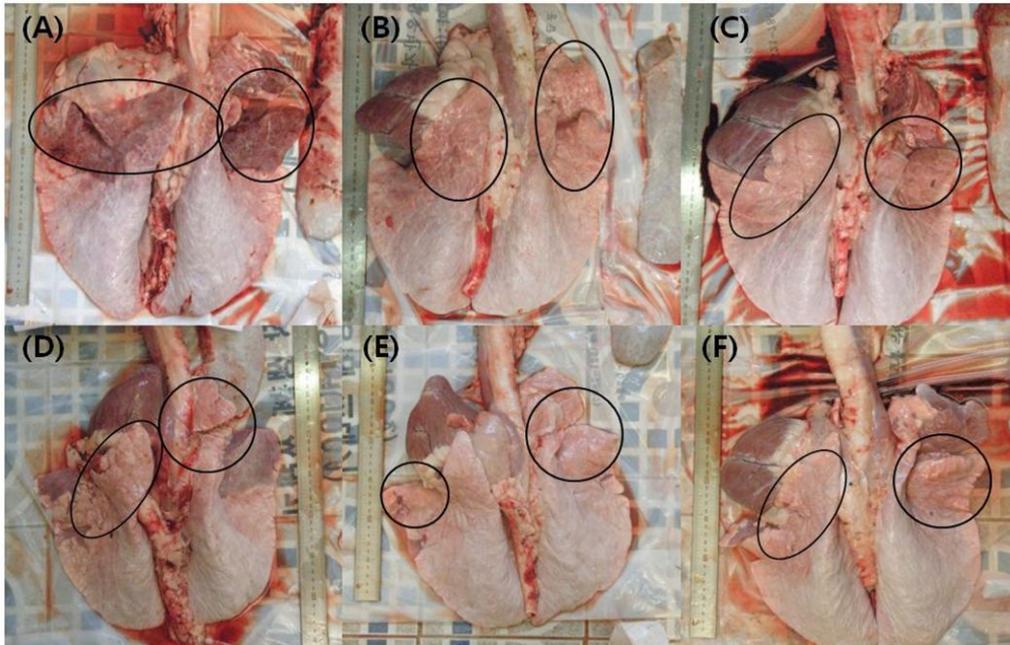


Figure 33. (A), (B), and (C) Lesion of lung after challenge in the control group. (D), (E) and (F) Lesion of lung after challenge in the SoltoB group. The black circles indicate typical lung lesions by infection. The control group shows severer lesion than SoltoB group.

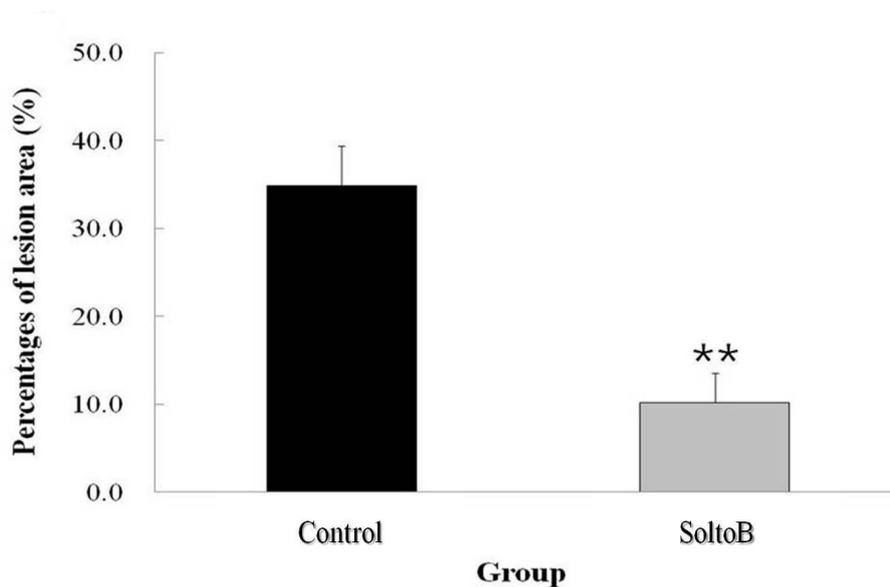


Figure 34. Percentages of superficial lesion area in experimentally infected calves. The SoltoB group shows significantly lower percentages of lesion area than the control group ($p < 0.01$).

(아) 공격 접종 이후 조직학적 검사

① 조직학적 검사

부검을 통해 얻어진 폐조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 H&E 염색을 실시하여 조직병리학적 분석을 수행하였다. 각각 관찰된 조직병리학적 병변은 Table 10를 기준으로 점수화 하여 SoltoB 투여군과 대조군의 병변의 차이를 분석하였다. Table 10의 점수화는 0에서 6점 사이에 이루어지며, 점수가 높을 수록 강한 병변을 의미한다. SoltoB 투여군과 대조군은 모두 조직병리학적으로 공격접종에 의해 type 2 pneumocyte hypertrophy 및 hyperlasia와 alveolar wall thickening과 neutrophil filtration이 관찰되었다. 반면 SoltoB 투여군의 경우 조직병리학적 병변이 대조군에 비해 완화되어 관찰되었고, 기관지내 neutrophil filtration은 대조군에 비해 현격히 감소하여 관찰되었다. 세균성 폐렴의 전형적인 특징인 bronchopneumonia에서 쉽게 관찰되는 기관지내 neutrophil filtration이 SoltoB 투여군에서 낮게 관찰된 것은 SoltoB 투여로 인해 면역력이 증가하여 virus 감염 이후 2차적으로 세균감염에 대한 저항성이 증가하여 공격접종에도 불구하고 세균성 폐렴이 완화되어 나타났기 때문인 것으로 보인다. Table 10를 바탕으로 평가된 조직병리학적 병변 점수 분석에서도 SoltoB 투여군은 2.06 ± 0.23 으로 대조군의 4.55 ± 0.22 에 유의적인 차이를 보였다 (Figure 35).

Table 10. The histopathological sign score criteria.

Description	Score
normal	0
mild multifocal	1
mild diffuse	2
moderate multifocal	3
moderate diffuse	4
severe multifocal	5
severe diffuse	6

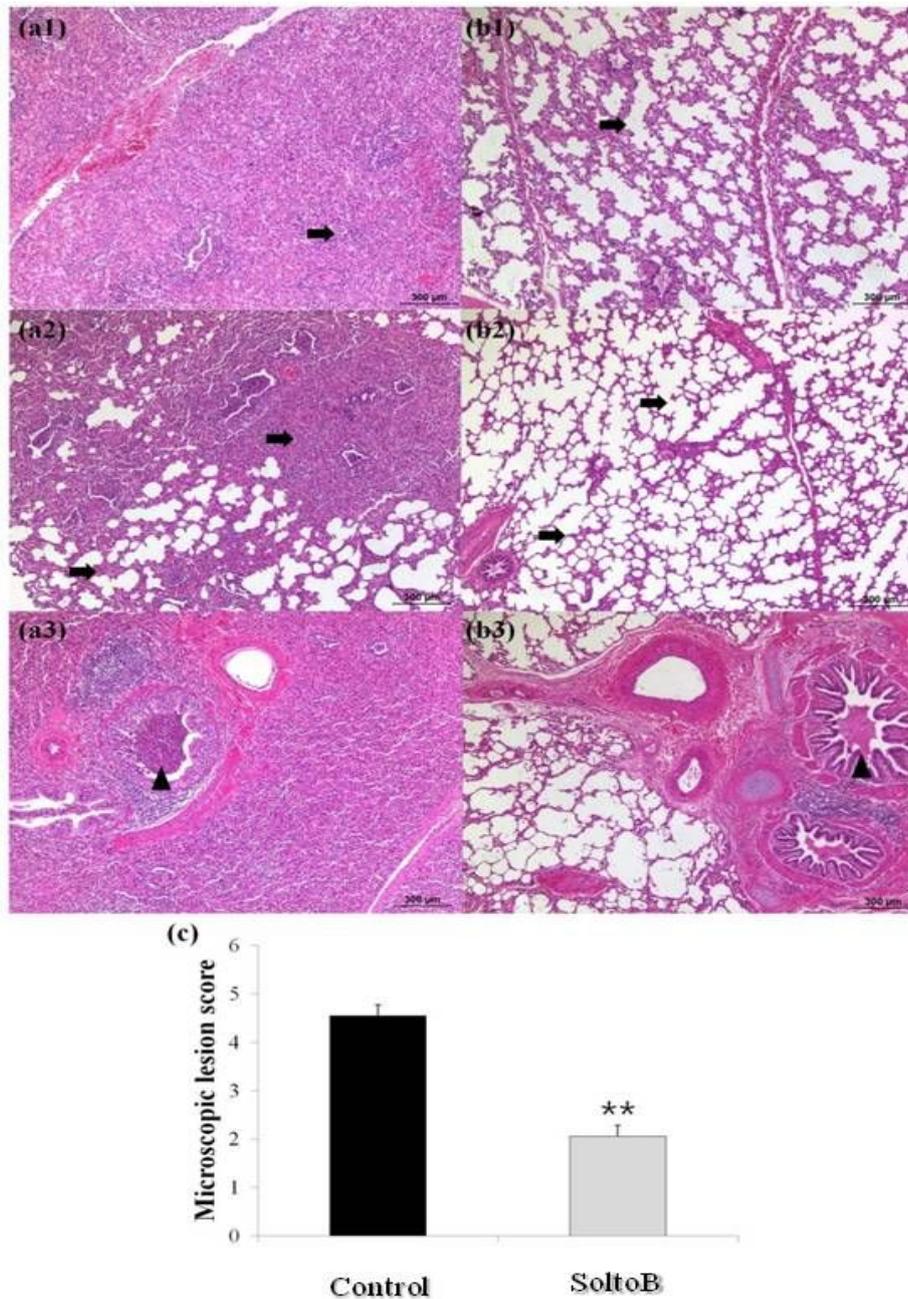


Figure 35. Histopathological features of lung tissue samples and microscopic lesion score in challenged calves. Severe neutrophils filtration and thickened alveolar septa are observed in lungs of the control group (arrows in a1 and a2) compared with the germanium biotite group (arrows in b1 and b2). Bronchiole also contains numerous neutrophils (arrowhead in a3) compared with the germanium biotite group (arrowhead in b3). The microscopic lesion scores were significantly different between the two groups ($p < 0.01$).

제 3 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

연차	목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1 차 년 도	SoltoB의 면역증강효과를 규명	▶마우스 비장 세포배양법으로 면역 유도 활성 평가	100%
	송아지에서 세균성 설사에 대한 SoltoB의 방어효과를 확인	▶국내 송아지세균성 설사 원인체 분석 ▶송아지 인공감염을 위한 균주 선발 및 감염 모델 확립 ▶ <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> 을 송아지에 인공감염 시킨 후 임상증상의 확인 및 분변 내 감염균주 감소 효과 분석	100%
	송아지에서 바이러스성 설사에 대한 soltoB의 방어효과를 확인	▶송아지의 바이러스성 설사 원인체의 검출 기법 확립 ▶Rota virus, Corona virus를 송아지에 인공감염 시킨 후 임상증상의 확인 및 분변 내 인공감염 바이러스 분리정도 평가	100%
2 차 년 도	설사유발 세균에 대한 SoltoB의 흡착효과를 확인	▶송아지 설사 유발 세균성 병원체에 대한 SoltoB의 흡착력과 성장 억제력 평가	100%
	송아지 호흡기성 세균에 대한 SoltoB의 방어효과를 확인	▶SoltoB를 급여한 송아지에서 세균성 호흡기 질병에 대한 항병력 증가 분석을 위한 인공감염 실험 ▶임상증상 및 호흡기에서 분비되는 세균의 양 측정	100%
	송아지 호흡기 IBR 바이러스에 대한 soltoB의 방어효과를 확인	▶SoltoB를 급여한 송아지에서 바이러스성 호흡기질병 (IBR)에 대한 항병력 증가 분석을 위한 인공 감염 실험 ▶임상증상 및 각 장기에 존재하는 바이러스의 양 측정	100%

제 2 절 관련분야에의 기여도

- 항생제 내성균에 대한 문제가 제기되면서 항생제 사용의 법적인 규제가 이루어지고 있으며 이에 따른 대체물질에 대한 연구가 진행되고 있다.
- 이번 연구에서 SoltoB의 세균의 흡착력 및 면역력 증강 효과를 규명하였으며, 특히 송아지 호흡기 및 소화기 질병 예방 효과를 규명하는 통합적 연구가 수행되었다.
- 본 시험결과를 토대로 최근 필요시 되고 있는 항생제 대체제로써의 가능성을 가늠해볼 수 있었으며, 본 연구에서 사용된 Solto B의 양축농가에 서의 이용을 통해 농가생산성 향상 및 질병감염으로부터의 예방에 의한 생산비 절감효과가 있을 것으로 사료된다.

제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 산업화 계획

1. 사업추진 전략

가. OFF 라인 전략

- 대형 유통업체와 독점 공급 조건으로 Solto B 판매
- 마케팅을 통한 양돈농가 방문 판매
- 사료 제조업체와의 협약을 통한 유통망 확대

나. ON 라인 전략

- (주)서봉바이오베스텍의 웹홈페이지 및 블로그 상에서의 홍보

제 2 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 본 연구에서는 송아지에서 실험이 진행되었으나, 최근 브랜드육의 개발 및 생산이 필수불가결한 국내 육우 시장 상황으로 볼 때 비육우에서의 연구를 통해 면역력과 항병력 뿐만 아니라 육질에서의 효과까지 실험을 진행할 필요가 있다고 사료된다.
- 또한, 송아지 뿐만아니라 산란계와 육계에 있어서도 연구가 진행될 필요가 있다고 본다.

제 5 장 참고 문헌

1. Abril, C., Engels, M., Liman, A., Hilbe, M., Albini, S., Franchini, M., Suter, M. and Ackermann, M. 2004. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *Journal of virology* **78**:3644.
2. Aikoh, T., Tomokuni, A., Matsukii, T., Hyodoh, F., Ueki, H., Otsuki, T. and Ueki, A. 1998. Activation-induced cell death in human peripheral blood lymphocytes after stimulation with silicate in vitro. *International journal of oncology* **12**:1355.
3. Alexander, T.W., Cook, S.R., Yanke, L.J., Booker, C.W., Morley, P.S., Read, R.R., Gow, S.P. and McAllister, T.A. 2008. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. *Veterinary microbiology* **130**:165-175.
4. Angen, Ø, Thomsen, J., Larsen, L.E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P.M.H. and Enemark, J. 2009. Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Veterinary microbiology* **137**:165-171.
5. Autio, T., Pohjanvirta, T., Holopainen, R., Rikula, U., Pentikainen, J., Huovilainen, A., Rusanen, H., Soveri, T., Sihvonen, L. and Pelkonen, S. 2007. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Vet Microbiol* **119**:256-265.
6. Bosch, JC, Kaashoek, MJ, Kroese, AH and Van Oirschot, JT. 1996. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker

- vaccines. *Veterinary microbiology* **52**:223–234.
7. Cromwell, G.L. 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology* **13**:7–27.
 8. Dowling, A., Hodgson, J.C., Schock, A., Donachie, W., Eckersall, P.D. and McKendrick, I.J. 2002. Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A: 3. *Research in veterinary science* **73**:37–44.
 9. Fulton, R.W. 2009. Bovine respiratory disease research (1983–2009). *Animal Health Research Reviews* **10**:131–139.
 10. Hanzlicek, G.A., White, B.J., Mosier, D., Renter, D.G. and Anderson, D.E. 2010. Serial evaluation of physiologic, pathological, and behavioral changes related to disease progression of experimentally induced *Mannheimia haemolytica* pneumonia in postweaned calves. *American journal of veterinary research* **71**:359–369.
 11. Hinkley, S., Hill, A.B. and Srikumaran, S. 1998. Bovine herpesvirus-1 infection affects the peptide transport activity in bovine cells. *Virus research* **53**:91–96.
 12. Hodgson, J.C., Barclay, G.R., Hay, L.A., Moon, G.M. and Poxton, I.R. 1995. Prophylactic use of human endotoxin core hyperimmune gammaglobulin to prevent endotoxaemia in colostrum deprived, gnotobiotic lambs challenged orally with *Escherichia coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **11**:171–180.
 13. Holian, A., Uthman, M.O., Goltsova, T., Brown, S.D. and Hamilton Jr, R.F. 1997. Asbestos and silica-induced changes in human alveolar macrophage phenotype. *Environmental Health Perspectives* **105**:1139.

14. Irsik, M., Langemeier, M., Schroeder, T., Spire, M. and Roder, JD. 2006. Estimating the effects of animal health on the performance of feedlot cattle. *Bovine Practitioner* **40**:65.
15. Jones, C. and Chowdhury, S. 2007. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews* **8**:187-205.
16. Jung, B.G., Toan, N.T., Cho, S.J., Ko, J., Jung, Y.K. and Lee, B.J. 2010. Dietary aluminosilicate supplement enhances immune activity in mice and reinforces clearance of porcine circovirus type 2 in experimentally infected pigs. *Veterinary microbiology* **143**:117-125.
17. Kaashoek, M.J., Moerman, A., Madi, J., Weerdmeester, K., Maris-Veldhuis, M., Rijsewijk, F.A.M. and van Oirschot, J.T. 1995. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine* **13**:342-346.
18. Kaashoek, MJ, Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, FAM, Quak, J., Gielkens, ALJ and Van Oirschot, JT. 1994. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine* **12**:439-444.
19. Kamphues, J. 1999. Antibiotic growth promoters for the view of animal nutrition. *Berliner und Munchenertierarztliche Wochenschrift* **112**:370.
20. Lovato, L., Inman, M., Henderson, G., Doster, A. and Jones, C. 2003. Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain

- that contains a mutation in the latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *Journal of virology* **77**:4848.
21. Muhl, A. and Liebert, F. 2007. Growth and parameters of microflora in intestinal and faecal samples of piglets due to application of a phytogenic feed additive. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **91**:411–418.
 22. Neu, H. C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**:1064–1073.
 23. Opriessnig, T., Thacker, EL, Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J. and Halbur, PG. 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology Online* **41**:624.
 24. Rice, JA, Carrasco-Medina, L., Hodgins, DC and Shewen, PE. 2007. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews* **8**:117–128.
 25. Rodriguez-Fuentes, G., Barrios, MA, Iraizoz, A., Perdomo, I. and Cedre, B. 1997. Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite. *Zeolites* **19**:441–448.
 26. Sarker, MSK, Kim, GM and Yang, CJ. 2010. Effect of green tea and biotite on performance, meat quality and organ development in ross broiler. *Egypt Poultry Science Journal* **30**:77–88.
 27. sub Song, D., Moon, H.J., Jung, K., Yeom, M.J., Kim, H.K., Han, S.Y., An, D.J., Oh, J.S., Kim, J.M. and Park, B.K. 2011. Association between nasal shedding and fever that influenza A (H3N2) induces in dogs. *Virology Journal* **8**:1.
 28. Suh, D.K. and Song, J.C. 2005. Simultaneous detection of

- Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae and Salmonella spp. in swine intestinal specimens by multiplex polymerase chain reaction. *Journal of veterinary science* **6**:231.
29. Ueki, A., Yamaguchi, M., Ueki, H., Watanabe, Y., Ohsawa, G., Kinugawa, K., Kawakami, Y. and Hyodoh, F. 1994. Polyclonal human T-cell activation by silicate in vitro. *Immunology* **82**:332.
30. van den Bogaard, A.E. and Stobberingh, E.E. 1999. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs* **58**:589–607.
31. Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zraly, Z. and Pavlik, I. 2010. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. *Veterinarni Medicina* **55**:199–224.
32. Yu, D.J., Na, J.C., Kim, T.H., Kim, S.H. and Lee, S.J. 2004. Effect of Supplementation of Complex Probiotics on Performances, Physio-chemical Properties of Meat and Intestinal Microflora in Broiler. *Journal of Animal Science and Technology* **46**:593–602.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.