

최 중
연구보고서

ELISA 진단법을 응용한 돼지 다발성 장막염
(글래써씨병)의 진단기법확립 및 백신개발

DEVELOPMENT OF ELISA DIAGNOSTIC KIT AND VACCINES
FOR PORCINE POLYSEROSITIS (GLASSER'S DISEASE)

주 관 연구 기 관

(주) 제일바이오

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “ELISA 진단기법을 응용한 돼지 다발성 장막염 (글래씨씨병) 의 진단기법확립 및 백신 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 6 일

주관연구기관명 : (주)제일바이오

총괄연구책임자 : 양 호 석

세부연구책임자 : 양 호 석

책임 연구원 : 강 구 환

선 임 연구원 : 한 태 욱

선 임 연구원 : 김 현 일

연 구 원 : 윤 병 필

연 구 원 : 박 경 필

연 구 원 : 박 찬 희

연 구 원 : 조 현 아

연 구 원 : 김 성 훈

연 구 원 : 양 지 현

요 약 문

I. 제 목

ELISA 진단기법을 응용한 돼지 다발성장막염(글래써씨병)의 진단기법확립 및 백신 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

돼지 다발성 장막염(글래써씨 병)은 헤모필러스 파라수이스(*Haemophilus parasuis*)에 의해 유발되는 질병으로 전세계적으로 문제가 되고 있으며 특히 사양관리가 비교적 양호한 돈군에서도 폭발적인 발생이 가능하기 때문에 수의 공중보건학적으로 매우 중요한 질병이라 하겠다. *H. parasuis*는 혈청형 2형을 항원으로 사용할 경우 1,2,4,5형에 대한 항체를 모두 검출할 수 있다는 결과(Nord Vet Med 1979 31(10):401-6)를 토대로 비교적 병원성이 높은 것으로 알려져 있는 균주와 국내에서 주로 검출되는 균주를 복합항원으로 사용해서 감염여부를 초기에 일회의 반응만으로 확인할 수 있는 진단키트를 개발하고자 하였다.

아울러 국내에서 유행하고 있는 야외균주를 분리, 혈청형을 규명하고 혈청형 표지에 관련된 단백질만을 고도로 정제하고 그것을 항원으로 사용하여 *Haemophilus* 감염 양상을 분석할 수 있는 진단키트를 개발하고자 한다. 뿐만 아니라 국내에서 문제되고 있는 균주의 혈청형을 빠른 시간 안에 쉽고 정확하게 분석하여 국내 유행 혈청형 기반 백신을 개발 하며, 더 나아가 국내에서 주로 문제되는 균주에 대해 예방 및 치료를 실시할 수 있게 하는데 그 목적이 있다.

2. 연구 개발의 필요성

돼지 다발성 장막염은 사양관리가 양호한 농장에서 오히려 문제가 되고 있으며 항체가 전혀 생성되어 있지 않은 돈군에서 폭발적으로 발생하는 양상을 보이고 있다. 미국, 캐나다, 유럽등지에서 다발하고 있고, 인접한 일본에서도 발생이 매년 보고되고 있는데 *H. parasuis*는 혈청형에 따라 병변이 크게 달라지는 것은 이미 알려진 사실이다. Morozumi와 Nicolet 등은 1986년 병변별로 검출된 균종들이 서로 다른 특징을 가지고 있다는 현상에 착안하여, 세균 추출물을 이용, 한천 겔 침강반응을 통해 7가지 이상의 혈청형이 있음을 알게 되었다. 이미 북미, 유럽, 호주, 일본등지에서는 호발 혈청형이 보고되어 있으나 국내의 경우 균분리 및 동정이 제대로 이루어지지 않아 혈청형에 대한 파악이 미흡한 실정이다. 또한 현재 국내에서 주로 많이 사용되는 혈청학적 방법은 보체결합 반응이나 한천겔 침강반응등인데 이들은 대량의 혈청을 신속, 정확하게 진단하는 데 한계를 가지고 있다. 아직까지 국내의 혈청학적인 조사 및 혈청형의 분포에 대한 파악도 이루어지지 않은 채 일부 업계에서 값비싼 백신을 수입하고 있는 실정이다. 이와 관련, 돼지 다발성 장막염은·홍막폐렴등과 마찬가지로 다양한 혈청형의 균종이 존재하기 때문에 질병발생 현황과 혈청형 파악을 통해 국내 실정에 맞는 백신주 및 백신의 형태를 결정하는 등 백신의 개발이 필요하다고 하겠다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 대상기술의 최종적인 목표는 국내에서 비교적 최근에 문제시되고 있는 돼지 다발성 장막염에 대한 조사를 통해 분자생물학적인 기법과 혈청학적인 기법을 동원해 질병의 양상을 정확히 파악할 수 있는 방법을 정립하고 또한 이에 대한 대처방안을 제시하는데 있다. 이에 대해 개략적인 기술은 다음과 같다.

조사내용으로는

- 국내 양돈장에서 야외 균주 분리
- 국내 분리주의 특성 및 혈청형 분석

진단기법의 정립

- 특이 유전자의 검색 및 진단용 특이 primer의 개발
- 특이 단백질을 이용한 진단키트의 작성
- 제작된 진단키트를 이용한 야외 실험

대처방안

- 국내 양돈장에서의 양성을 파악 및 혈청형 분석
- 유행 균주와 관련된 백신 검색

백신개발

- 국내에서 분포되고 있는 혈청형을 바탕으로 다가백신 개발
- 유전학적 (REP-PCR) 및 생화학적 검사
(SDS-PAGE 또는 Western blot을 통한 국내 대표적 분리주의 선별)
- 불활화 조건에 따른 백신의 면역원성 조사
- 보조제 종류에 따른 백신의 면역원성 조사
- 백신의 독성 검사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

H. parasuis 감염증은 돼지에서 섬유소성 복막염, 관절염을 동반한 급성 다발성 장막염 (일명 Glässer씨 병) 을 일으키는 질병이다. 최근 연구에 의하면, *H. parasuis*는 15 개의 혈청형 (serovars) 과 비정형 (non typeable strain) 으로 나뉘어져 있고, 유행하고 있는 혈청형의 분포도 발생 지역에 따라 다르게 나타나고 있다.

본 연구는 국내에서 발생하는 *H. parasuis* infection을 체계적으로 파악하기 위하여 *H. parasuis* 감염증의 임상병리학적 소견을 나타내는 돼지에서 분리한 *H. parasuis*를 대상으로 DNA profile, 세포외막 단백질 (OMP) pattern 조사 및 항생제 감수성 시험을 실시하였다.

본 연구에서 15 주의 표준 균주와 50 주의 *H. parasuis* 국내 분리주를 대상으로 중합 효소 연쇄 반응 (PCR) 을 실시한 결과 모든 균주에서 821 bp의 PCR 산물이 생성되어 양성임을 나타내었다. 제한효소 *Hind* III와 *Hinf* I에 의한 821 bp PCR 산물의 절단유무에 따라 I, II, III 및 IV 등의 4가지 PCR-RFLP type으로 분류할 수 있는데, 50 주의 국내 분리주의 경우 각각 5.7%, 5.7%, 25.7% 및 62.9%로 분류되었으며, 특히 5 형과 12 형이 속한 IV형이 가장 많았다.

국내 분리주의 genotype을 확인하기 위해 ERIC-PCR을 실시한 결과, 50 개의 분리주는 30 가지 유형으로 분류되어 국내에 매우 다양한 유전자형이 존재하는 것을 알 수 있었다.

병원성 인자의 한 가지 요소로 추정되는 OMP profile을 SDS-PAGE로 분석한 결과 2 가지 주요 band의 크기에 따라 국내 분리주를 2 가지 OMP profile로 분류할 수 있었으며 국내 분리주 모두 단순한 OMP profile을 나타내는 것으로 보아 강병원성을 지닌 것으로 판단되었다.

항생제 감수성 검사에서는 대부분의 분리주에서 cephalothin과 linco-spectin에 높은 감수성을 보였으며, trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin 및 tetracycline에는 저항성을 나타냈다.

본 연구를 통하여 얻어진 결과는 최근 국내에서 발생되고 있는 *H. parasuis* infection의 역학 연구, 치료 및 예방에 효과적이고 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

*H. parasuis*는 한천 겔 침강반응 (AGP)에 의해 1~15 까지 15가지의 혈청형과 nontypable strain으로 분류되고 각 혈청형간의 교차 방어능은 매우 다르며 전세계적으로 non typeable분리주의 분포가 매우 높게 나타나고 있다. 본 연구에서는 50주의 야외분리주 가운데 25주의 분리주에 대해서 혈청형 조사한 결과 48%인 12주가 non typeable strain으로 가정 높은 분포를 차지하고 있었다.

16S rRNA의 염기서열을 혈청형별로 분석하기 위해 PCR에 의해 1,475 bp의 유전자를 증폭한 후 pGEM-T easy vector에 클로닝한 후 염기서열을 RFLP 분석한 결과 200 bp부근과 800-900 bp부근에서 가장 높게 상이한 서열을 보이는 것이 관찰되었다. 향후 정밀한 분석을 통해 혈청형별로 분리할 수 있는 제한효소를 선별하여 제한효소 절편 다형성(RFLP)에 의해 혈청형 구별을 할 수 있는 방법을 개발하여야 하겠다.

*H. parasuis*의 구성 단백질 중 실제 면역원성이 있는 단백질을 조사하기 위하여 우선 *H. parasuis* 총 단백질과 OMP를 분리한 후 SDS-PAGE를 실시하고 Coomassie blue 염색을 실시하여 단백질 밴드를 조사하였다. 또한 동일한 표준주와 분리주를 대상으로 글래썬씨 병에 감염되어 회복된 혈청을 이용하여 Western hybridization을 실시한 결과 31~45 kDa 사이의 두 개의 밴드가 혈청형에 관계 없이 두드러지게 반응하는 것을 알 수 있었다. 이는 OMP를 대상으로 한 immunoblot에서도 동일한 결과를 나타내어 OMP가 혈청형에 관계없이 중요한 면역원성으로 작용함을 알 수 있었으며 OMP가 *H. parasuis*의 방어에 역할을 하는지는 추후 연구가 필요하리라 사료된다.

*H. parasuis*는 다양한 혈청형을 가지고 있고 각 혈청형 간의 교차 방어가 잘 일어나지 않는 것으로 보고되고 있으며 따라서 자가 백신의 효과를 관찰하고자 경기도 지역의 두 농장에서 분리 확인된 균주를 NAD가 포함된 TSB에서 증식한 후 0.3% formalin으로 48시간 불활화 시키고 aluminum으로 흡착시켜 자가 백신을 만든 후 3주령에 1차로 5주령에 2차로 두당 각각 2ml씩 근육으로 접종하였다. 백신에 의한 항체 형성을 조사하기 위해 백신 접종 전, 1차 접종 후 1주 뒤,

2차 접종 후 3주 뒤에 각각 채혈하여 ELISA 방법으로 흡광도를 측정하여 항체 형성 유무를 조사하였다. 1차 접종 후 1주일 뒤의 역가는 0.7을 보이는 반면에 2차 접종 후 3주 뒤에 역가는 1.9로 매우 높게 나타남을 알 수 있었다. 백신을 접종하지 않은 경우 감염이 될 수 있는 항체가를 0.4로 보았을 때 일차 접종 보다는 따라서 일반적으로 야외 감염에 방어하기 위해서는 2차 접종이 필요하다고 사료된다.

2. 연구결과 활용에 대한 건의

돼지 다발성 장막염은 국내에서 뿐만 아니라 국외에서의 발생빈도도 높고 큰 피해를 주는 질병이므로 본 개발과제를 통해 개발된 제품이 조속히 품목허가를 취득할 수 있도록 추진하고자 한다. 이에 국내에서의 품목허가 취득이나 국외로의 수출시 국내 기관의 허가 사항이나 국검 성적 등을 요구하는 경우도 있으므로 이 때 정부의 다각적인 지원이 필요할 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. TITLE

DEVELOPMENT OF ELISA DIAGNOSTIC KIT AND VACCINES FOR PORCINE POLYSEROSITIS (GLÄSSER'S DISEASE)

II. PURPOSE AND NECESSITY OF THIS RESEARCH PROJECT

1. Purpose of this research project

The porcine serositis (so called Glässer's disease) is a disease caused by *Haemophilus parasuis*. This disease had made problems all over the world. Specially, since this disease can outbreak in a even well-managed farms, this disease is so important. The results of pre-experienced scientists (Nord Vet Med 1979, 31(10):401-406) said if the antigen from *H. parasuis* serotype 2 was used as a antigen, that diagnostic kit can detect the antibodies derived from serotype 1, 2, 4, 5. Based on this results, we decided to make the diagnostic kit which can detect the antibodies which associated with *H. parasuis* at one steps.

In this study, we are going to make the diagnostic kits which can detect the *H. parasuis* associated with antibody using the highly purified antigens. The final purpose of this study is, based on the serotype analysis, to make a

vaccines which have a disease causing serotype strains's antigen as a main components .

2. Necessity of this research project

H. parasuis is making a problems in a large scaled farms and is showing a explosive disease outbreaking in the farm which has no antibodies against *H. parasuis*. This disease is reported annually from USA, Canada, Europe and even neighbor country Japan also. The fact that it can show various pathogenicity according to the serotypes has known well. Morozumi and Nicolet *et al.*, can found out *H. parasuis* had 7 serotypes when they are analysed by Agar gel precipitation test. The North America, Europe, Australia and Japan has announced about *H. parasuis*'s serotypes showing the symptoms in their own countries. But in the case of Korea, there is no report about the representative disease-causing serotypes. The agar gel precipitation test used in our country has a limit for exact measuring of antibody levels. So, through this study, it can be possible to design the vaccines which can prevent disease from *H. parasuis* infection.

III. CONTENTS AND SCOPE OF THIS RESEARCH PROJECT

The final purpose of this research is to establish the technological base through the broad investigation about the porcine polyserositis, molecular biological and serological techniques.

The research items in survey level are

- . Isolation of *H. parasuis* bacteria from the fields
- . The serological analysis of isolated *H. parasuis* bacteria

The establishment of diagnostic method

- . Development of primers for *H. parasuis* specific genes

- Development of Diagnostic kits based on the specific proteins
- Field trial with Newly made diagnostic kits

The development of Vaccines

- Multivalent vaccine according to the serological survey
- Genetical analysis (REP-PCR)
- The immunogenicity according to the sterile conditions
- The immunogenicity according to the adjuvants
- Toxigenicity of vaccines

IV. RESULTS AND SUGGESTIONS

1. Results

H. parasuis is the causative agent of Glässer's disease in swine, which is characterized by acute polyserositis and polyarthritis.

According to recent studies, *H. parasuis* is divided into fifteen serovars and non-typable strains and the prevalent serovars were different by the outbreak areas.

In order to characterize *H. parasuis* isolates in Korea, *H. parasuis* isolates recovered from field outbreaks were analyzed for genotyping and outer membrane proteins (OMPs) and antibiotics susceptibility.

Polymerase chain reaction (PCR) for an amplification of 16S rRNA gene of *H. parasuis* was performed with 15 reference strains and 50 *H. parasuis* isolates and an 821bp product was detected in all reference strains and all isolates. The 821bp PCR product from the 15 reference strains were divided into 4 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) types (I, II, III and IV) based on the digestion patterns by *Hind* III and *Hinf* I restriction enzymes. Thirty five isolates were also classified as 4 PCR-RFLP types; I

(5.7%), II (5.7%), III (25.7%) and IV (62.9%), respectively. The PCR-RFLP type IV which included serovars 5 and 12 were prevalent.

The 50 *H. parasuis* isolates were also typed by enterobacterial repetitive intergenic consensus ERIC-PCR and total 30 patterns were distinguished by the ERIC-PCR. The ERIC-PCR showed more discriminative between strains than the PCR-RFLP and serotype.

Considered OMPs as one of virulent factors, analysis of the OMPs performed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Analysis of the OMPs from *H. parasuis* reference strains and the isolates showed 2 kinds of OMP patterns by the size of two major bands. Because of homogeneous OMP profiles, all *H. parasuis* isolates seemed to be virulent. Most isolates were highly susceptible to cephalothin and linco-spectin, but highly resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin and tetracycline.

The results of this study might be useful for studying the epidemiology of *H. parasuis* infection and give valuable description of the present outbreaks and important clues for prevention of *H. parasuis* infection in Korea.

Out of 50 *H. parasuis* isolates, 12 isolates were untypable, 6 isolates were serovar 12, 4 isolates were serovar 4 and the rest each isolate was serovar 2, 4 and 11, respectively. All *H. parasuis* isolates produced 821 bp product by the PCR with species-specific primers.

To analyze partial sequence of 16S rRNA gene of 15 serovars of *H. parasuis*, 1,475 bp size serovar specific amplicons were amplified by PCR, cloned into pGEM-T easy vector, and their sequences were analyzed. Most sequence of 16S rRNA gene were found to be highly conserved but highly pleomorphic in the regions from 50 to 80 bp, 150 to 200 bp, and 800 to 900 bp.

Whole cell lysates and outer membrane protein (OMP) prepared from *H.*

parasuis reference strains and isolates were analyzed by SDS-PAGE and probed with the pig convalescent sera. Only two major bands were distinctively recognized, which turned out to be OMPs and cross reactive among different serovars. This indicates the OMPs of *H. parasuis* can be a vaccine component for cross protection.

Bivalent autogenous bacterin with two different non-typable *H. parasuis* isolates was developed and tested for its safety and immunogenicity in the field. The weaned piglets were injected 2 times two weeks apart and the vaccinated pigs did not show any adverse reaction to immunization. After second vaccination the geometric mean titers measured by ELISA were much higher compared to the non-immunized pigs. The usefulness of this bivalent bacterin to control the disease should be further evaluated by challenge study with heterologous *H. parasuis* strains.

The results of this study may give some clues for the development of improved vaccines that help combat the persistence of *H. parasuis* in swine farms.

Key words ; *Haemophilus parasuis*, Glässer's disease, serotype, PCR, outer membrane protein, autogenous bacterin

2. Future plan for the use of the research results and suggestion

The porcine polyserositis is prevalent occurring disease over the world including Korea. So, we will promote to gain the permission as soon as possible. When we prepare to export our diagnostic kit abroad, some countries require the National Certificate of analysis. At this time, we surely need the assistance of government.

CONTENTS (영 문 목 차)

| | |
|---|----|
| I An overview of research project | 21 |
| II. Current status of related technologies in Korea and the World..... | 23 |
| III. Contents and results of research | 26 |
| A. Materials and Methods..... | 26 |
| 1. The characteristics of <i>H. parasuis</i> and its isolation methods | 26 |
| ① Isolation media and optimization of cultural conditions..... | 26 |
| ② Selection test of Stock medium..... | 26 |
| ③ Antibiotic suseptability test of <i>H. parasuis</i> | 26 |
| ④ Survival ability of <i>H. parasuis</i> according to the stock conditions... | 27 |
| ⑤ Standard strain and field isolations of <i>H. parasuis</i> | 28 |
| 2. The molecular biological diagnosis of <i>H. parasuis</i> | 29 |
| ① PCR diagnosis based on 16S rRNA gene I | 29 |
| 1) The genomic DNA..... | 29 |
| 2) Polymerase chain reaction (PCR) | 30 |
| 3) Restriction fragment length polymorphism (RFLP)..... | 30 |
| ②. The diagnosis by 16S rRNA II..... | 31 |
| 1) Extraction of Chromosomal DNA | 31 |
| 2) Polymerase chain reaction (PCR)..... | 33 |
| 3) Isolation of Plasmid DNA | 33 |
| 4) Digestion of DNA by restriction enzymes..... | 33 |
| 5) Construction of recombinant plasmid | 33 |
| 6) Transformation of <i>E. coli</i> | 34 |
| 7) Screening of recombinant plasmid transformd <i>E. coli</i> | 35 |
| ③ Analysis of DNA sequence | 35 |
| 1) Extraction of genomic DNA | 35 |
| 2) Primer and Annealing temperature..... | 35 |

| | |
|---|----|
| 3) Terminator Cycle Reaction | 36 |
| 4) Competant cells and Plasmid | 37 |
| 5) Media and cultural conditions..... | 37 |
| ④. The development of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR techniques for <i>H. parasuis</i> genotyping..... | 40 |
| 1) Primers | 40 |
| 2) Extraction of chromosomal DNA..... | 40 |
| 3) ERIC-PCR conditions | 41 |
| ⑤. Selection of <i>H. parasuis</i> specific genes and its characterization ... | 41 |
| 1) The gene Extraction from <i>H. parasuis</i> | 41 |
| 2) Construction of Library | 41 |
| 3) Screening of gene transformed colony by colony blot..... | 42 |
| 4) Primers and PCR conditions | 43 |
| ⑥. Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE) | 43 |
| 3. Development of serological diagnostic kits and its protocols | 45 |
| ①. Extraction of <i>H. parasuis</i> outer membrane proteins | 45 |
| ②. SDS-PAGE..... | 45 |
| ③. Production of antiserum against <i>H. parasuis</i> and its serotyping... | 45 |
| ④. Agar gel preprecipitation (AGP) test..... | 46 |
| ⑤. The Outer membrane protein extracted from <i>H. parasuis</i> . as an antigen for ELISA and its specificity..... | 47 |
| 1) Culture of <i>H. parasuis</i> | 47 |
| 2) Harvest and protein extraction | 47 |
| ⑥. LPS extracted from <i>H. parasuis</i> and its antigenic analysis..... | 48 |
| 1). LPS extraction of <i>H. parasuis</i> | 48 |
| 2). Silver stain..... | 48 |
| ⑦. Antigen coating and determination of coating concentration..... | 48 |
| ⑧. Development of ELISA kit for diagnosis of <i>H. parasuis</i> | 49 |
| 1) <i>H. parasuis</i> specific protein coating conditions..... | 49 |
| 4. Selection of candidate strain of vaccines and its efficacy test | 49 |
| ①. Purification of OMP(outer membrane protein) | 49 |
| ②. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) | 50 |
| ③. Western hybridization..... | 51 |
| ④. Pathogenic test of vaccine in mouse | 51 |

| | |
|---|----|
| ⑤. Bulk production of inactivated Vaccine..... | 52 |
| ⑥ Efficacy and toxicity test in the field trial | 53 |
| ⑦ ELISA settings for antibody titration | 53 |
| | |
| B. Results and discussions..... | 55 |
| 1. Isolation method for <i>H. parasuis</i> and its characterization | 55 |
| ①. Selective media and cultural conditions..... | 55 |
| 1) Sampling method from field specimens..... | 55 |
| 2) Isolation media..... | 56 |
| 3) Results of culture according to culture conditions..... | 56 |
| ②. Selection of Stock medium..... | 57 |
| ③. Antibiotics susceptibility test of <i>H. parasuis</i> | 57 |
| ④. Survival ability of <i>H. parasuis</i> according to the stock conditions | 58 |
| ⑤. Standard strain and field isolations of <i>H. parasuis</i> | 59 |
| 1) <i>H. parasuis</i> Standard serotypes | 59 |
| 2) Confirmation of <i>H. parasuis</i> recovery method..... | 62 |
| 3) Serotyping of Korean filed isolates..... | 62 |
| 2. Molecularbiological diagnosis of <i>H. parasuis</i> | 64 |
| ①. PCR diagnosis based on 16S rRNA gene I | 64 |
| 1) PCR | 64 |
| 2) RFLP..... | 65 |
| ②. PCR diagnosis based on 16S rRNA geneII | 68 |
| 1) PCR | 68 |
| 2) PCR test for each serotypes using HP 16s RNA primer..... | 69 |
| 3) Specificity of HP 16s RNA primer against Pasteurellaceae..... | 70 |
| ③. The development of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR techniques for <i>H. parasuis</i> genotyping..... | 81 |
| ④. Screening of <i>H. parasuis</i> specific genes | 85 |
| 1) PCR of <i>H. parasuis</i> specific 2A3 gene | 85 |
| 2) PCR results of 2A3 according to <i>H. parasuis</i> serotypes..... | 86 |
| 3) Specificity test of 2A3 primers against Pasteurellaceae and Enterobacteriaceae..... | 86 |
| 4) Cloning of PCR product | 87 |
| ⑤. <i>H. parasuis</i> genotyping by PFGE | 90 |
| 3. Development of ELISA kit and serological diagnosis | 93 |

| | |
|---|-----|
| ①. The Outer membrane protein extracted from <i>H. parasuis</i> as an antigen for ELISA and its specificity..... | 93 |
| 1) The analysis of <i>H. parasuis</i> ' OMP by SDS PAGE(Sodium dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) | 93 |
| 2) Comparison of <i>H. parasuis</i> serotype 13 & 14 ELISA | 97 |
| 3) Spot analysis of <i>H. parasuis</i> serotype 13 and 14 ELISA..... | 99 |
| ②. LPS extracted from <i>H. parasuis</i> and its antigenic analysis..... | 100 |
| 1) Extraction of LPS(Lipopolysaccharide)..... | 100 |
| 2) LPS ELISA kit of <i>H. parasuis</i> | 100 |
| 3) Coating condition of specific proteins | 101 |
| C. Selection of Vaccine candidates and its efficacy test | 102 |
| 1. OMP (outer membrane proteins) analysis in Standard strains and field isolated strains. | 102 |
| 2. Selection of vaccine candidate strains for vaccine..... | 105 |
| 3. Pathogenic test of Vaccine candidate in mouse..... | 106 |
| 4 Efficacy and stability of vaccines in Farms..... | 109 |
| IV. Achievement of research goals and dedication to associated areas..... | 111 |
| V. Use plan of research results..... | 113 |
| A. Application to other researches..... | 113 |
| B. Requirement of additional researches | 114 |
| VI. References..... | 115 |

목 차

| | |
|---|----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 21 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황..... | 23 |
| 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과..... | 26 |
| 제 1 절 실험재료 및 방법..... | 26 |
| 1. <i>H. parasuis</i> 의 분리 기법 확립 및 균 특성 연구..... | 26 |
| 가. 분리배지 및 배양 조건의 최적화 실험..... | 26 |
| 나. Stock medium의 선발시험..... | 26 |
| 다. <i>H. parasuis</i> 의 항생제 감수성 검사..... | 26 |
| 라. <i>H. parasuis</i> 의 보관조건에 따른 생존능 조사 | 27 |
| 마. <i>H. parasuis</i> 의 공시균주 및 야외 분리주의 분리 | 28 |
| 2. 분자생물학적 <i>H. parasuis</i> 진단 기법의 개발 | 29 |
| 가. 16S rRNA 유전자를 이용한 <i>H. parasuis</i> 진단용 PCR 기법의 확립 I | 29 |
| 1) 유전자의 분리 | 29 |
| 2) Polymerase chain reaction (PCR) | 30 |
| 3) Restriction fragment length polymorphism (RFLP)..... | 30 |
| 나. 16S rRNA 유전자를 이용한 <i>H. parasuis</i> 진단용 PCR 기법의 확립 II | 31 |
| 1) Chromosomal DNA 추출 | 31 |
| 2) PCR을 이용한 유전자의 증폭 | 32 |
| 3) Plasmid DNA 분리..... | 33 |
| 4) DNA의 제한효소 절단 | 33 |
| 5) Ligation에 의한 재조합 plasmid 제작 | 33 |
| 6) 대장균의 형질전환 | 34 |
| 7) 재조합 plasmid 선별 | 35 |
| 다. DNA 염기서열 분석..... | 35 |
| 1) DNA 추출..... | 35 |
| 2) Primer 및 반응 조건..... | 35 |
| 3) Terminator Cycle Reaction | 36 |
| 4) 유전자 형질전환에 사용된 균주 및 plasmid..... | 37 |

| | |
|---|----|
| 5) 배지 및 배양조건 | 37 |
| 라. <i>H. parasuis</i> genotyping을 위한 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR 기법의 확립 | 40 |
| 1) Primers | 40 |
| 2) chromosomal DNA의 분리 | 40 |
| 3) ERIC-PCR 조건 | 41 |
| 마. <i>H. parasuis</i> 특이 유전자의 선별 및 특성 조사..... | 41 |
| 1) <i>H. parasuis</i> 로부터의 유전자 추출..... | 41 |
| 2) 라이브러리의 작성..... | 41 |
| 3) 외래유전자 도입 집락의 선별 | 42 |
| 4) PCR 프라이머와 PCR 수행 조건 | 43 |
| 바. Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE) | 43 |
| 3. 혈청학적 진단기법의 확립 및 진단키트의 개발 | 45 |
| 가. <i>H. parasuis</i> 외막단백질 분석을 위한 외막단백질의 추출 | 45 |
| 나. SDS-PAGE..... | 45 |
| 다. 항체의 제조와 <i>H. parasuis</i> 분리주의 혈청형 분석 (serotyping) | 45 |
| 라. Agar gel preppitiation (AGP) test..... | 46 |
| 마. <i>H. parasuis</i> 에서 추출한 외막단백질의 ELISA용 항원으로서의 혈청형별 특이성 비교 실험..... | 47 |
| 1) 균주 배양..... | 47 |
| 2) 균액의 수확 및 단백질 추출..... | 47 |
| 바. <i>H. parasuis</i> 에서 추출한 LPS의 항원형 분석..... | 48 |
| 1). LPS extraction of <i>H. parasuis</i> | 48 |
| 2). Silver 염색 | 48 |
| 사. 항원 coating 및 coating 농도 결정 | 48 |
| 아. <i>H. parasuis</i> 감염 진단용 ELISA 진단키트의 개발 | 49 |
| 1) 특이 단백질의 코팅조건 확립 | 49 |
| 4. 백신 후보균주의 선별 및 백신의 효력시험 | 49 |
| 가. 세포외막 (outer membrane, OMP)의 분리 및 분석..... | 49 |
| 나. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) | 50 |
| 다. Western hybridization..... | 51 |
| 라. 백신 후보 균주의 mouse에서의 병원성 시험..... | 51 |
| 마. 불활화 백신의 대량 제조..... | 52 |
| 바. 야외농장을 대상으로 한 백신의 효력 및 독성 시험..... | 53 |

| | |
|---|----|
| 사. 항체가 측정을 위한 ELISA 조건 확립 및 혈청검사 | 53 |
| 제 2 절 실험 결과 및 고찰 | 55 |
| 1. <i>H. parasuis</i> 의 분리 기법 확립 및 균 특성 연구..... | 55 |
| 가. 분리배지 및 배양 조건의 최적화 실험..... | 55 |
| 1) 가검재료에서의 채취부위의 확립..... | 55 |
| 2) 분리배지의 비교 | 56 |
| 3) 배양 조건별 배양 결과 | 56 |
| 나. Stock medium의 선발 | 57 |
| 다. <i>H. parasuis</i> 의 항생제 감수성 검사 | 57 |
| 라. <i>H. parasuis</i> 의 실험용 균주 보관조건에 따른 생존능 실험..... | 58 |
| 마. <i>H. parasuis</i> 의 공시균주 및 야외 분리주의 분리 | 59 |
| 1) <i>H. parasuis</i> 표준 혈청형 균주의 확보 | 59 |
| 2) <i>H. parasuis</i> recovery 방법의 확립..... | 62 |
| 3) 국내 분리주의 혈청형 분석 | 62 |
| 2. 분자생물학적 <i>H. parasuis</i> 진단 기법의 확립 | 64 |
| 가. 16S rRNA 유전자를 이용한 <i>H. parasuis</i> 진단용 | |
| PCR 기법의 확립 I | 64 |
| 1) PCR | 64 |
| 2) RFLP..... | 65 |
| 나. 16S rRNA 유전자를 이용한 <i>H. parasuis</i> 진단용 | |
| PCR 기법의 확립 II..... | 68 |
| 1) 혈청형 분석용 PCR..... | 68 |
| 2) 각 혈청형에 따른 HP 16S rRNA primer를 이용한 PCR..... | 69 |
| 3) Pasteurellaceae 및 Enterobacterceae 에 대한 HP 16s RNA primer의 특이성 검사 | 70 |
| 라. <i>H. parasuis</i> genotyping을 위한 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus(ERIC)- PCR 기법의 확립 | 81 |
| 마. <i>H. parasuis</i> 특이 유전자의 선별 및 특성 조사..... | 85 |
| 1) <i>H. parasuis</i> 특이 유전자(2A3)에 대한 PCR 검사 결과..... | 85 |
| 2) 혈청형별 <i>H. parasuis</i> 에 대한 2A3 primer의 PCR 결과 | 86 |
| 3) Pasteurellaceae 및 Enterobacteriaceae에 대한 2A3 primer의 특이성 시험 | 86 |
| 4) PCR을 통하여 얻은 각 유전자들의 Cloning..... | 87 |
| 바. PFGE에 의한 <i>H. parasuis</i> 의 유전형 분석 | 90 |
| 3. 혈청학적 진단기법의 확립 및 진단키트의 개발 | 93 |

| | |
|--|-----|
| 가. <i>H. parasuis</i> 에서 추출한 외막단백질의 ELISA용 항원으로서의 혈청형별 특이성 비교 실험..... | 93 |
| 1) Sodium dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS -PAGE)를 이용한 <i>H. parasuis</i> 외막단백질의 단백질 분석 | 93 |
| 2) <i>H. parasuis</i> serotype 13 & 14 ELISA 실험 결과..... | 97 |
| 3) <i>H. parasuis</i> 혈청형 13형과 14형간의 분산분석 결과..... | 99 |
| 나. <i>H. parasuis</i> 에서 추출한 다당류 (LPS)의 ELISA용 항원으로서의 혈청형별 특이성 비교 실험 | 100 |
| 1) LPS(Lipopolysaccharide)의 추출 | 100 |
| 2) <i>H. parasuis</i> 로부터 추출한 LPS로 ELISA kit 구성..... | 100 |
| 3) 특이 단백질의 코딩조건 확립..... | 101 |
| 제 3절 백신 후보균주의 선발 및 백신의 효력시험 | 102 |
| 1. 표준주 및 분리주의 총단백질과 세포외막단백질 (OMP)의 분석 | 102 |
| 2. 백신 후보균주의 선발 | 105 |
| 3. 백신 후보균주의 마우스에 대한 병원성 시험..... | 106 |
| 4. 야외농장에서의 백신의 효과 및 안전성 분석..... | 109 |
| | |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 111 |
| | |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획..... | 113 |
| 제 1 절 타연구에의 응용..... | 113 |
| 제 2 절 추가연구의 필요성..... | 114 |
| | |
| 제 6 장 참 고 문 헌..... | 115 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

돼지 다발성 장막염 또는 글래서씨병은 헤모필러스 파라수이스 (*Haemophilus parasuis*)에 의해 유발되는 질병으로 전세계적으로 문제가 되고 있으며 농장의 관리에 따라 큰 이환율 차이를 보이고 있는 질병이다. 특히 사양관리가 양호한 농장에서도 문제가 되고 있으며 항체가 전혀 생성되어 있지 않은 돈군에서는 폭발적으로 발생하는 양상을 보이고 있다. 미국, 캐나다, 유럽등지에서 다발하고 인접한 일본에서도 발생이 매년 보고 되고 있다.

*H. parasuis*는 혈청형에 따라 병원성이 크게 달라지는 것이 이미 밝혀져 있으며 Morozumi와 Nicolet등은 1986년 병변별로 검출된 균종이 서로 다른 성질을 가지고 있다는 성질에 착안, 세균 추출물을 이용, 한천 겔 침강반응을 통해 7개이상의 혈청형이 있음을 알게 되었다. 전세계적으로 주로 문제가 되는 혈청형은 1, 2, 4, 5, 10, 12, 13, 14 등의 혈청형으로 알려져 있다. 이미 북미, 유럽, 호주, 일본등지에서는 호발 혈청형이 보고 되어 있으나, 국내의 경우 부검조건 및 균 분리만을 하고 있지만 혈청형에 대한 파악은 부족한 상태이다. 또한 주로 많이 쓰이는 혈청학적 방법은 보체결합 반응이나 한천겔 침강반응등으로 대량의 혈청을 신속, 정확하게 진단하는 데는 한계가 있어 국내 양돈장장의 양성을 또는 종돈에서의 감염실태를 파악조차 하지 못하고 있는 실정이다. 혈청형에 따라 교차 방어가 나타나지 않을 수도 있는데 국내의 경우 혈청학적인 조사나 분포되는 혈청형의 파악도 이루어지지 않은 채 일부 업체에서 값비싼 백신을 수입하고 있다. 이와 관련하여 돼지 다발성 장막염은 흉막폐렴등과 마찬가지로 다양한 혈청형의 균종이 존재하기 때문에 질병발생 현황과 혈청형 파악을 통해 국내 질병발생 실정에 맞는 백신의 형태를 결정하고 백신주를 결정하는 등 백신의 개발의 필요성이 대두되고 있다.

면역효소검출기법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)은 1972년에 처음으로 그 개념이 개발되어 현재까지도 혈청 내에서의 항체 검사 및 항원의 정성, 정량 분석 등 의·약학, 생물학 분야에서 폭넓게 응용되고 있다. 혈청형 2형을 항원으로 사용할 경우 1, 2, 4, 5형에 대한 항체를 모두 검출할 수 있다는 결과(Nord Vet Med 1979 31(10):401-6)를 토대로 비교적 병원성이 높은 균주와 국내에서 주로 검출되는 키트를 중심으로 복합항원을 사용해서 감염여부를 한번에 체크할 수 있는 진단키트의 형태가 가능하다. 본 과제에서

개발하고자 하는 진단키트는 국내에서 유행하고 있는 야외균주를 분리, 혈청형을 규명하고 혈청형과 관계된 단백질을 항원으로 사용하기 때문에 Haemophilus 감염증 양상을 파악할 수 있을 뿐만 아니라 국내에서 문제되고 있는 균주의 혈청형을 빠른 시간 안에 쉽고 정확하게 파악할 수 있어 정확하게 국내에서 주로 문제되는 균주에 대해 예방 및 치료가 가능하게 된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내에서는 비교적 최근부터 문제되고 있는 돼지 다발성 장막염의 원인균인 *H. parasuis*는 세균분리동정 등 실험실학적 진단에 있어 병변을 보이는 개체에서 조차 세균분리동정 성공률이 낮기 때문에 주로 부검소견등 병변을 통해 진단을 하고 있다. 부검소견 등을 토대로 진단시 병변이 없는 경우는 진단하기 어려울 뿐만 아니라 병변을 나타내지 않는 보균돈에 대한 진단이 불가능하다는 한계를 가지고 있다.

한천겔 침강반응을 이용한 혈청형 분석의 경우 동시처리 가능한 샘플의 수가 반응당 10개의 혈청으로 한정되고 결과역시 양성 및 음성으로만 판정이 가능하며 처리시간이 약 72시간이상 소요되기 때문에 대량으로 샘플을 처리해야 하는 혈청검사 기법으로는 부적당하다. 이러한 단점들을 극복하기 위하여 양계나 양돈 혈청검사에서는 최근에 면역효소검출기법 (ELISA)이 많이 사용되고 있으나 돼지 다발성 장막염에 대한 면역효소검출기법은 국외의 경우 연구 중에 있으며, 국내의 경우 아직 개발되어 있지 않은 상태이다.

돼지 다발성 장막염은 우리나라뿐만 아니라 미국 캐나다, 독일을 비롯한 유럽, 호주 및 인접한 일본 등 선진국에서도 많이 발생하고 있다. 우리나라의 경우 1998년도부터 1999년까지 전국의 병성감정지정기관에서의 진단 상황을 보면 1998년에 전체 의뢰 가검물 중 8.0% 이었던 것이 1999년 12.5%로 크게 증가했으며 PRRS와의 복합감염도 1.3%로 매년 증가 추세에 있다. 병성감정기관에 의뢰되지 않은 가검물과 비교적 임상증상이 명확하다는 특징 때문에 가검물 의뢰가 이루어지지 않는 것을 고려하면 실제 피해규모는 이보다 더 많을 것으로 판단되며 더불어 이에 대한 대책 마련이 시급한 것으로 평가된다. 상기 국가들에서는 이미 유행하는 혈청형의 분석까지도 보고 되어 그에 적합한 혈청형으로 제조한 백신을 사용하고 있으나 국내의 경우 정확한 균분리 동정 및 혈청학적인 조사를 거치지 않고 단순히 병리부검소견을 통해 돼지 다발성 장막염을 진단하고 일부에서는 정확한 혈청형의 규명 없이 백신을 수입, 사용하고 있는 실정이다.

개발 대상기술과 관련, 외국에서는 IDEXX, KPL, symbiosis 등 다수의 업체들도 다른 질병에 대한 진단키트는 시판하고 있으나 아직 돼지 다발성 장막염에 대한 키트를 개발하지 못한 상태이다. 국내에서는 아직 동물용 진단키

트로써 개발된 제품은 당사의 닭 뉴캐슬병 바이러스 항체가 검사용 키트와 제노바이오텍의 돈콜레라 키트 이외에는 전무한 실정이다. 당사의 닭 뉴캐슬병 바이러스 항체가 검사용 키트의 경우 바이러스 증폭 기법과 바이러스 정제 기법을 토대로 개발되었으나 정제된 단백질이 아닌 바이러스 전체를 (Whole virus) 항원으로 사용하기 때문에 혈청형에 따른 구분이 어렵다는 단점을 가지고 있다. 바이러스 항원의 경우 단백질의 종류가 많지 않고 바이러스 자체를 항원으로 사용해도 교차반응(Cross reaction)등의 위험성이 거의 없으나, 세균의 경우 많은 단백질 항원이 존재하고 중간 특이성이 없는 단백질을 상당부분 포함하고 있기 때문에 고도의 정제기법이 반드시 필요하다.

본 개발 대상기술 과제를 통해 혈청형 특이성이 있는 것으로 구분된 단백질에 대해서는 특허 등 지적재산권의 권리행사가 가능하기 때문에 잠재적인 진단키트 시장을 고려해 볼 때 대상기술의 선점을 위해서라도 본 과제의 개발이 반드시 필요하다고 판단된다. 아직까지 돼지 다발성 장막염을 대상으로 하는 효소매개면역반응 검사용 ELISA 키트가 상용화되어 있지 않으며 관련된 항원의 경우 국제특허로의 출원도 가능할 것으로 평가된다.

표 1. 현재의 기술수준과 기술개발 대상 비교

| 구분 | 현재의 기술수준 | 기술개발 대상 |
|---------|----------------------------|------------|
| 대상 | 바이러스 | 세균 |
| 단백질 정제 | 필요 없음 | 필수 |
| 혈청형 구분 | - | 가능 |
| 필수기자재 | 초고속 원심분리기 | 단백질 정제 시스템 |
| 국의 개발제품 | 있음 | 없음 |
| 국내 개발제품 | 있음 (제일바이오 ND ELISA kit) | 없음 |

외국의 경우 백신은 각 혈청형에 따른 교차방어효과가 없기 때문에 균의 혈청형의 분포를 토대로 오일보조제가 함유된 다가 백신(bacterin)을 사용하고 있다. 그러나 국내의 경우 정확한 혈청형의 분석도 없이 고가의 백신을 수입

하여 판매하고 있어 국내 발생혈청형에 대해 얼마나 효과가 있을지에 대해 의문이 제기되고 있다. 국내의 경우 돼지 다발성 장막염의 증가추세에도 불구하고 제대로 백신의 개발연구가 이루어지지 않고 있으며 따라서 국내 혈청형에 맞는 백신의 개발이 필요하다고 하겠다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 실험재료 및 방법

1. *H. parasuis*의 분리 기법 확립 및 균 특성 연구

가. 분리배지 및 배양 조건의 최적화 실험

H. parasuis 표준균주를 대상으로 여러 배지, 즉 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 nicotineamide adenine dinucleotide (NAD)가 함유된 tryptic soy agar (TSA+NAD), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 NAD가 첨가된 tryptic soy broth (TSB+NAD), modified Friis' broth, NAD가 함유된 혈액배지 (BAP+NAD), NAD가 함유된 brain heart infusion agar (NAD+BHIA)와 chocolate agar, NAD가 첨가된 PPLO(pleuropneumonia like organism) 한천배지 등을 대상으로 집락의 수를 관찰하였다. 증식조건도 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 호기배양조건과 5% CO_2 에서 각각 배양된 집락의 수를 관찰하였고 broth의 경우 shaking incubation 과 stationary incubation 조건을 각각 비교 하였다.

나. Stock medium의 선별시험

동결건조방법 이외의 방법으로 *H. parasuis*의 장기보관을 위해 6% lactose, + TSB, TSB + 10% sucrose, 25% glycerol이 첨가된 TSB (TSB + 25% glycerol) 및 TSB + 4% milk + 25% glycerol을 비교 시험하였다.

다. *H. parasuis*의 항생제 감수성 검사

야외 분리주에 대한 항생제 내성을 확인하기 위해 항생제 감수성 실험을 disk diffusion (Jorgensen 등, 1999; McDermott 등, 2001) 방법으로 실시하였다. *H. parasuis* 야외분리주를 10 mg/ml NAD(Sigma)가 첨가된 tryptic soy broth(TSB; Difco)에 접종한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 배양된 균액을 0.5 McFarland용액과 동일하게 균농도를 맞춘 후 균부유액을 chocolate agar에 도말하였다. 배지 표면에 균액이 흡착되기

위해 15분간 실온에서 방치한 다음 항생제 disk를 견고하게 배지 표면에 부착시켰다. 배지를 35℃에 24시간 동안 배양한 후 항생제에 의한 억제 직경을 측정하였다. 본 연구에 사용된 항생제 디스크의 종류와 판정기준은 표 2.와 같다.

Table 2. *H. parasuis*의 항생제 감수성 및 내성 검사에 사용된 항생제의 종류 및 판정 기준

| 항생제 종류 | 판정기준 | 항생제 종류 | 판정기준 |
|-----------------|-------------------------|-------------|-------------------------|
| Ciprofloxacin | (S ≥21. I =16-20, R≤15) | Colistin | (S ≥11. I =9-10, R≤8) |
| OTC | (S ≥19. I =15-18, R≤14) | Vancomycin | (S ≥17. I =15-16, R≤14) |
| Neomycin | (S ≥15. I =13-14, R≤12) | Amoxicillin | (S ≥20. R≤19) |
| Enrofloxacin | (S ≥18. I =14-17, R≤13) | Penicillin | (S ≥29. R≤28) |
| Gentamicin | (S ≥15. I =13-14, R≤12) | Doxycycline | (S ≥18. I =14-17, R≤13) |
| Sulphamethoprim | (S ≥16. I =11-15, R≤10) | Ceftiofur | |
| Amikacin | (S ≥17. I =15-16, R≤14) | Tilmicosin | (S ≥17. I =15-16, R≤14) |
| Apramycin | (S ≥18. I =14-17, R≤13) | Kanamycin | (S ≥17. I =15-16, R≤14) |

라. *H. parasuis* 의 보관조건에 따른 생존능 조사

*H. parasuis*균을 3개 chocolate배지에 접종하여 37℃/48~72시간 배양한다. 48~72시간 배양 후에 *H. parasuis*가 잘 자란 3개의 배지를 37℃배양기, 실온, 냉장에 각각 한 plate씩 보관한다. 1일(24시간)경과 후에 각각 보관된 배지의 colony를 새로운 chocolate배지에 접종하여 37℃/48~72시간 배양하여 균이 증식하는지 여부를 확인한다. 2일(48시간), 3일(72시간) 등도 같은 방법으로 균이 생존하는 지를 확인한다.

마. *H. parasuis*의 공시균주 및 야외 분리주의 분리

H. parasuis 표준 혈청형 1~15형의 혈청형 중 8형을 제외한 총 14개 형의 표준균주는 독일 Schimmel박사로부터 분양을 받았고 *H. parasuis* standard strain(ATCC 19417)은 American Tissue Culture Collection(ATCC)에서 구입하였다. *H. parasuis* 분리는 임상적 관절염과 신경증상을 보이고 부검시 다발성 장막염을 보이는 포유자돈, 이유자돈, 및 육성돈에서 멸균된 면봉으로 폐, 뇌막 관절낭액에서 재료를 채취하여 chocolate agar와 면양혈액이 첨가된 혈액배지에 접종하였다. 혈액배지의 경우 위성현상에 의해 증식시키기 위해 *Staphylococcus aureus*를 feeder 접종한 후 37℃에서 24~48 시간 배양하고 용혈이 되지 않는 1~2 mm의 집락을 채취하여 chocolate agar에서 재접종, 단일 집락을 순수 분리하였다. 순수하게 분리된 집락의 생화학적 동정을 위해 catalase test, indole test 및 NAD-dependant test를 실시하였으며 일단 *H. parasuis*로 의심된 집락은 25% glycerol첨가된 tryptic soy broth(TSB, Difco, MD, USA)에 저장, -70℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 3. 이 연구과제에 사용된 *H. parasuis* 표준 균주 목록

| Strain original code ^a | KRG serovar ^b |
|-----------------------------------|--------------------------|
| H409 | 1 |
| H410 | 2 |
| H411 | 3 |
| H412 | 4 |
| H413 | 5 |
| H780 | 6 |
| H781 | 7 |
| H553 | 9 |
| H555 | 10 |
| H465 | 11 |
| H425 | 12 |
| H793 | 13 |
| H792 | 14 |
| H790 | 15 |

^aThe strains in the table are reference strains supplied by Dr. Schimmel.

^bKRG : Kielstein and Rapp-Gabrielson serotyping scheme (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).

2. 분자생물학적 *H. parasuis* 진단 기법의 개발

가. 16S rRNA 유전자를 이용한 *H. parasuis* 진단용 PCR 기법의 확립 I

1) 유전자의 분리

Chocolate agar에서 자란 집락을 1 ml phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)를 배지에 떨어뜨려 수확한 후 12,000 × g로 1분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 침전된 세균 pellet은

chromosomal DNA의 추출 및 outer membrane protein (OMP) 분리에 사용하였다. Chromosomal DNA의 추출은 G-spin Genomic DNA extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하였다. 추출한 DNA는 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) Polymerase chain reaction (PCR)

*H. parasuis*의 최종 동정은 Oliveira등이 (2001) 보고한 *H. parasuis*의 16S small subunit ribosomal RNA 유전자의 증폭으로 확인하였다. Primer oligonucleotide 염기서열, 즉 HPS-forward (5'-GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT-3') 및 HPS-reverse(5'-GGC TTC GTC ACC CTC TGT-3')을 토대로 제작하였다. PCR은 조건은 우선 5 µl template DNA, 0.2 mM의 각 deoxy-nucleoside triphosphate (dNTP, Quantum, CA, USA), 각각의 20 pmol primer, 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 1U *Taq* DNA polymerase (Promega, WI, USA)를 순서대로 PCR tube에 첨가하였고 최종적으로 멸균증류수로 총량이 50 µl가 되도록 하였다. PCR cycle은 우선 94℃에서 5분간 denaturation시킨 뒤 94℃에서 30초간 denaturation, 59℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 30초간 extension 하는 과정을 30회 반복한 후 마지막으로 72℃에서 5분간 extension을 실시하였다. PCR 증폭 산물은 1% agarose gel 상에서 0.5X Tris-borate-EDTA(TBE) buffer를 이용하여 100V로 60분 동안 전기영동을 한 후 0.5 µg/ml의 ethidium bromide가 희석된 TBE로 염색하고 UV transilluminator(SeouLin Bioscience Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 band를 관찰하였다. 증폭산물의 크기는 100 bp DNA ladder (GibcoBRL, MI, USA) molecular marker 이용하여 비교하였다.

3) Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

앞서 언급된 방법에 의해 증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, CA, USA)이용하여 정제한 후 제한 효소를 처리하여 RFLP를 관찰하였다. 제한효소는 *Hind* III과 *Hinf* I을 사용

하였다. 제한효소의 처리는 제조회사의 방법대로 실시하였으며 정제된 PCR산물에 10X enzyme buffer, 2 mg acetylated Bovine serum albumin, 20U *Hind* III 와 10U *Hinf* I을 각각 또는 혼합하였으며 최종적으로 멸균증류수로 총 20 μ l의 용량으로 맞춘 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 처리하였다. 제한 효소로 처리한 DNAs는 0.5X TBE buffer하에 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide가 희석된 TBE로 염색하고 UV transilluminator를 이용하여 band를 관찰하였다. Band의 크기는 100 bp DNA ladder molecular marker 이용하여 측정하였다.

나. 16S rRNA 유전자를 이용한 *H. parasuis* 진단용 PCR 기법의 확립 II

1) Chromosomal DNA 추출

*H. parasuis*의 균체는 Chocolate agar plate 나, 또는 Nicotinamide Adenine Dinucleotide(NAD)가 함유된(0.1%) PPLO plate(0.1% Proteose peptone, 0.1% Beef extract, 0.4% Beef heart digest, 1% Peptone, 0.5% Sodium chloride)에서 37 $^{\circ}$ C 24 시간 이상 정치배양 하였고, 이렇게 얻은 colony를 PPLO broth에서 37 $^{\circ}$ C 24 시간 이상 진탕배양(Shaking incubation)한 후 DNAzol reagent (Invitrogen cat. no. : 10503-027)를 이용하여 chromosomal DNA를 추출하였다.

진탕배양하여 얻은 *H. parasuis* 배양액 약 200 μ l를 취하여 1 ml의 DNAzol reagent를 넣고 pipetting이나 vortex로 잘 섞어준 다음 상온에서 약 5~10분간 방치한다. 그리고 10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 에서 10분 동안 원심분리 한다. 원심분리한 후 상층액 1 ml을 취하고, 거기에 0.5 ml의 100% ethanol을 넣고 살짝 vortex하여 섞어준 다음 상온에 5분정도 방치한다. 그리고, 10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 에서 5분 동안 원심분리 한 다음 즉시 상층액을 버리고 1 ml의 75% ethanol을 넣고 살짝 vortex하여 섞어준 다음 상온에 5분정도 방치한다. 그리고, 12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 에서 5분 동안 원심분리 한 다음 즉시 상층액을 버리고 상온에서 5~10분정도 air dry한다. 이렇게 얻어진 DNA pellet을 30 μ l

의 D.W로 현탁한 후 PCR을 위한 template로 사용하였다.

2) PCR을 이용한 유전자의 증폭

DNAzol reagent를 이용하여 얻은 *H. parasuis*의 chromosomal DNA를 template로 PCR (polymerase chain reaction)을 수행하여 필요한 유전자를 증폭하였다. 증폭에 이용한 primer 들 중 16sRNA 유전자의 경우 NCBI의 Gene bank에 등재 되어 있는 염기서열에 근거하여 고안하였으며, chromosomal DNA library 의 screening을 통하여 얻어진 유전자들의 경우에는 염기서열 분석결과에 기초하여 primer를 고안하였다.

PCR 반응은 AccuPower PCR PreMix(BioNeer cat. no. : K-2016)를 사용하여 수행하였으며, PreMix(20 μ l reaction)의 조성은 다음과 같다. Taq DNA polymerase 1U, Each: dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 250 μ M, Tris-HCl (pH 9.0, at 25 $^{\circ}$ C) 10 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM 의 최종농도로 반응하도록 사용하였다. Dried pellet 상태의 PreMix(20 μ l reaction) tube에 2 μ l의 *H. parasuis* chromosomal DNA를 넣고, 1 μ l의 forward primer(100 pmol) 와 1 μ l의 reverse primer(100 pmol)를 각각 넣어주고 16 μ l의 D.W를 넣어 최종부피를 20 μ l로 조절 한 후 vortex하고, 다시 spin down한 후에 PCR 반응을 수행하였다.

PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 충분히 denaturation 한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1 분 (denaturation), 60~69 $^{\circ}$ C에서 1 분 (annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 1 분(extension)의 반응을 35회 반복적으로 수행한 후, 다시 72 $^{\circ}$ C에서 5 분 동안 충분히 신장할 수 있도록 하였다. 특히 16s rRNA primer의 annealing 조건은 최종적으로 60 $^{\circ}$ C에서 1분으로 조정 되었으며, 2A3 primer의 경우에는 annealing 조건은 최종적으로 69 $^{\circ}$ C에서 40초로 조정 되었다.

PCR을 수행한 후 각 유전자의 증폭을 확인하기 위해 PCR 산물을 1% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다. 그리고 사용된 primer는 Table 4.에 나타내었다. 그리고 이러한 유전자들의 cloning 과정 등은 Fig. 2.에 나타내었다.

표 4. Oligonucleotide for PCR(Polymerase Chain Reaction)

| Name | Sequence of oligonucleotide | T _m |
|-----------------------|----------------------------------|----------------|
| HP 16s-RNA Forward | 5'-CAT GGC TCA GAT TGA ACG CT-3' | 54.9℃ |
| HP 16s-RNA Reverse | 5'-GAA TCA TAC CGT GGT AAA CG-3' | 49.3℃ |

3) Plasmid DNA 분리

Plasmid DNA 분리는 BioNeer사의 *AccuPrep* Plasmid Extraction Kit을 사용하였으며, BioNeer사에서 제공하는 protocol에 준하여 plasmid DNA를 분리하였다. 특정한 plasmid를 포함하고 있는 *E. coli* JM109는 LB medium(필요에 따라 ampicillin이나, kanamycin를 사용하였다.)에서 하룻밤 동안 키운 대장균 배양액을 6,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리 하여 그 *E. coli* pellet을 plasmid DNA 분리에 사용하였다. 필요에 따라서 분리된 DNA에 ethanol 침전을 실시하였다.

4) DNA의 제한효소 절단

pGEM-T easy vector에 각각의 유전자가 Cloning 되었는지 확인 하기 위하여 pGEM-T easy vector의 multiple cloning site의 *EcoR* I 제한효소 절단 부위를 *EcoR* I 제한효소를 사용하여 절단하였다. 제한효소의 반응조건은 37℃에서 8 시간 이상 반응시켰으며, 제한효소의 제조사가 제공하는 protocol에 준하여 반응시켰다.

5) Ligation에 의한 제조합 plasmid 제작

PCR 반응을 통하여 합성된 유전자의 Cloning 과정에 사용된 pGEM-T easy vector의 사용은 제조사에서 제공한 protocol에 준하여 사용하였다. 일반적으로 PCR 산물과 vector DNA를 혼합하고,

T4 DNA ligase를 사용하여 실온에서 8 시간 이상 ligation 반응을 수행 하였다. T4 DNA ligase의 반응조건은 원칙적으로 16℃에서 8 시간 이상 반응시켰으며, 필요에 따라 4℃, 37℃, 혹은 상온에서 사용하였으며, 원칙적으로 2X reaction buffer를 사용하였다. 그리고 모든 T4 DNA ligase의 사용은 제조사가 제공하는 protocol에 준하여 반응시켰다.

6) 대장균의 형질전환

E. coli JM109의 형질전환은 QIAGEN 사의 The QIAexpressionist의 방법에 준하였다. 먼저, *E. coli* JM109를 10 ml LB broth에서 37℃로 하룻밤 동안 배양하였다. 그리고 이렇게 배양한 배양액 1 ml을 100 ml LB broth에 접종하고, OD₆₀₀값이 0.5가 되도록(37℃, 약 2 시간 동안 배양한 경우) 배양 하였다. 이것을 얼음에 5분간 방치한 후 6,000 rpm으로 6 분간 원심분리 하여 cell pellet을 얻은 뒤 30 ml의 TFB1(100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM potassium acetate, 10 mM CaCl₂, 15% glycerol, pH 5.8)로 현탁하고 얼음에 90분 동안 방치 한다. 그리고 다시 6,000 rpm으로 6 분간 원심분리 하여 cell pellet을 얻은 뒤 4 ml의 TFB2(10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glycerol, adjust to pH 6.8 with KOH)로 현탁하여 competent cell을 만든 다음 100~200 μl 분주하여 -70℃로 바로 얼려 보관한다. 그리고 필요할 때 마다 얼음에서 천천히 녹여서 형질전환에 사용하였다.

준비된 competent cell 0.1 ml와 ligation mixture를 섞어서 on ice에 60 분간 방치한 후 42℃ water bath에서 90 초 동안 heat shock을 주었고 다시 on ice에 5 분간 방치한 후 이 균들을 1 ml LB medium에 옮겨 37℃ shaking incubator에서 90 분 이상 배양한 후 그 배양액의 100~200 μl를 Ampicillin 이나 Kanamycin이 포함된 LB plate medium에 도말하여 37℃에서 하룻밤 이상 배양하였다.

그리고 형질전환하여 얻은 colony 들 중에서 pGEM-T easy vector의 *lacZ* 유전자 사이로 PCR product가 삽입되었는지 알아보기 위하여, *E. coli* JM109의 형질전환시 LB plate medium에 도말하는 과정에서 plate 당 100 μl의 IPTG(500 mM) 와 20 μl의 X-Gal (5-bromo-

4-chloro -3-indolyl- β -D-galactoside, 50 mg/ml)을 함께 도말하여 *lacZ* 유전자가 X-gal을 분해하지 못하는 White colony 만을 선별하여 cloning 여부를 판별하였다.

7) 제조합 plasmid 선별

Plasmid DNA 분리는 BioNeer사의 *AccuPrep* Plasmid Extraction Kit을 사용하였으며, BioNeer사에서 제공하는 protocol에 준하여 plasmid DNA를 분리하였으며, plasmid DNA의 cloning 및 subcloning 여부는 각 유전자에 따라 특정한 제한효소를 사용하여 분별하였다.

다. DNA 염기서열 분석

본 연구에서 *H. parasuis*의 chromosomal DNA library에서 선택된 clon 들에 대하여 DNA 염기서열 분석을 수행하였다. 본 연구에서 수행된 모든 DNA 염기서열 분석은 (주)마크로젠에 의뢰하여 Automatic sequencer ABI3730xl (Applied Biosystems)로 수행 되었으며, DNA 염기서열분석에 사용된 Primer와 PCR 조건 등은 다음과 같다.

1) DNA 추출

DNA 염기서열 분석의 Terminator Cycle Reaction에 Template로 사용하기 위하여 각 clon 들의 DNA는 (주)BIONEER의 *AccuPrep*® Plasmid Extraction Kit를 사용하여 추출 하였으며, 상기 kit의 protocol에 준하여 DNA를 추출하였다.

2) Primer 및 반응 조건

Terminator Cycle Reaction에 사용된 primer은 Table 5.와 같다. 각 primer 들은 5 pmole/ul (5 uM) 농도로 사용되었다.

Table 5. Terminator Cycle Reaction에 사용된 primer

| Name | Sequence | Length |
|--------------|----------------------------|--------|
| T7 | AAT ACG ACT CAC TAT AG | 17 |
| SP6 | ATT TAG GTG ACA CTA TAG | 18 |
| T7promoter | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG | 20 |
| T7terminator | GCT AGT TAT TGC TCA GCG G | 19 |

또한, DNA 염기서열 분석에 사용된 Standard Cycle Sequencing Program은 다음과 같은 단일 조건에서 수행되었다.

Table 6. *H. parasuis* 유래 16S rRNA 유전자 서열분석에 사용된 PCR 조건

| BigDye™ terminator cycling conditions | |
|---------------------------------------|------------|
| Predenaturation | 96 °C 0:30 |
| Repeat the following for 25 cycles | |
| Denaturation | 96 °C 0:10 |
| Annealing | 50 °C 0:05 |
| Extention | 60 °C 4:00 |

3) Terminator Cycle Reaction

Terminator Cycle Reaction은 각 clon 들의 template DNA와 각각의 primer를 ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing

Ready Reaction Kits v3.1 (fluorescent dye terminators)을 사용하였으며, 상기 kit의 protocol에 준하여 reaction 하였다.

4) 유전자 형질전환에 사용된 균주 및 plasmid

본 실험에는 각 혈청형 별로 야외분리주 *H. parasuis* 배양액에서 DNA를 추출하여 16s rRNA 유전자 및 c시간osomal DNA library 의 screening을 통하여 얻어진 유전자들에 대하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하기 위한 template DNA로 사용하였다. 그리고 본 실험에 사용된 대장균 균주 및 plasmid DNA는 Table 7.과 같다. Plasmid pGEM-T easy vector(Fig. 3.)는 PCR을 통해 증폭된 여러 가지 유전자의 cloning을 위하여 사용하였다. *E. coli* JM109는 재조합 plasmid의 수용 균주 및 plasmid의 유지, 증폭, 추출에 사용하였다(Fig. 2).

각종 DNA marker, 제한효소, T4 DNA ligase, Taq DNA polymerase, DNA preparation kit등은 Promega사와 Bioneer사의 시약을 사용하였다.

5) 배지 및 배양조건

E. coli JM109는 LB medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)을 사용하여 37℃ incubator에서 배양시켰으며 필요에 따라 shaking incubation하였다. plasmid를 보유한 대장균은 필요에 따라 ampicillin(100 µg/ml) 과 kanamycin(25 µg/ml)이 함유된 LB medium에서 배양하였다.

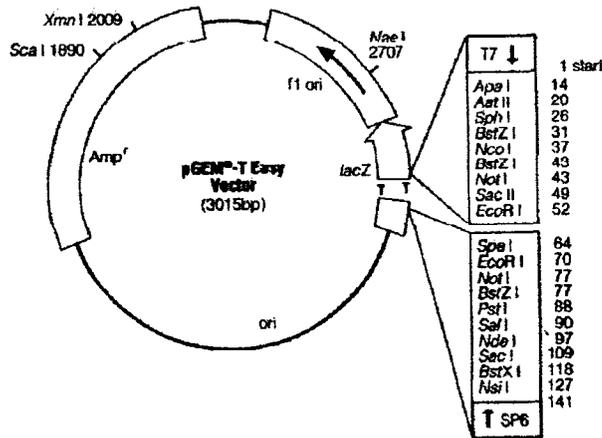


Fig. 1. pGEM-T easy vector

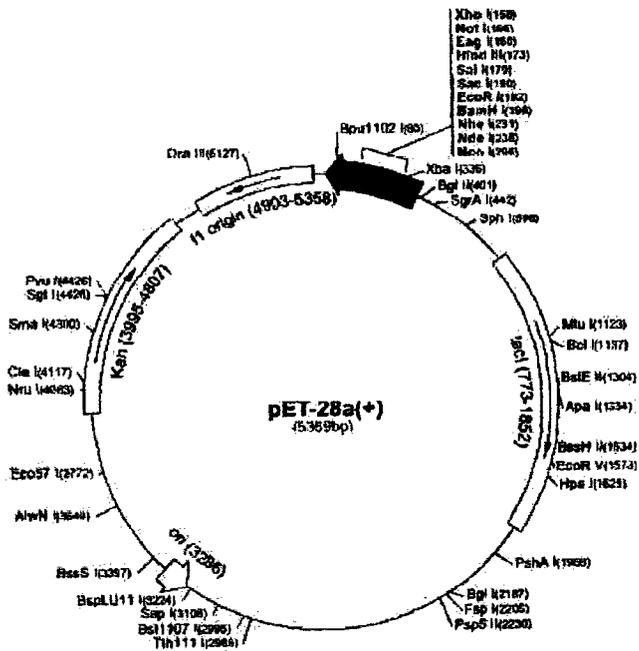


Fig. 2. pET-28b vector

Table 7. Strains and Plasmids used in this study

| Strains or plasmid | Properties |
|-------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> JM109 | <i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1, supE44, λ⁻, Δ</i> (<i>lac-proAB</i>), [<i>F'</i> , <i>traD36, proAB, lacI^fZΔ</i> M15]. |
| pGEM-T easy | <i>Amp^r, fl ori, T7 promoter, SP6</i> <i>promoter, lacZ.</i> |
| pET-28 | <i>Kar^r, Col E1 ori, fl ori, His-Taq, T7-</i> <i>Taq, lacI, T7 promoter.</i> |

*H. parasuis*에 16S small subunit ribosomal RNA gene의 염기서열을 비교하고 이를 바탕으로 RFLP에 의한 혈청형으로 감별을 보다 세분하게 하기 위하여 상기에서 언급한 16S rRNA 부위보다 더 긴 유전 절편을 얻기 위해 Genebank에 등록된 염기서열을 토대로 HPS-forward(5'-GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT-3') 및 HPS-reverse(5'-GGC TTC GTC ACC CTC TGT-3')을 각각 제작하였다.

PCR 반응조건은 5 μ l template DNA, 0.2 mM dNTPs (Quantum), 20 pmol의 각각의 primer, 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 1U *Taq* DNA polymerase (Promega)를 PCR tube에 첨가한 후 멸균증류수로 총량이 50 μ l가 되도록 조정하였다. PCR cycle은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation시킨 뒤 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 59 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 extension을 30회 반복한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 polymerization을 실시하였다. 증폭된 PCR산물이 1,475 bp 크기를 확인한 후 증폭된 DNA를 agarose gel plug에서 추출하기 위해 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, CA, USA)를 이용하였다. 분리된 DNA는 pGEM-T easy system I PCR cloning kit

(Promega)를 이용하여 pGEM-T easy vector에 cloning하였다. 재조합된 pGEM-T easy vector를 *E. coli* JM109로 형질전환시켰고, 원하는 형질전환체를 *EcoR* I으로 제한효소처리하여 선발하였다. 원하는 유전자가 삽입된 재조합 plasmid의 염기서열을 조사하였고 분석된 염기서열은 DNASIS로 분석하였다.

Gel의 Band상에서 보인대로 '1's와 '0's로 구성된 DNA서열을 TREECON package (Ver. 1.3b, Belgium)로 분석하였다. 이 package를 이용하여 *H. parasuis*의 분리주간의 근연 관계를 얻었다. UPGMA를 이용하여 clustering하고 bootstrap analysis로 확인하였다.

라. *H. parasuis* genotyping을 위한 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR 기법의 확립

Serotyping과 더불어 *H. parasuis*의 genotyping은 야외 분리주의 유전학적 연관성과 더불어 농장에서 자가백신을 사용할 때 중요한 판단 근거가 된다. 기존의 보고에 의하면 *H. influenzae*나 *H. parasuis*의 경우 ERIC-PCR (Rep-PCR)을 사용하여 genotyping을 하는 것으로 알려지고 있다. 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

1) Primers

Table 8. *H. parasuis* 유래 유전자 분석 (ERIC-PCR)에 사용된 primer set

| | |
|---------|-------------------------------------|
| ERIC-1R | 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' |
| ERIC-2 | 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3' |

2) chromosomal DNA의 분리

*H. parasuis*의 표준 균주 및 야외 균주를 LB(Luria-Bertani) broth에 접종하여 37°C Shaking-incubator에서 overnight 배양 후, 세균 pellet을 G-spin™ Genomic DNA Extraction kit(iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 chromosomal DNA를 추출하였다.

3) ERIC-PCR 조건

PCR components는 total volume 50 μ l에 10X PCR buffer 5 μ l, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 0.2 mM, primers 20 pmole, 1U *Taq* polymerase에 template DNA 4 μ l를 첨가하여 초기 denaturation은 95°C에서 2분간하였고, 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 6분간의 amplification을 35회 반복한 후, final extension을 72°C에서 6분간하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.5X TBE buffer로 용해시킨 1.5% agarose gel (0.5 μ g/ml ethidium bromide)에서 100V로 전기영동하고 화상분석기로 사진을 찍었다.

ERIC-PCR에 의해 얻어진 DNA fingerprint상에 위치하는 각각의 DNA band를 binominal matrix code(0,1)로 치환하여 TREECON package(Ver. 1.3b, Belgium)를 이용하여 분석하였다.

마. *H. parasuis* 특이 유전자의 선별 및 특성 조사

1) *H. parasuis*로부터의 유전자 추출

DNAzol액을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 먼저 4ml의 *H. parasuis* 배양액을 12,000 × g의 속도로 원심분리하여 상층액을 제거하고 200 μ l의 증류수로 재부유시킨 다음 사용한 DNAzol 액 1 ml를 첨가하여 조심스럽게 피펫으로 부유시키고 10,000 × g의 속도에서 10분간 원심분리한 상층액을 새 1.5 ml 원심분리 튜브에 옮기고 사용한 DNAzol액 1 ml 당 0.5 ml의 100% 에탄올을 첨가하여 DNA를 침전시킨다. 샘플을 위아래로 천천히 뒤집어서 잘 섞어주고 실온에서 3분간 정치시킨 다음 4,000 × g에서 2분간 원심을 실시한다. 상층액을 제거하고 DNA 펠렛은 75% 에탄올로 부유시켜 세척하고 DNA 펠렛을 200 μ l 8 mM NaOH로 녹여 실험에 사용한다.

2) 라이브러리의 작성

Sambrook *et al.*, (2001)의 방법에 준하여 실험을 실시하였다. 라이브러리의 작성을 위해 전단계에서 추출한 DNA를 *Sau3A1*을 사용하여 부분적으로 절단(partial digestion)하여 전기영동을 실시, 0.5~3 kb 구간의 DNA 절편이 들어 있는 gel 부위를 절개하여 추출한다. 벡터는 3가

지 open reading frame이 포함되도록 벡터 세 가지 (pET28-a, b, c, Invitrogen)를 섞어 *Bam*H I으로 소화시킨다. *Sau*3A I으로 소화시킨 *H. parasuis* 유래 유전자와 *Bam*H I으로 소화시킨 벡터를 ligation시켜 재조합 plasmid를 구성하였다.

3) 외래 유전자 도입 집락의 선별

구성된 재조합 plasmid를 *E. coli* BL21에 형질전환시키고 LB 배지위에 도포한 다음 30℃에서 16시간 배양하여 집락이 1~2 mm 크기가 되었을 때 번호를 매긴 나이트로 셀룰로즈 membrane을 배지의 표면과 접촉시킨다. 집락이 복사된 필터를 2 mM isopropyl- β -thiogalactopyranoside(IPTG)가 들어 있는 배지위에서 37℃, 4시간 동안 추가 배양하여 단백질을 발현시킨다. 단백질이 흡착되어 있는 membrane을 (1) 10% SDS(sodium dodecyl sulfate)에서 10분간 반응시킨다. (2) Denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5M NaCl)에서 5분간 반응시킨다. (3) neutralization solution (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4)에서 5분간 반응시킨다. (4) (3)번 실험을 1회 더 반복한다. (5) 2X SSC (0.3 M NaCl, 34 mM $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)액에서 15분간 반응시킨다. (6) 필터를 10분간 TBS 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)에 10분에 걸쳐 2회 세정한다. (7) BSA blocking buffer (3% BSA in TBS)에 1시간 동안 반응시킨다. (8) TTBS [100 mM Tris-HCl, 0.9% (w/v) NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.5]로 10분씩 2회 세정한다. (9) TBS로 10분씩 2회 세정한다. (10) anti-5 His antibody (Novogen, His-Tag Monoclonal Antibody, 0.1 μ g/ml)를 TBS에 희석하여 1시간 동안 반응시킨다. (11) TTBS 완충액에 10분씩 2회 세정한다. (12) TBS로 10분씩 2회 세정한다. (13) HRP 표지 염소 유래 항마우스 면역글로불린을 TBS에 희석하여 1시간 동안 반응시킨다. (14) TTBS 완충액으로 10분씩 2회 세정한다. (15) TBS로 5분씩 2회 세정한다. (16) 발색액 (0.018% H_2O_2 , 0.06 % 4-chloro-1-naphthol, 20% methanol in 25 ml TBS)에서 membrane을 발색시킨다. (17) 증류수로 membrane을 세정하여 반응을 종결시킨다. 발색된 membrane을 원래의 플레이트와 대조하여 양성반응을 나타낸 집락만을 선별하여 멸

균된 탐침으로 LB 액상배지가 담겨있는 cluster tube에 넣고 37℃에서 하룻밤 배양하여 라이브러리를 구성한다.

4) PCR 프라이머와 PCR 수행 조건

유전자의 염기서열 결과에 근거하여 1쌍의 프라이머를 디자인하였다. HP forward (5'- GAT CGA GTT GGA TGC CTG CAC GGT-3'), HP reverse (5'- GAT CCA TTG CAA ACC CTT CGC CCG-3'). 증폭된 PCR 산물의 예상 크기는 1.1 kb로 총 50 μ l PCR 반응액중 Taq DNA polymerase (Promega) 3U, 3 mM MgCl₂ and 1X reaction buffer [5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl, 0.01 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 5% glycerol, 0.1% Triton X-100], 0.3 mM dNTP (Promega), 그리고 *H. parasuis*에서 추출한 DNA 5 μ l를 섞고 94℃ 30초, 53℃ 90초, 72℃ 1분의 조건으로 35회 반복하여 PCR을 수행하였다. PCR로 증폭한 유전자는 ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel에서 100V 조건으로 30분 동안 전기영동을 실시하여 증폭된 유전자의 크기를 확인한다.

바. Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE)

*H. parasuis*의 대표적 genotype을 선별하기 위해 PFGE를 실시하였다. 표준 혈청형 및 분리주를 NAD가 첨가된 Tryptic soy broth(TSB) 2 ml에 접종한 후 37℃에서 진탕배양하였고, 균의 탁도는 1.5 ml의 Cell suspension buffer (100 mM Tris pH 7.5 , 100 mM EDTA pH 7.5)에 균을 넣어 colorimeter (BioMeieux S.A., Montalieu Vercieu, France)로 20%의 투명도로 현탁시켰다. 여기에 Proteinase K (20 mg/ml) 10 μ l을 넣고 잘 혼합하였다. 균 현탁액과 Proteinase K가 들어있는 tube에 1.2 % agarose (Seakem Gold agarose, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)를 섞은 후, Plug mold (Bio-Rad , USA)에 넣고 4℃에서 5분간 굳혔다. 굳힌 plug를 꺼내서 ES buffer (0.5 M EDTA, pH 9.0 ; 1 % sodium-lauroyl-sarcosine) 1.5 ml과 40 μ l의 Proteinase K(20 mg/ml)가

담긴 2 ml microcentrifuge tube에 옮긴 후 55℃ 진탕 항온수조에서 45분에서 1시간동안 처리하였다. plug를 번호가 표시된 screen caps (Bio-Rad)에 각 검체별로 넣고 55℃ 진탕 항온수조에서 plug를 세척하는데, 이 때 55℃로 미리 데워진 멸균 증류수로 15분간 한번, 55℃로 데워진 Plug wash TE buffer(10 mM Tris pH 7.5 , 1 mM EDTA pH 7.5)를 넣어 30분 동안 4회를 처리하였다. 세척 후의 plug는 TE buffer(10 mM Tris pH 7.5 , 1 mM EDTA pH 7.5) 1.5 ml에 옮겨 4℃에서 보관하였다. 4℃에 보관된 plug를 razor blade를 사용하여 1 mm 두께로 잘라 microcentrifuge tube에 옮긴 후, 제한효소용 완충액, 제한효소 (*Sma* I, 30U, Roche), BSA를 넣고 25 ℃에서 3시간동안 처리하였다. 처리가 완료된 tube는 반응액을 제거하고, 500 μ l의 TE buffer (10 mM Tris pH 7.5 , 1 mM EDTA pH 7.5)를 채워 넣었다. *H. parasuis* 의 DNA 전기영동은 CHEF (Contour Clamped Homogeneous Field) DR II electrophoresis system (Bio-Rad , USA) 방식을 사용하였으며, 소화처리 과정이 완료된 plug는 0.5X TBE buffer로 제조한 1% gel (Seakem Gold agarose, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)에 적재하고 나머지 빈 공간은 역시 동일한 1.0 % agarose gel로서 밀봉하였다. 전기영동 조건으로 0.5x TBE buffer를 사용하였으며, buffer의 온도는 14℃로 유지하였고, 6 V/cm에서 pulse time은 B1조건에서는 1초에서 38초의 범위로 설정하고 14시간동안 B2조건에서는 6초에서 8초의 범위로 설정하고 4시간동안 전기영동을 시행하였다. maker로서는 lamda DNA ladder marker (Bio-Rad, USA)를 동시에 사용하여 전기영동을 시행하였다. 전기영동 완료 후 gel은 500 ml 의 ethidium bromide 염색용액 (0.5 μ g/ml)에 넣어 30분간 염색을 실시하였고 염색이 끝나면 증류수를 이용하여 각 30분이상, 2회씩 탈색을 시켜주고 UV 장치를 이용하여 DNA band를 확인하고 폴라로이드 사진 촬영을 하였다. PFGE의 pattern 분석은 Tenover 등의 방법을 기본으로 삼고, 응용하여 시행하였다.

3. 혈청학적 진단기법의 확립 및 진단키트의 개발

가. *H. parasuis* 외막단백질 분석을 위한 외막단백질의 추출

*H. parasuis*를 배양한 다음 원심을 배양한 세균 pellet을 10 mM HEPES buffer(pH 7.4) 1 ml로 부유시킨 후 초음파 40W로 10초간 6회에 걸쳐 균체를 파괴시켰다. 깨지지 않은 균체를 제거하기 위해 4℃에서, 15,600 × g로 2분간 원심분리를 한 후 상층액을 새로운 1.5 ml centrifuge tube로 옮기고, 4℃에서 15,600 × g로 30분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 pellet을 0.2 ml의 10 mM HEPES buffer(pH 7.4)로 재부유 시켰다. 동량의 2% Sarkosyl in 10 mM HEPES buffer(pH 7.4)를 넣고, 간간히 섞어주면서 실온에서 30분간 배양한 후 4℃에서 15,600 × g로 30분간 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 10 mM HEPES buffer로 다시 한번 세척했다. 최종적으로 pellet을 50~100 μl의 10 mM HEPES buffer로 재부유시킨후 SDS-PAGE로 분석하였다.

나. SDS-PAGE

분리된 OMP의 성상을 확인하기 위하여 5% stacking gel과 12% separating gel에서 전기영동은 20 mA에서 2시간정도 시행하였고 Coomassie-blue staining을 실시한 후 band를 분석하였다.

다. 항체의 제조와 *H. parasuis* 분리주의 혈청형 분석 (serotyping)

야외에서 분리주의 혈청형을 분석하기 위해 *H. parasuis* 표준 혈청형에 대한 고도로 감작된 항혈청의 제조는 Morozumi와 Nicolet (1986)과 Rapp-Gabrielson과 Gabrielson (1992)이 보고한 이전의 방법에 준해 실시하였다. 1형에서 15형까지의 표준 혈청형의 균주를 chocolate 배지에 접종한 후 24시간 배양한 후 PBS로 집락을 수확하였다. 수확한 세균의 오염 유무를 확인하기 위해 세균 부유액을 혈액배지에 접종하여 이종균이 자라지 않는 것을 확인하였다. 세균부유액을 4×10^9 colony forming unit (cfu)/ml로 조정한 후 0.3% formaldehyde 용액 (Showa,

Tokyo, Japan)을 첨가한 후 4℃에서 24시간 불활화 시켰다. 불활화 된 표준 혈청형은 토끼에 접종하였다. 각 표준 혈청형 당 2마리의 토끼를 사용하였으며 불활화 된 세균 부유액 1 ml와 동량의 Freund's complete adjuvant (Sigma)와 혼합한 후 제조한 항원을 나누어서 피하로 접종하였다. 1차 접종 후 3주 후에 동량의 불활화 된 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 앞서 언급한 대로 동일하게 혼합한 후 동일한 방법대로 접종하였다. 2차 접종 후 2주 뒤에 한번 더 접종하였다. 3차 접종 후 10일 후에 심장채혈을 실시하여 혈액을 채취한 뒤 혈청을 분리하였고 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

상기의 가검재료에서 분리 동정된 *H. parasuis* 의 혈청형의 분석은 Morozumi와 Nicolet (1986) 등이 보고한 agar gel precipitation (AGP) 방법으로 실시하였다. 야외에서 분리된 *H. parasuis*를 chocolate agar에 접종, 37℃에서 배양하고 형성된 집락을 0.1 M PBS로 수확하였다. 수확한 세균 부유액을 4℃에서 12,000 × g로 10분 동안 원심분리하고 세균의 침전물을 0.1 g/ml으로 희석하였다. 내열성의 항원 추출액 (Heat-stable extracts)을 얻기 위하여 희석한 세균 부유액을 121℃에서 2시간 동안 고압 멸균시킨 후 12,000 × g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 항원으로 획득하였다. 0.1 M PBS에 Noble agarose를 0.6%로 용해한 뒤 슬라이드나 35 mm의 작은 Petri dish에 2 ml씩 분주하고 agar가 굳으면 punch를 사용하여 항원과 항체를 담을 구멍을 냈다. 넘치지 않을 정도로 중앙의 구멍에 40 μl 씩 항원추출액을 넣고 각 외각의 구멍에 상기에서 언급한 대로 제조한 표준 혈청형에 대한 항혈청을 넣었다. Agar가 마르지 않도록 습윤한 상태에서 72시간 동안 실온에서 반응시켰으며 매일 침강밴드 (precipitin band)의 생성 유무를 기록하였다.

라. Agar gel precipitation (AGP) test

시험관에 분주해 둔 gel medium을 끓는 물에 증탕하여 완전히 녹인후 유리판에 넘치지 않게 편 다음 굳힌다. gel 펀치로 원하는 형태로 well을 뚫고 진공펌프로 빨아낸다. 항원을 중앙 well에 넣고 humid chamber에 1시간

정치시킨 다음 주위 well에 혈청을 넣었다. Gel이 건조되지 않도록 습기가 유지되는 용기에 유리판을 넣고 뚜껑을 덮어 실온에 두고 72시간 후에 관찰하여 혈청과 항원사이에 띠가 생기면 양성으로 판정했다.

마. *H. parasuis*에서 추출한 외막단백질의 ELISA용 항원으로서의 혈청 형별 특이성 비교 실험

1) 균주 배양

Chocolate agar나 NAD-PPLO agar에 균을 접종하고 37℃, 24시간 동안 배양한다. Agar상에서 균의 집락을 확인한 다음 5 mg/l 의 농도로 NAD를 첨가한 PPLO broth에 1~2 loop의 균을 접종하고 37℃, 150 rpm에서 24시간 이상 배양시킨다.

2) 균액의 수확 및 단백질 추출

배양액을 6,000 rpm, 30분간 4℃에서 원심 분리한 다음 상층액을 버리고 침전물에 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid) 완충액(pH 7.4) 100 ml을 첨가하여 부유시킨다. 6,000 rpm, 30분간 4℃에서 원심분리 한다. 원심분리한 pellet를 10 mM HEPES (pH7.4) buffer 40 ml로 재부유 시킨 다음 12,000 × g, 4℃, 10분 동안 원심 분리한 후 pellet를 10 ml의 10 mM HEPES (pH7.4) 완충액으로 부유시킨다. 재부유한 용액을 Sonication (30%, 6회, 15초, on ice) 한 다음 12,000 × g, 4℃, 20분 동안 원심분리를 실시하여 세포 잔존물과 파쇄되지 않은 세포를 제거한다. 상층액을 144,000 × g, 4℃, 1시간 30분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet을 10 mM의 HEPES 완충액에 0.2%가 되도록 sodium N-lauroylsarcosinate를 첨가한 용액 10 ml로 재부유한 다음 실온에서 30분 동안 교반한다. 용액을 144,000 × g, 4℃, 1시간 동안 원심분리 하고 원심분리 한 pellet에 대하여 HEPES 완충액으로 2 회 세척한 다음 10 mM HEPES 완충액으로 부유시켜 -70℃에 보관한다.

바. *H. parasuis*에서 추출한 LPS의 항원형 분석

1). LPS extraction of *H. parasuis*

H. parasuis 균주 각각에 대해서 5ml PPLO broth (supplement NAD 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 배양한 후 배양물 중 1 ml(37 $^{\circ}\text{C}$ 5~6시간)을 1 l의 PPLO broth(supplement NAD 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 각각 배양한다.(37 $^{\circ}\text{C}$ 24~36시간) 배양액의 균수가 $10^7/\text{ml}$ 정도가 되도록 하고 이 배양액을 원심 분리한다.(5,000 \times g, 30분, 4 $^{\circ}\text{C}$) Srinand과. Hassan에 의한 방법으로 pellet을 10 ml의 PBS로 3번 정도 씻어낸 다음 4분 sonication(20,000Hz)후 원심분리한다.(5000g, 60분) 상층액만을 취하여 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 사용전까지 보관한다. acetone을 균액의 10배 분량을 넣어 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 놓아둔 다음 노란 상층액은 제거하고 하층액은 5배 분량의 acetone으로 세척한다. 세척한 다음 rotary evaporator에 의해 건조시킨 후 마쇄하여 LPS추출에 이용하였다. 건조된 세균을 65 $^{\circ}\text{C}$ 증류수로 6%가 되도록 현탁시키고 동량의 Phenol(65 $^{\circ}\text{C}$)과 혼합하여 5분 동안 stirring 한 다음 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시키고 원심분리한다.(2,000 \times g, 60분) 상층액을 수거하여 48시간 동안 D.W에 투석한 다음 동결하여 시험에 이용하였다. LPS항원은 SDS-PAGE를 하여 silver 염색 및 commassie brilliant blue 염색으로 단백질에 의한 오염여부 및 LPS를 확인하였다.

2). Silver 염색

50% methanol / 10% acetic acid 액에 1시간 30분 이상 정치시킨후 3차 증류수로 30분씩 3회 세척한다. 1차 반응용액(0.36% NaOH 10 ml, 14.8 M ammonium hydroxide 0.7 ml, 0.4% silver nitrate)으로 15분간 교반하고 3차 증류수로 세척한다. 2차 반응용액(1% citric acid 0.25 ml, 38% formaldehyde 25 μl , D.W 50 ml)으로 20분간 반응 후 5% acetic acid를 첨가하여 반응을 중지시킨다.

사. 항원 coating 및 coating 농도 결정

항원종류별 적절농도를 결정하기 위하여 항원을 5배에서 10,240배까지 coating buffer(0.1 M carbonate buffer)로 희석한 후 녹인 용액 100 μl

를 plate에 가하고 4℃ 냉장실에서 하룻밤 동안 반응시켜 coating하였다. 세척용액(0.01% Thimerosal in PBS, pH 7.2, Sigma T-5125) Nunc-immuno™ Wash 12를 이용하여 5회 세척하고 200 μ l의 blocking buffer(3% gelatin in PBS)를 분주한 후 37℃에서 1시간 incubation한 후 세척용액으로 5회 세척 한 후 air-dry 한다. 항원 종류에 따른 양성혈청과 음성혈청을 혈청 희석액(0.01% Thimerosal, 1% BSA in PBS pH 7.2)으로 100배 희석한 후 well 당 100 μ l 씩 분주하여 24℃에서 30분간 반응시켰다. 다시 세척용액으로 6회 세척한 후 100 μ l의 희석된 conjugate 용액(0.01% Thimerosal in PBS로 1000배 희석)을 넣고 24℃에서 30분 동안 반응시킨 다음 6회 세척 한 후 100 μ l의 기질용액(3.5 mM Citric acid, 293 mM glycine, 0.5 mM 2, 2'-azinodiethylbenzothiazolicsultone(ABTS), 0.015% H₂O₂, pH 4.2)을 가하고 15분간 반응시켜 발색시킨 다음 1M HCl로 반응을 중지시킨 다음 405 nm 파장에서 흡광도(optical density : OD)를 측정하였다.

아. *H. parasuis* 감염 진단용 ELISA 진단키트의 개발

1) 특이 단백질의 코팅조건 확립

세계적으로 가장 널리 분포되어 있는 혈청형 2형과 5형을 가지고 ELISA 항원으로서의 코팅조건을 확립하는 시험을 실시하였다. 불활화 된 항원의 단백질농도를 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 test tube protocol로 측정한 후 농도를 결정하였고 코팅하는 항원의 농도에 따른 비교(4가지 항원농도를 비교실험), microplate 제품에 따른 비교(2가지 회사 제품에 대한 비교실험), 항원코팅시간에 따른 비교(3가지 코팅시간에 대한 비교실험), 확립된 코팅조건의 재현성 실험(3반복 재현성 실험)을 실시하였다.

4. 백신 후보균주의 선발 및 백신의 효력시험

가. 세포외막 (outer membrane, OMP)의 분리 및 분석

세포외막의 분리는 Carlone등 (1985, 1986)이 보고한 방법으로 실시하

였다. 세균 pellet을 10 mM HEPES(*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, Sigma, MO, USA) buffer(pH 7.4) 1 ml로 부유시킨 후 tube를 얼음 속에 넣은 채로 초음파기기 MSE Sonoprep 150 ultrasonic disintegrator (Curtin Matheson Scientific Inc., TX, USA)를 이용하여 40 W로 10초간 6회에 걸쳐 균체를 파괴시킨다. 깨지지 않은 균체를 제거하기 위해 4℃에서 15,600 × g로 2분간 원심분리를 하고 상층액을 새로운 1.5 ml ultramicrocentrifuge tube로 옮기고 초원심 분리기(Optima™ TL Ultracentrifuge, Beckmanm, CL, USA)를 이용하여 4℃에서 16,000 × g로 30분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고, pellet을 0.2 ml의 10 mM HEPES buffer(pH 7.4)로 재부유 시킨 후 동량의 2% Sarkosyl in 10 mM HEPES buffer(pH 7.4)를 넣고, 간간히 섞어주면서 실온에서 30분간 배양한 후 4℃에서 16,000 × g로 30분간 원심분리를 하고 상층액을 버리고 10 mM HEPES buffer로 재차 세척해 주었다. pellet을 50~100 μl의 10 mM HEPES buffer로 재부유시킨 후 추출된 OMPs는 -20℃에 보관하여 SDS-PAGE 실험에 사용하였다.

나. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli gel system (Laemmli, 1970)을 약간 수정하여 실시하였다. *H. parasuis* 총단백질의 분석은 우선 균을 10 ml의 tryptic soy broth(10 μg/ml NAD in TSB)에서 37℃로 24~48시간동안 진탕배양하였다. 배양한 균액 3 ml를 채취하여 1.7 ml tube에 넣고 1,200 rpm에서 2분간 원심한 후 상층액을 버리고 침전물을 0.15M PBS(pH7.2)로 2회 세척하였다. 침전물을 30 μl PBS로 부유한 후 동량의 2X SDS loading buffer로 충분히 혼합한 후 10분 동안 끓인 후 원심한 후 상층액을 SDS-PAGE로 전기 영동하였다.

SDS-PAGE는 Discontinuous buffer system으로 5% stacking gel

(pH 6.8) 및 12% separating gel (pH 8.8) 사용하였다. 분석하고자 하는 샘플 50 μl 을 2X sample loading buffer [0.2 M Tris (pH 6.8), 4% SDS, 32% glycerol, 7.2% β -mercaptoethanol (Sigma) 및 0.4% bromophenol blue (Quantum)] 혼합한 후 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 끓인 후 spin down하고 상층액을 사용하였다. 전기영동한 후 gel을 고정액 (methanol : DDW : acetic acid = 45 : 45 : 10)으로 고정시킨 후 0.125% Coomassie brilliant blue R-250(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)으로 염색하였다.

다. Western hybridization

Western hybridization은 Towbin 등(1992)이 보고한 방법으로 실시하였다. 전개된 PAGE gel에서 nitrocellulose membranes로 단백질을 이동시킨 후 nitrocellulose membrane을 5% skim milk (in TBS(pH7.5))에서 1시간 이상 blocking 시킨 후 500배 희석된 일차 항체로 실온에서 4시간 반응 시켰다. 일차항체를 제거하기 위하여 TTBS(0.05% Tween20 in TBS)로 3~4회 세척한 후 1000배 희석한 이차 항체인 Horseradish peroxidase conjugated anti-swine IgG goat antibody(Sigma) 로 membrane을 3시간 반응시켰다. 이차 항체를 제거하기 위하여 TTBS로 4회 세척한 후 developing reagent (0.6 mg/ml 4-chloro-1-naphthol+cold methanol, 0.018% H_2O_2 in TBS)로 발색시켰다.

라. 백신 후보 균주의 mouse에서의 병원성 시험

선발된 *H. parasuis* 분리주를 tryptic soy broth 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24~48시간 배양하고 균수를 각각 2×10^9 CFU/ml, 2×10^{10} CFU/ml를 맞춘 후 4주령 된 mouse에 각군당 5마리씩 접종은 마리당 0.5 ml씩 복강에 접종하였다. 마우스에서의 백신의 효력을 관찰하기 위해 백신 후보균주들을 각각 TSB+NAD에 100 ml씩 배양하고 배양균액을 원심한 후 상층액을

제거하였다. 침전된 균을 0.15 M PBS(pH 7.2)로 2×10^9 CFU/ml로 부유시킨 후, 0.6% formalin을 1 : 1로 혼합하고 48시간 불활화 실시한 후 aluminum gel로 24시간 adjuvant하여 백신을 제조하였다. 제조한 백신을 0.5 ml(2×10^9 CFU/ml)씩 mouse의 복강내에 1차 접종한 후, 1차 접종 2주 후 2차 접종, 2차 접종 10일 후 살아있는 균을 마리당 1×10^{10} CFU로 복강내 접종하였다.

마. 불활화 백신의 대량 제조

대표적인 균주를 선발한 후 선발된 *H. parasuis* 를 10 ml의 TSB+NAD (100 µg/ml NAD in tryptic soy broth)에 접종하고 37°C에서 48시간 진탕배양한 후 미리 가온한 100 ml TSB+NAD에 옮겨 접종한 후 37°C에서 가장 높은 흡광도(OD₆₀₀)를 보일 때 까지 진탕배양을 하였다. Plateau에 도달한 때에 배양액을 미리 가온한 1000 ml의 TSB+NAD에 접종한 후 일정시간마다 OD₆₀₀값을 plateau까지 배양한 후 colony forming unit (CFU)를 측정하였다. 배양한 균액을 6000 rpm 30분 동안 원심분리 한 후 상층액을 버리고 수확한 세균을 0.15 M PBS(pH 7.2)로 1회 세척한 후 60 ml의 PBS로 부유하였다. 세균 부유액에 동량의 0.6% formalin을 천천히 첨가한 후 48시간 상온에서 불활화 시킨 후 불활화 유무를 확인하기 위해 formalin으로 처리한 세균부유액 100 µg을 chocolate agar에 접종하고 37°C에서 배양하였다.

Chocolate agar에서 세균이 자라지 않으면 세균 부유액을 멸균된 3겹의 거즈가 담겨있는 깔때기를 통과시켜 덩어리를 제거하고 바로 adjuvanting 과정을 실시하였다. 백신의 1 dose는 1×10^9 CFU/ 2 ml되도록 하고 알루미늄 젤은 총량의 10%로 첨가하였다. 상온에서 24시간 천천히 혼합한 후 제조된 백신의 오염 유무를 확인하기 위해 Blood agar에 백신을 200 µl를 접종하였다. 배양 후 48시간 후 Blood agar에서 균이 증식하지 않으면 mouse 5마리를 사용하여 복강내에 각각 0.5 ml씩 접종하고 2주 동안 관찰한 후 마우스가 폐사 또는 임상증상 유무

를 확인하였다. 제조한 백신은 4℃에 사용할 때까지 보관하였다.

바. 야외농장을 대상으로 한 백신의 효력 및 독성 시험

제조한 자가 백신은 동일한 농장에 접종을 하였다. 3주령에 1차로 5주령에 2차로 두당 각각 2 ml씩 근육으로 접종하였다. 백신에 의한 항체 형성을 조사하기 위해 백신 접종 전, 1차접종후 1주 뒤, 2차 접종 후 3주 뒤에 각각 채혈하여 이와 같은 ELISA 방법으로 흡광도를 측정하여 항체 형성 유무를 조사하였다

사. 항체가 측정을 위한 ELISA 조건 확립 및 혈청검사

항원의 단백질 농도는 BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) 방법으로 측정하였다. 돼지 혈액 채취하여 혈청 분리하여 -20℃에 보관하여 실험에 사용하였다. Coating buffer로 항원을 2 µg/ml의 농도로 희석하고 ELISA plate 각 well에 100 µl 씩의 희석된 항원을 분주한 다음 4℃에서 overnight 하고 각 well에 200 µl 씩 Washing buffer를 분주하여 3회 세척하고 각 well에 200µl 씩의 Blocking buffer를 분주한 다음 실온에서 1시간 정치하여 반응시킨 뒤 각 well에 200 µl 씩의 Washing buffer를 분주하여 3회 세척하였다. 다른 U-form microplate를 이용하여 첫 well에 180 µl의 Blocking buffer 와 20 µl의 가검혈청을 혼합하고 나머지 well에는 100 µl 씩의 Blocking buffer를 분주한 후, 첫 well의 혼합액 100 µl를 11번 well까지 2배수 계단 희석하여 옮긴 다음 마지막 well의 100 µl는 버렸다. 12번 well은 음성 대조군으로 사용하였다. 항원이 흡착된 ELISA plate에 2진 희석된 가검혈청과 음성혈청(PBS) 100 µl를 각 well에 옮긴 후 실온에서 1시간 반응시키고 Washing buffer를 각 well에 200 µl씩 분주하여 3회 세척하여 Conjugate(Horseradish peroxidase conjugated anti-pig IgG goat antibody)을 Blocking buffer로 1/1000 희석하여 각 well에 100 µl씩 분주한 후 실온에서 1시간 반응시켰다. Washing buffer를 각 well에

200 μl 씩 분주하여 4회 세척하고 각 well에 100 μl 씩의 기질용액(3.5 mM Citric acid, 293 mM glycine, 0.5 mM 2, 2'-azinodiethylbenzothiazolicsultone(ABTS), 0.015% H_2O_2 , pH 4.2)을 분주한 다음 실온에서 약 20분간 반응시키고 50 μl 의 stopping solution(0.05% SDS)를 가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader(490 nm)로 흡광도를 측정하였다.

제 2 절 실험 결과 및 고찰

1. *H. parasuis*의 분리 기법 확립 및 균 특성 연구

가. 분리배지 및 배양 조건의 최적화 실험

1) 가검재료에서의 채취부위의 확립

*H. parasuis*는 정상적으로 호흡기도에 군집하는 일반 기생세균이다. 비강이나 tonsil등의 호흡기도에서 분리시 오염도가 매우 높아 균의 분리가 매우 어려웠다. Pijon등의 연구 결과에 의하면 호흡기도나 tonsil에서 분리되는 *H. parasuis*는 주로 비병원성 세균으로 나타났다. 주로 글래썬병의 병변을 나타내는 돼지의 폐에서 세균분리를 한 결과 *H. parasuis*보다는 *Actionobacillus pleuro -pneumoniae*가 주로 분리되었다. 최적의 균분리조건 탐색에 대한 연구를 통해 가검재료에서 *H. parasuis*의 분리방법을 확립하였으며, 그 방법에 대하여 요약하면 다음과 같다. 육성돈 보다 이유자돈에서 주로 분리하여야 하며 임상증상이 나타나는 돼지에서 분리하는 것이 분리율이 높았다. 그리고, 폐사된지 24시간이 지난 돼지에서는 분리율이 매우 낮았다. 또한, 항생제를 투여하지 않은 돼지에서 분리하는 것이 분리율이 높았다. 전신감염이 나타나는 돼지, 즉 슬관절등의 관절부위가 부어 오른 돼지에서만이 병원성이 있는 *H. parasuis*를 분리할 수 있었으며 섬유소가 침착된 비호흡기도, 즉 폐, 심낭, 흉막, 복막의 표면에서 조직을 채취하거나 swab을 하는 것이 분리율이 높았다. 분리시에는 chocolate agar에 직접 도말 하기 보다는 혈액배지에 가검재료를 도말한 후 *Staphylococcus aureus*을 직선으로 접종하여 위성현상을 확인하는 것이 분리율을 높일 수 있는 동시에 *Actinobacillus pleuropneumoniae*와의 감별이 용이했다.

2) 분리배지의 비교

Table 9. 분리배지 및 배양조건에 따른 *H. parasuis* 배양결과

| 배지 종류 | 배양조건 | 배양결과 |
|-----------------------|----------|------|
| TSA+NAD | 37℃ 호기배양 | 우수 |
| Modifeid Friis' broth | 37℃ 호기배양 | 우수 |
| BAP + NAD | 37℃ 호기배양 | 보통 |
| BHIA + NAD | 37℃ 호기배양 | 보통 |
| Chocolate agar | 37℃ 호기배양 | 보통 |

- NAD (Nicotinamide Dinucleotide) : 5 µg/ml 농도로 사용

- 배양결과 TSA + NAD와 Modified Friis' broth가 우수한 것으로 나타났으나 Modified Frii's broth는 가격이 매우 고가인 단점이 있어 TSA + NAD를 주 분리용 배지로 사용하였다. *H. parasuis* 균주 특성상 용혈이 없기 때문에 상대적으로 고가인 혈액배지에 배양할 필요가 없는 것으로 판단되었으나 용혈을 나타내는 다른 균종과의 구분을 위해 1차적인 선택배지로써 사용하기로 하였다.

3) 배양 조건별 배양 결과

Table 10. 배양조건 (호기, 혐기, 5% CO₂)별 *H. parasuis* 배양 결과

| 배양조건 | 배양결과 |
|-----------------------|------|
| 호기 배양 | 우수 |
| 혐기 배양 (Gas Pack) | 미약 |
| 5% CO ₂ 배양 | 미약 |

나. Stock medium의 선발

*H. parasuis*는 매우 불안정한 균주이기 때문에 장기보존시 일반적으로 동결건조를 하고 있는 실정이다. 그러나 동결건조 시설이 없는 곳에서는 장기보존을 위해 동결건조를 할 수 없고 새로운 보관방법이 필요하다. 따라서 -70℃에서 장기간 보관할 수 있는 stock medium을 여러 가지로 조사한 결과 25% glycerol이 함유된 TSB가 4개월간의 동결보관 중에도 집균수가 줄어들지 않았고 따라서 본 연구에서는 25% glycerol이 함유된 TSB를 사용하였다.

다. *H. parasuis*의 항생제감수성검사

야외 분리주를 대상으로 항생제 감수성 검사를 실시한 후 저항성을 분석하고자 1993년에 분리한 야외 분리주의 저항성과 비교 분석하였다.

총 13가지의 항생제에 대해 감수성 시험을 실시한 결과 대부분의 분리주는 cephalothin 및 linco-spectin, ampicilli, gentamicin 및 tylosin에는 높은 민감성을 보였으나 trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin, penicillin 및 tetracycline에는 높은 저항성을 보였다 (Table 11). 1993년에 분리된 야외 분리주의 항생제 저항성과 비교할 때 최근 분리주의 경우, danofloxacin, erythromycin 및 tetracycline의 감수성은 떨어지고 다른 항생제에 대한 감수성은 증가하였다.

Table 11. Comparison of antibiotic susceptibility of *H. parasuis* isolates

| Antimicrobial agent | Isolates tested in the study | Isolates reported by Seok <i>et al.</i> (1993) |
|---------------------|------------------------------|--|
| Ampicillin | 84.6* | 76.9* |
| Cephalothin | 96.2 | 84.6 |
| Danofloxacin | 76.9 | 100.0 |
| Erythromycin | 38.5 | 69.2 |
| Gentamicin | 84.6 | 15.4 |
| Kanamycin | 65.4 | 15.4 |
| Linco-spectin | 100.0 | - |
| Neomycin | 73.1 | 7.7 |
| Penicillin | 50.0 | 30.8 |
| Tetracycline | 38.5 | 61.5 |
| Tiamulin | 80.8 | - |
| Trimethoprim- | | |
| Sulfamethoxazole | 30.8 | 46.2 |
| Tylosin | 84.6 | - |

* (No. of isolates showing sensitivity/ No. of isolates tested)X100(%)

라. *H. parasuis*의 실험용균주보관조건에 따른 생존능 실험

Table 12. plate에 도말한 실험용 균주의 보관 조건에 따른 보존성 실험

| 생존 일수 | 보관장소 | | |
|-------|---------|----|----|
| | 37℃ 배양기 | 실온 | 냉장 |
| Day 1 | + | + | + |
| Day 2 | + | + | + |
| Day 3 | + | + | + |
| Day 4 | + | + | + |
| Day 5 | - | - | + |
| Day 6 | - | - | + |
| Day 7 | - | - | + |
| Day 8 | - | - | + |
| Day 9 | - | - | - |

+ : 균 생존

- : 균 비생존

마. *H. parasuis*의 공시균주 및 야외 분리주의 분리

1) *H. parasuis* 표준 혈청형 균주의 확보

연구과제수행 전까지 국내에서는 *H. parasuis*의 15개 혈청형 모든 균주가 확보되어 있지 않았다. 본 연구과제를 시작하면서 14개의 혈청형 표준균주 일부를 국립수의과학검역원과 H연구소 그리고 독일의 Dr. Shimmel에게서 모두 확보했으며 ATCC에 등재된 분리주도 확보하였다. 이중 표준혈청형 14주와 ATCC주 1주등 도합 15주를 현재 보유하고 있다. 국내에서 글래씨씨병의 병변을 보이는 가검물에서 분리를 시도 하였으며 현재까지 분리된 야외분리주는 모두 18주이다. 많은 시행착오와 University of Minnesota의 Dr. Pijoan의 자문을 얻어 야외에서의 가검물에서의 분리기법을 확립하여 예상 목표수치인 50주를 분리하기 위해서는 올 하반기까지 분리시도를 계속할 계획이다.

Table 13. Reference strains of *H. parasuis* used in this study

| Strain original code ^a | KRG serovar ^b |
|-----------------------------------|--------------------------|
| H409 | 1 |
| H410 | 2 |
| H411 | 3 |
| H412 | 4 |
| H413 | 5 |
| H780 | 6 |
| H781 | 7 |
| H553 | 9 |
| H555 | 10 |
| H465 | 11 |
| H425 | 12 |
| H793 | 13 |
| H792 | 14 |
| H790 | 15 |

^aThe strains in the table are reference strains supplied by Dr. Schimmel.

^bKRG : Kielstein and Rapp-Gabrielson serotyping scheme (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).

Table 14. Genotype and phenotype classification of thirty five *H. parasuis* isolates analyzed in this study

| No | Isolate code | Region of isolation | Year of isolation | Eps* | RFLP type | OMP pattern |
|----|--------------|---------------------|-------------------|------|-----------|-------------|
| 1 | KM 1 | Kangwon-do | 1997 | 19 | I | A |
| 2 | KM 2 | Kangwon-do | 1997 | 27 | III | B |
| 3 | KM 3 | Kangwon-do | 1997 | 13 | II | ND** |
| 4 | KM 4 | Kangwon-do | 1998 | 29 | III | ND |
| 5 | KM 5 | Chollabuk-do | 1998 | 28 | III | A |
| 6 | KM 6 | Kyongsangbuk-do | 1998 | 22 | III | ND |
| 7 | KM 7 | Kyongsangbuk-do | 1998 | 9 | IV | ND |
| 8 | KM 8 | Kyongsangbuk-do | 1998 | 4 | IV | ND |
| 9 | KM 9 | Kyongsangbuk-do | 1998 | 18 | II | ND |
| 10 | KM 10 | Kyongsangbuk-do | 1998 | 8 | IV | ND |
| 11 | KM 11 | Kyongsangnam-do | 1998 | 16 | IV | A |
| 12 | KM 12 | Kyongsangnam-do | 1999 | 30 | III | ND |
| 13 | KM 13 | Chollanam-do | 1999 | 11 | IV | A |
| 14 | KM 14 | Chungchongnam-do | 1999 | 9 | IV | ND |
| 15 | KM 15 | Chungchongnam-do | 1999 | 15 | IV | ND |
| 16 | KM 16 | Chungchongbuk-do | 2000 | 4 | IV | ND |
| 17 | KM 17 | Cheju-do | 2000 | 23 | III | ND |
| 18 | KM 18 | Cheju-do | 2000 | 25 | III | ND |
| 19 | KyoungHP19 | Kyongsangbuk-do | 1999 | 5 | IV | A |
| 20 | 96512 | Chungchongbuk-do | 1996 | 1 | IV | A |
| 21 | KyoungHP17 | Kyongsangbuk-do | 1999 | 2 | IV | A |
| 22 | HP4(std) | Kyongsangbuk-do | 1999 | 21 | III | B |
| 23 | 99HP2 | Kyonggi-do | 1999 | 7 | IV | A |
| 24 | KyoungHP3 | Kyongsangbuk-do | 1999 | 7 | IV | A |
| 25 | HP5(std) | Kyongsangbuk-do | 1999 | 24 | IV | A |
| 26 | 99HP4 | Kyonggi-do | 1999 | 7 | IV | A |
| 27 | 99HP5 | Kyonggi-do | 1999 | 12 | IV | A |
| 28 | KyoungHP18 | Kyongsangbuk-do | 1999 | 14 | IV | A |
| 29 | Hapdok | Chungchongnam-do | 1998 | 17 | IV | A |
| 30 | 99HP3 | Kyonggi-do | 1999 | 6 | IV | A |
| 31 | 97652 | Chungchongnam-do | 1997 | 10 | IV | A |
| 32 | KyoungHP12 | Kyongsangbuk-do | 1999 | 20 | I | A |
| 33 | KyoungHP13 | Kyongsangbuk-do | 1999 | 3 | IV | A |
| 34 | 97052 | Chungchongnam-do | 1997 | 3 | IV | A |
| 35 | IVKB06023 | Kyonggi-do | 2002 | 26 | III | B |

* Eps: ERIC-PCR patterns. ** ND = not done.

호흡기 증상, 신경증상, 보행이상 등의 임상증상을 보이고 병리학적인 소견으로 다발성 장막염 및 관절염 등을 보이는 가검재료에서 균분리를 시도하였다. 이들 재료에서 총 50개 *H. parasuis* 분리주를 분리하였다. *H. parasuis*의 분리는 일반 세균보다 매우 어렵다. 일단 항생제를 투여한 돼지에서는 균분리가 거의 되지 않고 폐사 후 24시간이 지나면 세균을 분리할 수 없다. 또한 임상증상이 오래 지속된 돼지에서도 균 분리가 어렵다. 가검재료를 채취할 때도 조직 깊은 부위에서 채취할 경우에도 분리가 잘 되지 않는다. 균주 분리 동정 후 chromosomal DNA를 분리하여 PCR-RFLP 및 ERIC-PCR 실시하였다. 분리된 균은 25% glycerol 배지에 -70℃에 보관하였다. 분리주 중에서 대표적인 균주 23주를 선택하여 OMP 분석 및 항생제 감수성 실시하였다.

2) *H. parasuis* recovery 방법의 확립

일반적으로 *H. parasuis* 는 장기보관을 위해 동결건조를 실시하고 있다. 일반 세균처럼 증류수나 생리식염수 또는 broth로 현탁하여 직접 고형배지인 5 µg/ml의 NAD가 포함된 혈액배지나 Tryptic soy agar(TSA) 또는 chocolate agar에서 도말할 경우 거의 자라지 않은 것으로 나타났다. Recovery시에는 반드시 5 µg/ml의 NAD가 포함된 tryptic soy broth(TSB)에서 37℃에서 18~24시간 배양한 후 전술한 고형배지에 옮겨야만 증식이 됨을 확인하였다.

3) 국내 분리주의 혈청형 분석

1997년부터 2002년까지 분리된 *H. parasuis* 35주 중에서 25주의 혈청형을 0.6% agar gel precipitation test (한천겔응집반응)로 분석하였다. 총 25개 분리주 중에서 52% (13주)는 혈청형이 확인되었고, 나머지들 중에서 nontypeable 균주가 가장 높은 48%(12개 분리)의 분포를 보였다. 혈청형이 확인된 분리주중 12형이 24%(6주), 5형이 16%(4주), 2, 4, 11형이 각각 4%(1주)를 차지하였다 (Fig. 3).

*H. parasuis*의 혈청형은 세계의 각 지역마다 유행하는 혈청형이 각기 다르다. 국내의 경우 백 등(1982)이 다발성 장막염을 보이는 4마리의 자돈에서 국내 최초로 *H. parasuis*를 분리, 보고 하였다. 이 등 (1994)은 이유자돈에서 채취한 186개의 비강재료에서 8주의 *H. parasuis*를 분리한 후 혈청형을 분석한 결과 2, 3, 4, 및 5형임을 보고하였다. 이후 배 등(1998)은 다발성 장막염을 보이는 29두의 자돈에서 총 4주를 분리하였고 혈청형 분석결과 모두 5형임을 확인하였다. 그러나 본 연구결과로는 non typeable이 가장 많았고 확인된 혈청형 중에서는 12형이 가장 많은 것으로 나타났다. 본 연구에서는 국내에서 가장 많은 수를 분리하였고, 또한 이전에 분리된 혈청형의 분포와는 매우 다른 양상을 보이고 있다. 세계적인 혈청형의 분포를 살펴보면 독일, 호주, 캐나다 및 스페인 지역에서는 2, 4, 5 및 12형의 혈청형이 유행하는 것으로 나타나고 있다 (Blackall 등., 1996; Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992; Rubies 등. 1999). 국내의 경우 혈청형의 분포율과 non typeable주의 분포율도 이들 지역과 비슷한 비율을 나타냈다.

혈청형과 병원성과의 관련성은 아직까지 논란의 여지가 있다. Kielstein과 Rapp-Gabrielson (1992)는 혈청형 1, 5, 10, 12, 13, 및 14형이 가장 병원성이 높고 혈청형 2, 4, 8, 및 15형이 중간정도의 병원성을 지니고 있으며 혈청형 3, 6, 7, 9 및 15형이 약병원성이거나 병원성이 거의 없다고 보고하였다. 본 연구의 혈청형 결과를 기준으로 볼 때 10주의 분리주가 매우 강한 병원성을 보이고 (혈청형 5와 12) 2주는 높은 병원성 (2형과 4형) 1주가 약병원성 (11형)으로 분류되어 국내 분리주는 대부분 병원성이 높은 것으로 확인되었다.

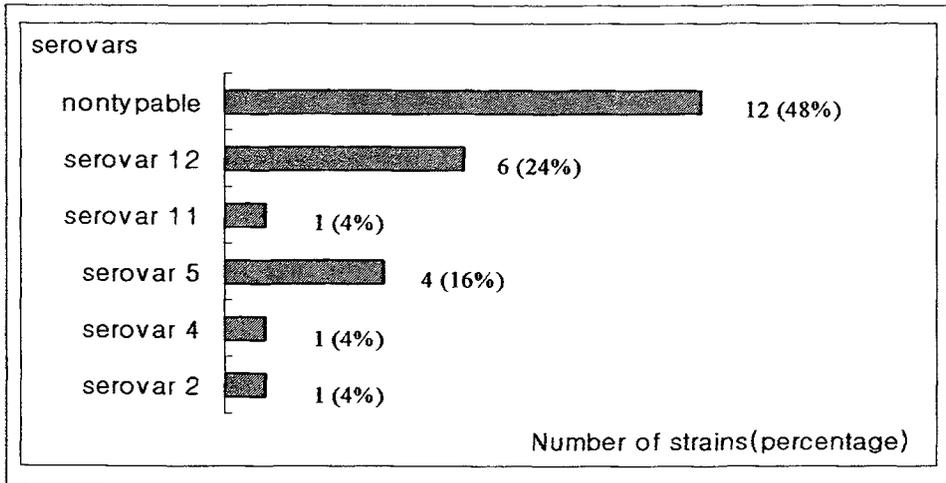


Fig. 3. Prevalence of the different serovars of *H. parasuis* isolates in Korea.

2. 분자생물학적 *H. parasuis* 진단 기법의 확립

가. 16S rRNA 유전자를 이용한 *H. parasuis* 진단용 PCR 기법의 확립 I

1) PCR

두 개의 *H. parasuis* 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 한 결과 821 bp의 크기의 밴드가 증폭되었으며 이 크기의 밴드는 이전의 보고와 일치하였다 (Oliveira 등, 2001). 15개 혈청형 (혈청형 8은 미확보로 실시하지 않았음) 및 strain ATCC 19417주는 PCR을 실시한 결과 동일한 크기의 밴드가 검출되었다 (그림 4.) 35개 *H. parasuis* 야외 분리주는 모두 동일한 밴드가 증폭되어 검출되었으나, *Salmonella typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*은 어떠한 DNA 절편도 증폭되지 않았다. PCR은 *H. parasuis*를 신속하게 진단하는데 매우 특이적임을 알 수 있었

다. 특히 *H. parasuis*의 경우 배양이 까다롭고 동정시 많은 시간이 소요되기 때문에 PCR은 더욱 신뢰할 만한 방법임이 확인되었다. Oliveira등 (2001)이 발표한 보고에 의하면 돼지 호흡기도에서 분리할 수 있는 15개의 세균을 대상으로 본 PCR을 적용해 본 결과 *Actinobacillus indolicus*의 경우에만 약한 밴드를 형성할 뿐 다른 균주에서는 어떠한 밴드의 증폭도 일어나지 않음이 확인되었다.

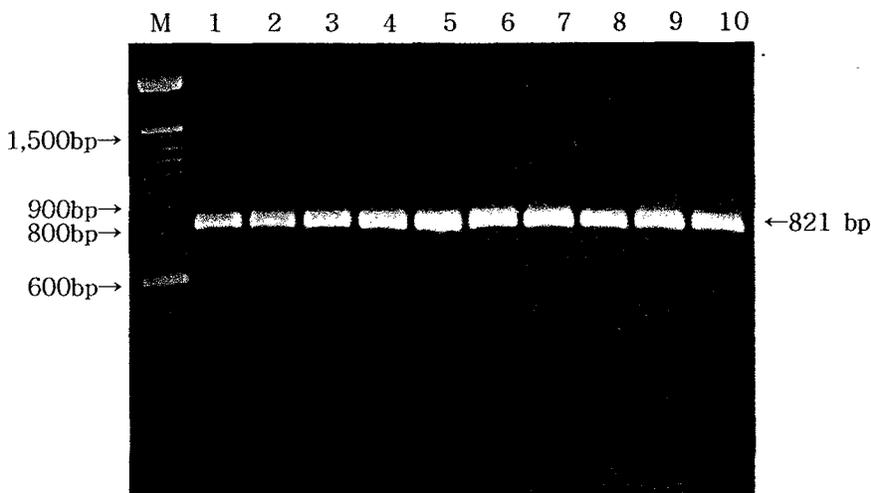


Fig. 4. PCR detection of *H. parasuis* Lanes: M, 100bp DNA molecular marker (GibcoBRL); 1-5, *H. parasuis* reference strains serovar 3, 4, 5, 7 and 9; 6-10, representative *H. parasuis* isolates.

2) RFLP

Oliveira 등 (2002)이 발표한 보고에 의하면 증폭된 821bp,의 PCR단편을 제한 효소 *Hind* III and *Hinf* I으로 처리한 후 형성되는 단편의 다형성 (RFLP)으로 *H. parasuis* 주를 4가지 type으로 분류가 가능하다고 하였다. 15주의 표준 혈청형에서 증폭된 821 bp PCR 산물을 두 종류 제한 효소로 절단한 후 얻어진 RFLP를 가지고 분류를 시도하였

다. 혈청형 7 및 9의 표준주에서 증폭된 PCR절편은 두 종류의 제한 효소로 절단되지 않았다 (type I). 혈청형 13, 14 및 15에서 증폭된 PCR 산물은 제한효소 *Hind* III에만 절단되는 것으로 나타났다 (type II). 혈청형 1, 2, 3, 4, 6, 10 및 11에서 증폭된 PCR 산물은 *Hinf* I 처리시에만 절단되는 것으로 나타났다 (type III). 혈청형 5 및 12에서 증폭된 PCR 산물은 *Hind* III 및 *Hinf* I의 두 제한 효소에서 모두 절단되는 것으로 나타났다 (type IV). 이러한 결과는 종전의 결과와 대부분 일치하는 것으로 나타났다. 35개 분리주의 증폭된 PCR 산물을 상기의 방법대로 처리한 후 PCR-RFLP를 실시한 결과 2주는 type I (5.7%), 2주는 type II (5.7%), 9 주는 type III (25.7%), 그리고 22주는 type IV (62.9%)에 속하는 것으로 나타났다 (Fig. 5. and Table 15.). Oliveira 등 (2002)이 발표한 기존의 보고에 의하면 PCR-RFLP의 경우 혈청형 분석이나 ERIC-PCR을 이용한 유전형 분석 보다는 구분력이 떨어지지만 증폭된 PCR산물을 두 가지 제한 효소 *Hind* III와 *Hinf* I으로 처리하였을 경우 증폭된 PCR절편의 절단 유무에 의해 4가지 type, 즉 1형 (혈청형 7, 9), 2형 (혈청형 5, 10, 14), 3형 (혈청형 1, 2, 3, 4, 6, 11)과 4형 (혈청형 12)로 분류할 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 기존의 연구와 약간 상이한 결과가 나타났다. 즉 혈청형 5의 경우 기존의 보고에 의하면 2형에 속했는데 본 연구에서는 4형에 속하는 것으로 나타났고 혈청형 13과 15형의 경우 2형에 속하는 것으로, 혈청형 10형의 경우 기존의 보고에서는 2형에 속하였는데 본 연구에서는 3형에 속하는 것으로 약간씩 차이를 보였다. 35주의 야외분리주를 분석한 결과 22주(62.9%)가 4형 (혈청형 5와 12형이 속해있음)에 속하는 것을 볼 때 국내의 분리주는 5와 12혈청이 주로 분포하고 있음을 굳이 혈청형 분석을 하지 않아도 간접적으로 알 수 있음이 확인되었다. 그러나 non typeable strain인 경우 PCR-RFLP로는 분류되지 않는 점은 이 방법의 한계임이 드러났다.

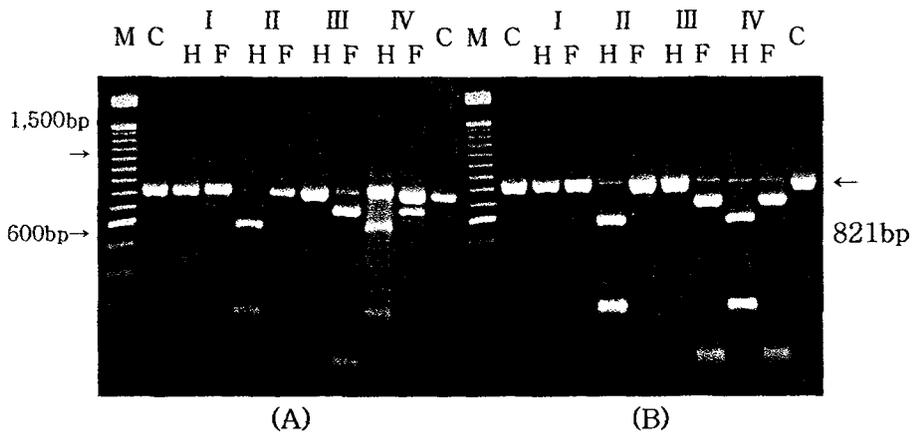


Fig. 5. PCR-RFLP profiles of reference strains (A) and isolates (B) of *H. parasuis* after digestion by *Hind* III and *Hinf* I. Lanes M, 100bp DNA molecular marker; C, No enzyme; type I, uncut by both enzymes; type II, digestion by only *Hind* III (H); type III, digestion by only *Hinf* I (F); type IV, digestion by both *Hind* III and *Hinf* I.

Table 15. PCR-RFLP types and classification of 35 *H. parasuis* isolates

| PCR-RFLP type | <i>Hind</i> III digestion | <i>Hinf</i> I digestion | Serovars belong to each type | No. of isolates (%) |
|---------------|---------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------|
| I | × | × | 7, 9 | 2 (5.7) |
| II | ○ | × | 13, 14, 15 | 2 (5.7) |
| III | × | ○ | 1, 2, 3, 4, 6, 10, 11 | 9 (25.7) |
| IV | ○ | ○ | 5, 12 | 22 (62.9) |

나. 16S rRNA 유전자를 이용한 *H. parasuis* 진단용 PCR 기법의 확립 II

1) 혈청형 분석용 PCR

*H. parasuis*의 각 혈청형에서 chromosomal DNA를 추출하였고, 이를 주형으로 HP 16S rRNA primer를 사용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 수행하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였으며, agarose gel electrophoresis를 통하여, 약 1.5 kb 크기의 16S rRNA fragment의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 6.).

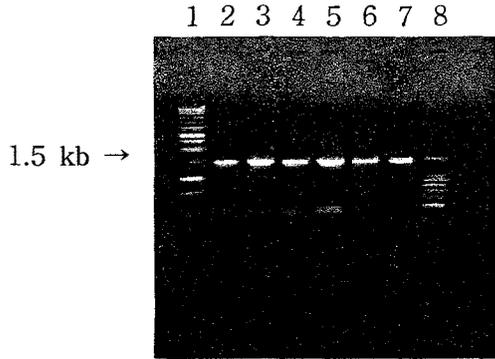


Fig. 6. 16S rRNA PCR product from *H. parasuis* 유래 (lane 1 ; 1 kb ladder marker, lane 2 ; 16S rRNA PCR product (52℃), lane 3 ; 16S rRNA PCR product (54℃), lane 4 ; 16S rRNA PCR product (55℃), lane 5 ; 16S rRNA PCR product (56℃), lane 6 ; 16S rRNA PCR product (57℃), lane 7 ; 16S rRNA PCR product (58℃), lane 8 ; 100 bp ladder marker

PCR 반응 조건은 52~58℃에서 1 분 동안 annealing 과정을 수행 하였을 때, 뚜렷한 PCR band를 확인 할 수 있었다. extension 반응 은 16S rRNA 유전자의 크기가 약 1.5 kb 이므로 72℃에서 1 분 동안 충분히 수행하였다.

2) 각 혈청형에 따른 HP 16S rRNA primer를 이용한 PCR

PCR 반응은 앞에서 기술한 조건으로 수행하였으며, 다만 annealing 과정은 60℃에서 1분 동안 수행 하였다. extension 반응 은 16S rRNA 유전자의 크기가 약 1.5 kb 이므로 72℃에서 1 분 동안 충분히 수행하였다. 각 혈청형에 대하여 약 1.5 kb의 뚜렷한 PCR band를 확인할 수 있었다.

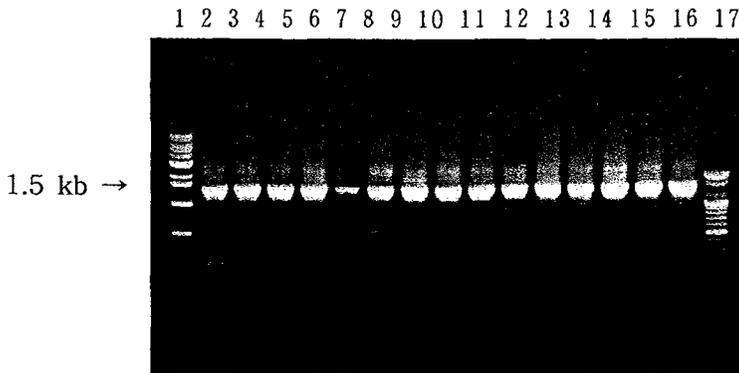


Fig. 7. 각 혈청형에 따른 HP 16s RNA primer를 이용한 PCR (lane 1 ; 1 kb ladder marker, lane 2 ; *H. parasuis* (ATCC 표준주), lane 3 ; *H. parasuis* serotype #1, lane 4 ; *H. parasuis* serotype #2, lane 5 ; *H. parasuis* serotype #3, lane 6 ; *H. parasuis* serotype #4, lane 7 ; *H. parasuis* serotype #5, lane 8 ; *H. parasuis* serotype #6, lane 9 ; *H. parasuis* serotype #7, lane 10 ; *H. parasuis* serotype #8, lane 11 ; *H. parasuis* serotype #9, lane 12 ; *H. parasuis* serotype #11, lane 13 ; *H. parasuis* serotype #12, lane 14 ; *H. parasuis* serotype #13, lane 15 ; *H. parasuis* serotype #14, lane 16 ; *H. parasuis* serotype #15, lane 17 ; 100 bp ladder marker)

3) *Pasteurellaceae* 및 *Enterobacteriaceae* 에 대한 HP 16s RNA primer의 특이성 검사

HP 16S rRNA primer를 이용하여 *Pasteurellaceae* 및 *Enterobacteriaceae* 속 등에 대하여 PCR을 수행하고 그 결과를 비교하였다. PCR 반응은 앞에서 기술한 조건으로 수행하였으며, 다만 annealing 과정은 60℃에서 1분 동안 수행 하였다. extension 반응은 16S rRNA 유전자의 크기가 약 1.5 kb 이므로 72℃에서 1 분 동안 충분히 수행하였다.

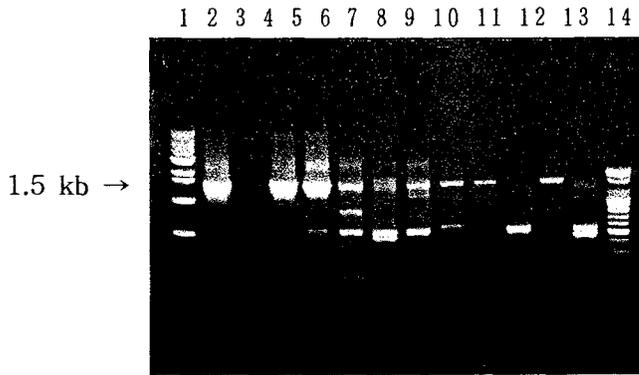


Fig. 8. *Pasteurellaceae* 및 *Enterobacter* 에 대한 HP 16s RNA primer 를 이용한 PCR 결과 (lane 1 ; 1 kb ladder marker, lane 2 ; *H. parasuis* (ATCC 표준주), lane 3 ; *Actinobacillus pleuropneumoniae* type 2 의 16S rRNA PCR, lane 4 ; *A. pleuropneumoniae* type 5 의 16S rRNA PCR, lane 5 ; *Pasteurella multocida* type A 의 16S rRNA PCR, lane 6 ; *P. multocida* type D 의 16S rRNA PCR, lane 7 ; *Aeromonas hydrophila* 의 16S rRNA PCR, lane 8 ; *Escherichia coli* 의 16S rRNA PCR, lane 9 ; *Enterobacter cloacae* 의 16S rRNA PCR, lane 10 ; *Klebsiella pneumoniae* 의 16S rRNA PCR, lane 11 ; *Proteus mirabilis* 의 16S rRNA PCR, lane 12 ; *Staphylococcus aureus* 의 16S rRNA PCR, lane 13 ; *Salmonella enteritidis* 의 16S rRNA PCR, lane 14 ; 100 bp ladder marker)

분석결과 *H. parasuis*가 속해 있는 family *Pasteurellaceae* 구성원인 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5와 *Pasteurella multocida* 등에 대해서 약하지만 양성반응을 나타내는 것으로 확인되었다. 이것은 Oliveira가 디자인한 primer에서도 공통적으로 나타나는 것으로 이번에 디자인한 primer가 *H. parasuis* 특이 유전자는 아닌 것으로 평가하였다.

PCR-RFLP에서 사용된 제한 효소 *Hind* III와 *Hinf* I는 *H. parasuis* 표준주 및 국내 분리주를 4가지 type으로 구분할 수 있었다. 이 때 사

용된 PCR 산물의 크기는 821 bp였다. PCR-RFLP에 의해 보다 세분화된 typing이 가능한지를 알아보기 위해 새롭게 primer를 제작하여 821 bp보다 더 긴 1,475 bp의 16S rRNA를 증폭하였다. 4가지 그룹보다 더 구별력이 있는 제한효소를 찾고 표준 혈청형간의 근연관계를 분석하기 위해 16S rRNA의 유전자를 좀더 길게 증폭하기 위해 GeneBank를 이용하여 새로운 primer를 제작하였다. 균주는 *H. parasuis* 표준혈청형 1-15형 (4형은 제외) 및 ATCC 19417를 사용하였으며 PCR에 의해 예상대로 1,475 bp크기의 유전자 절편을 증폭할 수 있었다 (Fig. 9). PCR에 의해 증폭된 1,475 bp 크기의 DNA절편을 agarose plug에서 정제한 후 정제된 DNA는 pGEM-T easy vector로 cloning하였고 삽입된 DNA를 가진 recombinant pGEM-T easy vector를 *E. coli* JM109에 형질전환시켰고, 목적하는 유전자 재조합 plasmid를 제한 효소 처리에 의해 선별하였다. 원하는 재조합 plasmid를 순수 정제한 후 염기서열을 분석하였다.

PCR-RFLP방법으로 처리할 때 *Hind* III와 *Hinf* I보다 구별력을 보이는 제한효소는 찾을 수 없었다. 표준 혈청형간의 증폭된 16S rRNA의 염기서열을 분석한 결과 50 bp에서 80 bp, 150 bp 에서 200 bp, and 800 에서 to 900 bp사이의 염기서열이 혈청형간의 차이가 심한 반면에 나머지 부위는 비교적 염기서열의 유사성이 높은 것으로 나타났다 (Fig. 10).

16S rRNA 염기서열을 근거로 하여 최소한의 coherence tree를 그려 보았다 (Fig. 11). 모든 혈청형의 16S rRNA의 부분적인 염기서열이 다르게 나타났다. 그러나 *H. parasuis* ATCC 91417 및 혈청형 2, 13, 15, 10, 11이 근연관계에 있어 매우 근접하게 나타났다. 이 결과에서 그려진 phylogenetic tree는 Oliveira등 (2002)이 기존에 발표한 결과와 유사한 것으로 나타나나 *H. parasuis* 혈청형간의 근연관계는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

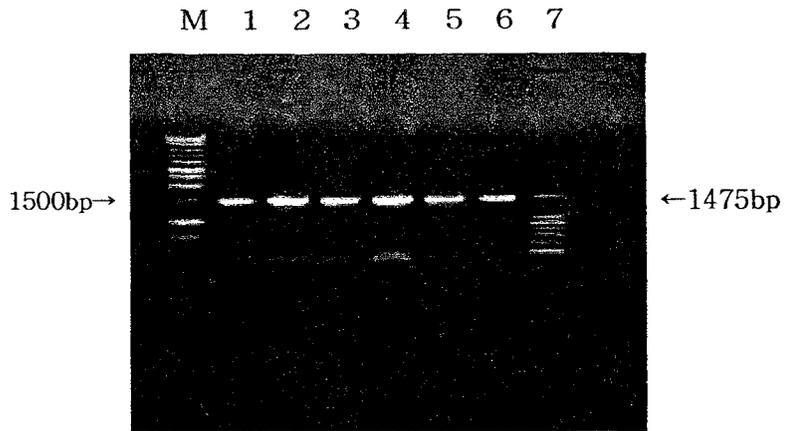


Fig 9. Amplification of 16S rRNA gene from *H. parasuis*.
Lanes M, 1kb ladder marker; 1 to 6, serovar 1, 3, 7, 8, 14, and 15 respectively; 7, 100bp ladder marker.

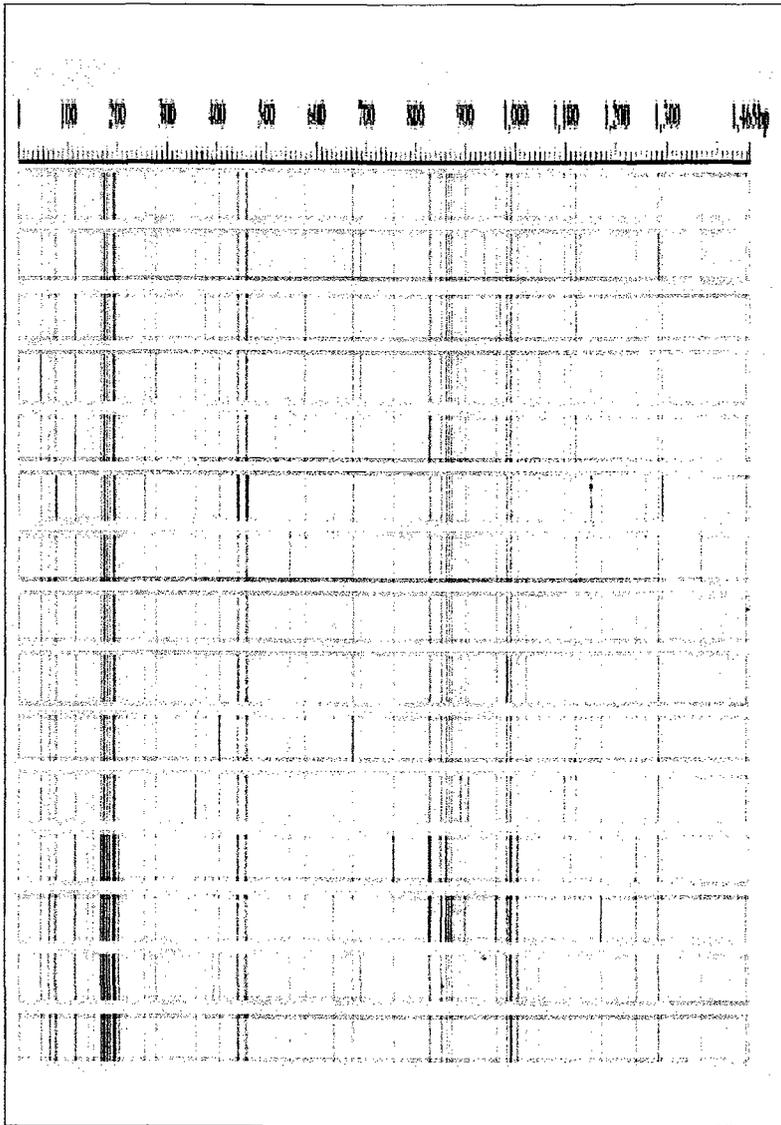


Fig 10. Homology of 16S rRNA sequences of 15 *H. parasuis* reference strains.

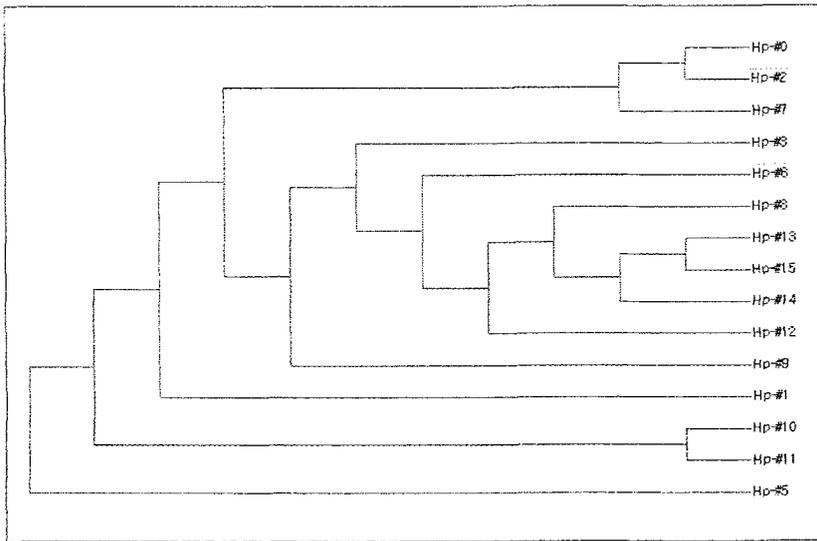


Fig 11. Coherence tree of *H. parasuis* reference strains.

다. 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석

```

*      *      *      *
20      40      60
hp-#0 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#1 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#2 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#3 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#5 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#6 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 75
hp-#7 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#8 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 73
hp-#9 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#10 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#11 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#12 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 74
hp-#13 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 75
hp-#14 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 75
hp-#15 : CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC : 75
CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTAGCAGGAGGCTTGTTC

*      *      *      *
80      100      120      140
hp-#0 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#1 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#2 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#3 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#5 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#6 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#7 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#8 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 148
hp-#9 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#10 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#11 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#12 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 149
hp-#13 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 150
hp-#14 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 150
hp-#15 : TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG : 150
TTGGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGATCTGGCTTATGGAGGGGGATAACACGGGAAACTG

*      *      *      *
160      180      200      220
hp-#0 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#1 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#2 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#3 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#5 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#6 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#7 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#8 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 223
hp-#9 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#10 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#11 : TTGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#12 : TCGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 224
hp-#13 : TCGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 225
hp-#14 : TCGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG : 225
hp-#15 : TCGCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG
T GCTAATACCGCGTATTCGCGAAGAGTGGGAGGCCATGGCCATAGATGAGCCAAAGTG

*      *      *      *
240      260      280      300
hp-#0 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#1 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#2 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#3 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#5 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#6 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#7 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#8 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 298
hp-#9 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#10 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#11 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#12 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 299
hp-#13 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 300
hp-#14 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 300
hp-#15 : GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA : 300
GGATTAGGTAGTGGTGGGGTAAAGGCCTCCAAGCCGACGACTCTAGCTGGCTGAGAGGATGACCAGCCACA

```

Fig. 12. *H. parasuis* 각 혈청형들에 대한 16S rRNA PCR product의 DNA 염기서열 분석


```

*          1220          *          1240          *          1260          *
hp-#0 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#1 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#2 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#3 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#5 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#6 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#7 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#8 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1273
hp-#9 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#10 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#11 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#12 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1274
hp-#13 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1275
hp-#14 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1275
hp-#15 : TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG : 1275
TAGGGCTACACACGTCGTACAATGGTGCATACAGAGGG GACGAAGCCCGGAGGTGG GTGAATCTCAGAAAGTG

```

```

*          1280          *          1300          *          1320          *          1340          *
hp-#0 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#1 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#2 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#3 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#5 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#6 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#7 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#8 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1348
hp-#9 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#10 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#11 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#12 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1349
hp-#13 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1350
hp-#14 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1350
hp-#15 : CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC : 1350
CATCTAAGCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTC

```

```

*          1360          *          1380          *          1400          *          1420          *
hp-#0 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#1 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#2 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#3 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#5 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#6 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#7 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#8 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1423
hp-#9 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#10 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#11 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#12 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1424
hp-#13 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1425
hp-#14 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1425
hp-#15 : GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG : 1425
GCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCAATGGGAGTGGGTGTACCAGAAGTAGATAG

```

```

*          1440          *          1460
hp-#0 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#1 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#2 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#3 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#5 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#6 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#7 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#8 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1462
hp-#9 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#10 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#11 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#12 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1461
hp-#13 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1464
hp-#14 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
hp-#15 : CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA--- : 1463
CTTAACTGAAAGGGGGCGTTTACCACGGTATATTCAA

```

Fig. 12. *H. parasuis* 각 혈청형들에 대한 16s RNA PCR product의 DNA 염기 서열 분석

라. *H. parasuis* genotyping을 위한 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus(ERIC)- PCR 기법의 확립

ERIC-PCR이 *Hemophilus*종의 유전형 분석에 매우 유용한 수단이었음이 알려짐에 따라 본 연구에서는 ERIC-PCR을 이용하여 표준주 및 야의 분리주의 유전형을 분석하였다. 두 가지의 ERIC PCR primer로 증폭된 DNA 절편들의 크기는 100bp에서 2,072bp 사이에 위치하였으며 세 번에 걸쳐 재현성 실험을 한 결과 각 밴드의 명암도에는 차이가 있을 뿐 전체적인 DNA fingerprint에는 차이가 없어 높은 재현성을 보였다. 14가지의 표준 혈청형은 각각 고유한 ERIC-PCR의 DNA fingerprint를 나타냈다 (Fig. 13-A). 35개의 야의 분리주를 대상으로 ERIC-PCR을 실시한 결과 30가지의 ERIC-PCR Patterns (Eps)으로 분류되었다(Fig. 13-B). 이를 바탕으로 35개 분리주의 coherence tree은 TREECON package를 사용하여 작성한 결과 Fig. 14. 와 같이 나타났다. 국내 분리주를 대상으로 한 ERIC-PCR에 의해 증폭된 DNA의 단편의 수가 많지 않은 것으로 보아 Ruiz등(2001)이 지적한 대로 국내 분리주는 매우 병원성이 높은 것으로 판단되었다. ERIC-PCR과 PCR-RFLP결과와 비교할 때, 동일한 PCR-RFLP형에 속하는 분리주들은 ERIC-PCR에서 얻어진 근연관계에서 매우 근접한 관계를 나타나는 것을 볼 수 있다 (Fig. 14). 이러한 결과는 매우 흥미로운 것으로 ERIC-PCR이 PCR-RFLP의 동일한 그룹 내에서 보다 세분화 시킬 수 있는 방법임이 확인되었다.

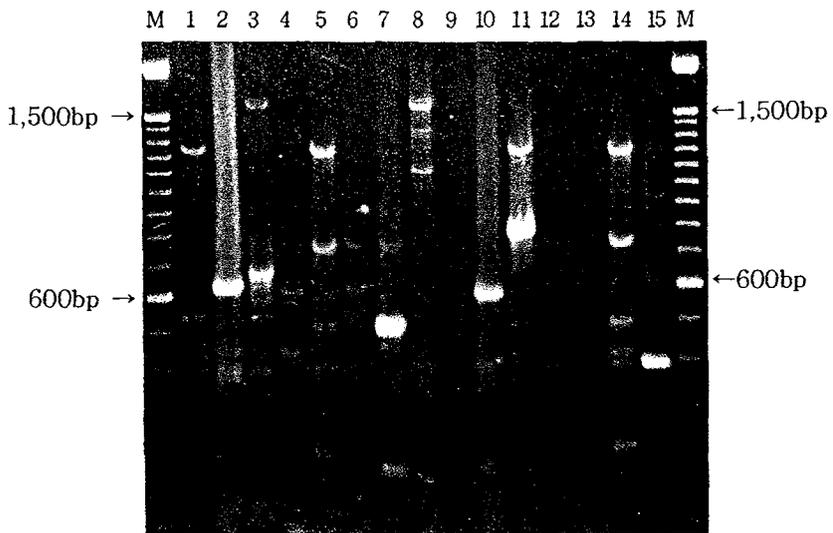


Fig. 13-A. ERIC-PCR fingerprints of reference strains of *H. parasuis* Lanes: M, 100bp DNA molecular marker; 1, ATCC 19417; 2-15, reference strains of *H. parasuis* from serovars 1-15 except serovar 8.

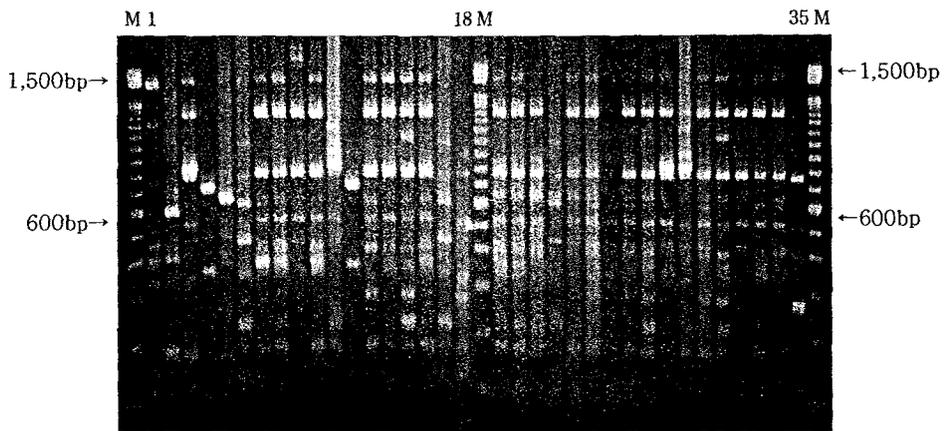


Figure 13-B. ERIC-PCR fingerprints of the isolates of *H. parasuis*. Lanes M, 100bp DNA molecular marker; 1-35, *H. parasuis* isolates (shown at Table 14).

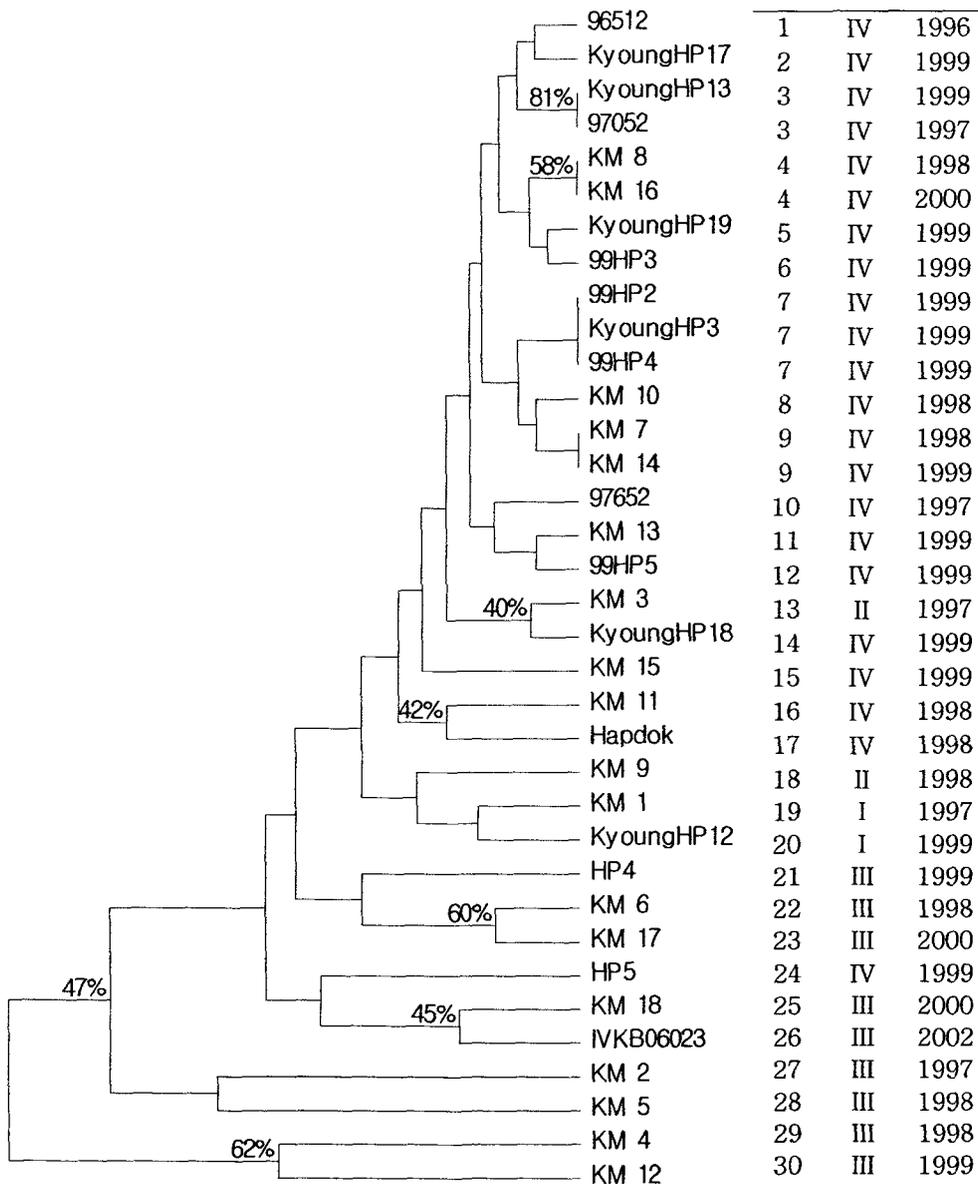


Figure 14. Phylogenetic tree of *H. parasuis* isolates This dendrogram was generated from a simple-matching similarity matrix by means of the unweighted pair-group average clustering method. The isolates were grouped into PCR-RFLP types on the right.

마. *H. parasuis* 특이 유전자의 선별 및 특성 조사

1) *H. parasuis* 특이 유전자(2A3)에 대한 PCR 검사 결과

H. parasuis chromosomal DNA library 의 screening을 통하여 얻어진 clone 들에 대하여 insert의 삽입여부와 그 크기를 확인하기 위하여 library를 제작한 plasmid인 pET-28 vector의 multiple cloning site 양쪽에 위치한 T7 promoter primer 와 T7 terminator primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 앞에서 기술한 조건으로 수행하였으며, 다만 annealing 과정은 55℃에서 1분 동안 수행 하였다. 각 clone들에 대하여 각각의 뚜렷한 PCR band를 확인 할 수 있었다.

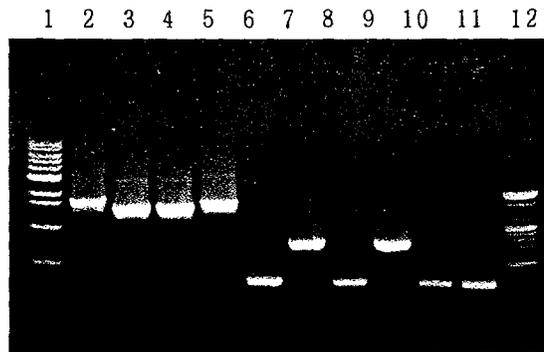


Fig. 15. *H. parasuis* library clone 들에 대한 T7 promoter primer, T7 terminator primer를 이용한 PCR (lane 1 ; 1 kb ladder marker, lane 2 ; *H. parasuis* library clone 1B12, lane 3 ; *H. parasuis* library clone 2A3, lane 4 ; *H. parasuis* library clone 2A4, lane 5 ; *H. parasuis* library clone 2A8, lane 6 ; *H. parasuis* library clone 2C1, lane 7 ; *H. parasuis* library clone 2E1, lane 8 ; *H. parasuis* library clone 2E4, lane 9 ; *H. parasuis* library clone 2G5, lane 10 ; *H. parasuis* library clone 2G9, lane 11 ; pET-28 a vector, lane 12 ; 100 bp ladder marker.)

2) 혈청형별 *H. parasuis*에 대한 2A3 primer의 PCR 결과

PCR 반응은 앞에서 기술한 조건으로 수행하였으며, 다만 annealing 과정은 60℃에서 1분 동안 수행 하였다. extension 반응은 16S rRNA 유전자의 크기가 약 1.5 kb 이므로 72℃에서 1분 동안 충분히 수행하였다. 각 혈청형에 대하여 약 1.1 kb의 뚜렷한 PCR band를 확인 할 수 있었다.

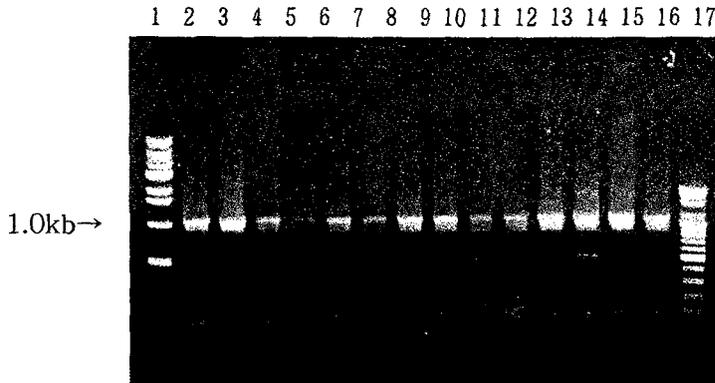


Fig. 16. 혈청형별 *H. parasuis*에 대한 2A3 primer의 PCR 결과 lane 1 ; 1 kb ladder marker, lane 2 ; *H. parasuis* (ATCC 표준주), lane 3 ; *H. parasuis* serotype #1, lane 4 ; *H. parasuis* serotype #2, lane 5 ; *H. parasuis* serotype #3, lane 6 ; *H. parasuis* serotype #4, lane 7 ; *H. parasuis* serotype #5, lane 8 ; *H. parasuis* serotype #6, lane 9 ; *H. parasuis* serotype #7, lane 10 ; *H. parasuis* serotype #8, lane 11 ; *H. parasuis* serotype #9, lane 12 ; *H. parasuis* serotype #11, lane 13 ; *H. parasuis* serotype #12, lane 14 ; *H. parasuis* serotype #13, lane 15 ; *H. parasuis* serotype #14, lane 16 ; *H. parasuis* serotype #15, lane 17 ; 100 bp ladder marker)

3) *Pasteurellaceae* 및 *Enterobacteriaceae*에 대한 2A3 primer의 특이성 시험

2A3 primer를 이용하여 *Pasteurellaceae* 및 *Enterobacteriaceae* 속 등에 대하여 PCR을 수행하고 그 결과를 비교 하였다. PCR 반응은 앞에서 기술한 조건으로 수행하였으며, 다만 annealing 과정은 69℃에서 40초 동안 수행 하였다.

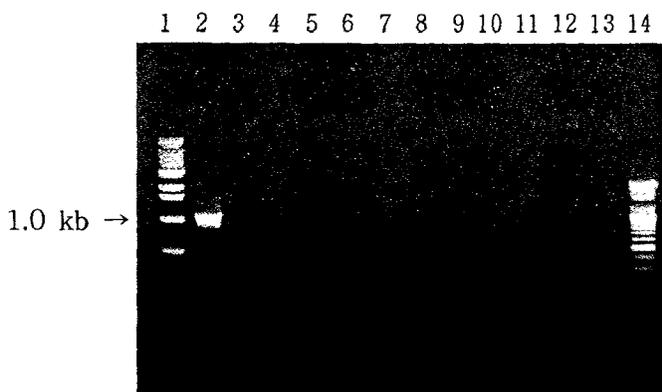


Fig. 17. *Pasteurellaceae* 및 *Enterobacteriaceae* 에 대한 2A3 primer를 이용한 PCR lane 1 ; 1 kb ladder marker, lane 2 ; *H. parasuis* (ATCC 표준주), lane 3 ; *Actinobacillus pleuropneumoniae* type 2 의 2A3 PCR, lane 4 ; *A. pleuropneumoniae* type 5 의 2A3 PCR, lane 5 ; *Pasteurella multocida* type A 의 2A3 PCR, lane 6 ; *P. multocida* type D 의 2A3 PCR, lane 7 ; *Aeromonas hydrophila* 의 2A3 PCR, lane 8 ; *Escherichia coli* 의 2A3 PCR, lane 9 ; *Enterobacter cloacae* 의 2A3 PCR, lane 10 ; *Klebsiella pneumoniae* 의 2A3 PCR, lane 11 ; *Proteus mirabilis* 의 2A3 PCR, lane 12 ; *Staphylococcus aureus* 의 2A3 PCR, lane 13 ; *Salmonella enteritidis* 의 2A3 PCR, lane 14 ; 100 bp ladder marker)

4) PCR을 통하여 얻은 각 유전자들의 Cloning

2A3 primer를 이용한 PCR을 통하여 얻은 *H. parasuis*의 각 혈청형에 대한 PCR product를 Promega사의 pGEM-T easy system I PCR cloning kit를 이용하여 pGEM-T easy vector에 삽입하여 cloning하였다. 그리고 이를 확인하기 위해서 각 유전자가 삽입된 plasmid를 cloning 된 유전자의 양쪽 바로 바깥쪽에 위치한 *EcoR* I 제한효소 절단부위를 *EcoR* I 제한효소를 이용하여 처리하여 pGEM-T easy vector에 성공적으로 *H. parasuis* library clon 유전자가 cloning된 것을 확인 할 수 있었다(Data not shown). 이번에 새롭게 검색한 2A3 유전자의 경우

Genebank에서 검색한 결과 지금까지 보고된 어떠한 유전자하고도 상관성이 없어 *H. parasuis* 특이 유전자를 세계최초로 탐색한 것으로 사료된다. (논문 작성중)

5). 특이 유전자(2A3) 염기서열의 분석

```

*           20           *           40           *           60           *
2A3-5 : NATCGAGTTGGATGCCTGCACGGTCGGTAAAGAGAATTTCCCTGTGATTTGGCTGTCCGGTGGTAATAAGCCCAT : 76
2A3-2 : NATCGAGTTGGATGCCTGCACGGTCGGTAAAGAGAATTTCCCTGTGATTTGGCTGTCCGGTGGTAATAAGCCCAT : 76
2A3-1 : NATCGAGTTGGATGCCTGCACGGTCGGTAAAGAGAATTTCCCTGTGATTTGGCTGTCCGGTGGTAATAAGCCCAT : 76

```

```

*           620           *           640           *           660           *           680
2A3-5 : TCAGCTACCATTACGGTTGCAAAGACTAATACGGTGGCGGTGAGTTGCGACAACGGTGTGACTAAGATGTAAG : 684
2A3-2 : TCAGCTACCATTACGGTTGCAAAGACTAATACGGTGGCGGTGAGTTGCGACAACGGTGTGACTAAGATGTAAG : 684
2A3-3 : TCAGCTACCATTACGGTTGCAAAGACTAATACGGTGGCGGTGAGTTGCGACAACGGTGTGACTAAGATGTAAG : 684
2A3-6 : TCAGCTACCATTACGGTTGCAAAGACTAATACGGTGGCGGTGAGTTGCGACAACGGTGTGACTAAGATGTAAG : 684
*****

*           700           *           720           *           740           *           760
2A3-5 : TACGGCTACCACCGATAACACGTTCTGCACGAACATAATCTTCTTCCCATGAGAACTACGTTTGCACGCCACCAC : 760
2A3-2 : TACGGCTACCACCGATAACACGTTCTGCACGAACATAATCTTCTTCCCATGAGAACTACGTTTGCACGCCACCAC : 760
2A3-3 : TACGGCTACCACCGATAACACGTTCTGCACGAACATAATCTTCTTCCCATGAGAACTACGTTTGCACGCCACCAC : 760
2A3-6 : TACGGCTACCACCGATAACACGTTCTGCACGAACATAATCTTCTTCCCATGAGAACTACGTTTGCACGCCACCAC : 760
*****

*           780           *           800           *           820           *
2A3-5 : ACCAGCAAGTTGTGGGGTATAAACAATCGCAATGGCTAGATGATAATCGGTACTGCGTTACCTAAGGTTGCAAGC : 836
2A3-2 : ACCAGCAAGTTGTGGGGTATAAACAATCGCAATGGCTAGATGATAATCGGTACTGCGTTACCTAAGGTTGCAAGC : 836
2A3-3 : ACCAGCAAGTTGTGGGGTATAAACAATCGCAATGGCTAGATGATAATCGGTACTGCGTTACCTAAGGTTGCAAGC : 836
2A3-6 : ACCAGCAAGTTGTGGGGTATAAACAATCGCAATGGCTAGATGATAATCGGTACTGCGTTACCTAAGGTTGCAAGC : 836
*****

*           840           *           860           *           880           *           900           *
2A3-5 : AATACTGCGGCAAGTGCAATACCAGGGAATGCCATTAAGATGTCCATAAAAGCATAATGACTTCGTTACCGAGCT : 912
2A3-2 : AATACTGCGGCAAGTGCAATACCAGGGAATGCCATTAAGATGTCCATAAAAGCATAATGACTTCGTTACCGAGCT : 912
2A3-3 : AATACTGCGGCAAGTGCAATACCAGGGAATGCCATTAAGATGTCCATAAAAGCATAATGACTTCGTTACCGAGCT : 912
2A3-6 : AATACTGCGGCAAGTGCAATACCAGGGAATGCCATTAAGATGTCCATAAAAGCATAATGACTTCGTTACCGAGCT : 912
*****

*           920           *           940           *           960           *           980
2A3-5 : TGTCTGCGGTGCGCAGCAGTTGCCCTAAGATACTGCCGAGTCAATGGCAAGTGCFACTGCACCAAGTCCGATAAA : 988
2A3-2 : TGTCTGCGGTGCGCAGCAGTTGCCCTAAGATACTGCCGAGTCAATGGCAAGTGCFACTGCACCAAGTCCGATAAA : 988
2A3-3 : TGTCTGCGGTGCGCAGCAGTTGCCCTAAGATACTGCCGAGTCAATGGCAAGTGCFACTGCACCAAGTCCGATAAA : 988
2A3-6 : TGTCTGCGGTGCGCAGCAGTTGCCCTAAGATACTGCCGAGTCAATGGCAAGTGCFACTGCACCAAGTCCGATAAA : 988
*****

*           1000          *           1020          *           1040          *           1060
2A3-5 : GAGTGAATGTTGAGCCCGTAAATTAAGCGAGATAAAATATCACGTCACAGACGGTCTGTCCCAAACCAAGTAATCT : 1064
2A3-2 : GAGTGAATGTTGAGCCCGTAAATTAAGCGAGATAAAATATCACGTCACAGACGGTCTGTCCCAAACCAAGTAATCT : 1064
2A3-3 : GAGTGAATGTTGAGCCCGTAAATTAAGCGAGATAAAATATCACGTCACAGACGGTCTGTCCCAAACCAAGTAATCT : 1064
2A3-6 : GAGTGAATGTTGAGCCCGTAAATTAAGCGAGATAAAATATCACGTCACAGACGGTCTGTCCCAAACCAAGTAATCT : 1064
*****

*           1080          *           1100          *           1120          *           1140
2A3-5 : GCATTGGTGCTTGAAC TGGGCGAAGGGTTTGCAATGGATC----- : 1105
2A3-2 : GCATTGGTGCTTGAAC TGGGCGAAGGGTTTGCAATGGATC----- : 1105
2A3-3 : GCATTGGTGCTTGAAC TGGGCGAAGGGTTTGCAATGGATC----- : 1105
2A3-6 : GCATTGGTGCTTGAAC TGGGCGAAGGGTTTGCAATGGATC----- : 1105
*****

```

Fig. 18. *H. parasuis* 각 혈청형들에 대한 특이 유전자(2A3)의 DNA 염기서열 분석

바. PFGE에 의한 *H. parasuis*의 유전형 분석

*H. parasuis*의 유전형 및 대표균주의 선발을 위해 PFGE를 실시하였다. 표준혈청형 및 야의 분리주를 대상으로 실시하였는데 밴드가 검출되는 균주와 검출되지 않는 균주로 일정하게 구분되었다. 실험의 오류로 인해 검출되지 않는 것으로 판단되어 4차레이상을 동일한 방법으로 실시하였는데 동일한 결과를 얻었다. 균주 내의 DNase의 활성이 강한 것인지를 확인하기 위해 chromosomal DNA추출시 formalin으로 처리하였지만 결과는 처리한 균주와 처리하지 않은 균주가 동일한 양상을 보였다 (data not shown).

제한효소 *Sma* I 처리에 의한 PFGE pattern은 48.5-485 kb 간격에 8-11개 band가 형성됨을 보였다. 또한 혈청형간의 PFGE pattern은 각각 다른 것으로 나타났다. *H. parasuis* 표준주의 혈청형 1, 2, 3, 6, 7, 9, 11의 48.5-485 kb 간격에 진한 band는 각각 9, 8, 11, 9, 8, 10, 10개 보였다 (Fig. 19, 21).

흥미로운 것은 표준혈청형과 야의분리주간 동일한 혈청형일 경우 PFGE의 pattern은 동일한 것으로 나타났다. 예를 들어 표준혈청형 5형의 PFGE pattern과 야의 분리주중 5형으로 확인된 PFGE pattern은 완벽하게 동일한 것으로 나타났다. 이러한 이유로 인해 PFGE가 분리주의 혈청형 분석에 중요한 수단으로 사용될 수 있으며 NT도 보다 세분하여 분석할 수 있으리라 판단된다. 문제는 앞에서 언급했듯이 PFGE시 대부분의 균주들이 미확인된 이유에 의해서 DNA가 검출되지 않는 것이다.

검출된 PFGE pattern을 이용하여 coherence tree를 구성하였다. 각 균주간에 동일한band 차이가 3개 이하이면 type A로 보고, 3개 이상이면 type B로 간주하였다. 또한 band 차이 3개 이하에서는 비슷한 band는 subtype I, II, III보이다. 혈청형 2와 3은 subtype I, serotype 1과 11는 subtype II, serotype 6, 7과 9 subtype III로 구분되었다 (Fig. 20).

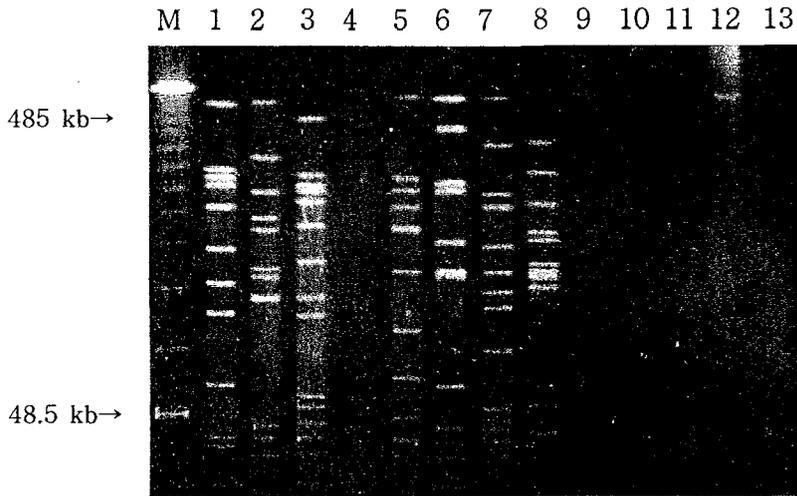


Figure 19. PFGE pattern of *Haemophilus parasuis* standards by *Sma* I. M: lambda DNA standard marker; Lane 1-13; serotype 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15 and ATCC 19417.

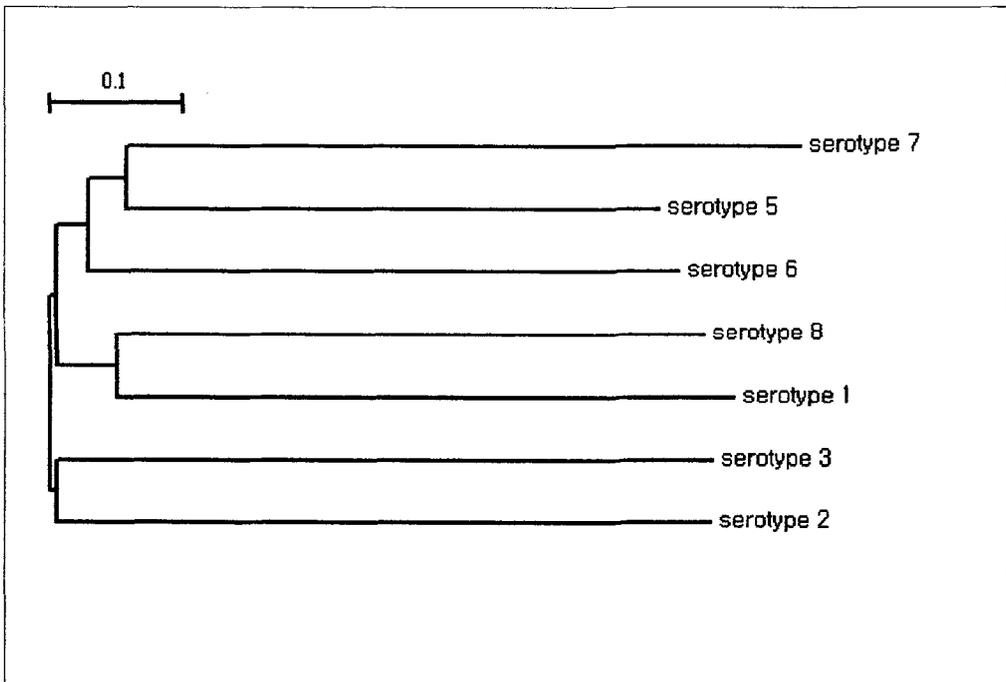


Figure 20. Dendrogram of *Sma* I of *H. parasuis* standard strains by PFGE.

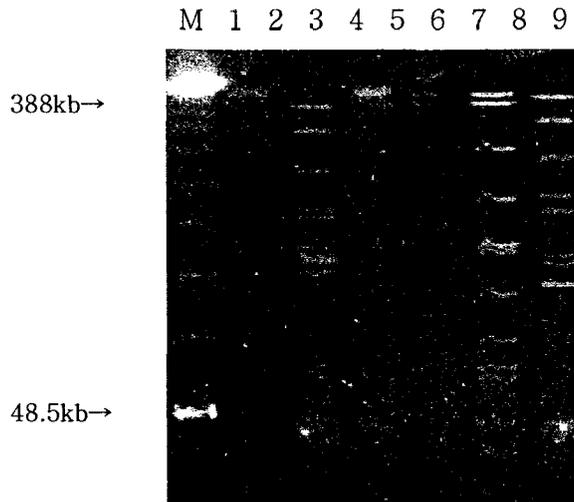


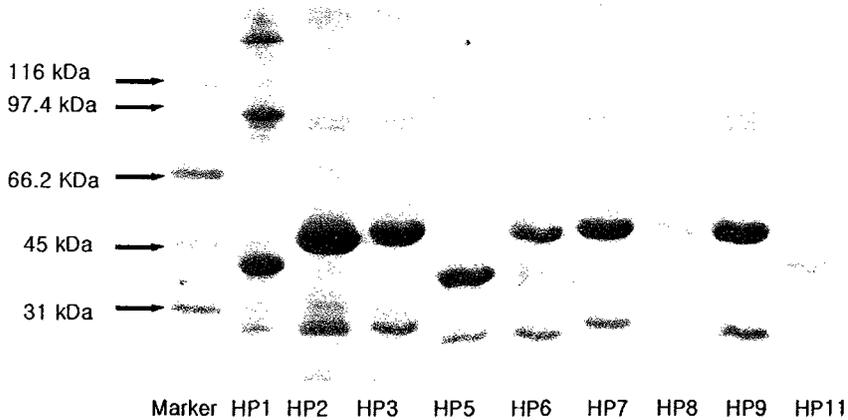
Fig. 21. PFGE pattern of *Haemophilus parasuis* isolated from pig by *Sma*I. M: lambda DNA standard marker; Lane1-9: isolate from pigs.

3. 혈청학적 진단기법의 확립 및 진단키트의 개발

가. *H. parasuis*에서 추출한 외막단백질의 ELISA용 항원으로서의 혈청형별 특이성 비교 실험

1) SDS PAGE (Sodium dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 를 이용한 *H. parasuis* 외막단백질의 단백질 분석

그람 음성균의 외막단백질은 세균의 최외곽에 위치한 단백질로써 이 단백질들은 세균의 조직 특이성 또는 병원성과 상당히 밀접한 관계를 가지는 것으로 알려져 있다. Ruiz 등(2001)은 외막단백질의 패턴과 질병 발생 패턴을 비교하였는데 단백질의 표현형(phenotype)에 따른 다발성 장막염등 체감염(systemic infection)과 호흡기 감염(respiratory infection)의 발생 경향을 조사하였다. 본 실험에서는 혈청형에 따른 외막단백질의 패턴을 분석하여 혈청형간 특성을 검색, 혈청형 또는 병원성과 관련된 특성을 확인하였다.



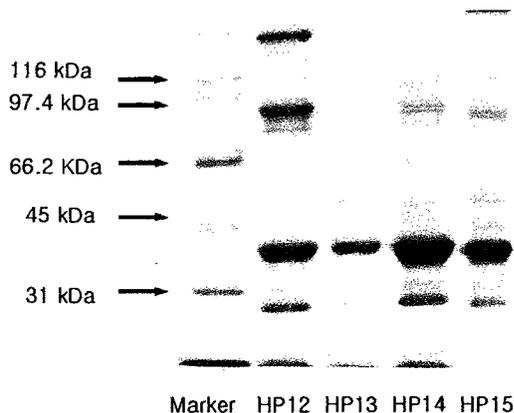


Fig. 22. *H. parasuis* 균종의 혈청형별 외막단백질 (Outer membrane protein)의 프로파일. 혈청형간 뚜렷한 차이를 보이며 특히 약독주나 비병원성주의 경우 40kDa 부근에서 특이적인 밴드가 관찰되었다.

표준 혈청형의 *H. parasuis*로 부터의 OMPs 추출하여 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 두개 주요한 진한 bands가 45kDa 및 31kDa 사이에서 검출되었으며 하나 또는 두개의 흐릿한 bands는 97.4kDa 및 66kDa 사이에서 검출되었다.

*H. parasuis*의 OMP profiles은 5-6개 bands 있고 그 중에 두개 진한 bands 31kDa 및 45kDa 차이에 따라 OMP pattern A와 B로 구분 하였다. 표준 혈청형의 OMP patterns은 크기가 큰 band의 크기가 45kDa 및 35kDa 차이에 따라 두개의 pattern으로 구분되었다 (Fig. 22.).

혈청형 1, 6 및 9는 OMP pattern A 군에 속하는 것으로 나타났고 혈청형 2, 3, 5, 7, 10, 11, 12, 14 및 15는 OMP pattern B군에 속하는 것으로 나타났다 (Fig. 22.) 23개 분리주 중에서 11주의 분리주는 OMP pattern A군에 속하는 것으로 나타났고 11주의 야외 분리주는 OMP pattern B군에 속하는 것으로 나타났다 (Fig. 23). 혈청형 13 표준주 및 야외 분리주 1주 (lane 18)는 어떠한 OMP 밴드도 검출되지 않았다.

OMP는 *H. parasuis*의 병원성 인자로 알려지고 있다. Ruiz등 (2001)은 다발성 장막염을 일으키는 돼지에서 분리된 고병원성 *H. parasuis* 분리주의 OMP profile은 건강한 돼지에서 분리된 비병원성주 OMP profile보다 일반적으로 동질성 (homogeneity)이 높다고 하였다. 동질성의 양상을 보이는 이유는 고 병원성 주에

서는 특정한 OMP만이 강력하게 발현하기 때문으로 추측되고 있다. 본 연구에서는 야외 분리주 23주를 대상으로 OMP분석을 실시한 결과 profile이 매우 동질성을 보여 고병원성임이 확인되었고 또한 주요 band에 의해 두가지 그룹으로 구분할 수 있었다.

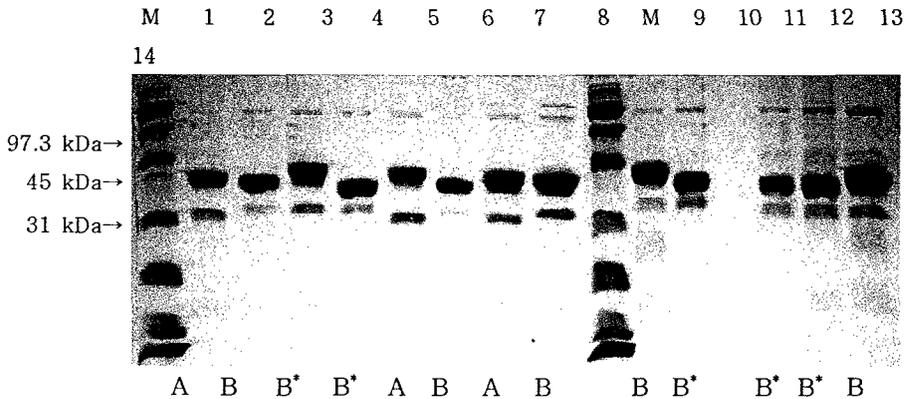


Fig. 23. OMP patterns of reference strains analyzed by SDS-PAGE
 Lanes M, Broad-range molecular size markers (Bio-Rad Laboratories); 1, serotype 1; 2, serotype 2; 3, serotype 3; 4, serotype 5; 5, serotype 6; 6, serotype 7; 7, serotype 9; 8, serotype 10; 9, serotype 11; 10, serotype 12; 11, serotype 13; 12, serotype 14; 13, serotype 14; 13, ATCC 19417. Asterisks indicate strain showing slight difference within a group.

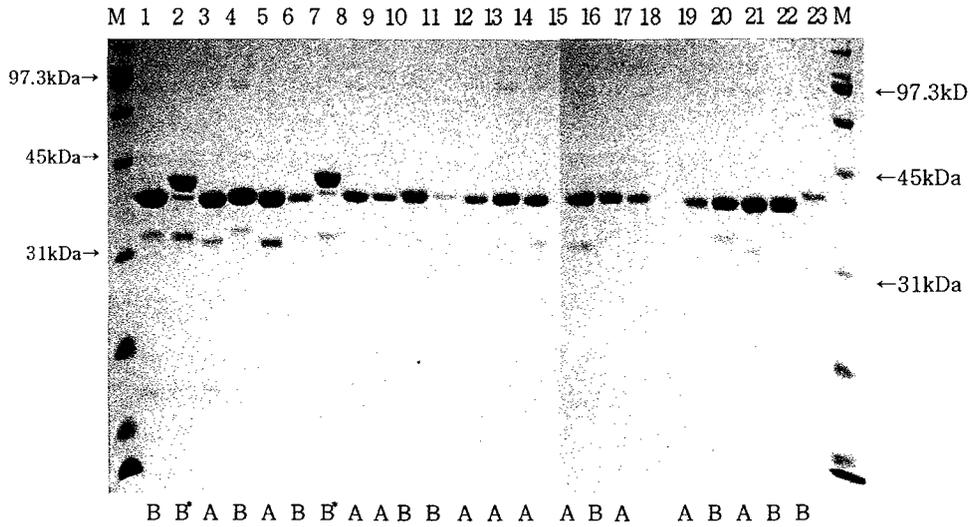


Fig. 24. OMP patterns of *H. parasuis* isolates analyzed by SDS-PAGE
 Lanes M, Broad-range molecular size markers; 1-23, *H. parasuis* isolates.
 Asterisks indicate isolates showing slight difference within a group.

Kielstein과 Rapp-Gabrielson (1992)의 연구결과에 따르면 1,5,10, 12, 13, 14 형은 매우 강독형으로 감염시 96시간 이내에 폐사를 일으킨다고 하였으며 2,4,15형의 경우 심한 다발성 장막염과 관절염 증상을 보인다고 하였다. 또한 약한 병원성을 보이는 8형과 임상적으로 증상을 발현하지 않는 3, 6, 7, 9, 11형으로 구분된다고 한다. 본 실험결과에서는 세균의 배양액에서 추출한 외막단백질의 패턴 분석결과가 혈청형과 어떠한 관련성을 갖는지 확인하였다. 실험결과 강독형으로 구분되는 1, 5, 10, 12, 13, 14, 15형의 경우 공통적으로 40kDa 부근에서 단백질이 나타났으며 약독주 또는 비병원성주인 3, 6, 7, 8, 9, 11형에서는 약 50kDa 부근에서 가장 진한 농도의 단백질이 검출되었다. 강독주에서는 2형만이 40kDa 부근에서 단백질이 검출되지 않은 반면 약독주나 비병원성균주에서 발견되는 50kDa 부근의 단백질보다 작은 크기의 단백질이 발견되어 이들 약독주나 비병원성 균주와는 구별되었다.

본 실험결과에 따라 야외로부터 분리된 *H. parasuis* 균종에 대하여 외막단백질을 분석하는 것 만으로도 강독주등 병원성 균종과 약독주 또는 비병원성 균종을 구분할 수 있을 것으로 기대된다.

2) *H. parasuis* serotype 13 & 14 ELISA 실험 결과

H. parasuis 유래 외막단백질의 SDS-PAGE상 패턴과 병원성간의 유사성은 이미 앞장에서 밝힌바 있다. 본 실험에서는 *H. parasuis* 혈청형 유래 외막단백질을 ELISA용 항원으로 사용하여 혈청검사용 ELISA kit를 구성한 다음 야외혈청형에 대하여 반응시켜, 혈청형별 반응도에 차이가 있는지 여부를 이 상당한 유사성을 가지고 있다는 가정하에 강독형 혈청형인 13형 혈청형과 14형 혈청형에 대한 야외 혈청 반응을 조사하였다.

Table 16. *H. parasuis* 혈청형 13형과 14형의 ELISA 흡광도 및 S/P ratio 비교

| Serotype | Group | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | average | stedv |
|----------|----------|----------|----------|----------|---------|-------|
| TYPE 13 | positive | 0.638 | 0.63 | 0.668 | 0.645 | 0.016 |
| | negative | 0.052 | 0.05 | 0.063 | 0.055 | 0.006 |
| TYPE 14 | positive | 0.939 | 0.952 | 0.768 | 0.886 | 0.084 |
| | negative | 0.05 | 0.047 | 0.05 | 0.049 | 0.001 |

Table 17. 야외혈청 90개에 대한 HP 13, 14형 추출 OMP ELISA 반응 결과

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 샘플번호 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 샘플내역 | | 모든 |
| HP 13 | O.D | 0.193 | 0.695 | 0.482 | 0.564 | 0.335 | 0.640 | 0.519 | 0.503 | 0.210 | 0.068 | 0.368 |
| | S/P | 0.234 | 1.084 | 0.723 | 0.862 | 0.474 | 0.991 | 0.786 | 0.759 | 0.263 | 0.022 | 0.530 |
| HP 14 | O.D | 0.233 | 0.912 | 0.766 | 0.735 | 0.665 | 1.024 | 0.864 | 0.634 | 0.261 | 0.074 | 0.624 |
| | S/P | 0.220 | 1.031 | 0.856 | 0.819 | 0.736 | 1.164 | 0.973 | 0.699 | 0.253 | 0.030 | 0.687 |
| 샘플번호 | | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
| 샘플내역 | | 모든 |
| HP 13 | O.D | 0.371 | 0.095 | 0.735 | 0.491 | 0.133 | 0.650 | 0.199 | 0.170 | 0.631 | 0.440 | 0.650 |
| | S/P | 0.535 | 0.068 | 1.152 | 0.739 | 0.132 | 1.008 | 0.244 | 0.195 | 0.976 | 0.652 | 1.008 |
| HP 14 | O.D | 0.502 | 0.129 | 0.772 | 0.582 | 0.149 | 0.697 | 0.316 | 0.207 | 0.873 | 0.626 | 0.804 |
| | S/P | 0.541 | 0.096 | 0.863 | 0.637 | 0.119 | 0.774 | 0.319 | 0.189 | 0.984 | 0.689 | 0.902 |
| 샘플번호 | | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 |
| 샘플내역 | | 모든 |
| HP 13 | O.D | 0.095 | 0.137 | 0.153 | 0.259 | 0.141 | 0.230 | 0.155 | 0.332 | 0.319 | 0.159 | 0.201 |
| | S/P | 0.068 | 0.139 | 0.166 | 0.346 | 0.146 | 0.296 | 0.169 | 0.469 | 0.447 | 0.176 | 0.247 |
| HP 14 | O.D | 0.099 | 0.246 | 0.251 | 0.433 | 0.186 | 0.490 | 0.217 | 0.548 | 0.562 | 0.267 | 0.373 |
| | S/P | 0.060 | 0.235 | 0.241 | 0.459 | 0.164 | 0.527 | 0.201 | 0.596 | 0.613 | 0.260 | 0.387 |
| 샘플번호 | | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |
| 샘플내역 | | 모든 | 모든 | 모든 | 모든 | 90일 |
| HP 13 | O.D | 0.359 | 0.436 | 0.284 | 0.420 | 0.119 | 0.267 | 0.086 | 0.376 | 0.602 | 0.243 | 0.437 |
| | S/P | 0.515 | 0.645 | 0.388 | 0.618 | 0.108 | 0.359 | 0.053 | 0.544 | 0.927 | 0.318 | 0.647 |
| HP 14 | O.D | 0.641 | 0.642 | 0.430 | 0.544 | 0.139 | 0.419 | 0.104 | 0.602 | 0.743 | 0.298 | 0.590 |
| | S/P | 0.707 | 0.708 | 0.455 | 0.591 | 0.107 | 0.442 | 0.066 | 0.660 | 0.829 | 0.297 | 0.646 |
| | | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 |
| | | 90일 |
| HP 13 | O.D | 0.691 | 0.254 | 0.153 | 0.070 | 0.140 | 0.132 | 0.109 | 0.070 | 0.102 | 0.102 | 0.174 |
| | S/P | 1.077 | 0.337 | 0.166 | 0.025 | 0.144 | 0.130 | 0.091 | 0.025 | 0.080 | 0.080 | 0.202 |
| HP 14 | O.D | 0.656 | 0.433 | 0.266 | 0.091 | 0.224 | 0.255 | 0.161 | 0.092 | 0.136 | 0.139 | 0.184 |
| | S/P | 0.725 | 0.459 | 0.259 | 0.050 | 0.209 | 0.246 | 0.134 | 0.051 | 0.104 | 0.107 | 0.161 |
| | | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 |
| | | 90일 | 90일 | 90일 | 90일 | 95일 | 100일 | 100일 | 100일 | 120일 | 120일 | 120일 |
| HP 13 | O.D | 0.229 | 0.281 | 0.277 | 0.261 | 0.599 | 0.418 | 0.432 | 0.495 | 0.412 | 0.510 | 0.410 |
| | S/P | 0.295 | 0.383 | 0.376 | 0.349 | 0.922 | 0.615 | 0.639 | 0.745 | 0.605 | 0.771 | 0.601 |
| HP 14 | O.D | 0.319 | 0.402 | 0.342 | 0.325 | 0.647 | 0.684 | 0.593 | 0.680 | 0.623 | 0.695 | 0.442 |
| | S/P | 0.322 | 0.422 | 0.350 | 0.330 | 0.714 | 0.758 | 0.650 | 0.754 | 0.686 | 0.771 | 0.469 |
| | | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | | |
| | | 120일 | | |
| HP 13 | O.D | 0.711 | 0.536 | 0.534 | 0.523 | 0.286 | 0.259 | 0.335 | 0.182 | 0.838 | | |
| | S/P | 1.111 | 0.815 | 0.811 | 0.793 | 0.391 | 0.346 | 0.474 | 0.215 | 1.326 | | |
| HP 14 | O.D | 0.736 | 0.642 | 0.625 | 0.597 | 0.592 | 0.356 | 0.573 | 0.379 | 0.988 | | |
| | S/P | 0.820 | 0.708 | 0.688 | 0.654 | 0.648 | 0.367 | 0.626 | 0.394 | 1.121 | | |

3) *H. parasuis* 혈청형 13형과 14형간의 분산분석 결과

자사 병성감정실에 의뢰된 야외혈청 중 항체가 수준이 고등도인 것과 중등도인 것, 저등도인 것들을 선별하여 *H. parasuis* 혈청형 13형과 14형에서 추출한 외막 단백질로 각각 코팅된 ELISA kit로 분석한 결과는 표 17.과 같으며 이 결과를 분산분석의 형태로 분석한 결과 (Fig. 24 참조) 두 가지 혈청형은 상관계수가 0.87로 혈청형간 차이점이 없는 것으로 파악되었다.

실험자들의 연구결과에 따라 *H. parasuis*의 외막단백질이 혈청형간 특이 단백질 일 것으로 예상되었으나 혈청형간의 차이점을 나타내지 않아 다당류에서 혈청형 특이 항원을 정제하기로 하였다.

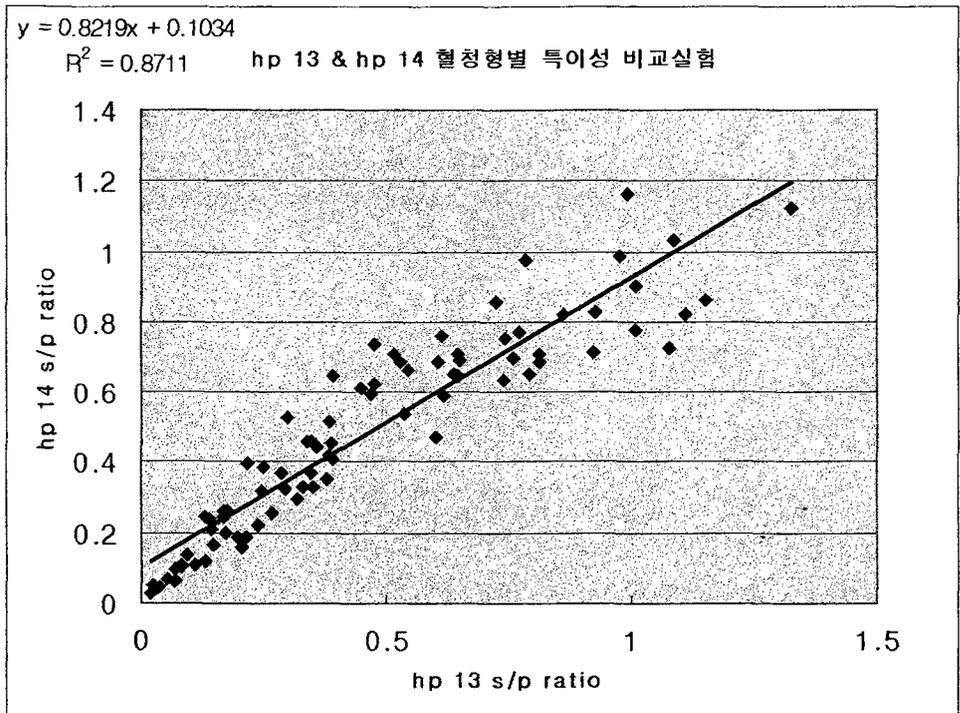


Fig. 25. *H. parasuis* 혈청형 13형과 14형에서 추출한 외막 단백질로 코팅한 ELISA kit에 야외혈청 90개를 반응시킨 결과.

나. *H. parasuis*에서 추출한 다당류 (LPS)의 ELISA용 항원으로서의 혈청형별 특이성 비교 실험

1) LPS(Lipopolysaccharide)의 추출

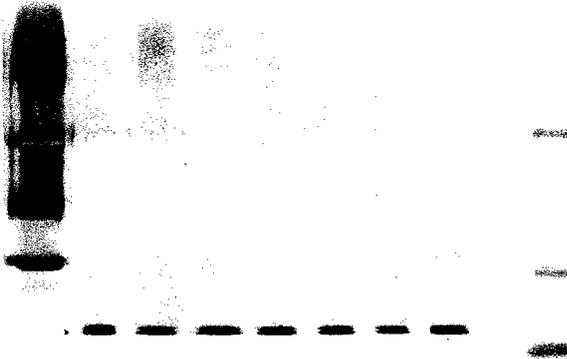


Fig 26. SDS-PAGE of LPSs(lipopolysaccharides) extracted from *H. parasuis*, (left : silver stain gel, right : coomassie stained gel) sample was mixed 1: 4 buffer containing with 1M Tris-hydrochloride, 2% SDS(W/V), 1% 2-mercaptoethanol(v/v), 0.001% bromophenol blue(w/v), 10% sucrose, 40mM EDTA, Sample were heated at 100℃ for 5min, cooled and applied to gel (lane 1. protein marker, lane 2. *H. parasuis* serotype 12, lane 3. *H. parasuis* serotype 2, lane 4. *H. parasuis* serotype 7, lane 5. *H. parasuis* serotype 1, lane 6. *H. parasuis* serotype 3, lane 7. *H. parasuis* serotype 13, lane 8. *H. parasuis* serotype 9)

2) *H. parasuis*로부터 추출한 LPS로 ELISA kit 구성

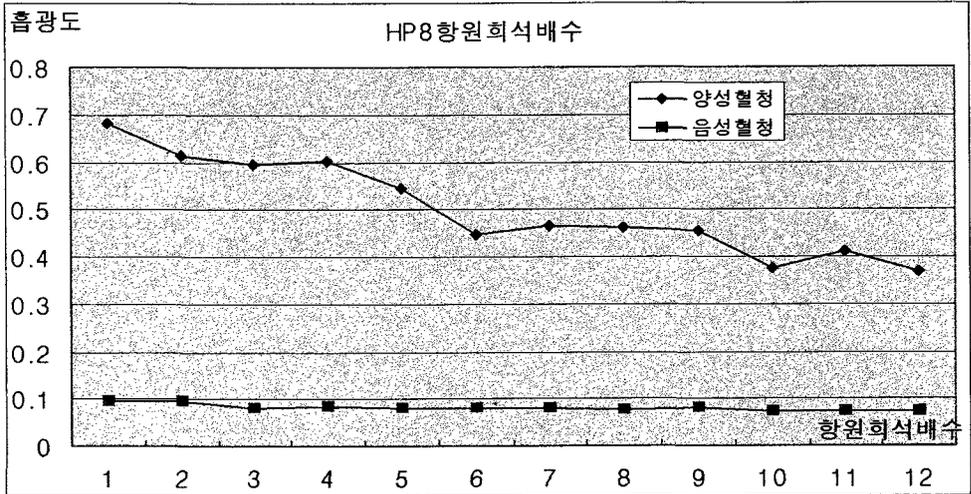


Fig 27. *H. parasuis*로부터 추출한 다당류에 대한 단일 혈청 항원 희석배수별 ELISA 항원 코팅결과

3) 특이 단백질의 코팅조건 확립

추후 ELISA진단키트의 개발을 위한 예비적인 실험으로 2형과 5형의 혈청형의 균주를 불활화 시킨 후 혼합한 후 단백질농도를 측정하였다. 확립된 코팅조건은 다음과 같다. 항원코팅량은 well당 200ng이 가장 적합하였고 코팅시간은 4℃에서 24시간 하는 흡착시키는 것이 가장 적합하였고 회사제품별 plate는 Costar사 제품이 가장 적합한 것으로 나타났다. 또한 확립된 코팅조건을 3반복 실시한 결과 재현성이 매우 뛰어난 것으로 나타났다.

제 3절 백신 후보균주의 선별 및 백신의 효력시험

1. 표준주 및 분리주의 총단백질과 세포외막단백질 (OMP)의 분석

H. parasuis 14개의 혈청형 및 ATCC 19417의 전체 단백질을 SDS-PAGE를 실시하였고 Coomassie brilliant blue로 염색하는 한편 야외 감염에서 회복한 돼지에서 얻은 회복기 혈청을 사용하여 western hybridization으로 분석하였다. 각 혈청형의 전체 단백질은 몇가지 band만 제외하면 거의 유사한 양상을 나타냈다. 또한 몇 가지 혈청형에 있어서는 특정 band의 명도가 낮게 관찰되는 것으로 나타났다.

총단백질 중 공통적인 항원성이 있는 band를 검출하기 위해 15가지 표준 혈청형의 총 단백질을 전기 영동한 후 회복기 혈청으로 western hybridization을 실시한 결과 Coomassie blue염색으로 검출된 대부분의 단백분획을 회복기 혈청과 반응하지 않는 것으로 나타났다. 흥미롭게도 31에서 45kDa 사이에서 두 가지 크기의 band가 회복기 혈청과 강하게 반응 하는 것으로 나타났다. 회복기 혈청과 강하게 반응하는 단백분획이 OMP인지를 확인하기 위해 표준 혈청형으로부터 OMP를 추출한 후 동일한 방법으로 회복기 혈청과 반응시킨 결과 총단백질에서 검출되었던 단백질 분획과 동일한 양상을 보였다 (Fig. 29). 이러한 결과는 결국 총단백질에서 회복기 혈청과 반응했던 단백분획이 OMP임이 확인되었으면 혈청형에 관계없이 OMP는 공통항원으로의 면역원성이 있음을 의미하는 것으로 나타났다. 단지 OMP의 크기는 혈청형에 따라 약간의 차이가 있는데 혈청형 2, 3, 11,과 12의 경우 두 가지 단백분획중 한개가 35kDa의 크기를 보이는 반면, 혈청형 6, 7, 9는 이보다 작은 32kDa의 크기를 보이는 것으로 확인되었다.

H. parasuis 분리주의 총단백질과 OMP도 표준주와 동일하게 SDS-PAGE에 의해 분석하였다 (Fig. 30, 31). 분리주에서 추출한 총단백질의 경우 표준혈청형에서 추출한 총단백질과 거의 유사한 양상을 나타내고 있다. 그러나 회복기 혈청으로 western hybridization을 실시한 결과 표준 혈청형보다는 다소 많은 단백분획들이 반응하여 검출되었으며 크기는 35에서 100kDa사이에 걸쳐 나타났다. 흥미롭게도 가장 반응이 강하게 나타나는 두개의 주요 단백분획의 크기가 35와 42kDa를 보였고 이 두 단백분획은 혈청형에 관계없이 공통적으로 나타났다. 명

도가 희미한 단백분획의 경우 분리주에 따라 검출되는 것과 검출되지 않는 것으로 다양한 양상을 보였다. 두 개의 주요한 단백분획중 35kDa의 단백분획이 좀더 강하게 반응하는 것으로 나타났고 42kDa 크기의 단백분획은 다소간 약하게 검출되었다. 이들 단백분획이 OMP임을 확인하게 위해 western blot을 실시한 결과 표준주와 마찬가지로 회복기 혈청과 강하게 반응하는 단백분획이 OMP임이 확인되었으며 분리주에 무관하게 공통적으로 작용하는 항원임을 알 수 있었다.

OMP는 *H. parasuis*의 병원성 인자의 하나로 간주되고 있다 (Ruiz 등, 2001). 그러나 OMP의 정확한 기능과 동정은 아직까지 확인되고 있지 않다. 본 연구 결과는 OMP가 혈청형 또는 분리주에 관계없이 교차반응을 보이는 단백질이며 공통항원으로서의 역할을 하는 것임을 보여주었다. 비록 OMP가 교차방어에 미치는 역할에 대해서는 아직까지 규명이 되어 있지 않지만 OMP가 백신성분으로서의 역할을 할 수 있는 것으로 추측되며 이에 대한 추후 연구가 필요하리라 사료된다.

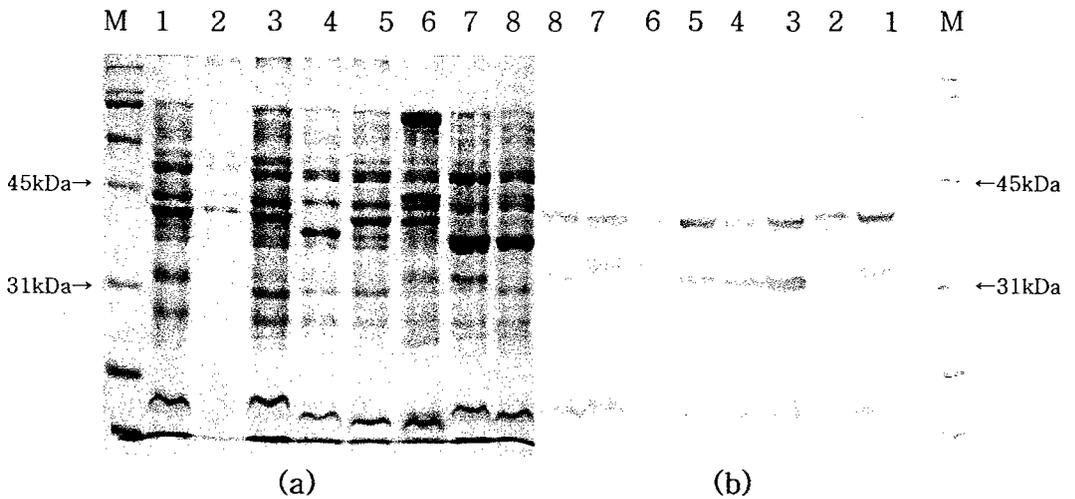


Fig. 28. Corresponding SDS-PAGE (a) and immunoblot (b) of whole cell lysates of *H. parasuis* reference strains. Lane M, molecular size marker; lanes 1~8, serotypes 2,3,6,7,9,11,12 and 15, respectively. Sizes are show on the left and right sides.

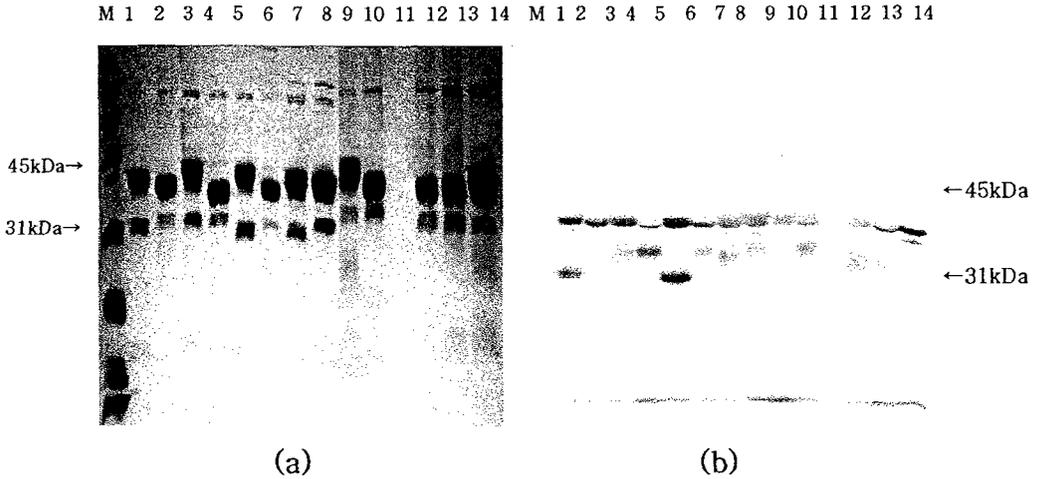


Fig 29. Corresponding SDS-PAGE (a) and immunoblot (b) of outer membrane proteins (OMP) prepared from *H. parasuis* reference strains. Lanes M, molecular size marker; lanes 1~14, serotypes 1,2,3,5,6,7,9,10,11,12,13,14,15 and ATCC 19417. Sizes are show on the left and right sides.

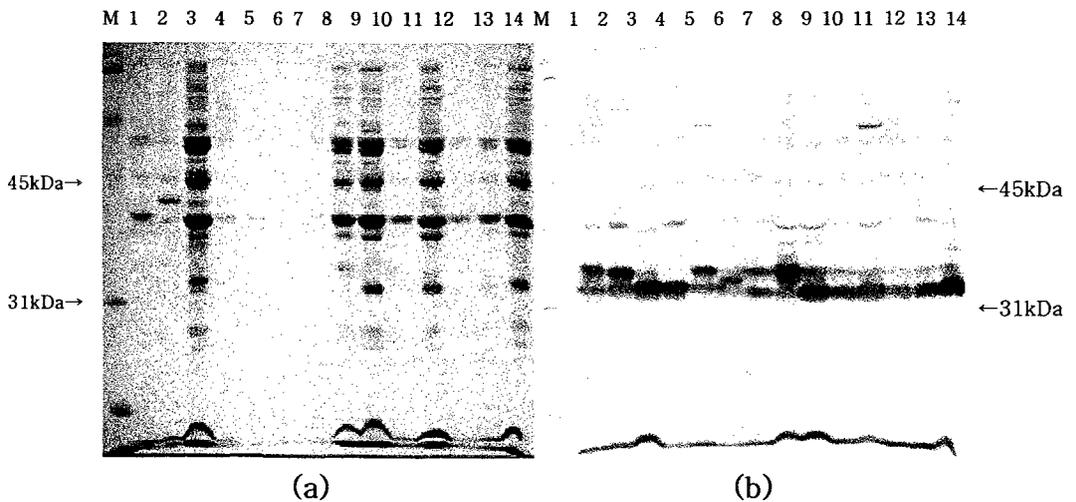


Fig 30. Corresponding SDS-PAGE(a) and immunoblot (b) of whole cell lysates of *H. parasuis* isolates. Lane M, molecular size marker; lanes 1~14, *H. parasuis* isolates. Sizes are show on the left and right sides.

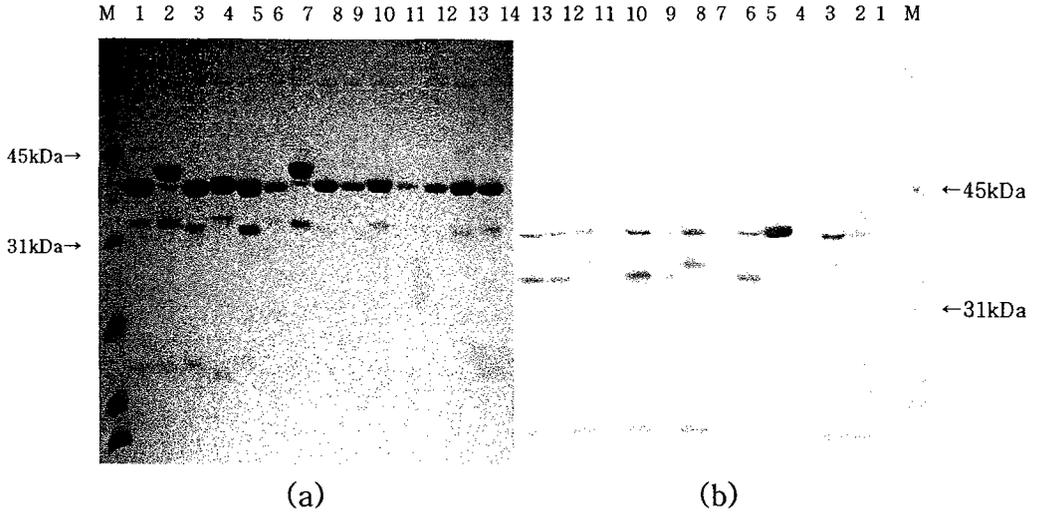


Fig. 31. Corresponding SDS-PAGE (a) and immunoblot (b) of outer membrane proteins (OMP) prepared from *H. parasuis* isolates. Lane M, molecular size marker; lanes 1~14, serotypes *H. parasuis* isolates. Sizes are show on the left and right sides.

2. 백신 후보균주의 선발

지금까지 언급했던 *H. parasuis*의 유전형 및 OMP분석방법을 통해서 는 백신 후보균주의 선발이 어려운 것으로 확인되었다. 따라서 국내에서 *H. parasuis* 야외분리주중 혈청형의 분포가 가장 높고 병원성이 강한 균주를 선발하여 총단백질을 분석한 후 각 혈청형 중에서 대표적인 총단백질 양상을 보이는 균주들을 일차적으로 백신 후보균주로 선발하였다. 국내 분리주중 가장 많이 분포를 하고 병원성이 높은 혈청형은 선발하였는데 nontypeable, 혈청형 12, 5, 및 4형의 분리주 들에서 총단백질의 양상을 SDS-PAGE 실시하여 대표적인 양상을 보인 균주 sample 중에서 4번(nontypeable), 9번(serovar 12), 11번(serovar 5), 13번(serovar 4)을 각각 한 균주씩 선발 하였다(Table 18).

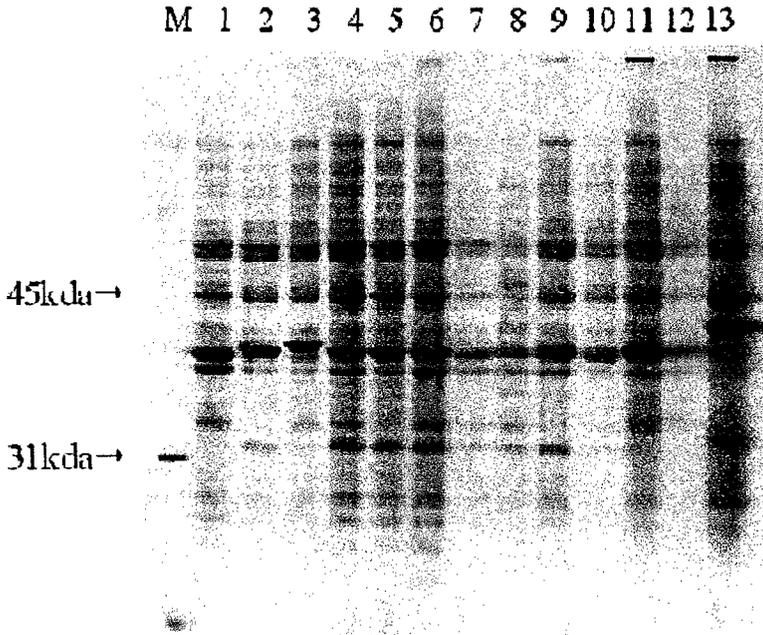


Fig 32. Corresponding SDS-PAGE of Whole cell lysates of *H. parasuis* isolates. (Lane M : Molecular size marker, Lanes 1-6, nontypeable, Lanes 7-9: serovar 12, Lanes 10-12 : serovar 5, Lane 13 : serovar 4.

3. 백신 후보균주의 마우스에 대한 병원성 시험

백신 후보균주들의 병원성을 조사하기 위해 *H. parasuis*의 균수를 2×10^9 CFU/ml, 2×10^{10} CFU/ml를 맞춘 후 각 균주당 5마리의 mouse에 마리당 0.5ml씩 복강 접종하였다. 이 실험은 2회 반복하였다. 복강 접종 1일 후 마리당 1×10^{10} CFU를 접종한 NT, 혈청형 5형, 12형에서는 mouse가 전부 폐사하였고 4형에서는 4마리만이 폐사하였다. 마우스당 1×10^9 CFU를 접종한 군에서는 5형에서 3마리가 폐사하였다 (Table 8).

*H. parasuis*를 mouse에 공격접종 후 폐사한 mouse를 부검을 실시한 후 병리조직학적 검사를 실시하였다. 적출한 실질장기는 10% 중성포르말린에 고정하고 조직절편을 만들어 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하였으며, 현미경적 관찰을 위해서 Hematoxylin과 Eosin(H&E) 염색을 실시하였다. 육안적인 소견으

로는 간과 비장의 총혈과 울혈이 약간씩 관찰되었을 뿐 기타의 이상은 없었다 (data not shown). 그러나 병리조직학적인 결과로는 균혈증, 림프구 고갈, 동형모세혈과 확장증, 간자색반병, 간문맥주위 괴사성 간염, 부종 등의 소견이 관찰되었다. 특히 *H. parasuis* nontypeable, 혈청형 12, 5형에서 간과 비장에 균혈증 소견이 심하게 관찰되었으며 부종도 심하게 관찰되었다. 대조군에서 국소성 염증반응이 한 마리에서 발견되었을 뿐 거의 정상으로 나타났다 (Table 19).

이상의 결과를 종합해 볼 때 백신 후보균주에서 5형, 12형, NT, 4형의 순서대로 병원성이 높은 것으로 나타났다.

Table 18. Mortality rates of mouse inoculated in *H. parasuis*

| | | Non typeable | Serovar 4 | Serovar 5 | Serovar 12 | PBS |
|---|------------------------|--------------|------------|-------------|-------------|-----------|
| A | 1×10^9 CFU | 0 (0%) | 0 (0%) | 3 (60%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| B | 1×10^{10} CFU | 5 (100%) | 4 (80%) | 5 (100%) | 5 (100%) | 0 (0%) |

Table 19. Histopathology of spleen and liver in the mice infected with *Haemophilus parasuis*

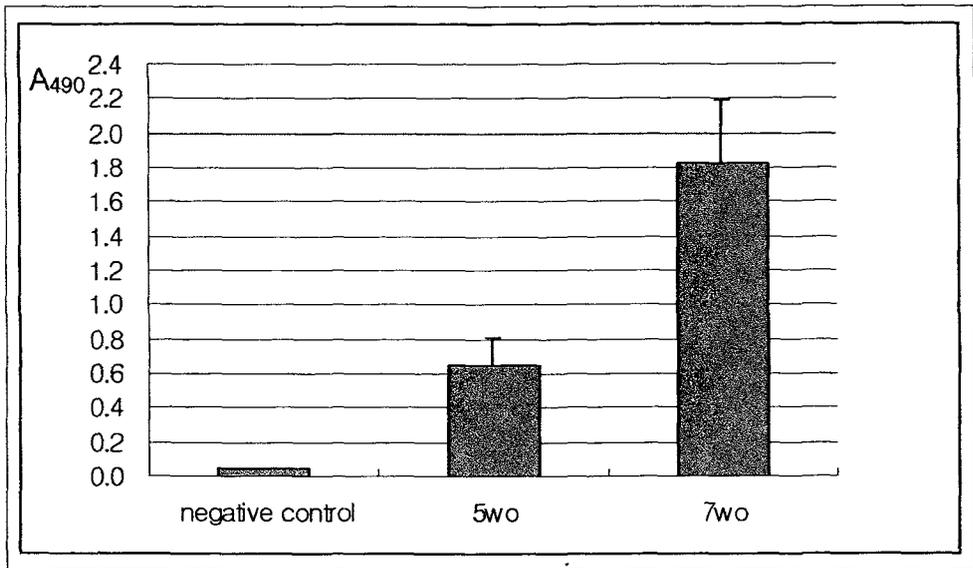
| Group | | Control | NT (10 ¹⁰ CFU) | Serovar12 (10 ¹⁰ CFU) | Serovar5 (10 ¹⁰ CFU) | Serovar5 (10 ⁹ CFU) | Serovar4 (10 ¹⁰ CFU) | |
|-------------------------------|-------------------------------------|----------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----|
| Animals No, examined | | 1 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | |
| Spleen | no specific lesions | | | | | | 1/4 | |
| | bacteremia in red pulp | | 1/3 | 2/3 | 3/3 | | | |
| | lymphoid depletion | mild | | 1/3 | | | | |
| | | moderate | 1/1 | 2/3 | 1/3 | | | |
| | | severe | | | 1/3 | | 3/4 | 3/4 |
| congestion | severe | | | 1/3 | | | | |
| Liver | no specific lesions | | 1/3 | | | 2/4 | | |
| | bacteremia | | 2/3 | 2/3 | 3/3 | | | |
| | telangiectasis | mild | | | | 3/3 | 1/4 | |
| | | moderate | | 2/3 | 1/3 | | | |
| | | severe | | | 1/3 | | | |
| | necrotic hepatocytes | mild | | 1/3 | | | 1/4 | |
| | | moderate | | | | | | |
| | periportal hepatitis | moderate | | | 1/3 | | | |
| | periportal necrotizing hepatitis | | | | 1/3 | | | |
| edema, portal areas (mild) | | 2/3 | 1/3 | 2/3 | 1/4 | 4/4 | | |
| inflammatory foci, | small | 1/1 | | | | | | |

NT: non typeable

4. 야외농장에서의 백신의 효과 및 안전성 분석

농장규모 1000두 농장의 돼지에 이가 백신을 주사하여 면역성이 있는지 확인하였다. 백신을 글래씨씨 병이 발생된 농장에 접종 후 항체 반응유무를 판정하였다. 일차 접종 후 1주일 뒤의 역가는 0.65을 보이는 반면에 이차 접종 후 3주 뒤의 역가는 1.83로 매우 높게 나타남을 알 수 있다. 백신을 접종하지 않은 경우 감염이 될 수 있는 항체를 0.48로 보았을 때 일차접종만으로는 야외 감염을 방어하기 어렵다고 판단하였으며 일반적인 야외감염을 방어하기 위해서는 최소한 2차 접종이 필요하다고 사료 된다.

(a)



(b)

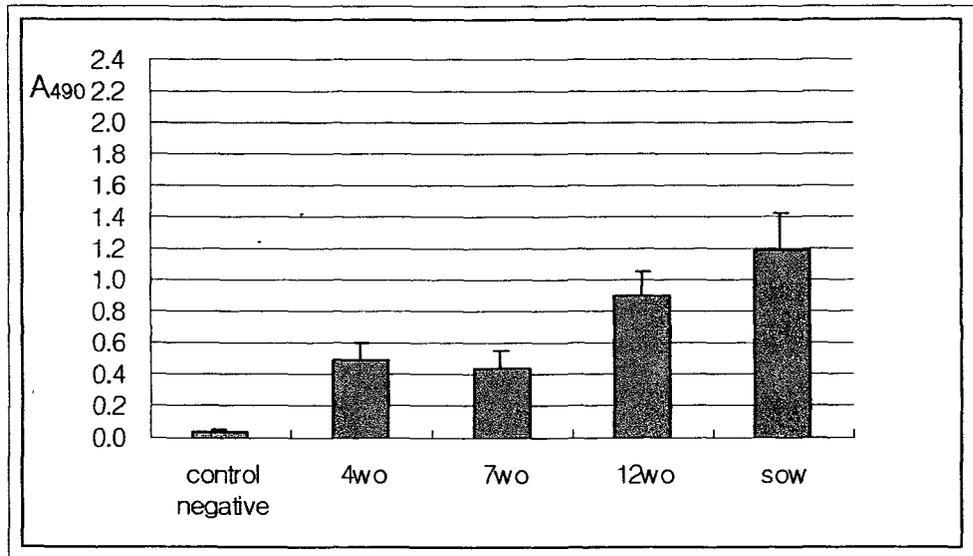


Fig 33. Antibody response in vaccinated groups (a) and nonvaccinated groups (b) after immunized with an autogenous *H. parasuis* bivalent vaccine.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 1차년도

| 연구목표 | 목표 달성도 | 관련분야 기여도 |
|---|---|--|
| 임상증상 발현 개체에서의 <i>H. parasuis</i> 분리율 개선 | - <i>H. parasuis</i> 분리율 20% → 60% | 야외 분리주 확보가 용이해져서 국내 질병 상황에 대한 파악을 체계적으로 진행할 수 있게 되었다. |
| <i>H. parasuis</i> 에 대한 균 특성 연구 | <i>H. parasuis</i> 의 외막단백질, LPS 등에 대한 분석이 완료되었으며 이들 항원에 대한 특성조사가 완료되었다. | 균 특성조사 결과를 토대로 진단키트 및 백신의 개발이 가능하게 됨. |
| <i>H. parasuis</i> 분리동정 프로토콜의 개발 | 균 분리동정율을 높이기 위한 가검물 조건과 선별 배지, 배양 조건, 그 밖에 항생제 감수성 검사 등 완료 | 우리나라에서 주로 검출되는 혈청형에 대한 항생제 감수성 검사가 완료됨에 따라 1차적인 항생제 선택이 가능해짐 |
| <i>H. parasuis</i> 야외분리주 50주 이상 확보 | 1차년도 종료 당시 18주 확보 | 차년도에서 지속적인 균주 확보 |

2. 2차년도

| 연구목표 | 목표 달성도 | 관련분야 기여도 |
|---------------------------------------|---|--|
| 야외분리주 50주 이상 확보 | 2차년도까지 총 35주 확보 | 국내에 유행중인 혈청형 분석 가능 |
| <i>H. parasuis</i> 특이 항체가 검사용 진단키트 개발 | <i>H. parasuis</i> 외막단백질을 항원으로 하는 ELISA 진단키트 구성 | 키트의 구성으로 <i>H. parasuis</i> 양성율의 신속한 진단 가능 |
| 시제품 구성 및 야외적용시험 | 2차년도부터 시제품을 구성하여 야외혈청에 대한 분석 실시 | 임상증상 발현과 관련된 항체가 분석지표 개발 |

3. 3차년도

| 연구목표 | 목표 달성도 | 관련분야 기여도 및 중요성 |
|-------------------------|---|---|
| 야외분리주 50주 이상 확보 | 당초 목표로한 야외분리주 50주 이상을 확보하고 표준주까지 확보 | 국내에 유행중인 <i>H. parasuis</i> 의 혈청형 분석가능 |
| ELISA 진단키트의 생산 및 야외적용시험 | 진단키트를 시제품의 형태로 생산하고 있으며 당사 병성감정실에 의뢰되는 다양한 일령의 혈청에 대하여 적용시험 실시 | <i>H. parasuis</i> 특이 항체를 검출할 수 있는 키트가 개발됨에 따라 국가 방역사업에 사용 가능 |
| 백신용 균주의 선발 | 혈청형 4형, 5형, 12형 및 non typeable에서 각각 1주씩 선발 | 국내 대표적 유행주를 포함 |
| 백신용 균주의 병원성 평가 | 백신후보균주의 마우스에 대한 병원성 평가 완료 : 병원성은 5형, 12형, non typeable, 4형 순 | 혈청형별 병원성 평가 완료 |
| 개발된 백신의 야외 적용 시험 | 1000두 이상의 돼지에 대하여 직접 면역원성 시험 실시 2차 접종 후 2주뒤 역가는 1.83 백신 미접종시 야외감염 가능 항체가 수준은 0.48로 결정 | 야외 적용 시험 결과를 통해 방어능 수준 및 백신 항체 평가에 대한 정확한 평가 기준 마련 예정 |

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 타연구에의 응용

1. *H. parasuis* 분리기법

*H. parasuis*는 분리하기가 매우 까다로운 균일 뿐만 아니라 쉽게 사멸하는 특징을 가지고 있다. 본 연구과제에서 균 분리동정 과정중에서 확보된 기술을 다른 세균의 분리동정 및 특성 조사에 활용할 경우 단시간 이내에 기초적인 조사가 가능할 것으로 판단된다. 특히 외막단백질의 추출기술이나 LPS 추출 조건등은 *Salmonella* 진단키트의 개발등에도 충분히 응용이 가능하다.

2. Colony blotting 기술의 응용

이번 연구과제 수행중에 개발된 Bacterial colony blot 기술을 이용해 유전자 library의 구성이 가능하게 되어 향후의 연구에 있어서도 마이코플라즈마 감염증, 흉막폐렴 등에서도 단백질을 생성하는 유전자의 규명이 가능할 것으로 사료된다.

규명된 유전자는 PCR 등 유전자 검사, 종 특이 단백질 생산에 의한 유전자 재조합 진단키트의 개발 그리고 면역원성 검증을 통한 백신용 항원의 제작등 그 응용범위는 매우 넓다고 할 수 있다. 향후 자사에서는 이러한 기법을 적용하여 유전자원 확보에 따른 경쟁력을 지속적으로 확보해 나갈 계획이다.

3. 다가 백신과 진단키트의 개발

본 과제에서는 백신과 항체가 검정을 할 수 있는 진단키트의 개발이 동시에 이루어졌다. 보통 백신이 개발되더라도 백신의 효능을 간접적으로 측정할 수 있는 지표가 마련되지 않아 표준품을 설정하는데 큰 애로를 겪었다. 이번 연구과제의 수행으로 백신 접종후 그 백신의 효능을 객관적으로 평가할 수 있는 진단키트의 개발이 병행됨으로써 향후 진단키트 개발이나 백신개발에 있어 두 연구과제가 원활히 진행되는데 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

제 2 절 추가연구의 필요성

1. LPS 중 혈청형을 결정짓는 인자 분석

본 연구과제의 시작단계에서는 흉막폐렴과 같이 혈청형 결정인자가 외막단백질상에 존재할 것으로 예상하였으나 15개 혈청형에 대한 분석결과 외막단백질에 있지 아니하고 LPS상에 존재할 것으로 예상되어 외막단백질은 *H. parasuis* 특이 항원으로, LPS를 혈청형 결정인자로서 연구를 진행중이다. 제일바이오에서는 연구기간 종료 이후에도 당초 연구계획에는 포함되어 있지 않았지만 이들 혈청형 결정 인자에 대한 연구를 계속 진행하여 혈청형을 쉽게 확인할 수 있는 기법의 개발을 진행할 예정이다.

2. 2A3 등 클로닝된 유전자에 대한 역할 규명

이번 연구과제에서 선별된 유전자에 대하여 gene bank에 등재된 유전자들과 비교를 한 결과 아직 등재되어 있지 않은 새로운 유전자임을 알게되었고 장내미생물등 양돈 분야에서 쉽게 접할 수 있는 다른 균종과 PCR 검사를 수행하였으나 어떠한 교차반응도 관찰하지 못했다. 이는 이 유전자가 *H. parasuis* 특이 유전자임을 강력히 시사하는 것이다. 따라서 본 과제에서는 원래의 과제 계획에는 들어있지 않았으나 이 유전자의 sequence 및 역할을 규명하여 향후 진단키트 개발이나 서브유니트 개발용 항원으로서의 가능성을 확인하기 위한 추가연구를 계획하고 있다.

제 6 장 참 고 문 헌

Amano, H., M. Shibata, N. Kajio, and T. Morozumi. 1994. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. J. Vet. Med. Sci. 56:639-644.

Appuhamy, S., R. Parton, J. G. Coote, and H. A. Gibbs. 1997. Genomic fingerprinting of *Haemophilus sommus* by a combination of PCR methods. J. Clin. Microbiol. 35:288-291.

Bae, Y. C., M.I. Kang, E. K. Hwang, H. J. Sohn, and S. H. Choi. 1998. Isolation and immunohistochemical diagnosis of *Haemophilus parasuis* from naturally occurring polyserositis in pigs. Kor. J. Vet. Res. 38:843-852.

Bak, U. B., J. S. Mah, and H. Y. Noh. 1982. A pathological study on the cases of Glässer's disease. Res. Rep. Kor. Ins. Ani. Sci. 2:71-79.

Baumann, G., and G. Bilkei. 2002. Effect of vaccinating sows and their piglets on the development of Glässer's disease induced by a virulent strain of *Haemophilus parasuis* serovar 5. Vet. Rec. 151:18-21.

Biberstein, E. L., and D. C. White. 1969. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. J. Med. Microbiol. 2:75-78.

Blackall, P. J., V. J. Rapp-Gabrielson, and D. J. Hampson. 1996. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. Aust. Vet. J. 73:93-95.

Carlone, G, F. Sottnek, and B. Plikaytis. 1985. Comparison of outer membrane protein and biochemical profiles of *Haemophilus aegyptius* and *Haemophilus influenzae* biotype

III. J. Clin. Microbiol. 22:708-713.

Carlone, G., M. Thomas, H. Rumschlag, and F. Sottnek. 1986. Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Haemophilus* species. J. Clin. Microbiol. 24:330-332.

George M. Carlone, Frances O. Sottnek, and Brian D. Plikaytis. 1985. Comparison of Outer Membrane Protein and Biochemical Profiles of *Haemophilus aegyptius* and *Haemophilus influenzae* Biotype III. J. Clin. Microbiol. 22:5:708-713.

Hassan J. O., P. A. Barrow, P. A. Mockett, S. Mcleod, Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA, The Veterinary Record May 26 : 519~522

Jorgensen, J. H., J. D. Turnidge, and J. A. Washington. 1999. Antibacterial susceptibility test: Dilution and disk diffusion methods, p. 1526-1543. In P. R. Murray *et al.* (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American society for microbiology, Washington, D.C.

Kielstein, P., and V. J. Rapp-Gabrielson. 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. J. Clin. Microbiol. 30:862-865.

Kielstein, P., H. H. Wuthe, ø. Angen, R. Mutters, and P. Ahrens. 2001. Phenotypic and genetic characterization of NAD- dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance. Vet. Microbial. 81:243-255.

Kielstein, P., H. Rosner, and W. Muller. 1991. Typing of heat stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of Agargel precipitation and dot blot procedure. J. Vet. Med. 38:315-320.

- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.
- Lee, R. J., H. B. Seok, and S. G. Cho.** 1994. Biochemical properties of *H. parasuis* and serological classification of the isolates. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* **18**:127-138.
- McDermott, P. F., A. L. Barry, R. N. Jones, G. E. Stein, C. Thornsberry, C. C. Wu, and R. D. Walker.** 2001. Standardization of broth microdilution and disk diffusion test for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*: Quality control standards for ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, gentamicin, penicillin, tetracyclin, tilmicosin and trimethoprim-sulfamethoxazole. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4283-4287.
- Morozumi, T., J. Nicolet.** 1986. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. *J. Clin. Microbiol.* **23**:1022-1025.
- Morozumi, T., and J. Nicolet.** 1986a. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **23**:138-142.
- Muirhead, M. R., and T. J. L. Alexznder.** 1997. Managing and treating disease in the weaner, grower and finishing periods. p.315-316, *In* Muirhead MR *et al.* (ed), *Managing pig health and the treatment of disease*, 1st ed. 5M Enterprises Limited, Sheffield.
- Nicolet, J.** 1992. *Haemophilus parasuis*. p. 526-528, *In* B. Straw *et al.* (ed), *Diseases of swine*, 7th ed. Wolfe Publishing Ltd, London.
- Nielsen, R.** 1993. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. *Acta. Vet. Scand.* **34**:193-198.
- Oliveira, S., Y. K. Choi, H. S. Joo, and C. Pijoan.** 2002. Cloning, sequencing and

typing of the 16S rRNA gene of *Haemophilus parasuis*, p. 225. In Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa.

Oliveira, S., L. Galina., and C. Pijoan. 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. J. Vet. Diagn. Invest. 13:495-501.

Rafiee, M., M. Bara., C. P. Stephens., and P. J. Blackall. 2000. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. Aust. Vet. J. 78:846-849.

Rafiee, M., and P. J. Blackall. 2000. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. Aust. Vet. J. 78:172-174.

Rapp-Gabrielson, V. J., D. A. Gabrielson., and G. J. Schamber. 1992. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. Am. J. Vet. Res. 53:987-994.

Rapp-Gabrielson, V. J. 1999. *Haemophilus parasuis*, p. 475-481. In B. Straw *et al.* (ed.), Diseases of swine, 8th ed. Iowa State University Press, Ames.

Rapp-Gabrielson, V. J., and D. Gabrielson. 1992. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am. J. Vet. Res. 53:659-664.

Riley, G. I., E. G. Russell, and R. B. Callinan. 1977. *Haemophilus parasuis* infection in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 171:649-651.

Rúbies, X., P. Kielstein, L. Costa, P. Riera, C. Artigas, and E. Espuna. 1999. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. Vet. Microbiol. 66:245-248.

Ruiz, A., S. Oliveira, M. Torremorell, and C. Pijoan. 2001. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1757-1762.

Saab, O. C. A., M. C. Castillo, A. P. Ruiz Holgado, and O. M. Nader. 2001. A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. *Mem. Inst. Oswaldo. cruz.* **96**:583-586.

Seok, H. B., K. H. Lee, and R. J. Lee. 1993. Bacteriological studies on polyserositis and polyarthritis (Glässers disease), and pathogenesis of the isolated organisms. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* **17**:1-12.

Smart, N. L., O. P. Miniats, J. I. MacInnes. 1988. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. *Can. J. Vet. Res.* **52**:319-324.

Solano-Aguilar, G. I., C. Pijoan, V. Rapp-Gabrielson, J. Collins, L. F. Carvalho, and N. Winkelman. 1999. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. *Am. J. Vet. Res.* **60**:81-87.

Takahasi, K., S. Nagai, T. Yagihashi, T. Ikehata, Y. Nakano, K. Senna, T. Maruyama, and J. Murofushi. 2001. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions. *J. Vet. Med. Sci.* **63**:487-491.

Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**:6823-6831.

Miniatis, O. P., Smart, N. L., Rosendal, S. 1991. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotics pigs. *Can. J. Vet. Res.* 55:37-41.

Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordeon. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology.* 24:145-149.