

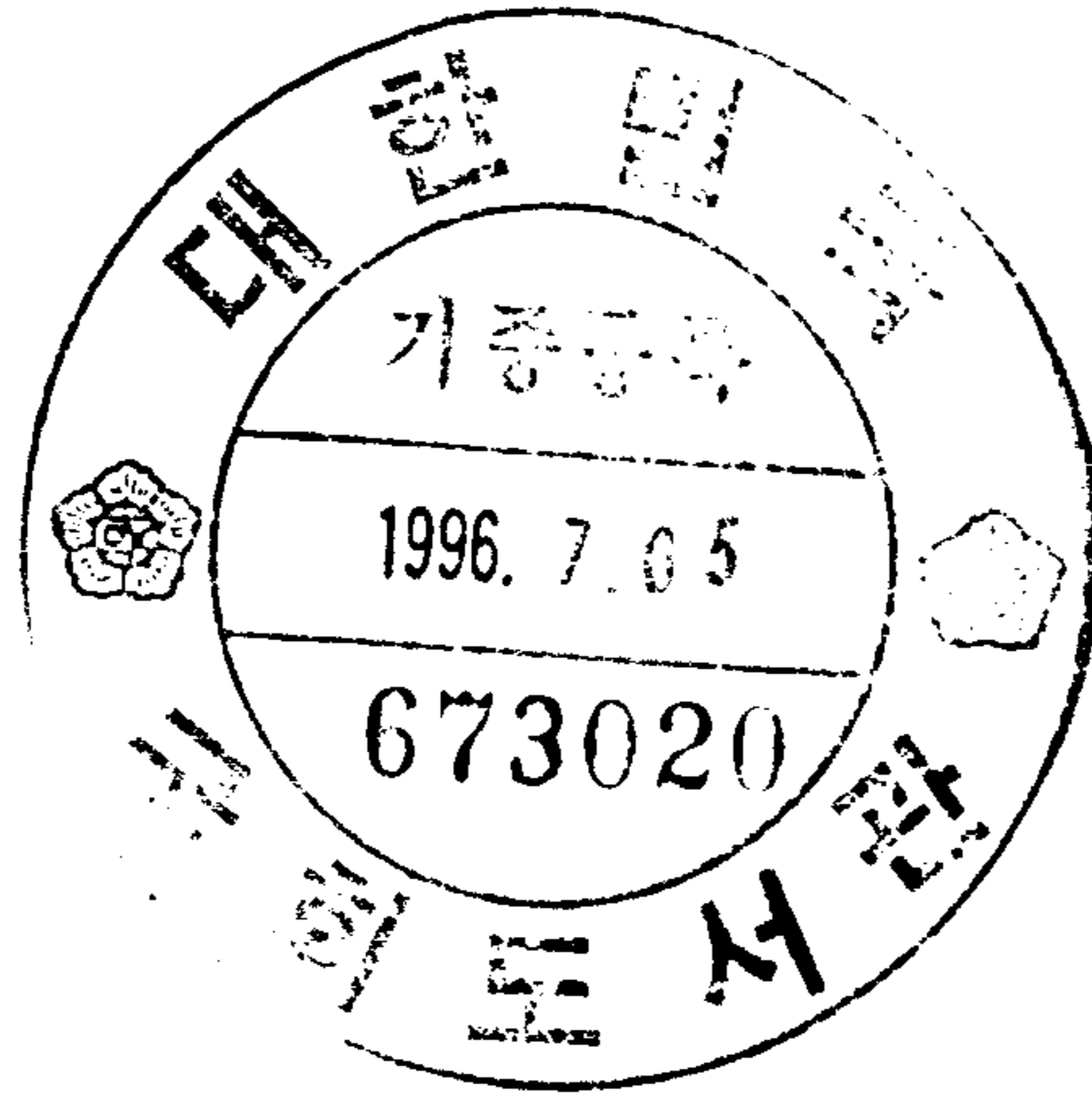
제 1 차 년 도
최종보고서

양돈장에서 진단가능한 돼지 흉막폐렴의
진단법 개발에 관한 연구

Research project for development of
diagnostic method of porcine pleuropneumonia
possible to diagnose in swine farm.

사단법인 양돈산학연구회

농 립 수 산 부



제 출 문

농림수산부장관 귀하

본 보고서를 “ 양돈장에서 진단가능한 돼지 홍막폐렴의 진단법 개발에 관한 연구 ” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1995년 12 월 일

주관연구기관명 : 사단법인 양돈산학연구회

총괄연구책임자 : 예 재 길

연 구 원 : 이 오 형

연 구 원 : 우 영 제

요 약 문

I. 제 목

양돈장에서 진단 가능한 돼지 흉막폐렴의 진단법 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

양돈장에서 피해가 큰 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의한 돼지 흉막폐렴의 진단을 양돈농가가 직접 할 수 있도록 돼지 흉막폐렴 간이 진단법을 개발하고 각 지역별로 양돈장의 비육 출하돈에 대한 돼지 흉막폐렴의 발생 상황을 조사하여 돼지 흉막폐렴의 조기 대책 수립에 활용함으로써 본 기술개발을 통하여 양돈생산성 향상에 기여하고자 합니다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발사업은 돼지 흉막폐렴의 진단액을 바이엘 동물의약품연구소 임상병리실험실에서 개발하고 양돈장에서 흉막폐렴으로 폐사한 돼지의 폐장기 360례를 수거하여 폐 조직 추출액을 제조한 후 3분 이내 판독할 수 있는 평판응집반응인 Coagglutination 반응법을 개발하였으며, 양돈장에서 진단가능한 돼지 흉막폐렴의 간이 진단법을 확립한 후 이 진단법으로 각 지역의 10개표본 양돈장에서 출하된 돼지 697두를 검사하여 돼지 흉막폐렴을 진단하고자 하였습니다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구결과

양돈장에서 진단 가능한 돼지 흉막폐렴의 간이 진단법을 개발하고 돼지 흉막폐렴의 발생 상황을 조사하여 얻은 결과는 다음과 같습니다.

- ① 본 연구에서 Coagglutination반응법을 응용하여 돼지 흉막폐렴의 간이진단법을 개발하였습니다.
- ② 돼지 흉막폐렴의 간이진단법은 양돈장에서 직접 진단할 수 있는 방법입니다.
- ③ Coagglutination반응법을 활용하여 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 분리시험결과 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 89株를 분리 하였습니다.
- ④ Coagglutination 반응법을 활용하여 비육출하돈의 폐장기를 검사 하였던바 697두중 48두가 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의한 흉막폐렴으로 진단되었습니다.
- ⑤ 본 연구결과 Coagglutination반응법은 균분리 방법보다 더욱 신속하고 정확한 방법임을 알았습니다.

2. 활용분야

본 연구개발 사업결과 양돈장에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 감염에 의한 돼지 흉막폐렴의 간이 진단이 가능함에 따라 양돈장이 나 양돈 전문 동물병원에서 활용할 수 있게 되었습니다. 즉 주요 활용분야는 양돈장에서 돼지의 호흡기성 질병의 진단에 활용할 수 있으며 도축장에서 도축검사시 폐장기의 검사에도 활용할 수 있습니다.

다. 그리고 동물병원에서 돼지 폐렴진단 시험에도 본 간이 검사법을 활용할 수 있습니다.

3. 활용방안

양돈장, 도축장 그리고 동물병원에서 본 간이 진단법을 활용할 경우 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 감염이 의심되는 폐장기를 시험관에 넣고 가온처리하여 조직 추출액을 제조한 다음 바이엘동물의 약연구소 임상병리실에서 공급하는 진단시약 (Coagglutination reagent)과 평판응집반응을 실시하면 간단히 그 결과를 육안으로 판단할 수 있습니다.

본 연구개발 사업으로 개발한 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 감염증인 돼지 흉막폐렴의 간이 진단방법을 (사)양돈산학연구회 회원 농장을 비롯하여 전국의 주요 양돈장에 기술이전을 실시하고자 합니다.

그 방법으로는 (사)양돈산학연구회에서 주관하는 기술교육세미나, 양돈농가 개별 방문 및 지역단위 양돈기술교육 세미나를 실시하여 기술보급을 추진하고자 합니다.

4. 건의사항

본 양돈장에서 진단가능한 돼지흉막폐렴 진단법 개발에 관한 연구로 인하여 파생되는 “진단시약의 대량생산을 위한 방법”과 “진단시약의 장기간 보관”은 실용화를 위해서는 필연적으로 추진되어야 할 관련 연구분야입니다.

그러나 본 연구는 간이진단법에 대한 연구개발이므로 개발된 진단법을 대량생산하여 실용화하기 위해서는 대형 발효조 시설 및 투자

가 필요합니다. 또한 장기간 보관에 대한 연구는 2년간의 연구기간이 소요되며 보존성 시험연구도 이미 개발된 다른 시약과 함께 연구해야 할 또하나의 분야로 사료됩니다.

따라서 대량 생산방법과 장기간 보관에 대한 두 분야의 연구가 추후 별도의 연구개발사업으로서 수행되어 개발될 때 본 연구에서 연구개발된 간이 진단법이 더욱 효과적으로 양돈장에서 이용될 수 있을 것입니다.

또한 본 연구개발사업의 활용을 효과적으로 실시하고 극대화 하기 위하여 (사)양돈산학연구회 주관 기술교육 세미나 이외 다른 양돈농가 기술 교육세미나에 본 연구 결과를 발표하고 시범적으로 실습할 수 있도록 조치하여 주실것을 건의합니다.

SUMMARY

For development of diagnostic method of porcine pleuropneumonia in swine farm, the authors have conducted a series of investigations and trials. The results could be summarized as follows.

1. The 89 strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* were isolated from 360 cases of porcine pleuropneumonia and the biochemical properties of the isolates were same as the reference strains.

2. According to the Coagglutination test for serotyping, the 39 isolates were identified as serotype 5, the 34 isolates as serotype 2, the 8 isolates as serotype 3 and the 2 isolates as serotype 7.

3. The clinical signs of pleuropneumonia were weakness, fever, anorexia, dyspnea and laboured breath in the later stages. The gross lesions of the pigs were hemorrhages in the lung tissues, adhesion of the pleura, enlargement of interlobular septa, nodular formation and hydrothorax.

4. Coagglutination test with the lung tissue extract and coagglutination reagent could be more acceptable and reliable than isolation of causative bacteria with culture media for diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumonia* infection.

5. The results of a survey of pleuropneumonia from 10 farms in slaughter house indicated that 48 cases out of 697 fattening pigs were pleuropneumonia and 31 out of 48 cases were positive reaction by coagglutination test with lung tissue extract. From the 48 cases of pleuropneumonia, 19 strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* were isolated.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	12
Chapter 2. Materials and Methods	15
1. Reference strains	15
2. Preparation of hyperimmune sera to reference strains	15
3. Isolation of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	16
4. Identification of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	17
5. Preparation of coagglutination reagents	17
6. Serotyping test for isolated <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> ..	18
7. Collection of lung tissue of porcine pleuropneumonia	19
8. Preparation of lung tissue extract from porcine pleuropneumonia	19
9. Coagglutination reaction	19
10. Survey of porcine pleuropneumonia from notified trial farms ..	20
Chapter 3. Results and Discussion	21
1. Isolation of causative bacteria from porcine pleuropneumonia ..	21
2. Serotyping of isolated <i>Actinobacillus pleuropneumonia</i>	22
3. Clinical signs and lung lesions of porcine pleuropneumonia ..	23
4. Development of diagnostic method for porcine pleuropneumonia	23

4-1 Coagglutination reaction to reference antigens	23
4-2 Coagglutination reaction to lung tissue extract	24
4-3 Diagnostic survey of porcine pleuropneumonia by Coagglutination reaction	25
4-4 Interpretation of diagnostic method for porcine pleuropneumonia with Coagglutination reaction	28
Chapter 4. Conclusions	30
Chapter 5. References	32

목 차

제 1 장	서 론	12
제 2 장	재료 및 방법	15
제 1 절	공시 표준 균주	15
제 2 절	표준균주에 대한 면역 혈청의 제조	15
제 3 절	Actinobacillus pleuropneumoniae의 분리	16
제 4 절	Actinobacillus pleuropneumoniae의 동정	17
제 5 절	Coagglutination reagent의 제조	17
제 6 절	분리한 Actinobacillus pleuropnenmoniae의 혈청형 검사 ..	18
제 7 절	돼지 흉막폐렴의 병변 재료 수집	19
제 8 절	돼지 흉막폐렴 병변에서 조직 추출액의 제조	19
제 9 절	Coagglutination 반응	19
제 10 절	표본 양돈장 지정 및 돼지 흉막 폐렴조사	20
제 3 장	결과 및 고찰	21
제 1 절	돼지 흉막폐렴병소에서 세균분리	21
제 2 절	분리한 Actinobacillus plenropnenmoniae의 혈청형	22
제 3 절	Actinobacillus pleuropnenmoniae 감염돈의 증상과 폐병변 ..	23
제 4 절	돼지 흉막폐렴의 진단법 개발	23
	1. 표준항원에 대한 Coagglutination 반응결과	23

	2. Lung tissue extract(폐조직 추출액)에 대한	
	Coagglutination 반응 결과	24
	3. Coagglutination 반응법을 이용한 돼지 흉막폐렴의	
	진단 조사결과	25
	4. Coagglutination 반응법을 이용한 돼지 흉막폐렴	
	진단 방법 해설	28
제 4 장	결 론	30
제 5 장	참고문헌	32

제 1 장 서 론

돼지에서 *Actinobacillus(Haemophilus) pleuropneumoniae* 감염병은 발열, 호흡곤란, 원기소실, 개구복식 호흡, 폐출혈 및 섬유소성 흉막폐렴등을 특징으로 하는 호흡기 질병으로서 돼지의 흉막폐렴으로 부르고 있다 (Sebunya, 1983).

돼지의 흉막폐렴은 밀집사육, 환기불량, 장거리 수송, 기후의 급변, 갑작스런 환경변화 등 스트레스가 가해졌을때 생체의 저항력저하로 *Actinobacillus pleuropneumoniae*가 감염되어 발병하게 된다.

여러 연구자들에 의하여 돼지의 흉막폐렴 병소에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 분리하여 발생을 보고한 바 있다. 즉 Shope는 아르헨티나 지방에서 돼지의 흉막폐렴 병소로부터 *A. pleuropneumoniae*를 분리하여 1964년 최초로 보고하였다. 그 후 Nielson은 1970년 덴마크에서, Little (1970)은 영국에서, Mylrea등(1974)은 오스트레일리아에서, Kiupel(1974)은 독일에서, Morgan과 Phillips(1978)는 스코틀랜드에서, Sanford와 Josephson (1981)은 캐나다에서, 예재길과 서익수(1981)는 우리나라에서 각각 돼지 흉막폐렴의 발병을 보고하였다.

최근 우리나라에서의 돼지 흉막폐렴의 발생율은 윤 용덕 등이 조사한 성적은 돼지 가검물 890건 중 98건(1993년도 농촌진흥청 가축위생연구소 시험 연구보고서) 이었으며, 저자가 조사한 성적은 돼지 가검물 953건 중 79건(한국에서 발생한 돼지의 세균성 질병 조사. 한국임상수의학회지 제 11권 2호 1994)으로 조사보고 된 바 있다.

이러한 돼지 흉막폐렴은 집단 사육 양돈장에서는 이환율이 높고 폐사율도 높아 경제적 피해가 큰 질병이므로 많은 연구자들에 의해 효과적인 치료약

제 및 예방접종약의 개발등의 방제대책으로 피해를 줄이고 있다.

돼지 흉막폐렴은 임상증상의 관찰, 육안적 병변 및 병리 조직학적 소견 관찰 그리고 원인세균인 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 분리 및 동정으로 진단하고 있다. 그러나 최종 진단은 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 분리하여 생화학적, 혈청학적 검사로써 확진할 수 있다.

*Actinobacillus pleuropneumoniae*의 생화학적 특성은 그람 음성의 다양형 태성 단간균으로 V factor (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) 존재하에서만 발육하며 porphyrin 양성, 비운동성, 용혈성, O-nitrophenyl- β -D-galactopyranosidase 양성반응을 보인다. 돼지의 병변재료에서 *A. pleuropneumoniae*를 분리 배양할 때 집락의 성상은 끈적 끈적하여 platinum에 달라붙는 특성이 있으며 5-6대 계대하면 이런 현상은 대부분 없어진다.

이러한 실험실적 검사방법은 3-4일이 소요되어 돼지 흉막폐렴의 효과적인 방제대책 수립에 큰 지장을 초래하고 있는 실정이다. 그러므로 가장 빠른 시간내에 본 질병을 정확하게 진단하는 진단법 개발이 필요한 실정이다. 돼지 흉막폐렴은 급성 전염병이므로 양돈장에서는 가급적 빨리 진단할수록 효과적인 방제대책 수립에 유리하다.

Mittal등(1983)은 *Staphylococcus aureus* Cowan I (NCTC 8540) 균주를 이용한 Coagglutination 반응법을 활용하여 돼지 흉막폐렴 병소에서 분리한 세균을 검사한 결과 빠르고 정확하게 *Actinobacillus pleuropneumoniae*로 同定하였으며 혈청형 구분도 가능함을 발표한 바 있다. 그 후 Mittal등(1983, 1987, 1988), Hunter(1986), Mueller등(1986), 예 재길(1989) 등이 분리 균주의 혈청형 검사방법으로 Coagglutination 반응을 활용하였다고 보고하였다. 본 연구진은 *A. pleuropneumoniae*가 감염증식된 섬유소성 흉막폐렴 병변에는 다량의 *A. pleuropneumoniae* 균체와 cell debris가 존재함에 착안

하여 폐장에서 조직액을 추출한 후 Coagglutination reagent로 반응하여 본 질병을 진단할 수 있음을 알았다.

본 연구에서는 양돈장에서 가장 피해가 큰 돼지 홍막페렴의 진단법 개발에 관한 연구로써 양돈장에서 돼지 홍막페렴을 진단할 수 있는 진단법을 개발하고 개발된 진단법을 활용하여 비육돈 및 출하돈에 대한 확인 검사를 실시하였다. 즉 Coagglutination reagent를 제조한 후 폐조직에서 extract를 가온 추출하여 반응시키는 방법으로 양돈장에서도 검사할 수 있도록 연구개발하였다. 그리하여 양돈장에서 돼지 홍막페렴을 가급적 빨리 진단하여 확실한 치료대책을 조기에 수립하도록 하므로써 돼지 홍막페렴의 피해를 감소시키고자 본 연구를 실시하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 공시 표준균주

본 연구에 공시한 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 균주의 혈청형별 균주명은 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1: Shope 4074(ATCC 27088, HK 405, CCM 5869), serotype 2: S. 1536(ATCC 27089, HK 406, CCM 5870), serotype 3: S. 1421 (ATCC 27090, HK 407, CCM 5871), serotype 4: M 62, serotype 5: 966, K 17, serotype 6: Femo, serotype 7:WP 83 등이었다(Kilian등, 1978; Nielsen, 1986).

공시 균주는 tryptic soy agar(TSA) 평판배지에서 *Staphylococcus aureus* 주위에서만 증식하는 위성현상을 보였으며 혈액배지에서 용혈성을 비롯하여, urea 양성, catalase 양성, nicotinamide adenine dinucleotide(NAD) 요구성 및 Gram 음성, 단간균의 형태를 보였다.

이러한 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 균주를 NAD 5ug/ml 첨가한 TSA 사면배지에서 증식하여 -70℃ 보관하면서 실험에 사용하였다.

제 2 절 표준균주에 대한 면역혈청의 제조

항혈청 제조용 면역원은 Rapp등(1985)의 방법에 준하여 제조하였다. 즉 NAD 첨가 TSA 평판배지에 공시 표준균주(혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)를 접종하여 12시간 배양한 후 생리식염수로 집균하여 일부는 순수성 시험 및 생균수 계산에 사용하였다. 나머지는 8,000 rpm에서 20분간 2회 원심세척하고 0.3% 포르말린 함유 생리식염수(Mittal등, 1981; Rapp등, 1985)로 부유하여

5℃ 냉암소에 보관하면서 항혈청 제조용 면역원으로 사용하였다. 이 면역원의 세균수는 1×10^{10} 개/ml 되게 조정하였다(Sebunya와 Saunders, 1982).

토끼면역혈청의 제조는 Gunnarson등(1977), Mittal등(1983), Rosendal과 Boyd(1982), Rapp등(1985) 등의 방법에 준하였다.

공시 토끼는 건강한 토끼(New Zealand White, 6개월령, 체중 2kg)를 각 군주당 3마리씩 21마리를 사용하였다. 면역원을 접종하기전 채혈하여 시험관응집반응으로써 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 대한 항체가 없음을 확인하였다.

접종은 처음에 피하주사, 2회부터 8회까지는 정맥으로 주사하였으며, 접종량은 1회부터 8회까지 각각 0.5ml, 0.5ml, 1ml, 1ml, 2ml, 2ml, 3ml, 3ml씩으로 3일 간격으로 접종하였다. 최종 접종한 후 7일만에 토끼의 심장에서 전 채혈하였다. 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

제 3 절 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 分離

양돈장에서 발생하고 있는 돼지 흉막폐렴을 진단하고자 바이엘동물의약연구소 임상병리실에 의뢰된 돼지 가검물의 폐장기에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 분리하였다. 즉 폐장병변부를 무균적으로 채취하여 NAD 5ug/ml 첨가한 TSA 평판배지, 면양혈액한천배지, TSA 평판배지 등에 도말한 후 37℃에서 24시간 배양하였다. 면양혈액한천배지 및 TSA 평판배지에 접종시에는 *Staphylococcus aureus*를 평판배지 중앙에 일직선으로 그어서 배양하였다 (Sandford와 Josephson, 1981). 배양 발육한 집락 증

Actinobacillus pleuropneumoniae 의 집락과 유사한 집락을 취하여 이를 분리하였다.

제 4 절 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 同定

Actinobacillus pleuropneumoniae 분리균의 동정은 Shope(1964), Biberstein(1977), Sebunya등(1982)의 방법에 준하였다. 즉 Gram 염색, alkaline methylene blue 염색으로 세균의 형태와 염색성을 조사하였으며 발육시 X factor 및 V factor 요구능 (Biberstein등, 1977), 위성현상, 용혈성 (Brandreth와 Smith, 1985), catalase 생성능 및 urease 생성능등을 조사하여 분리균을 동정하였다.

제 5 절 Coagglutination reagent의 製造

Coagglutination 반응에 필요한 Coagglutination reagent는 Christensen 등 (1973), Grasso 등(1981)의 방법에 따라 다음과 같이 제조하였다.

Protein A를 다량 생성할 수 있는 *Staphylococcus aureus* Cowan I (NCTC 8530) 株를 TSA 평판배지에서 37℃ 24 시간 배양하고 PBS로 집균하였다. 집균한 것을 3,000 rpm에서 15분간 2회 원심세척하고 0.5% 포르말린 함유 PBS에 부유시켜 실온에서 3시간 불활화 하였다. 이것을 다시 3,000 rpm에서 15분간 원심한 후 상청액은 버리고 PBS로 세포용적비 10%(vol/vol)가 되게 조정하여 재부유하였다. 이 부유액을 80℃의 수조에서 5분간 작용하였다. 이러한 *Staphylococcus aureus* 부유액 1ml을 각각의 혈청형별 토끼면역혈청 0.1ml와 충분히 혼합한 후 실온에서 30분 작용시켰다.

이것을 3,000 rpm에서 15분간 2회 원심세척하고 PBS로 세포용적비 10%(vol/vol)가 되게 조정한 후 sodium azide를 0.1%되게 첨가하여 5℃ 냉암소에 보관하면서 coagglutination reagent로 본 실험에 사용하였다.

제 6 절 분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의

혈청형 검사

돼지의 폐장기에서 분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청형 검사는 분리균주의 배양 항원 집균액과 각 혈청형별 coagglutination reagent로써 직접 평판 응집반응으로 실시하였다. 즉 분리균주를 NAD 첨가 TSA 평판배지에 접종하여 18-24시간 배양 후 생리식염수로 집균하였다. 집균 후 8,000 rpm에서 20분간 2회 원심세척하였다. 침전균체를 0.1% formalin PBS에 세포용적비 5%되게 넣어 균일하게 부유한 후 5℃ 냉암소에 보관하면서 혈청형별 실험에 쓰일 항원으로 사용하였다(Yamamoto와 Ogata, 1980). 각 혈청형별로 coagglutination reagent를 auto-pipette (Pipetman, Gilson medical electronics U.S.A.)로써 혈청응집판에 0.05ml씩 적하 후 동량의 혈청형 검사용 분리균주의 항원을 적하하여 각반봉으로써 잘 혼합하였다. 판독은 혼합 후 30초에 실시하였으며 3분 후 최종확인하였다. 분리균주가 autoagglutinating type 일 경우 NAD 첨가 TSA 평판배지에 접종하여 18-24시간 배양 후 생리적식염수로 집균하고 집균한 상층액을 혈청반응검사용 항원으로 사용하여 coagglutination reagent와 반응하여 혈청형을 구분하였다.

제 7 절 돼지 흉막폐렴의 병변재료 수집

돼지 흉막폐렴의 진단법을 개발하고자 우리나라의 집단사육 양돈장에서 폐사한 돼지의 폐장을 수집하였다. 또한 비육 후 출하한 돼지의 폐장기를 서울, 경기, 부산, 광주, 충청지역의 도축장에서 채취하여 세균검사와 더불어 흉막폐렴의 진단액 제조에 사용하였다.

제 8 절 돼지 흉막폐렴 병변에서 조직 추출액의 제조

돼지 흉막폐렴 병소에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 분리하지 않고 직접 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 감염여부를 진단하고자 Mittal 등(1983), Hunter와 Livingstone(1986)의 방법에 준하여 폐장병변으로부터 조직액을 추출하여 그 조직 추출액으로써 coagglutination 반응을 시도하였다. 병소 조직 2g을 무균적으로 채취하여 PBS 3ml를 가하고 폐조직은 부검용 가위로 3-5회 세절하였다. 이것을 시험관에 넣어 10분간 가온 처리하였다. 가온 처리시 80℃, 90℃, 95℃로 각각 처리하여 시험하였던 바 본 실험에서는 95℃ 처리가 가장 비특이 반응이 적고 민감하게 반응되었다. 그러므로 폐조직 추출액 제조시에는 95℃로 열처리하였다. 열처리 후 3,000 rpm에서 20분간 원심하여 상층액을 조직추출액으로 사용하였다 (Mittal 등, 1983).

제 9 절 Coagglutination 반응

흉막폐렴 병변의 조직 추출액 0.1ml 과 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청형별 coagglutination reagent 0.1ml를 응집반응판에 적하 후 각반봉으로써 잘 혼합하였다. 판독은 혼합 후 3분에 실시하였다.

제 10 절 표본 양돈장 지정 및 돼지 흉막폐렴 조사

전국에서 산발적으로 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의한 돼지 흉막 폐렴이 발생되었던 10개 지역의 양돈장에서 폐장기를 수거하여 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 분리하고 폐장기 조직에서 조직 추출액을 제조하여 진단하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 돼지 흉막폐렴 병소에서 세균 분리

*Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의한 돼지 흉막폐렴의 발생상황을 파악하고자 바이엘동물의약연구소 임상병리실에 의뢰된 돼지 흉막폐렴 가검물 360예로부터 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 89株를 分離, 同定하였다.

분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*는 모두 Gram 음성의 다양형태성 소간균으로 catalase 및 urease 양성, indol 음성이었으며 세균배지에 증식할 때 V factor (NAD)를 요구하였다. 그러나 대부분의 분리균주는 용혈성을 보였으나 일부 균주는 비용혈성을 보였다.

돼지 흉막폐렴의 원인세균으로는 *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*등이나 *Actinobacillus pleuropneumoniae*가 주 원인으로 알려져 있다. 돼지 폐장기로 부터 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 분리는 일반 세균중식배지로는 불가능하므로 여러가지 특별한 기술이 필요하다. 그래서 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 감염여부를 확인할 때 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 분리실험보다 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 antigen을 검색하는 coagglutination 반응법을 응용하는 것이 바람직하다. 그러므로 본 연구에서는 폐장기에서 직접 조직 추출액을 제조하여 coagglutination reagent로 coagglutination반응법을 시도 하였다.

제 2 절 분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청형

분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 89株를 Mittal등이 혈청형 검사 방법으로 이용한 coagglutination반응으로써 혈청형을 검사한 성적은 (표 1)과 같다. 즉 혈청형 5가 39株로서 가장 많았으며 혈청형 2가 34株로서 많았다. 그리고 혈청형 3이 8주 혈청형 7이 2주이었다.

Table 1. Serotyping of 89 isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Korea

Serotype	No. of isolates
1	-
2	34
3	8
4	-
5	39
6	-
7	2
NT	6
Total	89

제 3 절 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 감염돈의

증상과 폐병변

Actinobacillus pleuropneumoniae 감염돈의 임상증상은 원기소실, 식욕절폐, 발열(40-41℃), 결막충혈, 호흡곤란 그리고 견좌자세등의 증상을 보였으며 폐사직전에는 호흡곤란, 개구복식 호흡 그리고 구강과 비강주위에 포말성, 혈액성 참출물등이 관찰되었다.

*Actinobacillus pleuropneumoniae*가 분리된 폐병변은 폐홍막의 비후와 유착, 폐장부종, 폐장출혈, 소엽간 결재직의 확장 및 출혈, 폐장조직의 결절형성 그리고 흉수 저류등의 병변을 보여 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 병원성이 매우 강함을 알 수 있었다.

제 4 절 돼지 흉막폐렴의 진단법 개발

1. 표준항원에 대한 Coagglutination반응 결과

*Actinobacillus pleuropneumoniae*의 smooth colony type과 autoagglutinating type의 혈청형을 구분하고 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 감염돈의 폐장병변 조직액으로써 신속한 진단을 하고자 Coagglutination 반응을 시도하였다. *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 각 혈청형별 Coagglutination reagent와 각 혈청형별 표준 항원과의 교차반응 결과 동종 혈청형간의 반응은 30초이내 강한 응집반응을 보여 육안으로 판독하기 용이하였으며 3분후 확인 검사에서 혈청형 5와 혈청형 6사이에서 미세한 교차반응이 일어나 공통항원 성분이 일부 인정되었다. 이상의 결과로써 Coagglutination반응은 분리균주의 혈청형 검사 방법으로 신속하고 정확한 진단법으로 활용할 수 있음을 알았다.

2. Lung tissue extract(폐조직추출액)에 대한 Coagglutination 반응결과

Actinobacillus pleuropneumoniae 감염에 의한 돼지 흉막폐렴을 신속하게 진단할 목적으로 *Actinobacillus pleuropneumoniae*가 감염된 폐조직에 함유되어있는 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 균체 및 가용성 항원을 Coagglutination 반응으로 검색하였다.

흉막폐렴 병소 조직을 채취하여 폐조직 2g에 PBS 3ml를 가하고 폐조직은 부검용 가위로 3-5회 세절한 후 95℃로 10분간 가온처리후 3,000rpm에서 20분간 원심하여 상층액을 조직 추출액으로 사용하였다.

조직추출액과 각혈청형별 Coagglutination reagent를 평판응집 반응하여 3분 후 판독하였다. 총 26예의 돼지 흉막폐렴병소에 조직 추출액을 제조하여 Coagglutination 반응하였으며 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 분리도 동시에 수행하였던바 Coagglutination 반응법으로는 22예가 감염으로 확인되었으나 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 분리 검사결과 20예에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 분리하였다 (표2).

즉 Coagglutination 반응법은 84.6%의 검출율을 보였으며 세균분리방법은 76.9%의 검출율을 보였으나 두 반응간의 일치율을 92.3%로 우수하였다.

그러므로 Coagglutination 반응법으로써 폐장기 병변조직에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 항원을 검출하는 방법은 세균분리용 배지를 이용하여 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 분리하는 방법보다 더욱더 신속하고 정확한 진단방법임을 알 수 있었다.

Table 2.

Comparison of the detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigens by the coagglutination test and the cultural isolation technique in lung materials of 26 pigs which died by acute pleuropneumonia.

ㅎ

		No. of lung tested by Coagglutination		
		Positive	Negative	Total
Results of isolation test	Positive	20	0	20
	Negative	2	4	6
	Total	22	4	26

3. Coagglutination 반응법을 이용한 돼지홍막폐렴의 진단조사 결과

전국의 각 지역별 도축장에서 출하돈의 폐장기를 육안적으로 조사하였다. 10개 지역의 양돈장에서 출하된 돼지 총 697두중 홍막폐렴을 보인 돼지의 수는 48두로 6.9%이었으며 coagglutination 반응에서 양성돈의 수는 31두 이었다(표 3).

그리고 48례의 홍막폐렴 폐장기에서 19株의 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 가 분리되었다.

이러한 결과는 돼지의 홍막폐렴 병소에서 폐조직을 채취하여 양돈장에서 폐조직 추출액을 제조한 후 실험실에서 공급한 coagglutination reagent를 사용하여 평판응집반응하면 돼지의 홍막폐렴을 신속하고 정확하게 진단 할 수 있음을 확인하였다.

(표 3) 도축장에서 수집한 출하돈의 폐장기에 대한 흉막폐렴 진단 조사

도축검사 횟수	검사한 출하 돈지의 수	흉막폐렴 병변을 보인 돈지의 수	Coagglu- tion반응에서 양성돈의 수	App가 분리된 돈지의 수	임상형
제 1 차	40	6	5	3	S-5
제 2 차	45	2	2	2	S-2
제 3 차	105	13	6	3	S-2
제 4 차	37	1	0	0	-
제 5 차	106	6	5	2	S-2 S-5
제 6 차	20	1	0	0	-
제 7 차	104	2	2	1	S-5
제 8 차	98	6	4	3	S-2
제 9 차	107	7	5	3	S-5
제 10 차	35	4	2	2	S-3
합 계	697	48	31	19	

Table 3. Survey of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in slaughter house

Serial No. of inspection	No. of inspected pig	No. of pleuropneumonia	No. of positive by coagglutination test	No. of isolated App strain	Serotype
1	40	6	5	3	S-5
2	45	2	2	2	S-2
3	105	13	6	3	S-2
4	37	1	0	0	-
5	106	6	5	2	S-2 S-5
6	20	1	0	0	-
7	104	2	2	1	S-5
8	98	6	4	3	S-2
9	107	7	5	3	S-5
10	35	4	2	2	S-3
Total	697	48	31	19	

4. Coagglutination 반응법을 이용한 돼지 흉막폐렴 진단방법 해설

Coagglutination 반응법은 사람의 폐렴진단시 도입한 검사방법으로써 Kronvall(1973), Edward와 Coonrod(1980)는 사람의 객담에서 Pneumococcal antigen 검사에, Grasso등(1981)은 *Haemophilus influenza* type b 감염증, Onokodi와 Wauters(1981)는 *Klebsiella*감염증을 검사 하였다고 보고 하였다.

본연구자는 이러한 진단법을 돼지 흉막폐렴의 원인세균인 *Actinobacillus pleuropneumoniae*감염증 검사에 Coagglutination 반응이론을 도입하고자 시도하였다.

즉 본 연구에서 개발한 양돈장에서 진단이 가능한 돼지 흉막폐렴의 진단 방법은 (그림 1)의 모식도와 같다. 즉 양돈장에서 폐사한 돼지에서 채취한 폐장기를 95℃로 10분간 가온처리하여 폐조직 추출액을 만든후 실험실에서 제공하는 Coagglutination reaget와 평판 응집반응을 실시하면 3분이내에 Coagglutination반응결과를 판독할 수 있다. 이러한 방법은 실험실에서 세균 분리검사 방법보다 신속하게 할 수 있으며 혈청형까지 확인할 수 있어 방역 대책수립에 즉시 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

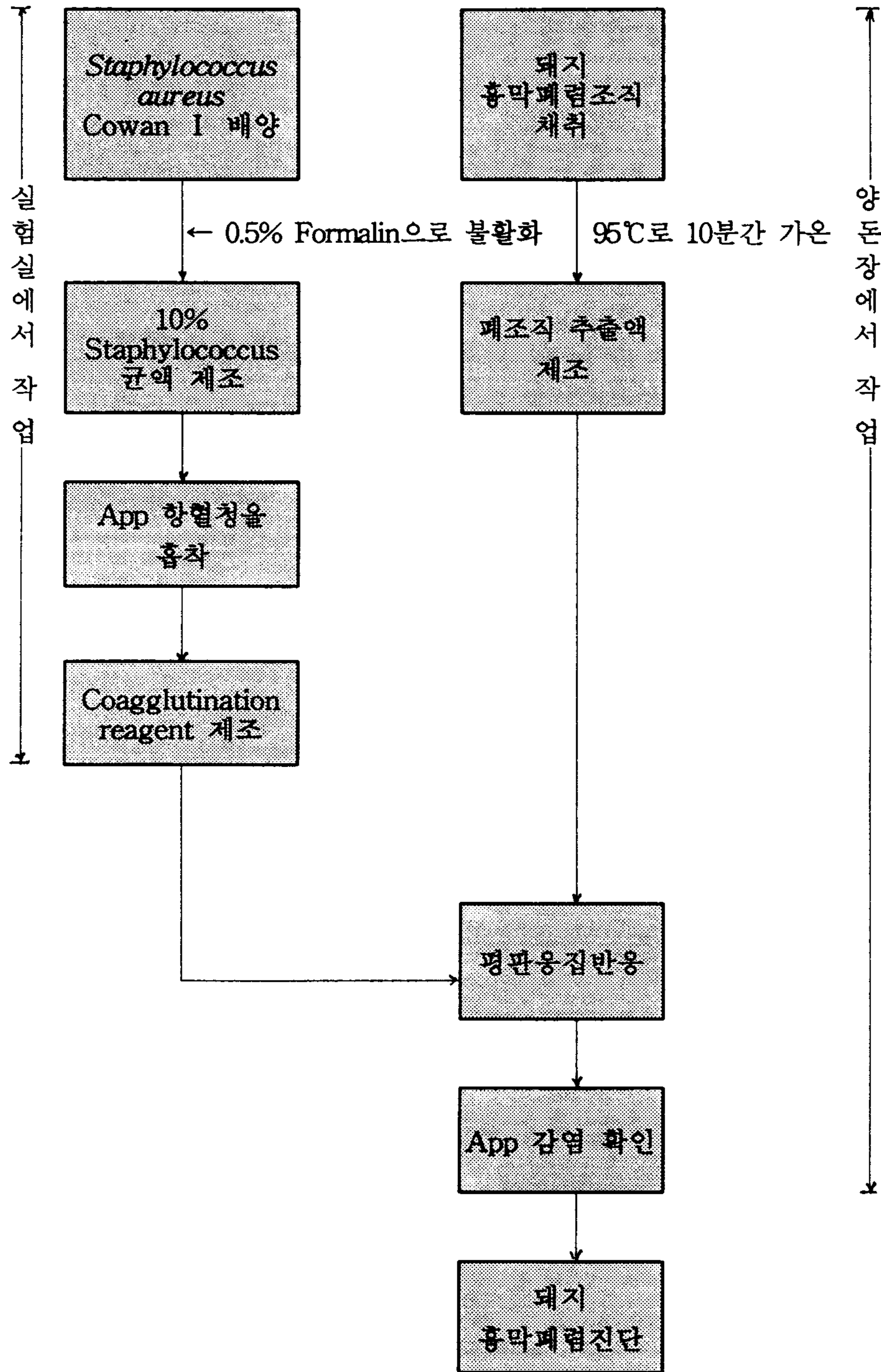


그림1. 돼지 홍막폐렴 진단방법 모식도

제 4 장 결 론

양돈장에서 경제적 피해가 큰 돼지 흉막폐렴의 발생 상황을 조사하고 양돈장에서 진단 가능한 돼지 흉막폐렴의 간이 진단법 개발을 시도하였다.

바이엘 동물의학연구소에 보관중인 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청형별 표준 균주로서 면역 혈청을 제조하여 국내에서 분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 Coagglutination 반응법으로 혈청형별 검사를 실시하였다. 그리고 양돈장에서 진단 가능한 돼지 흉막폐렴 진단법을 개발하고자 돼지 흉막폐렴 병소조직에서 여러가지 방법으로 폐조직 추출액을 제조하여 바이엘 동물의학연구소에서 만든 Coagglutination reagent로써 평판응집반응하여 실험실에서 세균 분리검사 하는 것 보다 신속하고 정확한 간이 진단법을 개발하였던 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 본 연구에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 89株를 분리하였으며 Coagglutination 반응법으로 혈청형별 검사 하였던 바 혈청형 5가 39株, 혈청형 2가 34株, 혈청형 3이 8株, 혈청형 7이 2株 이었다.
2. *Actinobacillus pleuropneumoniae* 감염돈은 원기소실, 식욕절폐, 발열, 호흡곤란 등의 임상증상을 보였으며 폐사 직전에는 개구복식 호흡을 하였고 구강과 비강 주위에 혈액성 참출물이 관찰되었다. 폐병변은 폐장출혈, 소엽간 결재직 확장 및 출혈, 폐장에서의 결절형성, 폐흉막의 유착, 흉수 저류 등이었다.

3. *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 각 혈청형별 표준항원에 대한 Coagglutination 반응결과 동종혈청형간 30초 이내 강한 응집반응을 보여 육안으로 판독하기에 용이 하였다.
4. 실험실에서 폐조직 추출액 (Lung tissue extract)을 제조하여 Coagglutination 반응하였던 바 세균분리용 배지를 이용하여 *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 분리하는 것 보다 더욱 더 신속하고 정확하게 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 감염을 확인할 수 있었다.
5. 각 지역별 집단 사육 양돈장에서 출하된 폐장기 검사결과 총 697두중 흉막폐렴을 보인 돼지의 수는 48두이었으며 Coagglutination반응에서 양성돈의 수는 31두 이었다. 그리고 48례의 흉막폐렴 폐장기에서 19株의 *Actinobacillus pleuropneumoniae*가 분리되어 Coagglutination 반응이 균분리 방법보다 더욱 더 정확한 방법임을 알 수 있었다.
6. 이상의 결과를 요약하면 양돈장에서 폐장기를 가온처리하여 폐조직 추출액을 만든후 실험실에서 제공한 Coagglutination reagent와 평판응집 반응을 실시하면 돼지 흉막폐렴의 원인균인 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 감염 여부를 확실히 진단할 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 장 참고문헌

1. Biberstein, E.L., Gunnarsson, A. and Hurvell, B. : Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus spp.* from swine. Am. J. Vet. Res., 38 : 7-11, 1977.
2. Brandreth, S.R and Smith, I. M. : Prevalence of pig herds affected by pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* in Eastern England. Vet. Rec., 117 : 143-147, 1985.
3. Christensen, P., Kahlmeter, G., Jonsson, S and Kronvall, G : New method for the serological grouping of Streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A - containing Staphylococci. Infection and Immunity, 7 : 881-885, 1973.
4. Edward, E.A and Coonrod, J.D : Coagglutination and counterimmunoelectrophoresis for detection of Pneumococcal antigens in the sputum of pneumonia patients. J. Clini. Microbiol., 11 : 488-491, 1980.
5. Grasso, R. J., West, L.A., Holbrook, N. J., Halkias, D. G., Paradise, L. J. and Frideman, H. : Increased sensitivity of a new coagglutination test for rapid identification of *Haemophilus influenzae* type b. J. Clini. Microbiol. 13 : 1122-1124, 1981.

6. Gunnarsson, A., Biberstein, E. L. and Hurvell, B. : Serological studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): Agglutination reaction. Am. J. Vet. Res., 38 : 1111-1114, 1977.

7. Hunter, D. and Livingstone, J. : Detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* antigens using the coagglutination test. Vet. Rec., 118 : 129, 1986.

8. Kilian, M., Nicolet, J. and Biberstein, E. L. : Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* Shope 1964 and proposal of neotype strain. International Journal of Systematic Bacteriology, 28 : 20-26, 1978.

9. Kiupel, V. H. : Diagnostische und eqizootiologische Beobachtungen zum Vorkommen der *Haemophilus pleuropneumoniae* beim schwein. Monatsh Veterinaermed, 30 : 685-687, 1974.

10. Kronvall, G. : A rapid slide-agglutination method for typing Pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A-containing Staphylococci. J. Med. Microbiol., 6 : 187-190, 1973.

11. Little, T. W. A. : *Haemophilus* infection in pigs. Vet. Rec., 87 : 399-402, 1970

12. Mittal, K. R., Higgins, R. and Lariviere, S. : An evaluation of agglutination and coagglutination techniques for serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates. Am. J. Vet. Res. 48 : 219-226, 1978.

13. Mittal, K. R., Higgins, R. and Lariviere, S. : Detection of type specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae* Infected pigs by coagglutination test. J. Clini. Microbiol. 18 : 1355-1357, 1983.

14. Mittal, K. R., Higgins, R. and Lariviere, S. : Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. J. Clini. Microbiol. 15 : 1351-1354, 1983.

15. Mittal, K. R., Higgins, R. and Lariviere, S. : Serological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotype 6 and their antigenic relationship with other serotypes.

Veterinary Record. 122 : 199-203, 1988.

16. Mittal, K. R., Higgins, R. and Lariviere, S. : Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* and detection of type specific antigens in the lungs of infected pigs by coagglutination and ring precipitation tests. Proc. 3rd Symp. Vet. Lab. Diagnost. P 411-419, 1983.

17. Morgan, J. H. and Phillips, J. E. : Isolation of *Haemophilus parahaemolyticus* from pigs in Scotland. Vet. Rec. 103 : 139-140, 1978.

18. Muller, E., Korte, G. and Petzoldt, K. : Isolation and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in North western Germany. Proc. IPVS., P267, 1986.
19. Mylrea, P. J. Fraser, G., Macqueen, P. and Lambourne, D. A. : Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parapaemolyticus*. Austral. Vet. Jour. 50 : 225-259, 1974.
20. Nielsen, R. : *Haemophilus parahaemolyticus* as the cause of pleuropneumonia in swine. I. Clinical, pathological and epidemiological studies. Nord. Vet. Med., 22 : 240-245, 1970.
21. Nielsen, R. : Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype : serotype 12. Acta Vet. Scand. 27 : 453-455, 1986.
22. Onokodi, J. K. and Wauters, G. : Capsular Typing of Klebsiellae by coagglutination and latex agglutination. J. Clini. Microbiol., 13 : 609-612, 1981.
23. Rapp, V. J., Ross, R. F. and Erickson, B. Z. : Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. Am. J. Vet Res., 46 : 185-192, 1985.

24. Rosendal, S. and Boyd, D. A. : *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. J. Clinin. Microbil., 16 : 840-843, 1982.
25. Rosendal, S. and Mitchell, W. R. : Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs : A survey of Ontario pork producers, 1981. Can. J. Comp. Med., 47 : 1-5, 1983.
26. Sanford, S. E. and Josephson, G.K.A : Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* epizootic in southwestern Ontario : Clinical, Microbiological, Pathological and some Epidemiological findings. Can. J. Comp. Med., 45 : 2-7, 1981.
27. Saunders, J. R., Osborne, A. D. and Sebunya, T. K. : Pneumonia in Saskatchewan swine : Abattoir incidence of intrathoracic lesions in pigs from a herd infected with *Haemophilus pleuropneumoniae* and from other herds. Can. Vet. J. 22 : 224-247, 1981.
28. Sebunya, T. N. K. and Saunders, J. R. : *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine : A review. J. A. V. M. A., 182 : 1331-1337, 1983.
29. Sebunya, T. N. K. and Saunders, J. R. : Studies on immunity to *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in mice. Am. J. Vet. Res., 43 ; 1793-1798, 1982.

30. Sebunya, T. N. K., Saunders, J. R. and Osborne, A. D. : Characteristics of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates and some epidemiological findings on porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* in Saskatchewan. Can. Vet. J., 23 : 224-228, 1982.

31. Shope, R. E. : Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. J. Exp. Med., 119 : 357-368, 1964.

32. Yamamoto, K. and Ogata, M. : The use of agglutination test in the serological diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Proc. IPVS, p218, 1980.

33. 예재길 : 한국에서 발생한 돼지의 세균성 질병 조사.
한국임상수의학회지, 11(2) : 169-178, 1994.

34. 예재길 : 한국에서의 돼지 흉막폐렴의 발생상황과 방제 대책. 대한수의학회지, 32 (2호 부록) 21-45, 1992.

35. 예재길 : 흉막폐렴돈에서 분리한 *Haemophilus pleuropneumoniae*에 관한 연구. 한국축산과학연구소보, 2 : 1-7, 1983.

36. 예재길, 서익수 : 섬유소성 흉막폐렴돈의 폐병소로부터 분리한 *Haemophilus parahaemolyticus*에 관한 연구. 서울대학교 수의대 논문집, 6 : 41-57, 1981.

37. 예재길, 서익수 : 한국에서 돼지 *Haemophilus pleuropneumoniae* 감염
병에 관한 연구. 서울대학교 수의대 논문집, 14 : 129-177, 1989.