

돼지에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청학적 진단법에 대한 비교연구

심항섭, 우종태, 조중현, 전무형*
경기도 가축위생시험소 북부지소, 충남대학교 수의과대학*

Comparative Studies on Serological Tests for
Actinobacillus pleuropneumoniae Infection in Swine

Hang-Sub Shim, Jong-Tae Woo, Jung-Huin Cho, Moo-Hyung Jun
Nothern Branch of Kyunggi Veterinary Service laoratory
College of Veterinary medicine, Chungnam national University

Abstract

To establish an effective diagnostic measure for detection of the antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the methods for tube agglutination test(TAT), plate agglutination test(PAT), micro-agglutination test(MAT) and agar-gel immunodiffusion test(ID) were improved and standarized, and the comparative studies were carried out.

The results obtained through the experiments were summarized as follows.

1. The rabbit hyperimmune sera to reference serotypes 1 to 6 were cross-tested with TAT, PAT, MAT and ID. In the homologous systems, the range of antibody titers in TAT was 80 to 640, showing the cross-reaction in serotypes 3, 4, 5 and 6. The range of antibody titers in PAT was 4 to 64, showing the cross-reaction in serotypes 3, 4, 5 and 6. In ID, the range of antigen titers was 8 to 32, and cross-reaction was observed in serotype 5.
2. The optimal concentration of antigen in PAT and MAT were 100mg/ml and 1.25mg/ml respectively. The most sensitive reaction in MAT was observed in 52°C for 18hrs.
3. In ID, the most promising antigen and the buffer for agar-gel were EDTA-treated antigen and 0.05M tris buffer(pH 7.2), respectively.
4. By the tests for 200 swine sera, it was found that the frequency of positive reaction were 203 in TAT, 240 in PAT and 163 in ID.
5. When compared the titers of TAT with those of MAT for 200 swine sera, MAT showed the

higher titer than TAT being increased by relative correlation. Int was found that the titer for positive readings were 20 in TAT and 40 in MAT.

6. when compared the results of ID with those of TAT for 200 swine sera, all sera with TAT titer under 10 were negative in ID. Of the sera with TAT titer 20 and 40, 55.1% and 91.8% were positive in ID, respectively. All sera with TAT titer above 80 were positive in ID. In comparison of ID and MAT, all sera with MAT titer under 20 were negative in ID. Of the sera with MAT titer 40 and 80, 24.7% and 93.9% were positive in ID, respectively. All sera with MAT titer over 160 showed positive in ID.

7. In conclusion, the established MAT showed high sensitivity but low specificity, whereas ID revealed low sensitivity but high specificity.

Key words : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, tube agglutination test, micro-agglutination test, agar-gel immunodiffusion test

서 론

*Actinobacillus pleuropneumoniae*는 그람음성의 다양형 태성 단간균으로 배지에 증식시 혈액에 포함되어 있는 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD 또는 V factor)를 요구하며, 돼지에 감염하여 발열, 호흡곤란, 원기소실, 폐출혈 및 섬유소성 흉막폐렴을 주증으로 하는 급성 및 만성호흡기 질환을 일으킨다.^{1, 2)} 본 병은 밀집 사육, 환기불량, 기후급변, 갑작스런 환경변화 등 스트레스가 가해져 저항력이 저하되었을 때 발병하여 폐사를 비롯하여 성장지연과 사료효율의 저하를 야기하며 양돈업에 많은 경제적 손실을 초래한다.^{2, 3, 4)}

돼지흉막폐렴을 일으키는 병원체는 Pattison 등⁵⁾, Matthews와 Pattison⁶⁾, 그리고 Olander⁷⁾ 등에 의해 처음 관찰되어 원인체가 *Haemophilus-like organism* 또는 *Haemophilus parahaemolyticus*로 각각 보고된 바 있었으며, Shope 등³⁾은 돼지흉막폐렴으로부터 분리한 균을 *H. parahaemolyticus*로 보고한 바 있으나, Nicolet 등³⁾은 분리균의 배양특성 및 생화학적 성상을 기초로 하여 이들의 원인이체가 동일한 것이라 보고하였다.

또한 Kilian 등⁹⁾은 돼지에서 분리한 균주들이 Pittman¹⁰⁾이 환자로부터 분리하여 *H. parahaemolyticus*로 명명하기를 제안하여 최근까지 사용되어져 왔다. 그

리나 Pohl등¹¹⁾은 *H. parahaemolyticus*의 DNA구조 및 phenotype에 대한 연구결과 이 균은 Genus *Actinobacillus pleuropneumoniae*로 명명할 것을 주장하였으며, The Congress of 11th International Pig Veterinary Society에서 돼지흉막폐렴의 원인균을 *A. pleuropneumoniae*로 통일하도록 명시한 바 있다.

*A. pleuropneumoniae*의 혈청형은 Nicolet¹²⁾와 Gunnarsson 등¹³⁾에 의해 혈청형 1부터 5형이 보고된 이래 현재 12종 이상의 혈청형이 분류 보고되었다.^{14, 15, 16, 17)} 돼지흉막폐렴은 전세계적으로 널리 분포되어 있고^{8, 18, 19, 20, 21, 22, 23)} 우리나라에서는 1979년 본 병이 처음 보고된 이후 현재까지 지속적으로 발병되어 양돈산업에 많은 경제적인 손실을 입히고 있다.^{24, 25, 26, 27)} 마등²⁴⁾과 박등²⁵⁾은 돼지의 폐렴병변으로 부터 *H. parahaemolyticus*를 분리하였음을 보고하였고, 박등²⁶⁾은 도축돈에서 돼지흉막폐렴균을 분리하였고 이들 분리주는 혈청형 2, 3, 4 및 5형이었으며 도축돈의 항체가 조사에서 161두중 86두(53.42%)가 항체 양성돈으로 국내 돈군의 항체 보유율이 높다고 보고 하였다. 또한 예²⁷⁾는 경기도지역에서 발생한 흉막폐렴 이환돈으로부터 *H. pleuropneumoniae*를 분리하고 분리주가 혈청형 2와 5형이었음을 보고하였다. 또한 이등²⁸⁾은 경북지방에서 흉막폐렴의 발생을 보고하였고, 박등²⁹⁾은 흉막폐렴균의 면역원성을

조사하였고, 예 등³⁰⁾은 육성돈의 항체조사에서 142두 중 64두(45.1%)에서 항체가 출현하였으며 혈청형은 5형, 2형, 3형순으로 나타났고 모돈에서는 65두 중 60두(92.3%)가 양성으로 높은 수준이었고 혈청형별로는 5형, 2형, 1형, 4형 및 3형순으로 나타났음을 보고하였다. 그리고 양 등³¹⁾은 흉막 폐렴균과 *H. parasuis*의 시험관 응집시험 결과 40이하에서 교차응집반응이 나타나는 사실을 보고하였다.

Perry 등³²⁾은 *A. pleuropneumoniae*의 혈청은 capsular polysaccharide와 lipopolysaccharide구조의 차이에 따른 것이라고 하였고, Bendixen 등³³⁾ 및 Altman 등³⁴⁾ 그리고 여러학자들^{35, 36, 37, 38)}은 *A. pleuropneumoniae*의 병원성 인자는 capsular polysaccharide와 lipopolysaccharide 및 용혈소이며, 균체내독소와 캡슐물질은 본 균의 체액성 면역반응과 식균작용을 간섭하며, 이들은 높은 특이 항원성을 가졌다는 사실을 보고한 바 있으며, *A. pleuropneumoniae*의 균체는 phenol, EDTA, 열처리 등에 의해 처리되었을 때 혈청형 특이항원인 polysaccharide 및 lipopolysaccharide가 방출된다고 보고된 바 있다.^{35, 38, 39, 40)}

*A. pleuropneumoniae*의 항체검출법으로는 평판응집시험^{41, 42)}, 시험관응집시험^{13, 43)}, 환류침강시험^{41, 44)}, co-agglutination 시험^{41, 44)}, 간접혈구응집시험⁴⁵⁾, 면역확산시험^{35, 46, 47, 48)}, 보체결합시험^{49, 50, 51)}, 간접형광항체시험⁴²⁾, 라텍스응집시험⁵²⁾, 효소연계면역흡수시험^{40, 53, 54, 55)} 등이 보고된 바 있다.

이중 시험관응집시험은 술식이 간단하다는 장점이 있어 혈청검사에 가장 보편적으로 사용되고 있으며, 국내에서 보고된 자료도 주로 이 방법을 이용하여 항체검사를 수행하였다. 그러나 이 방법은 시간이 많이 소요되며 경제적이며 재현성이 떨어지며 비특이반응이 나타나는 단점이 있어 2-mercaptoethanol처리 방법, 보체결합시험의 병용 등 여러가지 보완방법이 보고된 바 있다. 또한 최근에 개발되어 응용되고 있는 효소연계면역흡수시험과 라텍스응집시험 등에서도 혈청형간의 교차반응 문제를 완전히 해결하지 못하고 있는 실정이다. 그러므로 *A. pleuropneumoniae* 감염 동물의 혈중항체를 검출하기 위한 보다 간편하고 특이성이 높고 술식이 단순한 시험

방법을 확립할 필요성이 요망된다.

본 연구에서는 돼지에서 *A. pleuropneumoniae* 항체를 효과적으로 검출하기 위해 시험관응집시험, 평판응집시험, 마이크로응집시험 및 면역확산시험의 기법과 술식을 개선하고 표준화한 다음 이에 대해 비교 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시 표준균주 : 가축위생연구소에서 분양받은 *A. pleuropneumoniae* serotype 1(Shope 4074), serotype 2(S 1421), serotype 4(M 62), serotype 5(K 17) 및 serotype 6(Fem ϕ)을 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)를 5 μ g/ml 농도로 첨가한 tryptic soy agar(TSA) 사면배지에 접종한 후 10% CO₂에 18시간 배양한 다음 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

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

항원제조 : 각 serotype별로 균주를 NAD(5mg/ml)가 첨가된 TSA 평판에 접종하여 10% CO₂ 상태하에서 37°C에서 18시간 배양한 후 멸균생리식염수로 채균하여 12,000rpm에서 20분 원심세척(3회)한 다음 0.3% formalin에 ml당 균체를 100mg되게 부유시켜 냉장고에 보관하면서 토끼집중, 시험관응집시험, 평판응집시험 및 마이크로응집시험을 위한 항원으로 공시하였다.

토끼면역혈청 제조 : 위에서 준비된 항원을 5 μ g/ml 되게 조정한 후 피하와 근육으로 1.5ml씩 동시에 1회 주사하고 5일 간격으로 0.5, 1.0, 2.0ml을 이정액대로 주사하고 최종주사후 7일에 전체혈하여 혈청을 분리한 후 56°C에서 30분간 비등화하여 -20°C에 보관하여 사용하였다.

돼지 가검혈청 : 경기지역 도축장에서 도축돈 200두로부터 혈액을 채취하여 혈청분리후 -20°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

시험관응집시험 : Gunnarsson 등¹³⁾과 Mittal 등⁴³⁾

의 방법에 준하여 사용하였다. 약술하면 항원의 농도는 1mg/ml 농도로 조정하여 수행하였으며, 가검혈청은 배수회석법으로 0.25ml되게 멸균식염수로 희석하고 여기에 항원을 동량으로 혼합한 다음 52℃ 항온수조에서 18시간 반응시킨 후 응집유무를 판정하였다. 시험결과 응집역가 20이상을 양성으로 판정하였다.

평판응집시험 : Mittal등⁴¹⁾과 Rapp등⁴²⁾의 방법에 준하여 사용하였다. 약술하면 항원의 농도는 100mg/ml, 50mg/ml, 10mg/ml, 5mg/ml 및 1mg/ml되게 조정하여 수행하였으며, 각 혈청은 멸균식염수로 배수회석하고 평판에 0.02ml씩 적하후 각 농도의 항원을 동량으로 적하하여 교반용으로 잘 혼합한 후 1분내에 응집유무를 판독하였다.

마이크로 응집시험 : Gunnarsson등¹³⁾과 Mittal등⁴³⁾의 TAT방법을 응용하여 수행하였다. 약술하면 항원의 농도는 10mg/ml, 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1/25mg/ml, 0.625mg/ml 및 0.3125mg/ml되게 농도를 조정하여 수행하였으며, 각 혈청은 마이크로플레이트(U=bottomed 96 well microplate ; 녹십자)에 배수회석법으로 0.05ml되게 희석한 다음 동량의 항원을 가하고 습윤상자에 넣고 시험 목적에 따라 각각 실온에서 18시간, 37℃에서 18시간, 52℃에서 1시간 반응시킨 후 37℃에서 18시간 반응시켰다. 응집을 나타내는 최종혈청 희석배수는 역수를 응집가로 하였으며 응집가 40이상을 양성으로 판정하였다.

면역확산시험용 항원 제조

고압가열항원(AA) : Nicolet 등⁴⁰⁾과 Mittal 등³⁸⁾의 방법에 준하여 제조하였다. 약술하면 5 μ g/ml의 NAD를 첨가한 TSA에 접종하여 10% CO₂하에서 18시간 배양한 균을 멸균식염수로 채균하여 12,000rpm에서 20분간 냉장원심한 후 상층액을 버리고 침전균괴에 멸균증류수를 가하여 10%균부유액← 만든 다음 121℃에서 20분동안 고압가열한 후 12,000rpm에서 20분 냉장원심하고 상층액을 채취하여 4배 희석하여 항원으로 사용하였다.

EDTA처리항원(EA) : Nicolet 등⁴⁰⁾과 Willson 등⁵³⁾의 방법에 준하여 제조하였다. 약술하면 5 μ g/ml의 NAD를 첨가한 TSA에 접종하여 배양한 균을 멸균식염수로 채균하여 12,000rpm에서 20분간 냉장원심한 후 상

층액을 버리고 침전된 균량에 40배의 5mM EDTA (ethylenediamineteraacetic acid)로 부유시켜 37℃에서 4시간 동안 교반한 후에 12,000rpm에서 20분 동안 냉장원심후 0.2 μ m filter 여과기로 여과하여 -70℃에 보관하며 항원으로 사용하였다.

Phenol water-extracted antigen(PA) : Gunnarsson³⁵⁾의 방법에 준하여 제조하였다. 약술하면 공시균주를 5 μ g/ml의 NAD를 첨가한 TSA에 접종하여 18시간 배양한 후 멸균식염수로 집균하였다. 집균후 세균부유액을 12,000rpm에서 20분 냉장원심하고 침전된 세균은 세포용적 20배의 멸균증류수로 부유시킨 후 균액과 동량의 90% phenol을 첨가한 후 자석교반기로 40분 동안 65℃로 가열 혼합하였다. 이 부유액을 12,000rpm에서 20분간 냉장원심한 다음 상층액을 취하여 셀로판튜브에 넣고 4℃에서 18시간 증류수로 투석한 후 항원으로 사용하였다.

면역확산시험(agar-gel immunodiffusion test : ID) : Gunnarsson 등³⁵⁾과 Mittal 등⁴⁶⁾과 전 등⁵⁶⁾의 방법을 응용하여 실시하였다. 약술하면 겔은 0.7% agarose(Sigma)를 사용하였고, 완충요액은 veronal buffer(pH 8.6), phosphate buffered saline(pH 7.2) 및 0.05M tris buffer(pH 7.2)를 사용하여 비교 실험하였다. 아가젤 플레이트는 가열 용해시킨 아가를 87mm × 15mm페트리디쉬에 20ml씩 분주하고 응고시킨 후 겔판처를 이용하여 직경 3mm의 구멍을 6mm간격으로 만들었다. 이 구멍에 마이크로피펫으로 항원과 혈청을 0.02ml씩 주입하고 습윤상자에 넣은 후 실온에서 48시간 반응시켜 침강선의 유무를 관찰하였다.

결과 및 고찰

토끼면역혈청에 대한 교차 시험관응집시험 : 시험관응집시험으로 *A. pleuropneumoniae*의 혈청형에 대한 특이성을 시험하기 위하여 혈청형 1, 2, 3, 4, 5형 및 6형으로 면역된 토끼혈청에 대한교차시험을 실시한 바 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 동종혈청형간의 응집가는 1형은 640, 2형과 3형은 160, 4형은 320, 5형은 80 그리고 6형은 320이었고, 이종혈청형간의 교차반응은 1형과

2형에서는 나타나진 않았으나 3형은 6형과 10, 4형은 3형과 20, 5형은 2형과 10, 그리고 6형은 3 및 5형과 40 및 10으로 각각 나타났다.

Gunnarsson 등¹³⁾ 등 1형, 2형, 3형, 4형 및 5형으로 고도면역된 토끼혈청을 이용한 시험관응집시험에서 동종혈청형간의 응집반응은 640-320배 수준에 응집되었으

Table 1. Cross tube agglutination tests of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to 6 to the rabbit antiserum

Rabbit antiserum	Antigens					
	Serotype 1	Serotype 2	Serotype 3	Serotype 4	Serotype 5	Serotype 6
Serotype 1	640*	<10	<10	<10	<10	<10
Serotype 2	<10	160	<10	<10	10	<10
Serotype 3	<10	<10	160	20	<10	40
Serotype 4	<10	<10	<10	320	<10	<10
Serotype 5	<10	<10	<10	<10	80	10
Serotype 6	<10	<10	10	<10	<10	320
Normal rabbit serum	<10	<10	<10	<10	<10	<10

* The number represents the reciprocal of the highest serum dilution showing agglutination.

며, 혈청형 3은 4형과 교차응집이 나타남을 보고하였다. 또한 예 등²⁹⁾은 동종혈청형간에 400-1600배에서 응집이 일어났으며, 이종혈청형간의 교차반응이 1형은 3 및 5형과, 5형은 2, 4 및 6과 6형은 2, 4 및 5형과 각각 교차반응이 나타남을 보고한 바 있어 본 실험의 결과와 유사하였다. 또한 Mittal 등⁴³⁾은 *A. pleuropneumoniae*을 인공감염시킨 돼지의 혈청에 대한 시험관응집시험을 실시한 결과 교차반응이 여러 혈청형간에 나타나 *A. pleuropneumoniae*의 혈청형을 구별하는데는 많은 문제가 있다고 보고한 바 있으며 혈청형간의 교차반응은 토끼면역혈청보다 돼지면역혈청에서 더 높게 나타난다는 사실이 지적된 바 있다.^{43, 57)} 본 실험에서도 3개 혈청형간에 교차반응이 관찰되어 시험관응집시험에 의한 혈청형의 구별이 비교적 어렵다는 사실이 입증되었다.

항원농도에 따른 평판응집시험 효과 : 평판응집시험에서 항원의 적정농도를 정하고 반응의 특이성을 밝히고자 1, 5, 10, 50 및 100mg/ml 농도의 항원에 대해 토끼면역혈청으로 교차시험을 실시한 결과는 Table 2와 같다. 항원농도 100mg/ml과 50mg/ml에서 1형 항원 및 2형 항원은 5형과, 3형 항원은 4 및 6과, 4형 항원은 3형과 5형 항원은 2 및 6형과 6형 항원은 2, 3 및 5형과 1-4의 교차반응이 있었고, 동종혈청형간의 응집역가는 100mg/ml에서 1-16, 50mg/ml에서 4-32였다. 10mg

/ml의 항원농도에서 2형, 3형, 4형, 5형 및 6형 항원은 이종혈청형과 1-4의 교차반응이 있었고, 동종혈청형간의 응집역가는 4-64였으며, 5mg/ml의 항원농도에서 2형, 3형, 4형, 5형 및 6형 항원은 이종혈청형과 1-2의 교차반응이 관찰되었고, 동종혈청형간의 응집역가는 2-32였다. 5mg/ml이하의 항원농도에서는 항원항체의 결합응집도가 작아 육안적 관찰이 어려웠다. 본 실험 결과 평판응집시험에서 항원의 최적농도는 동종혈청형간의 응집역가가 높고 비교적 교차반응이 적은 10mg/ml인 것으로 판명되었다.

또한 항원농도 50 및 100mg/ml에서 10mg/ml보다 응집역가가 낮은 것은 항원과잉에 의한 postzone현상이라 사료된다. 그리고 각 항원농도에서 교차반응이 심하여 혈청형 1을 제외한 모든 혈청형에서 교차반응이 관찰되어 혈청형의 구분이 불가능한 것으로 나타났다. Mittal 등⁴¹⁾은 토끼면역혈청에 대해 rapid slide agglutination test와 quantitative plate agglutination test를 이용한 바 있으며, Rapp 등⁴²⁾은 돼지혈청 중 *A. pleuropneumoniae*항체를 검출하기 위해 slide agglutination test와 간접형광항체시험을 상호 비교 시험한 2형과 4형 그리고 3형과 6형이 교차반응이 나타났다고 보고한 바 있었다. 이들은 모두 평판응집반응은 신속하고 간편하지만 혈청형간 교차반응이 심하여 특이성이 낮은 단점이 있

Table 2. Cross plate agglutination test to rabbit antiserum of various concentration of antigen

Serotypes of antigen	Serotypes of rabbit antiserum	Antigen concentration(mg / ml)				
		100	50	10	5	1
1	1	4*	16	32	16	<1
	2	<1	<1	<1	<1	<1
	3	<1	<1	<1	<1	<1
	4	<1	<1	<1	<1	<1
	5	1	1	<1	<1	<1
	6	<1	<1	<1	<1	<1
2	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	2	4	4	2	<1
	3	<1	<1	<1	<1	<1
	4	<1	<1	<1	<1	<1
	5	1	2	2	1	<1
	6	<1	<1	<1	<1	<1
3	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1	<1	<1
	3	16	32	64	32	<1
	4	1	2	1	1	<1
	5	<1	<1	<1	<1	<1
	6	1	4	4	2	<1
4	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	1	<1	1	<1
	3	1	1	1	2	<1
	4	8	16	32	16	<1
	5	<1	<1	<1	<1	<1
	6	<1	<1	<1	<1	<1
5	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	1	2	1	1	<1
	3	<1	<1	<1	<1	<1
	4	<1	<1	<1	<1	<1
	5	1	4	8	8	<1
	6	2	2	1	1	<1
6	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	1	1	2	1	<1
	3	1	1	2	2	<1
	4	<1	<1	<1	<1	<1
	5	1	1	2	2	<1
	6	8	16	32	16	<1

* The number represents the reciprocal of the highest serum dilution showing agglutination.

음을 지적한 바 있다. 본 시험에서 얻어진 결과를 보면 평판응집시험은 시험관응집시험보다 교차반응이 비교

Table 3. Cross micro-agglutination test of rabbit hyperimmunine serum of various concentration of antigen

Serotypes of antigen	Serotypes of rabbit antiserum	Antigen concentration(mg / ml)				
		10	5	2.5	1.25	0.625
1	1	160*	320	640	1280	320
	2	20	10	<10	<10	<10
	3	20	10	<10	<10	<10
	4	10	10	<10	<10	<10
	5	20	10	<10	<10	<10
	6	10	10	<10	<10	<10
2	1	20	10	<10	<10	<10
	2	80	160	320	320	80
	3	20	20	10	<10	<10
	4	10	10	<10	<10	<10
	5	20	10	10	<10	<10
	6	20	10	<10	<10	<10
3	1	20	10	<10	<10	<10
	2	20	10	10	<10	<10
	3	80	80	160	320	80
	4	80	40	20	10	10
	5	20	10	<10	<10	<10
	6	20	20	10	10	10
4	1	20	10	<10	<10	<10
	2	20	10	<10	<10	<10
	3	40	40	20	20	10
	4	80	160	320	640	160
	5	20	10	<10	<10	<10
	6	20	10	<10	<10	<10
5	1	20	10	<10	<10	<10
	2	20	40	40	40	40
	3	20	10	<10	<10	<10
	4	20	10	<10	<10	<10
	5	40	80	160	320	80
	6	20	10	10	10	10
6	1	10	10	<10	<10	<10
	2	20	10	<10	<10	<10
	3	160	160	80	80	40
	4	40	10	<10	<10	<10
	5	40	20	20	20	10
	6	160	160	320	640	160

* The number represents the reciprocal of the highest serum dilution showing agglutination.

적 높은 것으로 인정되었다.

항원농도가 마이크로응집시험에 미치는 영향 : 마

이크로응집시험에서 항원의 적정농도를 정하고 반응의 특이성을 구명하고자 10, 5, 2.5, 1.25, 0.635 및 0.3125mg/ml 농도의 항원에 대해 토끼면역혈청으로 교차시험을 실시한 결과는 Table 3과 같다. 항원농도 10mg/ml과 5mg/ml에서는 모든 항원형이 이중혈청형과 10-160의 교차반응이 있었고, 동종혈청형간의 응집역가는 10mg/ml에서 40-160, 5mg/ml에서 80-320이었다. 항원농도 2.5mg/ml에서 2형 항원은 혈청형 3형 및 5형과, 3형 항원은 2형, 4형 및 6형과, 4형 항원은 3형과, 5형 항원은 2형 및 6형과, 그리고 6형 항원은 혈청형 3형 및 5형에서 10-80의 교차반응이 관찰되었고, 동종혈청형간의 응집역가는 160-640이었다. 항원농도 1.25mg/ml과 0.625mg/ml에서 3형 원은 이중혈청형 4형 및 6형과 4형 항원은 3형 혈청과, 5형 항원은 2형 및 6형 혈청과, 그리고 6형 항원은 3형 및 5형 혈청과 10-80의 교차반응이 관찰되었고, 동종혈청형간의 응집역가는 25mg/ml에서 320-1280, 0.635mg/ml에서 80-160이었으며 (Photo1), 0.635mg/ml에서는 항원농도가 낮아 응집반응의 관찰이 어려웠다. 본 시험결과 마이크로응집시험에서 항원의 최적농도는 동종혈청형간의 응집가가 높고, 비교적 교차반응이 적은 1.25mg/ml인 것으로 판명되었다.

항원-항체의 반응온도가 마이크로응집시험에 미치는 영향 : 처리온도가 마이크로응집시험에 미치는 영향을 구명하기 위해 혈청형 4항원과 토끼면역혈청을 이용하여 실온에서 18시간, 37℃에서 18시간, 52℃에서 18시간 반응하며 응집역가를 관찰한 바 Table 4와 같은 결과를 얻었다. 실온에서 18시간 반응시 최고 응집가는 40이었고, 37℃에서 28시간 반응시 최고 응집가는 320으로 나타났으며 52℃에서 1시간 반응시킨 후 37℃에서 18시간 반응시킬 때와 52℃에서 18시간 반응시 최고 응집가는 640으로 나타났다.

토끼 또는 돼지혈청 중의 *A. pleuropneumoniae* 항체 검출을 위한 시험관응집시험의 총 용량은 일반적으로 0.4-0.5ml에서 수행되어져 왔다.^{13, 26, 30, 43)} 그러나 본 시험에서는 시료와 노력을 절약하고 혈청반응을 대량으로 수행할 수 있게 하기 위해 96well U-bottomed microp-plate를 이용하여 항원과 항체를 혼합한 총용량을 0.1ml

체계로 하는 마이크로응집시험을 고안하고자 항원농도와 반응온도에 대해 일련의 시험을 수행하였다. 본 시험결과 시험관응집시험에서 토끼면역혈청 항체가 1형이 640, 2형과 3형이 160, 4형이 320, 5형이 80 및 6형이 320배 인것에 비해 마이크로응집시험의 적정반응조건에서 나타난 동종혈청형간의 항체역가는 시험관응집시험에 비해 2-4배 높게 나타났다. 또한 교차반응 시험결과 (Table 3)를 종합해 보면 마이크로응집시험은 시험관응집시험에 비해 감수성과 교차반응성이 높았고 평판응집시험에 비해 감수성은 높고 교차반응은 낮은 것으로 사료되었다. 시험관응집시험에서 항원-항체의 일반적인 반응온도는 실온에서 18시간 또는 37℃에서 18시간을 적용하고 있다. 그러나 *A. pleuropneumoniae*에서는 반응온도를 Gunnarsson¹³⁾은 52℃에서 18시간, Mittal 등⁴³⁾

은 52℃에서 1시간 반응한 다음 37℃에서 18시간 반응하는 것이 가장 적합하다고 보고한 바 있었다. 본 시험에서 고안하고자 하는 마이크로응집시험에서는 Gunnarsson 등¹³⁾과 Mittal 등⁴³⁾은 52℃에서 1시간 반응한 다음 37℃에서 18시간 반응하는 것이 가장 적합하다고 보고한 바 있었다. 본 시험에서 고안하고자 하는 마이크로응집시험에서는 Gunnarsson¹³⁾과 Mittal 등⁴³⁾의 방법 외에 실온과 37℃에 대한 시험을 병행하여 수행하였던 바 52℃에서 18시간의 반응이 가장 적합함을 알 수 있었다. 본 시험에서 확립된 마이크로응집시험은 특이성은 다소 낮지만 감수성이 높고 술식이 경제적이며 대량으로 항체검출시험이 능하므로 더욱 개량하면 대단위 양돈장의 돈군에 대한 혈청역학적 조사에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

완충용액이 면역확산시험에 미치는 영향 : 아가겔 제조시 사용되는 완충용액이 ID의 감수성에 미치는 영향을 구명하기 위해 veronal buffer (pH 8.6), phosphate buffered saline (pH 7.2) 및 0.05M tris buffer (pH 2)로 아가겔을 만들어 혈청형 2의 AA, EA 및 PA항원과 동종항 혈청을 이용하여 감수성을 비교 시험한 결과는 Table 5에 나타난 바와 같다.

0.05M tris buffer에서는 각 항원이 혈청희석배수 16배까지 침강대를 나타내 감수성이 가장 높았으며, ver-

Table 4. Effects of the temperature on antigen-antibody reaction in micro-agglutination test with *A. pleuropneumoniae* serotype 4

Temperature treatment	Antigen concentration (mg / ml)				
	10	5	2.5	1.25	0.625
I	20*	20	20	40	<10
II	40	80	160	320	40
III	80	80	320	640	80
IV	80	160	320	640	160

* The number represents the reciprocal of the highest serum dilution showing agglutination.
 I : Room temperature for 18 hrs
 II : 37°C for 18 hrs
 III : 52°C for 1 hrs followed 37°C, 18 hrs
 IV : 52°C for 18 hrs

Table 5. Effects of various buffers on agar-gel immunodiffusion test with *A. pleuropneumoniae* serotype 6 antigen and rabbit antiserum

Buffers	Soluble antigens		
	AA	EA	PA
Veronal (pH 8.6)	4*	8	4
PBS (pH 7.2)	8	8	8
0.05M tris (pH 7.2)	8	16	16

* The number represents the reciprocal of the highest serum dilution showing positive reaction.
 AA : autoclaved antigen
 EA : EDTA treated antigen
 PA : phenol water-extracted antigen

onal buffer는 4-8배까지 침강대를 나타내 감수성이 가장 낮았다. *A. pleuropneumoniae*에 대한 항체를 검출하기 위해 Gunnarsson 등^{35, 48)}, Mittal 등^{47, 58, 59)}, Mitui 등⁵²⁾은 면역확산법을 응용한 바 있다. 이 방법들은 주로 *A. pleuropneumoniae*의 항원의 특이성과 혈청형을 구별하기 위한 목적으로 활용되었고 혈청형 구별에 특이성이 높은 것으로 보고된 바 있다. 그러나 본 시험법을 이용하여 돼지 가검혈청에 대해 광범위하게 적용한 바 없

으며 다른 항체 검출법과 비교 시험한 보고는 없다. 이에 본 시험에서는 면역확산시험에 사용되는 항원과 아가젤의 조건 등에 대해 시험하여 반응 적정조건을 구명하고자 일련의 시험을 수행하였다. 면역확산시험에서 완충용액이 항원-항체반응에 영향을 준다는 사실이 여러 학자들^{56, 60)}에 의해 보고된 바 있다. 본 실험결과 아가젤 면역확산시험의 완충용액으로 Mittal 등⁴⁶⁾과 Gunnarsson 등³⁵⁾이 사용한 PBS나 veronal buffer보다 LeJeune 등⁶⁰⁾과 전 등⁵⁶⁾이 바이러스성 질병의검출을 위해 사용한 0.05M tris buffer가 감수성인 높은 것으로 사료되었다.

면역확산시험용 항원의 효능 비교 : ID에서 autoclaved antigen(AA), EDTA treated antigen(EA) 및 phenol water-extract antigen(PA)의 항체검출효능을 비교하기 위해 토끼면역혈청으로 교차시험을 실시한 바 Table 6과 같은 결과를 얻었다. AA는 혈청형 1, 2 및 4형에서는 교차반응이 없었고, 3 및 5혈청형에서 6형 항원과 2의 교차반응이 있었으며, 동종혈청에 대한 항원의 역가는 8-32였다. 또한 PA도 혈청형 1, 2, 3, 4 및 6형에서는 교차반응이 없었으며, 5형 혈청에서 6형 항원과 2의 교차반응이 있었으며, 동종혈청에 대한 항원의 역가는 8-16이었다.(photo2).

이 시험결과 EA 및 PA는 AA에 비해 교차반응이 적었고 항원의 감수성은 EA가 가장 높은 것으로 나타났으며, 실용 항원농도는 4배 희석한 것이 적절하다고 사료되었다. 이러한성적은 Nicolet 등⁴⁰⁾이 ELISA를 이용하여 *A. pleuropneumoniae*의 항체검출을 위해 phenol추출항원, autoclaved항원 등 여러 soluble항원 중 EDTA처리항원이 가장 좋은 결과를 나타낸다는 보고와 일치하였다. 그리고 EDTA처리항원이 가장 좋은 결과를 나타낸다는 보고와 일치하였다. 그리고 EDTA항원을 사용했을 때 교차반응은 5형 및 6형 간에서만 관찰되는 면역확산 시험의 혈청형에 대한 특이성은 시험관응집시험, 평판응집시험, 마이크로응집시험보다 현저히 높았다. 또한 Gunnarsson 등³⁵⁾이 *A. pleuropneumoniae*에 석탄산으로 추출한 항원을 사용하여 각 혈청형별 토끼면역혈청과 면역확산시험을 실시한 결과 혈청형별 특이성분은 2-4종류의 polysaccharide와 lipopolysaccharide

라 하였다. 본 실험에서도 공시한 항원을 동종혈청과 반응시킬 때 때로 2개이상의 침전대가 관찰되어(photo 2), 공시한 항원의 구성성분이 복합적인 것임을 인정할 수 있었다. 또한 Mittal 등⁵⁸⁾은 *A. pleuropneumoniae*형

청형 6을 56°C에서 1시간 동안 처리한 상층액으로 ID를 실시한 결과 혈청형 3 및 5와 교차반응이 나타났다고 보고하였으며, 예 등³⁰⁾은 phenol항원을 사용하여 토끼면역혈청과 시험한 결과 청형 6과 5형에서 교차반응이 일

Table 6. Cross agar-gel immunodiffusion test of various antigen preparations to rabbit antiserum

Antigen preparations	Serotypes of antigen	Serotypes of rabbit antiserum						Normal rabbit serum
		1	2	3	4	5	6	
AA	1	8*	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	8	<1	<1	<1	<1	<1
	3	<1	<1	8	<1	<1	2	<1
	4	<1	<1	<1	16	<1	<1	<1
	5	<1	<1	<1	<1	4	<1	<1
	6	<1	<1	1	<1	1	8	<1
EA	1	32	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	16	<1	<1	<1	<1	<1
	3	<1	<1	8	<1	<1	<1	<1
	4	<1	<1	<1	32	<1	<1	<1
	5	<1	<1	<1	<1	8	<1	<1
	6	<1	<1	<1	<1	2	16	<1
PA	1	16	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	8	<1	<1	<1	<1	<1
	3	<1	<1	8	<1	<1	<1	<1
	4	<1	<1	<1	16	<1	<1	<1
	5	<1	<1	<1	<1	8	<1	<1
	6	<1	<1	<1	<1	2	16	<1

* The number represents the reciprocal of the highest antigen dilution showing positive reaction.

AA : autoclaved antigen

EA : EDTA treated antigen

PA : phenol water-extracted antigen

어난다고 보고한 바 있어 본 실험과 일치하였다.

돼지혈청에 대한 진단효능의 비교 : 경기지역의 도축장에서 도축되는 돼지 200두에 대해 *A. pleuropneumoniae*에 대한 항체를 앞에서 확립된 시험관응집시험(TAT), 마이크로응집시험(MAT) 및 면역확산시험(ID)으로 검출하고 얻어진 결과로 진단효능을 비교한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

시험관응집시험 : TAT로 실시한 결과는 Table 7에서 나타낸 바와같다. 도축돈 200두 중에서 항체양성두수는 124두(62%)로 나타났으며, 이중 혈청형 5가 84두

(42%), 혈청형 2가 59두(29.5%), 혈청형 3이 20두(10%), 혈청형 4가 18두(9%), 혈청형 1과 6이 각각 14두(7%) 및 8두(4%)의 순으로 나타났으며 이중 2형이상의 혈중항체가 양성돈은 53두였다. *A. pleuropneumoniae*의 양성항체가 분포빈도는 1 : 20에서 38.4%(78두), 1 : 40에서 30.0%(61두), 1 : 80에서 1.23%(25두), 1 : 160에서 11.3%(23두), 1 : 320에서 5.4%(11두), 1 : 640에서 1.5%(3두), 1 : 1280에서 1.0%(2두)로 나타났으며 항체가의 분포는 5형에서 가장 높았고 다음은 2형과 3형 순이었다.

국내 도축돈의 *A. pleuropneumoniae*항체양성율을 박

Table 7. Distribution of tube agglutination antibody titers of 200 slaughtered pigs against *A. pleuropneumoniae*

Serotypes of antigen	Titers									No of positive* (%)
	<10	10	20	40	80	160	320	640	180	
1	22	164	10	3	1	—	—	—	—	14 (7)
2	29	112	24	21	5	6	3	—	—	59 (29.5)
3	83	97	12	6	2	—	—	—	—	20 (10)
4	69	113	8	4	5	1	—	—	—	18 (9)
5	46	70	16	27	12	16	8	3	2	84 (42)
6	83	109	8	—	—	—	—	—	—	8 (4)
Distribution frequency (%)	332	665	78 (38.4)	61 (30.0)	25 (12.3)	23 (11.3)	11 (5.4)	3 (1.5)	2 (1.0)	203

* TAT titer over 20 : positive
TAT titer below 20 : negative

Table 8. Distribution of micro-agglutination antibody titers of 200 slaughtered pigs against *A. pleuropneumoniae*

Serotypes of antigen	Titers								No of positive* (%)
	<10	20	40	80	160	320	640	1280	
1	124	56	14	5	1	—	—	—	20 (10)
2	60	74	22	26	8	7	2	1	66 (33)
3	110	64	15	7	4	—	—	—	26 (13)
4	122	56	10	4	6	2	—	—	22 (11)
5	49	57	26	22	12	15	14	5	94 (47)
6	143	45	10	2	—	—	—	—	12 (6)
Distribution frequency (%)	608	352	97 (40.4)	66 (27.5)	31 (12.9)	24 (10)	16 (6.6)	6 (2.5)	240

* MAT titer over 40 : positive
MAT titer below 40 : negative

등²⁶⁾은 53.4%, 예 등²⁷⁾은 45.7% 그리고 양 등³¹⁾은 5%로 보고한 바 있어 본 실험 결과와 다소 차이는 있으나 혈청형별 항체가 분포는 5형과 2형이 가장 많이 나타나 이들의 성적과 유사하였다. 또한 Mittal 등⁴³⁾과 강 등⁵⁷⁾은 *A. pleuropneumoniae*에 대한 항체측정법 연구에서 TAT는 혈청희석배수 10배이하에서 *A. pleuropneumoniae*에 감염되지 않은 돼지에서도 양성반응이 나타나므로 혈청희석 20배이상을 양성으로 판정하였으며, 본 실험에서도 혈청희석배수 20배이상을 양성으로 판정하였다. 또한 혈청형 중 병원성이 가장 높은 혈청형 1의^{43, 61)} 감염율이 7%로 나타나 이에 대한 대책이 요망된다.

마이크로응집시험: MAT로 실시한 결과는 Table 8

과 같다. 도축돈 200두 중 항체양성두수는 139(69.5%)로 나타났으며 이중 혈청형 5가 94두(47%), 혈청형 2가 66두(23%), 혈청형 3이 26두(13%), 혈청형 4가 22두(11%), 혈청형 1이 20두(10%) 그리고 혈청형 5이 12두(6.0%)의 순으로 나타났으며, 이중 2형이상의 항체가 양성돈은 72두였다. *A. pleuropneumoniae*의 MAT항체가 분포빈도는 1:40에서 40/4%(97두), 1:80에서 5%(66두), 1:160에서 12.9%(31두), 1:320에서 10%(24두), 1:640에서 6.6%(16두), 1:1280에서 2.5%(6두)로 나타났다.

본 시험에서 고안된 마이크로응집시험은 Table 10에서 나타낸 바와 같이 시험관응집시험에 비해 감수성이

높고 특이성이 낮기 때문에, 양성판정역가를 40이상으로 하여 판정한 바 항체양성율은 TAT에 비해 240대 203으로 다소 높게 나타났다(Table 7, 8).

면역확산시험: ID법으로 실시한 결과는 Table 9와 같다. 도축돈 200두 중 항체 양성두수는 120두(60%)로 나타났다. 이 중 혈청형 5가 72두(36%), 혈청형 2가 45두(22.5%), 혈청형 4가 16두(8%), 혈청형 3이 15두(7.5%), 혈청형 1이 10두(5%), 혈청형 6이 5두(2.5%)로 나타났다. 이 중 2형이상의 항체양성돈은 29두였다.

*A. pleuropneumoniae*의 면역확산시험 항체가 분포는 1:1에서 36.1%(59두), 1:2에서 26.4%(43두), 1:4에서 17.8%(29두), 1:8에서 11.7%(19두), 1:16에서 6.1%(10두) 및 1:32에서 1.8%(3두)로 나타났으며 혈청형 분포는 5형, 2형, 4형, 3형 및 1형의 순으로 나타났다.(Photo 3) 또한 면역확산시험을 이용하여 TAT와 MAT에서 항체가가 낮아 혈청형 구분이 어려운 돼지혈청을 토끼면역혈청과 동시에 반응시킴으로서 혈청형의 특이성과 동질성을 확인할 수 있으며 *H. parasuis*와 *A. pleuropneumoniae*와 부분적으로 공통항원성을 가지는

Table 9. Distribution of agar-gel immunodiffusion antibody titers of 200 slaughtered pigs against *A. pleuropneumoniae*

Serotypes of antigen	Titers							No of positive* (%)
	-	1*	2	4	8	16	32	
1	190	5**	4	1	-	-	-	10 (5)
2	155	17	11	8	7	2	-	45 (22.5)
3	185	8	6	1	-	-	-	15 (7.5)
4	184	6	6	4	-	-	-	16 (8)
5	128	18	16	15	12	8	3	72 (36)
6	195	5	-	-	-	-	-	5 (2.5)
Distribution frequency(%)	1088	59 (36.1)	43 (26.4)	29 (17.8)	19 (11.7)	10 (6.1)	3 (1.8)	163

* The number represents the reciprocal of the highest serum dilution showin positive reaction.

** Number of sera

Table 10. Distribution of micro-agglutination test(MAT) antibody in accordance with tube agglutination (TAT) antibody titer to *A. pleuropneumoniae*

TAT titer	Frequency	MAT titer							
		<20	20	40	80	160	320	640	1280
<20	997*	608	352	37	-	-	-	-	-
20	78	-	-	58	20	-	-	-	-
40	61	-	-	2	46	13	-	-	-
80	25	-	-	-	-	18	7	-	-
160	23	-	-	-	-	-	17	6	-
320	11	-	-	-	-	-	-	9	2
640	3	-	-	-	-	-	-	1	2
1280	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Total	1200	608	352	97	66	31	24	16	6

* Distribution frequency of 200 porcine sera for 6 serotypes showing the corresponding titers

병원체에기인된 비특이반응을 검출할 수 있을 것으로 사료된다.(Photo 3)

본 시험에서 고안된 ID는 도축돈의 혈청 중 *A. pleuropneumoniae*항체 검출빈도가 163으로 나타나 TAT와 MAT에 비해 감수성이 낮았다. 그러나 본 방법의 특이성이 다른 방법에 비해 현저히 높다는 사실이 토끼면역 혈청에 대한 실험에서 입증되었기 때문에 혈청형 구분 목적으로 이 방법이 적합한 것으로 생각된다.

시험관응집시험과 마이크로응집시험의 비교:MAT

의 항체가와 TAT의 항체가를 비교한 결과는 table 10 와 같다. TAT항체가 20미만인 혈청 997건 중 608건은 MAT항체가 20배이하였고, 352건은 20배, 37건은 40배 이었으며, 또한 TAT항체가 20인 혈청 78건 중 6건은 MAT항체가 20건이었고, 51건은 40배, 21건은 80배이 었으며, 전반적으로 TAT항체가가 증가할수록 MAT항 체가도 증가하였다.

MAT는 TAT보다 술식이 간편하고 경제적이어서 시 험관응집시험에 대신하여 흔히 이용되는 방법이다. 본

Table 11. Relationship between the results of agar-gel immunodiffusion(ID) and tube agglutination(TAT) antibody titers to *A. pleuropneumoniae*

Serotypes of ant:gen for ID test *	TAT titer								No of positive (%)
	≤10	20	40	80	160	320	640	1280	
1	0/186**	6/10	3/3	1/1	—	—	—	—	10/14 (71.4)
2	0/141	12/24	19/21	5/5	6/6	3/3	—	—	45/59 (76.3)
3	0/180	8/12	5/6	2/2	—	—	—	—	15/20 (75)
4	0/182	6/8	4/4	5/5	1/1	—	—	—	16/18 (88.8)
5	0/116	6/16	25/27	12/12	16/16	8/8	3/3	2/2	72/84 (85.7)
6	0/192	5/8	—	—	—	—	—	—	5/8 (62.5)
Distribution frequency(%)	0/997	43/78 (55.1)	56/61 (91.8)	25/25 (100)	23/23 (100)	11/11 (100)	3/3 (100)	2/2 (100)	163/203

* EDTA antigen used

** Number positive ID/Number of positive TAT in homologous antiserum

Table 12. Relationship between the results of agar-gel immunodiffusion(ID) and micro-agglutination(MAT) tests to against *A. pleuropneumoniae* *

Serotypes of antigen for ID test *	MAT titer								No of positive (%)
	≤10	20	40	80	160	320	640	1280	
1	0/124**	0/56	4/14	5/5	1/1	—	—	—	10/20 (50)
2	0/60	0/74	3/22	24/26	8/8	7/7	2/2	1/1	45/66 (68.2)
3	0/110	0/64	5/15	6/7	4/4	—	—	—	15/66 (52.7)
4	0/122	0/56	4/10	4/4	6/6	2/2	—	—	16/22 (72.7)
5	0/49	0/57	5/26	21/22	12/12	15/15	14/14	5/1	72/94 (76.6)
6	0/143	0/45	3/10	2/2	—	—	—	—	5/12 (41.7)
Distribution frequency(%)	0/608 (0.0)	0/352 (0.0)	24/97 (24.7)	62/66 (93.9)	31/31 (100)	24/24 (100)	16/16 (100)	6/6 (100)	163/240

* EDTA antigen used

** No of positive ID/No of sera at the MAT titer in homologous antiserum

연구에서 *A. pleuropneumoniae*에 대한 항체검출은 TAT보다 교차반응이 많이 나타나 혈청형별 특이성은 낮았으나 반응의 감수성이 높고 간편하며 대량시험이 가능하여 비특이반응을 제거하기 위한 항원정제와 술식 개선에 대한 연구가 수행되면 본 병의 진단에 효과적으로 응용될 가능성이 있다고 사료된다.

시험관응집시험과 면역확산시험의 비교: TAT와 ID를 비교한 결과는 Table 11과 같다. TAT항체가 10배 이하에서는 ID에서 전두수가 음성이었으며, TAT항체가 20배에서는 TAT양성 78례 중 43례에서 ID양성이 관찰되어 ID양성율은 55.1%이었으며, 40배에서는 TAT양성 61례 중 56례(91.8%)에서 ID양성이 관찰되었으며, TAT항체가 80배이상의 전례에서 ID양성이 관찰되었다. 두 방법간 항체양성 일치율은 79.9% (163/204)였다. Mitui등⁵²⁾은 *A. pleuropneumoniae*에 대한 항체검출과 혈청형 측정을 목적으로 돼지에 *A. pleuropneumoniae*를 인공감염시킨 후 TAT와 sodium deodecyl sulfate(SDS)로 처리한 항원으로 ID시험을 비교한 결과 TAT역가 14-21배에서 ID양성반응이 나오기 시작하였다고 보고하여 본 실험과 유사한 성적을 나타내었다.

마이크로응집시험과 면역확산시험의 비교: MAT와 ID를 비교한 결과는 Table 12와 같다. MAT항체가 20배이하에서는 ID에서 전례가 음성이었으며, MAT항체가 40배에서는 MAT양성 97례 중 24례(24.7%)에서 ID양성이 나타났으며, 80배에서는 MAT양성 66례 중 62례(93.9%)에서 ID양성이 관찰되었고, 160배이상의 MAT양성 전례에서 ID양성이 관찰되었다. 또한 두 방법간에 항체양성 일치율은 67.9%(163/240)으로서 TAT와 ID를 비교할 때 보다 낮았다. 이는 MAT가 TAT에 비해 감수성이 높고 특이성이 낮는데 기인된 것으로 사료된다.

ID는 가용성항원을 이용하여 아가젤 내에서 항원-항체 반응의 침강대를 발현⁶²⁾시킴으로서 항원 또는 항체를 동정하는 방법으로 특이성이 매우 높고 술식이 간편하다는 장점이 있어 세균성 질병, 클라미디아성 질병 및 바이러스성 질병의 혈청학적 연구 및 진단에 광범위하게 이용되고 있다.^{56, 63, 64, 65, 66, 67, 68)} *A. pleuropneumoniae*

에 대한 ID는 여러학자들에^{35, 47, 51, 52, 58, 59)} 의해 이용되었으며 혈청형별 특이성이 높아^{35, 47)} 이제까지는 주로 분리균주의 혈청형 형별시험에 이용되어 왔으나^{35, 47, 51, 58, 59)} 돼지혈청을 이용한 비교시험은 수행한 바 없었다. 본 실험에서는 돼지혈청을 대상으로 하여 TAT, MAT 및 ID를 비교한 바(Table 11, 12), ID는 *A. pleuropneumoniae* 혈청형간에 교차반응이 흔히 생기고, *H. parasuis*항체와도 교차반응이 인정되는 TAT나 MAT에 비해, 낮은 항체가(20-40)에서 양성율이 떨어지나 40-80이상에서 높은 양성율을 나타내기 때문에 ID은 *A. pleuropneumoniae*에 대한 항체검출에 높은 특이성이 인정되었다. 또한 ID는 토끼면역혈청을 이용하여 혈청형의 동질성을 확인할 수 있기 때문에 *A. pleuropneumoniae*항체검출에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다(Photo 4). 또한 최근에는 *A. pleuropneumoniae* 균체의 lipopolysaccharide와 polysaccharide 및 outer membrane protein을 정제하는 연구가 여러학자들에^{37, 39, 69, 70, 71)} 의해 실시되고 있으며 이러한 균체의 정제항원을 이용한 ID의 감수성에 대한 추가적인 시험이 수행되어야 한다고 사료된다.

결 론

돼지에서 *A. pleuropneumoniae*항체를 효과적으로 검출하기 위해 시험관응집시험, 평판응집시험, 마이크로응집시험 및 면역확산시험의 기법과 술식을 개선하고 표준화한 다음 이에 대해 비교 실험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *A. pleuropneumoniae*표준균주 1-6형으로 면역된 토끼혈청에 대해 TAT, PAT, MAT 및 ID로 교차시험을 실시한 바 TAT에서 동종간 응집역가는 80-640이었고, 3형, 4형, 5형 및 6형에서 교차반응이 관찰되었다. PAT에서 동종간 응집역가는 4-64이었고, 2형, 3형, 4형, 5형 및 6형에서 교차반응이 관찰되었다. MAT동종간의 응집역가는 80-1280이었고 3형, 4형, 5형 및 6형에서 교차반응이 관찰되었다. 그리고 ID에서 동종간의 항원역가가 8-32였고, 5형에서만 교차반응이 관찰되었다.

2. PAT에서 적정항원의 농도는 10mg/ml, 그리고 MAT에서 1.25mg/ml이었으며, MAT에서 적정반응은 52℃에서 18시간이었다.

3. 면역확산시험용 항원농도 EDTA처리항원이 가장 적합하였고, 겔 제조용완충용액은 0.05M tris buffer (pH 7.2)가 적절하였다.

4. 200건의 돼혈청에 대해 *A. pleuropneumoniae* 1-6형의 항원으로 양성항체 발현 빈도를 조사한 바 TAT에서 203건, MAT에서 240건 그리고 ID에서 163건이었다.

5. 돼지혈청에 대해 TAT와 MAT를 비교한 바 TAT에 비해 MAT에서 항체가가 높았으며, TAT역가가 증가할수록 MAT역가도 증가하였고, TAT양성 판정기준 20에 비해 MAT의 양성판정여가는 40으로 하였다.

6. 돼지혈청에 대해 TAT와 ID를 비교한 바 TAT항체가가 10배이하에서는 ID에서 진두수가 음성이었으며, TAT항체가가 20배에서 55.1%, 40배에서 91.8%이었으며, 80배이상에서 100%의양성율을 나타내었다. 또한 MAT와 ID를비교한 바 MAT항체가가 20배이하에서 ID는 전례가 음성이었으며, MAT항체가가 40배에서 24.7%, 80배에서 93.9%이었으며, MAT항체가가 160배 이상에서는 전례가 양성으로 나타났다.

7. 본 시험에서 고안된 MAT는 감수성은 높고 특이성은 낮으며, ID는 감수성은 낮으나 특이성이 높았으며, 혈청형 분석에 이용할 가치가 높다고 사료 되었다.

참고문헌

1. Gillespie JH, Timoney JF. 1984. *Hagan and Bruner's infectious disease of domestic animals*, 7th ed. Corenell Univ Press.
2. Nicolet J. 1986. *Haemophilus* infections. *Disease of swine*, 6th ed. Iowa state Univ press.
3. Nicolet J, Konig H. 1966. Zur *Haemophilus pleuropneumoniae* beim schwein. *Pathol Microbiol.* 29 : 301-306.
4. Little TWA, Harding JDJ. 1980. The interaction of *Haemophilus parahaemolyticus* and *Pasteurella multocida* in the respiratory tract of the pig. *Br Vet J.* 136 : 371-383.
5. Pattison IH, Howell DG, Elloit J. 1957. A *Haemophilus-like organism* isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J comp Pathol.* 67 : 320-329.
6. Matthews PRJ, Pattison IH. 1961. The identification of a *Haemophilus-like organism* associated with pneumoniase and pleurisy in the pig. *J Comp Pathol.* 71 : 44-52.
7. olander HJ. 1963. A septicemic disease of swine and its causative agent *Haemophilus parahaemolyticus*. Ph D diss Univ of California.
8. Shope RE, White DC, Leidy G. 1964. Porcine contagious pleuropneumoniae. II. Studies of the pathogenicity of the etiological agent *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J Exp Med.* 119 : 369-375.
9. Kilian M, Nicolet J, Biberstain EL. 1978. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae*. (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. *int J Syst Bacteriol.* 28 : 20-26.
10. Pittman M. 1953. A classification of the hemolytic bacteria of the genys *Haemophilus*: *Haemophilus haemolyticus* Bergey et al and *Haemophilus parahaemolyticus* nov. spec. *J Bacteriol.* 65 : 750-751.
11. Pohl S, Bertschinger HU, Frederiksen W, mannheim W. 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae*. and the *Pasteurella haemolytica-like organism* causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genys *Actinobacillus* (*Act inobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int J Syst Bacteriol.* 33 : 510-514.
12. Nicolet J. 1971. Sur l'hemophilose du porc. III. Differentiation serologique de *Haemophilus parahaemolyticus*. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd*

- Infectionskr Hyg Abt Orig. 216 : 487-495.
13. Gunnarsson A, Biberstein EL, Hurvell B. 1977. Serologic studies on *Haemophilus parahaemolyticus*(*pleur opneumoniae*): Agglutination reaction. *Am J Vet Res.* 38 : 1111-1114.
 14. Rosendal S, Boyd DA. 1982. *Haemophilus pleropneumoniae*. serotyping. *J clin Microbiol.* 16 : 840-843.
 15. Nielsen R, O'Conner PJ. 1984. Serological characterization of 8 *Haemophilus pleropneumoniae* strains and proposal of a new serotype. Serotype 8. *Acta Vet Scand.* 25 : 96-106.
 16. Nielsen R. 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleropneumoniae*. strains and proposal of a new serotype : serotype 12. *Acta Vet Scand.* 27 : 453-455.
 17. Fery J, Nicolet J. 1990. Hemolysin Patterns of *Actinobacillus pleropneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 28 : 232-236.
 18. Kiupel VH. 1974. Diagnostische und epizootiologische Beobachtungen zum Vorkommen der *Haemophilus pleropneumoniae*. beim Schwein. *Monatsh Veterinaerme.* 30 : 685-687.
 19. Schiefer B, Moffatt RE, Greenfield J, Agar JL, Majka JA. 1974. Porcine *Haemophilus parahaemolyticus* pneumonia in Saskatchewan, I. Natural occurrence and findings. *Can J Comp Med.* 38 : 99-104.
 20. Hsu FS, Weng CN, Chou NY, King JM, han H. 1976. An epizootic of porcine *Haemophilus parahaemolyticus* pneumonia in Taiwan, Annual research report of animal industry research institute. Taiwan Sugar Coperation. 191-197.
 21. Mylrea PJ, Fraser G, Macqueen P, lambourne DA. 1974. Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. *Austral Vet Jour.* 50 : 255-259.
 22. 尾田. 1984. 豚の纖維素性 胸膜炎. 臨床獸醫. 2 : 44-48.
 23. Morgan JH, Phillips JE. 1978. Isolation of *Haemophilus parahaemolyticus* from pigs in Scotland. *Vet Res.* 103 : 139-140.
 24. 마침술, 전운성. 1979. 양돈단지의 증식을 저하에 대한 병인학적연구. 3. 미생물학적 시험. 서울대학교 수의대 논문집. 4(2) : 93.
 25. 박응복, 임창형. 1979. 양돈단지의 증식을 저하에 대한 병인학적연구. 2. 병리학적조사. 서울대 수의대 논문집. 4(2) : 120.
 26. 박정문, 김종엽, 변정옥, 김봉환. 1985. *Haemophilus pleropneumoniae*의 분리, 혈청형 및 항체조사. 농시논문집(축산, 가위), 27(2) : 45-52.
 27. 예재길. 1983. 흉막폐렴에서 분리한 *Haemophilus pleropneumoniae*에 관한 연구. 한국축산과학연구소보. 2 : 1-7.
 28. 이현범, 이근우, 바후열. 1984. 돼지흉막폐렴의 발생. 대한수의학회지. 24 : 99-014.
 29. 박정문, 김종엽, 조성근, 김봉환, 1986. 돼지흉막폐렴 유래 *Haemophilus pleropneumoniae*의 면역원성에 관한 연구. 농사시험연구논문집. 28(2) : 67-76.
 30. 예재길. 1988. 한국에서 돼지 *Haemophilus pleropneumoniae*감염병에 관한 연구. 서울대학교 수의학 박사학위 논문.
 31. 양창근, 김순재, 조성근. 1990. 돼지의 *Haemophilus* 감염증에 관한 조사연구. 한국수의공중보건학회지. 14(1) : 21-33.
 32. Bendixen PH, Shewen PE, Rosendal S. 1981. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumonia* for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. *infect Immun.* 33:673-676.
 34. Altman E, Brisson J, Perry M. 1986. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Haemophilus pleropneumoniae* serotype 1. *Biochem Cell Biol.* 64:707-716.
 35. Gunnarsson A. 1979. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus*(*pleur*

- opneumoniae*): Extraction of type-specific antigens. *Am J Vet Res.* : 40(4):469–472.
36. sebunya TNK, Saunders JR. 1983. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine : a review. *JAVMA.* 182:1331–1337.
 37. Fenwick BW, Osburn BI, Olander HJ. 1986. isolation and biochemical characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res.* 47:1433–1441.
 38. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S, Martineau GP. 1987. Effect of heat treatment on the surface antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Veterinary Record.* 17:62–65.
 39. Schnaitman CA. 1971. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X=100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 108:553–563.
 40. Nicolet J, Paroz P, Krawinkler M, Baumgartner A. 1981. An enzymelinked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res.* 42(12):2139–2142.
 41. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation test for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 15(6):1019–1023.
 42. Rapp VJ, Ross RF, Zimmermann Erickson B. 1985. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am J Vet Res.* 46(1) : 185–192.
 43. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1984. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pig. *Am J Vet Res.* 45:715–719.
 44. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J Clin Microbiol.* 18(6):1351–1354.
 45. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1983. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J Clin Microbiol.* 17(5):787–790.
 46. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1988. Quantitation of serotype-specific and cross-reaction group-specific antigens by coagglutination and immunodiffusion tests of differentiating *Actinobacillus(Haemophilus) pleuropneumoniae* strains belonging to cross-reacting serotypes 3, 6, and 8. *J Clin Microbiol.* 17:787–790.
 48. Gunnarsson A, Hurvell B, Biberstein EL. 1987. Serologic studies of porcine strains of *Haemophilus paraahaemolyticus(pleuropneumoniae)* : Antigenic specificity and relationship between serotypes. *Am J Vet Res.* 39:1286–1292.
 49. Lombin LH, Rosendal S, Mitchell WR. 1982. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can J Comp Med.* 46:109–114.
 50. Gunnarsson A. 1979. Evaluation of different antigens in the complement fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae(paraahaemolyticus)* infections in swine. *Am J Vet Res.* 40:1564–1567.
 51. Gunnarsson A, hurvell B. 1980. Studies of the complement fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in swine. *Proc IPVS.* 228.
 52. Mitui T, Onaga H, Nagasawa Y, Kuramasu S. 1981. Studies on *Haemophilus* infection in swine. I. Application of the latex agglutination test to the diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae(H.*

- parahaemolyticus*) infection. *Vet Microbiol.* 6:339-349.
53. Willson PJ, Schipper C, Morgan ED. 1988. The use of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *can Vet J.* 29:583-585.
 54. Willson PJ, Falk G, Klashinsky S. 1987. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Can Vet J.* 28(3):111-116.
 55. Nielsen R, Plambeck T, Foged NT. 1991. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *J Clin Microbiol.* 29(4):794-797.
 56. 전부형, 정운익, 박봉균, 안수환. 1983. 소 백혈병 (Bovine Leukosis)에 관한 연구 : IV. 면역확산법과 보체결합반응법에 의한 항체검출 효과 비교. *한국수의공중보건학회지.* 7(2):121-127.
 57. Kang BK, Yamamoto K, Ogata M. 1983. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus pleuropneumoniae(parahaemolyticus)* : Antigenic specificity and prevalence of antibodies to serotypes. *Korean J Vet Res.* 23(2):153-158.
 58. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1988. Serological studies of *Actinobacillus(Haemophilus) pleuropneumoniae* strains of serotype 6 and their antigenic relationship with other serotypes. *Veterinary Record.* 27:199-203.
 59. Mittal KR, Bourdon S. 1991. Cross-reactivity and antigenic heterogeneity among *A. pleuropneumoniae* strains of serotype 4 and 7. *J Clin Microbiol.* 29(7):1344-1347.
 60. LeJeune JM, Hart LT, Larson AD, Segar CL. 1977. Microimmunodiffusion test for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine serum. *AM J Vet Res.* 38(4):459-463.
 61. Rosendal S, Boyd DA, Gilbride KA. 1985. comparative virulence of porcine *haemophilus bacteria.* *Can J Comp Med.* 49 : 68-74.
 62. Tizard IR. 1988. *Immunology, an introduction*, 2nd ed. Saunders College Publishing.
 63. Buxton A, Fraser G. 1977. *Animal microbiology.* Blackwell Scientific Publications LTD UK.
 64. Gaskin JM, Neal FC, Rubin HL. 1977. Equine antibody to bovine serum induced by several equine vaccines as a source of extraneous precipitin lines in the agar gel immunodiffusion test for equine infectious anemia. *Am J Vet Res.* 38(3):373-377.
 65. Cutlip RC, Jackson TA, Laird GA. 1977. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am J Vet Res.* 38(7):1081-1084.
 66. Jochim MM, Chow TL. 1969. Immunodiffusion of bluetongue virus. *Am J Vet Res.* 30(1):33-41.
 67. Luis A, Estela BA. 1967. Application of the agar gel technique in the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Am J Vet Res.* 28(127):1903-1904.
 68. Miller JM, VanderMnaaten MJ. 1977. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ J Cancer.* 13:1369-1375.
 69. Rapp VJ, Ross RF. 1986. Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. *Infect Immun.* 54:751-760.
 70. Denner HG, Potter AA. 1988. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus(Haemophilus) pleuropneumoniae.* *Infect Immun.* 57:798-802.
 71. MacInnes J, Rosendal S. 1984. Analysis of major antigens of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* and related organisms. *Infect Immun.* 55:1626-1634.

Legends for photos

- Photo. 1.** The features of micro-agglutination test for detection of *A. pleuropneumoniae* antibody.
I ; serotype 4 antigen used, II ; serotype 6 antigen used. ①, ②, ③, ④, ⑤ and ⑥ stand for rabbit antiserum types 1, 2, 3, 4, 5 and 6 and ⑦, normal rabbit serum.
- Photo. 2.** The reactions of agar-gel immunodiffusion test for measurement of potency various antigens.
Central wells of I, II and III were filled with type 1 rabbit antiserum, and that of IV, type 6 rabbit antiserum. The peripheral well of I was filled with type 1 phenol water extracted antigen, that of II type 1 phenol water extracted antigen, that of III, type 1 autoclaved antigen, and that of IV, type EDTA antigen.
All antigens were diluted two-fold dilution from 1 : 2 and started filling in number 1 well.
The titers of antigens were I : 1/32, II : 1/16, III : 1/8, and IV : 1/16.
- Photo. 3.** The reactions of agar-gel immunodiffusion test for detection of the antibody to *A. pleuropneumoniae* in swine sera.
Central wells were filled with test swine serum, and the peripheral wells, EDTA antigen type 1 to 6.
The results indicate that I is type 3; II, type 2; III, type 2 and 5; IV, type 5 and type 6.
- Photo. 4.** Serotype identity test for the swine sera typed by MAT using agar-gel immunodiffusion test by applying rabbit antisera.
I. ① was filled with EA of serotype 2: ①, pig sera of serotype 2: ②, rabbit immune sera of serotype 2: ③, ④, ⑤ and ⑥, empty well.
II. ① was filled with EA of serotype 4: ① and ③, rabbit immune sera of serotype 4: ②, pig sera of serotype 4: ④ and ⑤ and ⑥, empty well.
III. ① was filled with EA of serotype 3: ①, rabbit immune sera of serotype 3: ②, pig sera of serotype 3: ③, ④, ⑤ and ⑥, empty well.
IV. ① was filled with EA of serotype 6: ②, rabbit immune sera of serotype 6: ③, pig sera of serotype 6: ④, ⑤ and ⑥, empty well.
I and II show the complete identity, III, partial identity and IV, complete nonidentity.

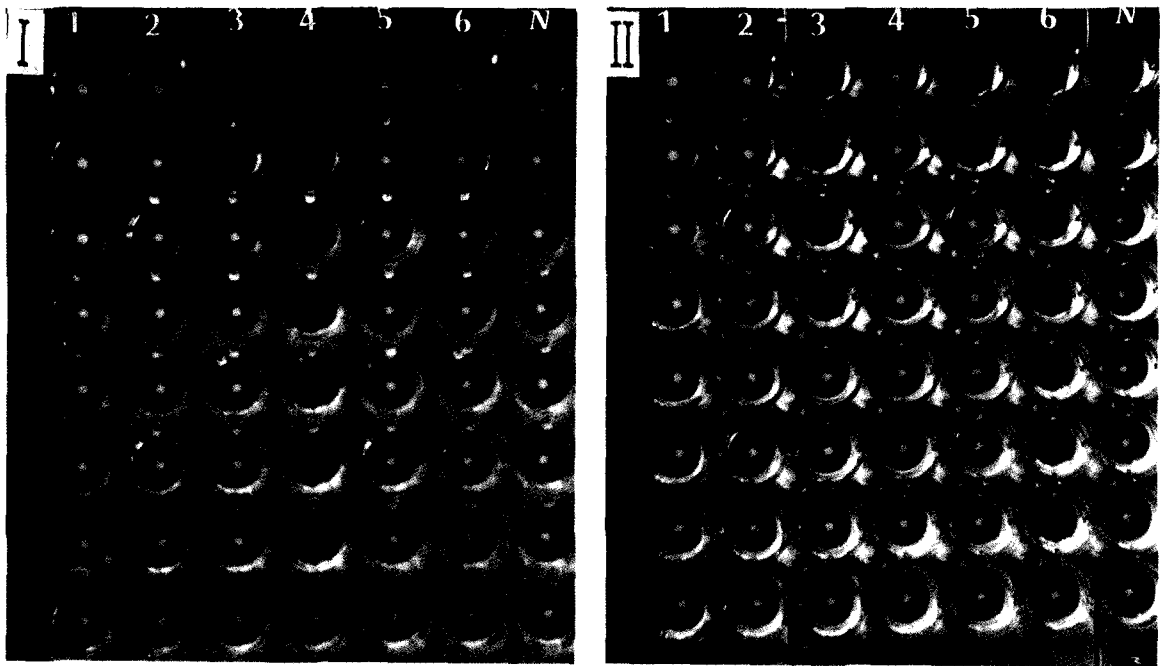


Photo 1.

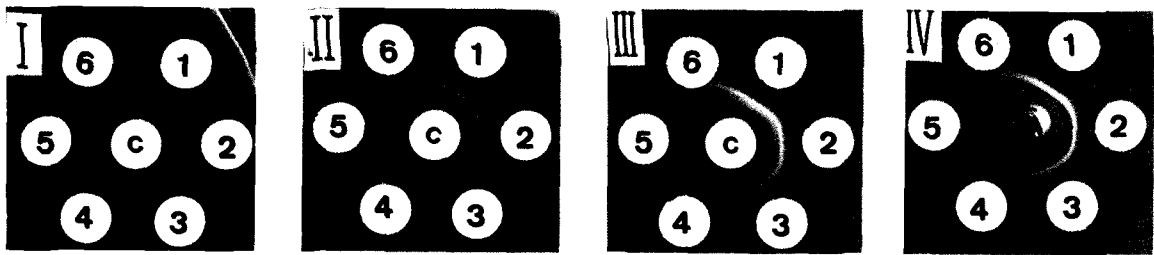


Photo 2.

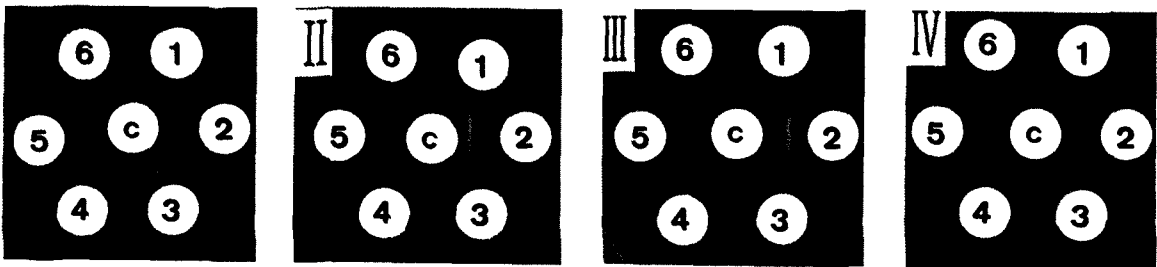


Photo 3.

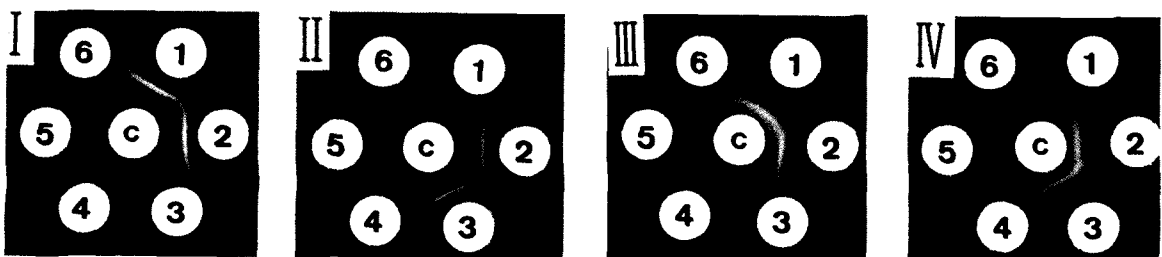


Photo 4.