

Coagglutination 반응법에 의한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청형 조사

예 재 길¹
바이엘동물의약연구소

Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Coagglutination Test

Jae-gil Yeh¹

¹Bayer Veterinary Medical Research Institute, Seoul, 157-200

ABSTRACT : For the inspection of the occurrence situation of porcine pleuropneumonia and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from lung lesions of pig in Korea, a series of experimentation have been carried out by the isolation and identification of *A. pleuropneumoniae*, serotyping by coagglutination test, observation of lung lesion and clinical signs from 360 cases of porcine pneumonia in Clinical Pathology Laboratory, Bayer Veterinary Medical Research Institute. The results could be summarized as follows. The reaction of coagglutination between the reference antigens and the specific reagents of *A. pleuropneumoniae* was strongly agglutinated within 30 seconds without cross reaction. The 89 strains of *A. pleuropneumoniae* were isolated from 360 cases of porcine pleuropneumonia and the biochemical properties of the isolates were same as the reference strains. The 89 isolated strains could be serotyped 39 strains as serotype 5, 34 strains as serotype 2, 8 strains as serotype 3, 2 strains as serotype 7 by coagglutination test, respectively. The clinical signs of pleuropneumonia were weakness, fever, anorexia, dyspnea and laboured breath in the later stages. The gross lesions of lung were haemorrhages, enlargement of interlobular septa, nodular formation and adhesion of the pleura.

Key words : porcine pleuropneumonia, *A. pleuropneumoniae*, serotype

서 론

돼지에서 *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* 감염병은 발열, 호흡곤란, 원기소실, 개구복식 호흡, 폐출혈 및 섬유소성 흉막폐렴 등을 특징으로 하는 호흡기 질병으로서 돼지의 흉막폐렴으로 부르고 있다.^{2,14,20,23,28}

돼지의 흉막폐렴은 밀집사육, 환기불량, 장거리 수송, 기후의 급변, 갑작스런 환경변화 등 스트레스가 가해졌을 때 생체의 저항력 저하로 *A. pleuropneumoniae*에 감염되어 발병하게 된다.

여러 연구자들에 의하여 돼지의 흉막폐렴 병소에서

본 연구는 농림부에서 1994년~1995년 시행한 농림특정 연구사업의 연구결과중 일부입니다.

*A. pleuropneumoniae*가 분리되어 발생이 보고된 바 있다. 즉 Shope²³는 아르헨티나 지방에서 돼지의 흉막폐렴 병소로부터 *A. pleuropneumoniae*를 분리하여 1964년 최초로 보고하였다. 그 후 Nielson¹⁵은 1970년 덴마크에서, Little⁸은 영국에서, Mylrea 등¹⁴은 오스트레일리아에서, Kiupel⁷은 독일에서, Morgan과 Phillips¹²는 스코틀랜드에서, Sanford와 Josephson¹⁸은 캐나다에서, 예와 서²⁷는 우리나라에서 각각 돼지 흉막폐렴의 발병을 보고하였다.

이러한 돼지 흉막폐렴은 집단 사육 양돈장에서는 이환율이 높고 폐사율도 높아 경제적 피해가 큰 질병이므로 많은 연구자들에 의해 효과적인 치료약제 및 예방접종약의 개발 등의 방제대책으로 피해를 줄이고 있다.

돼지 흉막폐렴은 임상증상의 관찰, 육안적 병변 및 병리 조직학적 소견 관찰¹⁹ 그리고 원인세균인 *A. pleu-*

¹Corresponding author.

*ropneumoniae*의 분리 및 동정으로 진단하고 있다. 그러나 최종 진단은 *A pleuropneumoniae*를 분리하여 생화학적, 혈청학적 검사로써 확진할 수 있다.

Mittal 등¹⁰은 *Staphylococcus aureus* Cowan I (NCTC 8530) 균주를 이용한 coagglutination 반응법을 활용하여 돼지 흉막폐렴 병소에서 분리한 세균을 검사한 결과 빠르고 정확하게 *A pleuropneumoniae*로 동정하였으며, 혈청형 구분도 가능함을 발표한 바 있다. 그 후 Mittal 등^{9,11}, Mueller 등¹³, 예와 서²⁸가 분리균주의 혈청형 검사방법으로 coagglutination 반응을 활용하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 돼지 흉막폐렴의 진단에 관한 연구로써 coagglutination 반응법을 확립하여 국내에서 분리한 *A pleuropneumoniae*의 확인 및 혈청형을 조사하였다.

재료 및 방법

공시 표준균주

본 연구에 공시한 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 균주의 혈청형별 균주명은 *A 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: Fem ϕ , serotype 7: WP 83 등이었다^{6,16}.

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

이러한 *A pleuropneumoniae* 균주를 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 5 μ g/ml 첨가한 TSA 사면배지에서 증식하여 -70°C 보관하면서 실험에 사용하였다.

표준균주에 대한 면역혈청의 제조

항혈청 제조용 면역원은 Rapp 등¹⁷의 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 3회 원심세척하고 0.3% 포르말린 함유 생리식염수로 부유하여 5°C 냉암소에 보관하면서 항혈청 제조용 면역원으로 사용하였다^{11,17}.

이 면역원의 세균수는 1×10^{10} cfu/ml 되게 조정하였

다²¹. 토끼면역혈청의 제조는 Gunnarson 등⁵의 방법에 준하였다.

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

접종은 처음에 피하주사, 2회부터 8회까지는 정맥으로 주사하였으며, 접종량은 1회부터 8회까지 각각 0.5 ml, 0.5 ml, 1 ml, 1 ml, 2 ml, 2 ml, 3 ml, 3 ml 씩으로 3일 간격으로 접종하였다. 최종 접종한 후 7일만에 토끼의 심장에서 전 채혈하였다. 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하고 비동화시킨 다음 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

*A pleuropneumoniae*의 분리

양돈장에서 발생하고 있는 돼지 흉막폐렴을 진단하고자 바이엘동물의약연구소 임상병리실에 의뢰된 돼지 가검물의 폐장기에서 *A pleuropneumoniae*를 분리하였다. 즉 폐장병변부를 무균적으로 채취하여 NAD 5 μ g/ml 첨가한 TSA 평판배지, 면양혈액한천배지, TSA 평판배지 등에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 면양혈액한천배지 및 TSA 평판배지에 접종 시에는 *S aureus*를 평판배지 중앙에 일직선으로 그어서 배양하였다¹⁸. 배양 발육한 집락 중 *A pleuropneumoniae*의 집락과 유사한 집락을 취하여 이를 분리하였다.

또한 *A pleuropneumoniae* 감염돈의 임상증상과 *A pleuropneumoniae*가 분리된 가검물의 병리소견도 아울러 관찰하였다.

*A pleuropneumoniae*의 동정

A pleuropneumoniae 분리균의 동정은 Shope²³, Bib-erstein¹, Sebunya 등²²의 방법에 준하였다. 즉 Gram 염색, alkaline methylene blue 염색으로 세균의 형태와 염색성을 조사하였으며 발육시 X factor 및 V factor 요구능, 위성현상, 용혈성, catalase 생성능 및 urease 생성능 등을 조사하여 분리균을 동정하였다.

Coagglutination reagent의 제조

Coagglutination 반응에 필요한 coagglutination reagent는 Christensen 등³, Grasso 등⁴의 방법에 따라 다음과 같이 제조하였다.

Protein A를 다량 생성할 수 있는 *S aureus* Cowan I (NCTC 8530) 주를 TSA 평판배지에서 37°C 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°C의 수조에서 5분간 열처리 하였다.

이러한 *S aureus* 부유액 1 ml을 각각의 혈청형별 토끼면역혈청 0.1 ml와 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°C 냉암소에 보관하면서 coagglutination reagent로 본 실험에 사용하였다.

분리한 *A pleuropneumoniae*의 혈청형 검사

돼지의 폐장기에서 분리한 *A pleuropneumoniae*의 혈청형 검사는 분리균주의 배양 항원 집균액과 각 혈청형별 coagglutination reagent를 이용하여 직접 평판응집반응으로 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°C 냉암소에 보관하면서 혈청형별 실험에 쓰일 항원으로 사용하였다²⁴. 각 혈청형별로 coagglutination reagent를 auto-pipette (Pipetman, Gilson medical electronics, USA)로써 혈청응집판에 0.05 ml씩 적하 후 동량의 혈청형 검사용 분리균주의 항원을 적하하여 교반봉으로 잘 혼합하였다. 판독은 혼합 후 30초에 실시하였으며, 3분 후 최종확인하였다. 분리균주가 autoagglutinating type 일 경우 NAD 첨가 TSA 평판배지에 접종하여 18-24시간 배양 후 생리식염수로 집균하고 집균한 상층액을 혈청반응검사용 항원으로 사용하여 coagglutination reagent와 반응하여 혈청형을 구분하였다.

결과 및 고찰

돼지 흉막폐렴 병소에서 세균 분리

*Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의한 돼지 흉막폐렴의 발생상황을 파악하고자 바이엘동물의약연구소 임상병리실에 의뢰된 돼지 흉막폐렴 가검물 360예로부터 *A pleuropneumoniae* 89주를 분리, 동정하였다.

분리한 *A 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 보였다²⁶.

*A pleuropneumoniae*의 생화학적 특성은 Gram 음성의 다양형태성 단간균으로 V factor 존재하에서만 발육하며 porphyrin 양성, 비운동성, 용혈성, O-nitrophenyl-β-D-galacto-pyranosidase에 양성반응을 보인다. 본 연구에서 일부 균주가 혈액배지에서 용혈성을 보이지 않아 이부분에 관한 여러 가지 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

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.

*A pleuropneumoniae*의 표준항원에 대한 coagglutination 반응 결과

*A pleuropneumoniae*의 smooth colony type과 autoagglutinating type의 혈청형을 구분하고자 coagglutination 반응을 시도하였다.

*A pleuropneumoniae*의 각 혈청형별 coagglutination reagent와 각 혈청형별 표준 항원과의 교차반응 결과 동종 혈청형간의 반응은 30초이내 강한 응집반응을 보여 육안으로 판독하기 용이하였으며, 3분 후 확인 검사에서 혈청형 5와 혈청형 6사이에서 미세한 교차반응이 일어나 공통항원 성분이 일부 인정되었다. 이상의 결과로써 coagglutination반응은 분리균주의 혈청형 검사 방법으로 신속하고 정확한 진단법으로 활용 수 있음을 알았다.

분리한 *A pleuropneumoniae*의 혈청형

분리한 *A pleuropneumoniae* 89주를 coagglutination 반응으로 혈청형을 검사한 성적은 Table 1과 같다. 즉 혈청형 5가 39주로서 가장 많았으며, 혈청형 2가 34주, 혈청형 3이 8주, 혈청형 7이 2주이었다.

*A pleuropneumoniae*감염돈의 증상과 폐병변

A pleuropneumoniae 감염돈의 임상증상은 원기소

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

실, 식욕절폐, 발열(40-41°C), 결막출혈, 호흡곤란 그리고 견좌자세 등의 증상을 보였으며, 폐사직전에는 호흡곤란, 개구복식 호흡 그리고 구강과 비강주위에 포말성, 혈액성 참출물 등이 관찰되었다.

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

결 론

Actinobacillus pleuropneumoniae 감염병인 돼지 흉막폐렴의 발생상황을 파악하고 혈청형을 조사하고자 coagglutination 반응법을 확립하였다. 바이엘동물의약연구소 임상병리실에 의뢰된 360예의 돼지 폐렴 가검물에서 *A. pleuropneumoniae*의 분리, 동정, 혈청형 검사, 임상증상 및 병변의 관찰 결과는 다음과 같다.

1. *A. pleuropneumoniae*의 각 혈청형별 표준항원에 대한 coagglutination 반응 결과 동중혈청형간 30초 이내 강한 응집반응을 보여 육안으로 판독하기에 용이하였다.

2. 분리한 *A. pleuropneumoniae* 89주를 coagglutination 반응법으로 혈청형별 검사를 하였던 바 혈청형 5가 39주, 혈청형 2가 34주, 혈청형 3이 8주, 혈청형 7이 2주이었다.

3. *A. pleuropneumoniae* 감염돈은 원기소실, 식욕절폐, 발열, 호흡곤란 등의 임상증상을 보였으며, 폐사 직전에는 개구복식 호흡을 하였고 구강과 비강 주위에 혈액성 참출물이 관찰되었다. 폐병변은 폐장 출혈, 소엽간 결재직 확장 및 출혈, 폐장에서 결절형성, 폐홍막의 유착, 흉수 저류 등이었다.

감사의 글

본 연구, 조사에 협조하여 준 바이엘동물의약연구소 임상병리실 박경운 차장에게 감사함을 이 글에 담아 두고자 합니다.

참고문헌

1. Biberstein EL, Gunnarsson A and Hurvell B: Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus* spp. from swine. Am J Vet Res 1977; 38: 7-11.
2. Brandreth SR and Smith IM: Prevalence of pig herds affected by pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* in Eastern England. Vet Rec 1985; 117: 143-147.
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. Infect Immun 1973; 7: 881-885.
4. Grasso RJ, West LA, Holbrook NJ, Halkias DG, Paradise LJ and Frideman H: Increased sensitivity of a new coagglutination test for rapid identification of *Haemophilus influenzae* type b. J Clin Microbiol 1981; 13: 1122-1124.
5. Gunnarsson A, Biberstein EL and Hurvell B: Serological studies on porcine strains of *Haemophilus parahemolyticus* (*pleuropneumoniae*): Agglutination reaction. Am J Vet Res 1977; 38: 1111-1114.
6. Kilian M, Nicolet J and Biberstein E L: Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* Shope 1964 and proposal of neotype strain. Int J Syst Bacteriol 1978; 28: 20-26.
7. Kiupel VH: Diagnostische und eqzootiologische Beobachtungen zum Vorkommen der *Haemophilus pleuropneumoniae* beim Schwein. Monatsh Veterinaermed 1974; 30: 685-687.
8. Little TWA: *Haemophilus infection* in pigs. Vet Rec 1970; 87: 399-402
9. Mittal KR, Higgins R and Lariviere S: An evaluation of agglutination and coagglutination techniques for serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates. Am J Vet Res 1988; 48: 219-226.
10. Mittal KR, Higgins R and Lariviere S: Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. J Clin Microbiol 1983; 15: 1351-1354.
11. Mittal KR, Higgins R and Lariviere S: Serological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotype 6 and their antigenic relationship with other serotypes. Vet Rec 1988; 122: 199-203.

12. Morgan JH and Phillips JE: Isolation of *Haemophilus parahaemolyticus* from pigs in Scotland. *Vet Rec* 1978; 103: 139-140.
13. Muller E, Korte G and Petzoldt K: Isolation and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in North western Germany. *Proc IPVS* 1986; 267.
14. Mylrea PJ, Fraser G, Macqueen P and Lambourne DA: Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. *Aust Vet J* 1974; 50: 225-259.
15. Nielsen R: *Haemophilus parahaemolyticus* as the cause of pleuropneumonia in swine. I. Clinical, pathological and epidemiological studies. *Nord Vet Med* 1970; 22: 240-245.
16. Nielsen R: Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet Scand* 1986; 27: 453-455.
17. Rapp VJ, Ross RF and Erickson BZ: Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am J Vet Res* 1985; 46: 185-192.
18. Sanford SE and Josephson GKA: Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* epizootic in Southwestern Ontario: Clinical, microbiological, pathological and some epidemiological findings. *Can J Comp Med* 1981; 45: 2-7.
19. Saunders JR, Osborne AD and Sebuya TK: 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* 1981; 22: 224-247.
20. Sebuya TNK and Saunders JR: *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: A review. *JAVMA* 1983; 182: 1331-1337.
21. Sebuya TNK and Saunders JR: Studies on immunity to *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in mice. *Am J Vet Res* 1982; 43: 1793-1798.
22. Sebuya TNK, Saunders JR and Osborne AD: Characteristics of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates and some epidemiological findings on porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* in Saskatchewan. *Can Vet J* 1982; 23: 224-228.
23. Shope RE: Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J Exp Med* 1964; 119: 357-368.
24. Yamamoto K and Ogata M: The use of agglutination test in the serological diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Proc IPVS* 1980; 218.
25. 예재길: 한국에서 발생한 돼지의 세균성 질병 조사. *한국임상수의학회지* 1994; 11(2): 169-178.
26. 예재길: 한국에서의 돼지 흉막폐렴의 발생상황과 방제 대책. *대한수의학회지* 1992; 32(2, 부록): 21-45.
27. 예재길, 서익수: 섬유소성 흉막폐렴돈의 폐병소로부터 분리한 *Haemophilus parahaemolyticus*에 관한 연구. *서울대학교 수의대 논문집* 1981; 6: 41-57.
28. 예재길, 서익수: 한국에서 돼지 *Haemophilus pleuropneumoniae* 감염병에 관한 연구. *서울대학교 수의대 논문집* 1989; 14: 129-177.