

## 효소면역흡착법을 이용한 대구지역의 돼지폐렴에 대한 항체분포조사 연구

조유정<sup>1</sup>, 서동균, 송동준, 이춘식, 배영찬

대구광역시보건환경연구원  
(접수 2002. 5. 16, 게재승인 2002. 6. 14)

## Survey on the antibody distributions of swine pneumonia by ELISA in Daegu province

Yoo-Joung Cho<sup>1</sup>, Dong-Kyun Suh, Dong-Jun Song,  
Chun-Sik Lee, Young-Chan Bae

Daegu Metropolitan Health & Environment Research Institute, Daegu, 706-090, Korea  
(Received 16 May 2002, accepted in revised form 14 June 2002)

### Abstract

The study was performed to investigate the antibody distributions of 4 swine respiratory disease including *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae* serotype 2 and 5 in Daegu area by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA).

1. The overall sero-positive rates were 55.6% in June, 48.0% in August, 51.3% in October and 25.4% in November.

2. The positive reaction rates to *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae* serotype 2 and 5 were found to be 50.0%, 36.5%, 55.0%, and 42.0% respectively.

3. The antibody titers were distributed on range 20~80 in *M hyopneumoniae*, 20~80 in *P multocida*, 160~640, 20~80 in *A pleuropneumoniae* serotype 2 and 5.

Key words : ELISA, *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae*

### 서 론

양돈산업의 구조가 집약적 다두 사육 및 단

지화로 전환되면서 발생하는 여러 질병 중 호흡기 질병이나 공기전파 전염병은 양돈산업에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있으므로 현대 양

<sup>1</sup>Corresponding author

Phone : 053-760-1301, Fax : 053-760-1333

E-mail : cho9221@hanmail.net

돈 환경에서 중대한 질병으로 간주되고 있다<sup>1-3)</sup>.

돼지호흡기 질병을 일으키는 병인체는 세균, 바이러스 및 기생충 등으로 크게 나눌 수 있고 과밀사육, 환기불량, 온도, 습도 등의 환경요인도 복잡하게 관여하여 호흡기질병을 유발시킨다<sup>3-8)</sup>.

집약적 사육이 보편화된 현대 양돈형태에서는 *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus* spp, *Bordetella bronchiseptica* 등과 *Streptococcus suis*, *Salmonella choleraesuis* 등의 세균에 의한 호흡기 질병이 크게 만연되고 있을 뿐 아니라 swine influenza virus, porcine reproductive & respiratory syndrome(PRRS) virus 등에 의한 바이러스성 호흡기 질병도 점점 증가하고 있는 추세이다<sup>4)</sup>.

돼지의 호흡기 질병으로는 특히 유행성 폐렴, 위축성비염, 흉막폐렴이 많이 발생한다.

*M hyopneumoniae*은 국내외적으로 가장 문제가 되고 있는데 *M hyopneumoniae*는 1차 침입균으로 직접 병소를 형성하여 발병하게 되는데, 대부분은 임상적으로 경미한 정도를 보이거나 이차적으로 혼합 감염되었을 때 증상이 악화되고 특별한 외부 증상 없이 만성으로 경과하는 경우도 많다<sup>9)</sup>.

*P multocida*는 건강한 돼지의 구강과 인후두에 존재하고 있으나 환기불량, 수송, 밀집사육 등으로 항병력이 약화되었을 때 주로 이차 감염으로 폭발적으로 증식하여 발생하고, 돼지에서 *M hyopneumoniae*와 HCV 또는 ADV의 감염은 이차적으로 *P multocida* 폐렴을 초래한다<sup>10)</sup>.

*A pleuropneumoniae*은 농장에서 처음 발생할 경우 심급성으로 경과를 취하여 폐사율이 가장 높고, *A pleuropneumoniae*의 감염뿐 아니라 여러 환경변화에 따른 스트레스가 원인이 되어 더욱 많이 발생한다<sup>11)</sup>. 국내에서도 1970년 이후 발생이 확인되었고 호흡기 친화성이 강한 일차 병원체로 주로 밀사에 의한 직접접촉에 의해 전파되고, 모든 연령에 감수성이 있으나 최초 발생 농장에서 후보돈과 비육말기돈에서 폭발적으로 발생하고 난 후 산발적으로 발생하면서 위축돈이 된다. *A pleuropneumoniae*

혈청형은 12가지가 있는데 국내에서는 2형과 5형이 가장 많은 문제를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>12,13)</sup>. *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae*는 호흡기 원인 세균과 혼합감염시 증상이 악화되어 큰 피해를 초래하나<sup>14-16)</sup>, 심하게 악화되지 않는 한 불현성 감염 또는 만성으로 내과하는 경우가 많으므로 양돈농가에서 심각성을 제대로 알기란 쉽지 않다.

따라서 본 연구에서는 이들 질병의 효과적인 방제를 위하여 혈청학적 방법으로 *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae*에 대한 항체수준을 검사하여 대구관내 양돈장의 호흡기 질병에 대한 사양관리 지도와 질병 예방의 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 검사혈청

본 연구는 2001년 1월부터 12월까지 대구관내에서 사육중인 돼지 중 200두의 혈액을 검사 재료로 사용하였다. 혈액은 원심분리 후 혈청을 분리하여 56℃에서 30분간 비동화하여 실험에 공하였다.

### 항원 및 대조혈청

OMP 항원 : 국립수의과학검역원에서 분양받은 균체외막 단백질을 사용하였다. 이 항원은 균체를 sonicator로 처리하여 추출한 균체의 외막단백질을 N-laurylsarcosinate로 처리하여 얻어진 항원을 Sephadex G-200 gel을 이용한 column chromatography에 의해 추출한 정제 항원으로 -20℃에서 보관하면서 ELISA test 항원으로 사용하였다.

양성대조혈청 : *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae* serotype 2와 5가 혼합감염된 양성혈청을 국립수의과학검역원으로부터 분양 받아 사용하였다.

음성대조혈청 : 국립수의과학검역원으로부터 분양 받은 SPF 돼지혈청을 음성 혈청으로 사용하였다.

## Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

항원을 coating buffer( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93g, DW 1 l, pH 9.6 ± 0.1)에 적정 배수 희석한 다음 ELISA plate 각 well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 4°C에서 overnight시켰다. 다음 날 항원액을 제거한 후 washing buffer(pH 7.2 phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20) 200  $\mu\text{l}$ 로 3회 세척하고, blocking buffer(2% bovine serum albumin in PBS) 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 37°C에서 1시간 배양하였다.

첫 well에 PBS 180  $\mu\text{l}$ 에 가검혈청 20  $\mu\text{l}$ 를 혼합하고 나머지 well에 PBS 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주 후 첫 well의 혼합액을 100  $\mu\text{l}$ 를 2배수 계단 희석한 가검혈청을 항원이 흡착된 ELISA plate에 옮긴 다음 37°C에서 2시간 배양하였다. Washing buffer 200  $\mu\text{l}$ 로 3회 세척하고 anti-pig IgG peroxidase conjugate를 PBS에 3,000배 희석하여 각 well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. Washing buffer로 세척 후 substrate(*o*-phenylenediamine, 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.1M  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )를 각 well당 100  $\mu\text{l}$ 분주한 다음 10분간 실온에서 반응시키고, stop solution(3M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )을 각 well당 50  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 가검혈청/음성혈청이  $\geq 2$ 인 혈청검사배수의 역수를 유의성 있는 항체가로 판정하였다.

## 결 과

### 균별 및 월별 항체양성 빈도

*M. hyopneumoniae*, *P. multocida* 및 *A. pleuropneumoniae*에 대하여 항목별 200건, 총 800건 검사를 실시한 결과 항체양성(률)은 6월에는 160건 중 89 (55.6%)건, 8월에는 200건 검사에 96(48.0%)건, 10월에는 232건 검사에 115 (51.3%)건, 11월에는 208건 검사에 53(25.4%)건이 양성으로 나타나 6월이 가장 높았고 11월이 가장 낮게 나타났다. 항목별로는 항체가 160 이상은 6월에 *M. hyopneumoniae*에서 75.0%로 가장 높았고, 8월에는 *M. hyopneumoniae* 및 *A. pleuropneumoniae* 2형이 76.0%, 10월에는 *A. pleuropneumoniae* 2형이 62.0%, 11월에는 *P. multocida* 및 *A. pleuropneumoniae* 2형이 34.6%로 각각 높았다(Table 1).

### 항체가 160 이상인 균의 분포

원인균별 항체가  $\geq 160$  이상의 분포를 보면, *M. hyopneumoniae*는 100 (50.0%)두, *P. multocida*는 73(36.5%)두, *A. pleuropneumoniae* type 2는 110(55.5%)두, *A. pleuropneumoniae* type 5는 84(42.0%)두로 나타나 *P. multocida*가 가장 낮고 *A. pleuropneumoniae* 2형이 가장 높은 것으로 나타났다(Table 2).

Table 1. The overall seropositive reaction rates

	Jun			August			October			November		
	No of serum tested	No of positive	Rates	No of serum tested	No of positive	Rates	No of serum tested	No of positive	Rates	No of serum tested	No of positive	Rates
MP*	40	30	75.0	50	38	76.0	58	22	37.9	52	10	32.6
PM	40	15	37.5	50	8	16.0	58	32	55.1	52	18	34.6
APP(2)	40	29	72.5	50	38	76.0	58	36	62.0	52	7	13.4
APP(5)	40	15	37.5	50	12	16.0	58	25	43.1	52	18	34.6
Total	160	89	55.6	200	96	48.0	232	115	51.3	208	53	25.4

\* MP : *Mycoplasma hyopneumoniae*, PM : *Pasteurella multocida*, APP(2) : *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2, APP(5) : *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5

Table 2. Sero-positive rates against *M hyopneumoniae*, *P multocida*, and *A pleuropneumoniae* serotype 2 and 5

	No of serum tested	Antibody titer $\geq 160$	%
<i>M hyopneumoniae</i>	200	100	50.0
<i>P multocida</i>	200	73	36.5
<i>A pleuropneumoniae</i> type 2	200	110	55.0
<i>A pleuropneumoniae</i> type 5	200	84	42.0

Table 3. Antibody titer against isolates by ELISA

	Antibody titer (%)			
	$\leq 10$	20 - 80	160 - 640	$\geq 1,280$
<i>M hyopneumoniae</i>	4(2.0)	96(48.0)	91(45.4)	9(4.5)
<i>P multocida</i>	17(8.5)	110(55.0)	71(35.5)	2(1.0)
<i>A pleuropneumoniae</i> type 2	4(2.0)	86(43.0)	87(43.5)	23(11.5)
<i>A pleuropneumoniae</i> type 5	23(11.5)	107(53.5)	70(35.0)	0(0.0)

#### ELISA에 의한 항체역가별 분포

*M hyopneumoniae*에 대한 항체가 분포 : ELISA를 이용한 혈청학적 검사에 대한 결과 *M hyopneumoniae*에 대한 항체가 분포는 Table 3에서와 같다. 항체가 10 이하가 2.0%(4두), 20에서 80 사이가 48.0%(96두), 160에서 640 사이가 45.4%(91두), 1,280 이상이 4.5%(9두)로 대부분 항체를 보유하고 있었으며, 20에서 80사이가 48.0%로 가장 높게 나타났다.

*P multocida*에 대한 항체가 분포 : *P multocida*에 대한 항체가 분포는 10 이하가 8.5%(17두), 20에서 80사이가 55.0%(110두), 160에서 640사이가 35.5%(71두), 1,280 이상이 1.0%(2두)로 대부분 항체를 보유하고 있었으며, 20에서 80사이가 55.0%로 가장 높게 나타났다.

*A pleuropneumoniae*에 대한 항체가 분포 : *A pleuropneumoniae* 2형과 5형에 대한 항체가 분포는 10 이하는 2.0%(4두)와 11.5%(23두), 20에서 80 사이는 43.0%(86두)와 53.5%(107두), 160에서 640 사이는 43.5%(87두)와 35.0%(70두), 1,280 이상은 11.5%(23두)와 0%(0두)로 나타났다.

#### 고 찰

본 연구는 대구지역 양돈농가 돼지 200두의 혈청을 대상으로 ELISA를 이용하여 *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae* 2형과 5형의 항체가 분포를 조사하였다.

월별 항체가 조사 결과 양성률은 6월, 10월, 8월, 11월의 순으로 높게 나타났는데, 이는 어 등<sup>17)</sup>은 *M hyopneumoniae*에 대한 계절별 조사 결과 여름, 겨울, 가을, 봄 순으로 나타났고, 이 등<sup>18)</sup>은 가을, 겨울, 봄, 여름 순으로 항체 양성률을 나타내 계절과 항체양성률의 연관성을 나타내지는 않는 것으로 사료된다.

항체가 분포 결과 10이하, 20에서 80사이, 160에서 640사이, 1,280 이상에서 나타난 항체가 분포를 보면 *M hyopneumoniae*가 2.0%, 48.0%, 45.4%, 4.5%, *P multocida*가 8.5%, 55.0%, 35.5%, 1.0%, 그리고 *A pleuropneumoniae* 2형과 5형이 2.0%와 11.5%, 43.0%와 53.5%, 43.5%와 35.0%, 11.5%와 0%의 수치를 나타내었다. *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae* 5형이 20~80사이가 48.0%, 55.0%, 53.5%로 가장 높은 항체가 분포

를 나타냈고, *A pleuropneumoniae* 2형이 160~640에서 43.5%로 가장 높은 항체가 분포를 나타내었으며, *A pleuropneumoniae* 2형의 항체가 분포가 1,280이상에서 *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae* 5형보다 높게 나타남을 알 수 있었다. 항체가 160 이상의 분포결과로 보면 *M hyopneumoniae*가 50.0%, *P multocida*가 36.5%, *A pleuropneumoniae* 2형과 5형이 55.0%, 42.0%로 나타나 *A pleuropneumoniae* 2형이 가장 높았음을 알 수 있었다. *A pleuropneumoniae* 혈청형중 2형과 5형이 많이 발생하고 그 중 2형이 많이 분리된다는 국내 보고와 연관 관계를 나타냈다. *M hyopneumoniae*의 양성률을 비교하여 보면 50.0%로 권 등<sup>19)</sup>의 70.5%, 허 등<sup>20)</sup>의 58.3%, 여 등<sup>17)</sup>의 84.6%보다 낮게 나타났고 박 등<sup>21)</sup>의 43.4% 보다는 높게 나타났다. *A pleuropneumoniae*의 항체가 서 등<sup>22)</sup>은 2형이 42.8% 5형이 23.5%로 보고하였고 박 등<sup>23)</sup>은 53.4%, 예 등<sup>24)</sup>은 45.7%, 양 등<sup>25)</sup>은 5%로 본 실험과는 다소 차이를 보였다. 예와 서<sup>12)</sup>는 응집 반응을 이용하여 조사하였는데, 그 결과 육성돈 142두 중 64두(45.1%)에서 항체가 출현하였으며 모돈에서는 65두 중 60두(92.3%)가 양성으로 높게 관찰되었고 본 연구에서와는 달리 *A pleuropneumoniae* 5형이 *A pleuropneumoniae* 2형보다 높게 나타났고 보고하였다.

본 연구에서 전체적으로 낮은 항체가를 나타낸 것은 대구시에 소규모 양돈농가가 많고 예방약에 의한 항체형성률이 저조하기 때문인 것으로 사료되었고, 대구지역 양돈의 상당수가 항체는 형성되어 있으나 질병을 방어할 정도로 양호한 상태는 아닌 것으로 사료되었다.

본 연구에서 혈청학적 검사 결과 질병별 항체 분포 및 월별 질병별 항체 양성률에 차이를 나타냈으나 혼합백신에 의한 항체형성과 야외 감염에 의한 항체를 효소면역학적검사 방법만으로는 판정하기 어려운 상황이었으므로 양돈장에서의 폐렴 발생 상황과 직접 연관시킬 수는 없지만, 앞으로 양돈장 별로 항체분포를 좀 더 연관성 있게 분석한다면 매우 유용한 자료가 될 것이고, 지속적인 호흡기질병예방 대책

을 수립한다면 양돈산업의 경제적 손실을 최소화하고 생산성을 향상시키는 기초자료가 되리라 사료된다.

## 결 론

돼지 호흡기질병에 대한 효소면역흡착법에 의한 혈청 항체가 검사 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 조사 결과 *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae* 2형과 5형에 대한 평균 양성률은 6월에 55.6%, 8월에 48.0%, 10월에 51.3%, 11월에 25.4%로 나타났다. 검색군주별 높은 항체가는 6월에 *M hyopneumoniae*가 75.0%, 8월에 *M hyopneumoniae* 및 *A pleuropneumoniae* 2형에 대하여 76.0%, 10월에 *A pleuropneumoniae* 2형이 62.0%, 11월에는 *P multocida*와 *A pleuropneumoniae* 2형에서 각각 높게 나타났다.
2. 대구지역 양돈농가에서 사육하는 돼지의 항체가 양성률은 *A pleuropneumoniae* 2형(55.0%), *M hyopneumoniae*(50.0%), *A pleuropneumoniae*(42.0%), *P multocida*(36.5%) 순으로 높게 나타났다.
3. 질병별 항체가 분포결과 *M hyopneumoniae*, *P multocida*, *A pleuropneumoniae* 5형은 20~80 사이에서 48.0%, 55.0%, 53.5%로 높은 항체가 분포를, *A pleuropneumoniae* 2형은 160~640에서 43.5%로 가장 높은 항체가 분포를 나타내었다.

## 참고문헌

1. Donham KJ. 1991. Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine. *Am J Vet Res* 52 : 1723~1730.
2. 오효성, 임창형, 박응복, 1985. 출하돈의 마이코플라즈마 폐렴에 관한 병리조직학적

- 연구. 서울대학교 수의대 논문집 10 : 25~36.
3. 정현규, 한정희, 김재훈, 1996. 돈사의 상대 습도가 돼지 흉막폐렴의 병인에 미치는 영향. 대한수의학회지 36 : 131~142.
  4. Muirhead MR 1979. Respiratory disease of pigs. *Br Vet J* 135 : 497~508.
  5. Wilson MR, Takov R, Friendship RM, et al 1986. Prevalence of respiratory disease an their association with growth rate and space in randomly selected swine herds. *Can J Vet Res* 50 : 209~216.
  6. Curtis SE, Kelley KW, 1983. Environment and health in the hog house. *Proc Univ Ill Pork Ind Conf* : 56.
  7. Straw BE, 1986, A look at the factors that contribute to the development of swine pneumonia. *Vet Med* 8 : 747~756.
  8. Christensen G, Mousing J, 1992, Respiratory system In; Diseases of swine 7ed. *Iowa state Univ Press* : 138~162.
  9. Ross. RF. 1992. Mycoplasmal disease. In : *disease of swine. 7ed.* Edited by Leman AD. Ame's Iowa State Univ Press, Iowa : 537~551.
  10. Rosendal S, Mitchell WR. 1983. Epidemiology of *Haemophilus Pleuropneumoniae* infection in pigs : A survey of Ontario pork producers. *Can J comp Med* 47 : 1~5.
  11. 예재길, 서익수. 1989. 한국에서 돼지 *Haemophilus pleuropneumoniae* 전염병에 관한 연구. 서울대학교 수의대 논문집 14 : 129~176.
  12. 박정문, 김종염, 변정옥 등. 1984. 돼지의 흉막폐렴에 관한 연구 *Haemophilus parahaemolyticus* 분리, 혈청학적 성상 및 항체 조사에 의한 발생상황. 대한수의학회지 24 : 4~10.
  13. Ciprian A, Colmenares C, Lopez-revilla R, et al. 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can J Vet Res* 52 : 434~438
  14. Smith IM, Hodges RT, Betts AO, et al. 1973. Experimental infection of gnotobiotic piglets with *Pasteurella septica* (serotype A) alone or with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Path* 83 : 307~321
  15. Caruso JP, Ross RF. 1990. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus(haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am J Vet Res* 51(20) : 227~231.
  16. 권중현, 조성근, 이종복. 1992. 도살장 및 양돈장의 돼지로부터 *Mycoplasma hyopneumoniae*의 분리 및 혈청학적 조사. 한국마이코플라즈마학회지 3 : 46~53.
  17. 허문, 김순재, 조성근. 1994. Immunoblotting에 의한 *Mycoplasma hyopneumoniae* 항원 분석 및 돼지 마이코플라즈마 폐렴의 특이진단법 개발. 한국마이코플라즈마학회지 5 : 21~39.
  18. 어용준, 육동현, 이재문 등. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae*에 대한 항체가 분포도 조사. 한가위지 22 : 89~94.
  19. Fuentes M, Pijon C. 1986. Phagocytosis and intercellular killing of *Pasteurella multocida* by porcine alveolar macrophages after infection with pseudorabies virus. *Vet Immunol Immunopathol* 13 : 165~172.
  20. 이정아, 김성국, 조옥숙 등 1997. 돼지의 호흡기질병 감염 상황 조사. 한가위지 20(1) : 27~36.
  21. 박창목, 장국현, 한정희. 2000. 도축돈에서 폐렴의 혈청학적 및 병리학적 관찰. 한가위지 23(2) : 113~124.
  22. 서희진, 배성수, 김대원 등. 2000. 효소면역흡착시험을 이용한 경북서부지역의 돼지흉막폐렴에 대한 항체 분포조사. 한가위지

- 23(3)289~299.
23. 박정문, 김종엽, 변정옥, 김봉환. 1985. *Haemophilus*의 분리, 혈청형, 및 항체조사. 농시 논문집(축산.가위) 27(2) : 45~52.
24. 예재길. 1983. 흉막폐렴에서 분리한 *Haemophilus pleuropneumoniae*에 관한 연구. 한국축산과학연구소보 2 : 1~7.
25. Yang CK, Kim SJ, Cho SK. 1990. Studies on *Haemophilus* infection of pigs in Korea. Kor J Vet Publ Hlth 14(1) : 21~33.