

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 흉막폐렴에 미치는 영향
- 혈청학적 및 백혈구아군 분포율에 관한 연구 -

정현규¹⁾, 박용호²⁾, 한정희³⁾

¹⁾도드람 양돈조합, ²⁾서울대학교 수의과대학, ³⁾강원대학교 수의학부대학

(접수 2007. 2. 7 게재승인 2007. 3. 20)

Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on
pigs with pleuropneumonia
- Studies on serology and proportion of porcine
subpopulation of peripheral blood -

Hyun-Kyu Jeong¹⁾, Yong-Ho Park²⁾, Jeong-Hee Han³⁾

¹⁾Dodram Pig Farmer's Co-operative

²⁾Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University

³⁾Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine and Institution of
Veterinary Science, Kangwon National University

(Received 7 February 2007, accepted in revised from 20 March)

Abstracts

The purpose of this study was to evaluate the effect of a subsequent infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus to pigs with *A pleuropneumonia*. Twenty three 7-week-old commercial pigs were infected intratracheally with PRRS virus

Corresponding author

Dr. Jeonghee Han, DVM, PhD

Tel : +82-33-250-8657 Fax : +82-33-256-3722

E-mail : hanjh@kangwon.ac.kr

and/or *A pleuropneumoniae* serotype 5 . Serum antibody titers were examined by an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and proportion of porcine leukocyte subpopulations in peripheral blood was examined by flow cytometry.

In this experiment, antibodies against PRRS virus and *A pleuropneumoniae* were detected at 2 weeks and 1 week postinfection and the number of antibody positive pigs were gradually increased. And in proportion to leukocyte subpopulations in peripheral blood of pigs infected with *A pleuropneumoniae* compared with pigs administrated with saline, the proportion of PoCD4 and N cells were increased($P<0.1$). Furthermore, in proportion to leukocyte subpopulations in peripheral blood of pigs infected with PRRS virus followed by *A pleuropneumoniae* compared with pigs administrated with saline, the proportion of MHC class II, PoCD4 and B cells were significantly increased($P<0.1$)

The results indicated that dual infection with PRRS virus and *A pleuropneumoniae* induced the stronger immune responses associated with macrophages and Th cells in pigs than single infection with PRRS virus or *A pleuropneumoniae*.

Key words : PRRS virus, *A pleuropneumoniae*, dual infections, ELISA, porcine leukocyte subpopulations.

서 론

돼지에서 큰 피해를 주는 호흡기질병으로는 돼지 흉막폐렴(porcine pleuropneumonia), 위축성 비염(atrophic rhinitis, AR), 마이코플라스마 폐렴, 파스튜렐라 폐렴 등이 있다¹⁾. 흉막폐렴 등은 급성의 경과를 가지는데 돼지 생식기 호흡기 증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 등의 바이러스성 질병이 혼합감염되었을 때 피해는 더욱 커진다²⁾. 최근에는 PRRS virus(PRRSV)와 세균이 함께 감염되어 호흡기증상을 더욱 심화시켜 큰 피해를 주는 돼지 호흡기질병복합군(porcine respiratory disease complex, PRDC)이 전세계적으로 문제를 일으키고 있다³⁾. PRDC의 원발성 병원체는 swine influenza virus(SIV), pseudorabies virus(PRV), PRRSV, porcine

respiratory coronavirus(PRCV) 등의 바이러스와 *Mycoplasma hyopneumoniae* 이고, 속발성 병원체로는 *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Salmonella choleraesuis* 등의 세균이 알려져 있다³⁻⁵⁾.

PRDC 연구의 일환으로 PRRSV와 다른 세균성 호흡기질병 원인체와의 인공복합감염 후 증상과 병변의 심한 정도에 대한 연구가 많이 진행되었는데, PRRSV와 병원성이 높은 *Str suis* type 2를 specific pathogen-free(SPF) 자돈에 복합감염시켰을 때에 전형적인 폐혈증과 뇌막염이 관찰되었다⁶⁾. 3주령의 SPF 돼지에 PRRSV를 접종한 후 SIV 또는 낮은 병원성을 가진 *A pleuropneumoniae*를 복합감염하였을 때 SIV에 의한 임상증상에는 큰 변화를 주지 않았으나 *A pleuropneumoniae*를 접종한 돼

지에서는 더욱 심한 급성 흉막폐렴소견을 보였다고 하였다⁷⁾.

PRRSV와 혼합감염되어 PRDC의 증상을 일으키는 *A pleuropneumoniae*에 의한 돼지 흉막폐렴은 출혈성, 괴사성 및 섬유소성 폐렴이 특징인 세균성 호흡기질환으로 전세계적으로 발생되어 높은 경제적 손실을 일으키는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾.

돼지에서 호흡기계에 영향을 주는 병원체가 호흡기도 점막의 일차적인 자연적 방어장벽을 통과하여 체내로 들어오면 병원체는 순환혈액내의 호중구, 큰포식세포, 보체 및 lysozyme 등이 동원되어 이루어지는 비특이적 면역기전에 의해 제거될 뿐만 아니라 면역반응에 있어 중추적인 역할을 담당하는 림프구가 주도하는 특이적인 면역기전에 의해 제거된다¹¹⁻¹³⁾. 이러한 림프구가 주도하는 면역기전 등을 연구하기 위하여 Kohler와 Milstein¹⁴⁾에 의해 최초로 개발된 단클론항체 작성기법은 각종 질병에 대한 정밀진단 방법의 획기적인 발전에 기여하였고 사람을 비롯하여 각종 동물의 백혈구에 존재하는 특정한 표면항원을 분석하여 림프구를 아군별로 분류하는데도 널리 활용되었다¹⁵⁾. 사람이나 동물에서 혈액은 살아있는 상태에서 쉽게 구할 수 있는 유일한 림프구의 공급원이기 때문에 혈액에 대한 림프구의 아군별 분포율을 조사함으로써 개체의 면역수준이나 질병상태를 알아보려는 시도가 많았다¹⁶⁻¹⁸⁾.

PRRSV와 SIV 등의 바이러스가 일차적으로 감염되고 이차적으로 *A pleuropneumoniae* 등의 세균이 복합감염되어 심한 호흡기증상을 나타내는 PRDC는 비육시기인 18주령에서 심한 성장정체 등을 나타내기 때문에 PRDC의 병인을 규명하려는 연구가 이루어져 왔다^{3,5)}. 주로 SPF돼지

또는 초유를 급여하지 않은 돼지에서 PRRSV와 *A pleuropneumoniae*의 복합감염에 대하여 보고되었다⁶⁾. 국내에서도 PRDC가 많은 피해를 일으키는 것으로 추정되나 이와 관련되어 국내에서 분리된 PRRSV와 *A pleuropneumoniae*를 섭취한 일반돼지에 복합감염시킨 연구는 이루어지지 않고 있다. 따라서 국내에서 분리된 PRRSV와 *A pleuropneumoniae*를 초유를 섭취한 일반 이육돈에 감염시킨 다음 형광세포 유출장치를 이용한 분석을 통하여 병인을 규명하여 국내에서 문제되는 PRDC의 예방대책에 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시험동물 및 실험설계

돼지 바이러스성 호흡기질환의 병원체인 PRRSV와 돼지 흉막폐렴을 일으키는 세균인 *A pleuropneumoniae* serotype 5에 대한 혈청검사 결과 항체음성으로 판정된 23두의 4주령 랜드레이스-요크셔 교잡자돈을 양돈장에서 선발하여 실험 양돈장으로 이동하여 격리시킨 다음 실험에 사용하였다. 사육돈방(3×2.5×1.2m)은 콘크리트벽을 설치하여 주위 환경과 통제되게 하였고 돈사의 온도와 습도는 일정하게 유지시켰으며 환풍기를 통하여 환기를 시켰다.

실험군은 5개군으로 구분하여 각 군의 사육돈방에 3-5두씩 넣어 3주간 적응시킨 후 7주령에 기관내로 접종실험을 실시하였다. 실험 I 군에서 실험 IV군까지는 각각 5두, 실험 V 군은 3두를 배치하였다. 실험 I 군은 PRRSV를 접종한 군, 실험 II 군은 *A pleuropneumoniae*를 접종한 군, 실험 III 군은 PRRSV를 접종한 다음 1주 후에 *A*

*pleuropneumoniae*를 접종한 군, 실험IV군은 *A pleuropneumoniae*를 접종한 다음 1주 후에 PRRSV를 접종한 군, 실험V군은 대조군으로 멸균 생리식염수를 기관내로 접종한 군으로 구분하였다(Fig 1). 전실험기간 동안에는 항생제가 섞이지 않은 사료를 급여하

였다. 처음 1주간은 갓난돼지 사료를 급여한 후 젓먹이 사료로 교체하였고, 음수는 자유 급여토록 하였다. 사육돈방 주위는 4급암모늄제제를 이용하여 1일 2회 소독을 실시하였다.

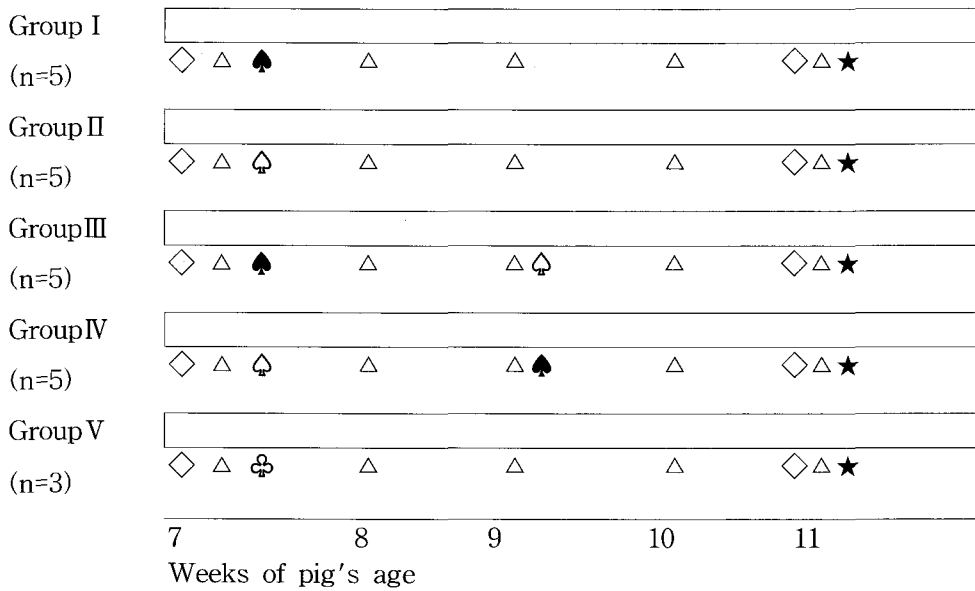


Fig 1. Experimental design

- Group I : pigs infected with PRRS virus
- Group II : pigs infected with *A pleuropneumoniae* serotype 5
- Group III : pigs infected with PRRS virus followed by *A pleuropneumoniae* serotype 5
- Group IV : pigs infected with *A pleuropneumoniae* serotype 5 followed by PRRS virus
- Group V : pigs administrated with sterile saline
- ♠ : infection of pigs with PRRS virus intratracheally
- ♠ : infection of pigs with *A pleuropneumoniae* serotype 5 intratracheally
- ♣ : administration of pigs with sterile saline intratracheally
- ◇ : measurement of body weight
- △ : collection of blood
- ★ : autopsy

시험바이러스와 시험균주

PRRSV는 국내에서 분리된 바이러스를 강원대학교 수의학과 미생물학 교실에서 분양받아 Kim 등¹⁹⁾의 방법에 따라 MARC-145세포에 계대한 후 -70℃에 보관하며 사용하였다.

돼지 흉막폐렴을 일으키는 세균은 국내에서 분리된 돼지 흉막폐렴의 원인체인 병원성이 있는 것으로 알려진 *A pleuropneumoniae* serotype 5를 서울대학교 수의과대학 전염병학 교실에서 분양받아 사용하였다.

PRRS 바이러스

PRRSV의 증식을 위해 MARC-145세포를 사용하였다. MARC-145세포는 5-10% fetal bovine serum, 0.15% sodium bicarbonate 및 항생제를 함유한 Eagle's minimum essential medium(MEM)을 사용하여 배양하였으며 PRRSV를 접종한 후 5% CO₂, 37℃ incubator에서 세포를 유지시켰다. PRRSV에 의한 세포변성효과를 확인한 후 배양세포를 -70℃와 실온에서 3회 얼렸다 녹인 다음 1,500rpm에서 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상층액을 바이러스 역가 측정 후 실험에 사용하였다.

A pleuropneumoniae serotype 5

국내에서 분리된 *A pleuropneumoniae* serotype 5를 0.1%(w/v) β-NAD(Sigma, USA)를 여과멸균하여 혼합한 tryptic soy agar(Difco, USA)에 접종한 다음, 37℃ incubator에서 18시간 배양시킨 후 생리식염수로 집균하여 실험에 사용하였다.

동물접종

기관내 접종을 위하여 Thacker 등²⁰⁾의 방

법에 따라 돼지를 체중 kg당 2.2mg의 ketamine(상품명: Katala, 유한양행)과 1.65mg의 xylazine(상품명: Rompun, 한국바이엘)으로 마취시켜 앙와자세를 취하게 한 다음, 기관내로 13게이지의 주사침을 관통시켜 직경 1mm의 비닐관을 주사침 내경으로 삽입시킨 후 104.0 TCID₅₀의 PRRSV 또는 7.0×10⁷CFU의 *A pleuropneumoniae* 부유액 1ml와 9ml의 생리식염수를 혼합하여 총 10ml를 비닐관을 통하여 접종하였다.

혈청검사

PRRSV와 *A pleuropneumoniae* serotype 5를 기관내로 접종한 후 혈중 항체는 부검을 실시할 때까지 1주 간격으로 채혈하여 ELISA로 측정하였다. 채취한 혈액은 혈청을 분리한 후 eppendorf tube에 옮긴 다음 56℃에서 30분간 비동화시킨 후 검사에 사용하였다.

PRRSV에 대한 혈청검사

PRRSV에 대한 항체검사는 HerdChek[®] PRRS(IDEXX, USA)를 이용하여 실시하였다.

시료희석액을 이용하여 1:40으로 희석한 검사혈청과 음성대조 및 양성대조 혈청 100 μl를 각각 PRRSV가coating된 well(PRRS well)과 normal host cell(NHC)이 coating된 well(NHC well)에 샘플당 2 well씩 분주한 후 실온에서 30분간 배양한 후 모든 well의 액상성분을 제거하고 300 μl washing solution으로 3회 내지 5회 세척하였다. 각 well에 anti-porcine:horseradish peroxidase (HRPO) conjugate 100 μl를 분주한 후 실온에서 30분간 배양한 후 washing solution으로 3회 내지 5회 세척하였다. 각 test plate well에 100 μl의 tetramethylbenzidine(TMB)

substrate solution을 첨가하고 실온에 15분간 배양하였다. 반응을 끝내기 위하여 각 well에 100 μ l의 stop solution(0.125% hydrofluoric acid)을 첨가한 후 ELISA reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 650nm 파장에서 흡광도를 측정하여 다음 sample/positive(S/P) ratio를 구하여 항체 생성여부를 확인하였다.

S/P ratio를 계산할 때 양성대조 평균치와 음성대조 평균치의 차이가 0.150 이상이거나 같아야 하고, S/P ratio가 0.4 또는 그 이상이면 PRRSV 항체에 대하여 양성으로 판정하였다.

A pleuropneumoniae serotype 5에 대한 혈청검사

ELISA 검사용 항원은 A pleuropneumoniae serotype 5를 sonicator로 처리하여 추출한 OMP를 N-laurylsarcosinate로 처리하여 만든 것으로 국립수의과학검역원으로부터 분양받아 사용하였다.

항원을 coating buffer(Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, DW 1,000ml, pH 9.6)에 1:100으로 희석한 후 ELISA plate의 각 well에 희석된 항원을 well당 100 μ l을 분주한 다음 4 $^\circ\text{C}$ 에서 overnight시켰다. Washing buffer[Tween 20 0.5ml, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2) 1,000ml]로 3회 세척한 후 각 well에 200 μ l blocking buffer(bovine serum albumin 2g, PBS 1,000ml)를 분주한 다음 37 $^\circ\text{C}$ 에서 1시간 정치시켰다. Washing buffer로 세척한 다음 20 μ l 가검혈청을 10배수 단계희석하고 음성혈청도 함께 well에 옮긴 후 37 $^\circ\text{C}$, 2시간 반응시켰다. Washing buffer로 세척한 다음 100 μ l anti-swine IgG peroxidase conjugate(Sigma)를 분주한 다음 37 $^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응시킨 후

washing buffer로 세척하였다. 100 μ l O-phenylenediamine substrate 용액을 각 well에 분주하고 실온에서 10분간 배양하였다. 반응을 끝내기 위하여 100 μ l stop solution(2.5M H_2SO_4)을 첨가한 후 ELISA reader(Molecular Device)로 492 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 산출하였다. 가검혈청(P)/음성혈청(N) 값이 2.0 이상을 나타내는 최대혈청희석배수를 역가로 간주하였으며 역가 40이상은 양성혈청으로, 40미만은 음성혈청으로 판정하였다.

돼지 말초혈액의 면역세포 분포검사

돼지 백혈구 표면 특이 단클론항체와 형광세포유출장치(flow cytometry)를 이용하여 PRRSV 또는 A pleuropneumoniae serotype 5의 접종에 따른 시기별 돼지 말초혈액내 면역세포인 주요조직합체(major histocompatibility complex, MHC) 발현세포와 림프구 아집단 분포율에 대한 변화를 검사하였다.

말초혈액으로부터 백혈구 분리

말초혈액 백혈구(peripheral blood leukocyte, PBL)의 분리는 Davis 등²¹⁾의 방법으로 실시하였다. 돼지 전대정맥에서 채혈한 혈액을 acid citrate dextrose(A-CD)-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)가 첨가된 시험관에 혼합하여 잘 섞은 다음 1,500rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리하여 buffy coat층을 채취한 후 Hypaque Ficoll(Histopaque, Sigma)에 중층한 다음 1,500 rpm에서 20분간 원심분리한 후 Ficoll과 혈장과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS(pH 7.0)로 3회 세척한 뒤 다시 PBS에 부유시킨 다음 trypan blue exclusion

technique에 의해 생존 세포수를 측정 한 후 최종농도가 1×10^7 /ml로 조절하여 검사에 이용하였다.

백혈구 아집단 검사용 단클론항체

PRRSV 또는 *A pleuropneumoniae* serotype 5의 접종에 따른 시기별 면역학적 특징을 검사하기 위하여 백혈구의 세포 표

면항원(cell surface molecules)에 특이적인 단클론항체인 MHC class I, MHC class II, Po(porcine)CD2, PoCD4, PoCD8 및 surface IgM(sIgM), Non T/Non B($\gamma\delta$ TCR \oplus N), PoCD11a, PoCD45, granulocyte와 monocyte(G/M)에 특이적인 백혈구 표면 단클론항체 총 11종을 사용하였다(Table 1).

Table 1. A panel of monoclonal antibodies specifically reactive with swine leukocyte differentiation antigens

Leukocyte differentiation antigens	Monoclonal* antibodies	Representative cells	References
MHC class I	PT85A	All nucleated cells	Davis <i>et al</i> (1987)
MHC class II	H42A	Antigen presenting cells	Davis <i>et al</i> (1987)
	TH81A5	Antigen presenting cells	Davis <i>et al</i> (1987)
PoCD2	MSA4	T cells	Davis <i>et al</i> (1987)
PoCD4	PT90A	T h/i cells	Davis <i>et al</i> (1987)
PoCD8	PT81B	T c/s cells	Davis <i>et al</i> (1987)
sIgM	PIg45A	B cells	Davis <i>et al</i> (1987)
$\gamma\delta$ TCR?N	PT79A	N cells	Davis <i>et al</i> (1987)
PoCD11a	MUC76A	B, T, N cells	Davis <i>et al</i> (1987)
PoCD45	74-9-3	T, N, B cells	Davis <i>et al</i> (1987)
G/M	DH59B	Granulocytes & Monocytes	Davis <i>et al</i> (1987)

형광세포 유출장치 분석

백혈구 아군별 분포율 분석은 Davis 등¹⁵⁾의 방법에 준해서 flow cytometry(Becton-Dickinson, USA)를 이용하여 실시하였다. V-bottomed 96 well-microplate의 한 well당 단클론항체 50 μ l(15 μ g/ml)와 혈액에서 분리한 1×10^7 /ml의 백혈구 50 μ l를 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 잠작시킨 다음 4 $^{\circ}$ C의 first washing buffer[PBS 450ml, ACD 50ml, 20% NaN 35ml, gamma globulin free horse serum(GIBCOBRL, USA) 10ml, 250mM EDTA 20ml, 0.5% phenol red 1ml]로 3회

원심(2,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 3분) 세척한 후 상층액을 버리고 밑부분에 모인 백혈구의 pellet을 plate mixer 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다.

부유된 백혈구는 이차항체로 단일염색을 하기 위하여 fluorescein isothiocyanate (FITC)conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody(Caltag Lab, USA)를 200배 희석한 후 각 well에 100 μ l씩 첨가하였다. 이를 다시 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 잠작시킨 다음 first washing buffer 성분에서 horse serum만 제거한 4 $^{\circ}$ C의 second washing buffer로 3회 원심세척한 다음 2%

PBS-formalin(38% formalin 20ml, PBS 980ml) 용액을 well당 200 μ l 되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사때까지 4 $^{\circ}$ C 냉장소에 보관하였다. 염색이 완료된 재료는 flow cytometry를 이용하여 총 2,000 개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포 수를 측정하였으며 측정과 자료분석은 FACSCalibur 및 Cell Quest program(Becton Dickinson, USA)을 이용하여 실시하였다.

통계처리

실험을 통하여 얻은 성적은 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다²²⁾.

결 과

국내 양돈업뿐만 아니라 전세계 양돈산업에 있어서 많은 경제적 손실을 주고 있는 돼지 바이러스성 호흡기질병인 PRRS와 돼지 세균성 호흡기질병인 흉막폐렴과의 상관관

계를 규명하고자 감염실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

혈청검사결과

PRRSV에 대한 항체가

ELISA를 이용한 PRRSV에 대한 항체검사 결과 PRRSV만을 단독 접종한 실험 I 군에서 접종한 2주 후부터 항체 양성반응이 증가되었다.

PRRSV를 접종하고 1주 후에 *A pleuropneumoniae*를 접종한 실험III군에서는 PRRSV를 접종한 2주 후부터 양성반응이 증가된 양상을 보였다. *A pleuropneumoniae*를 접종하고 1주 후에 PRRSV를 접종한 실험IV군에서도 PRRSV를 접종하고 2주 후부터 양성반응을 보이면서 시간이 경과할수록 증가하였다. PRRSV에 대한 항체양성율은 실험 5개군 중에서 PRRSV를 접종하고 *A pleuropneumoniae*를 추가접종하였던 실험III군에서 가장 높게 관찰되었고, 실험II군과무접종 대조군인 실험V군에서는 PRRSV에 대하여 전 주령에 걸쳐 양성반응을 나타내지 않았다(Table 2).

Table 2. Antibody response against PRRSV detected by ELISA

Group	Weeks postinfection				
	0	1	2	3	4
I	0/5*	0/5	2/5	3/5	4/5
II	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
III	0/5	0/5	1/5	5/5	5/5
IV	0/5	0/5	0/5	2/5	4/5
V	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

*No. of positive pigs/No. of tested pigs

A pleuropneumoniae serotype 5에 대한 항체가

A pleuropneumoniae serotype 5에 대한 ELISA 항체가 *A pleuropneumoniae*를 단독으로 접종한 실험Ⅱ군에서 접종한 1주 후부터 양성반응을 보이기 시작한 이후 지속적으로 증가하여 다른 실험군에 비하여 높게 관찰되었다. PRRSV와 *A pleuropneumoniae*를 접종한 실험Ⅲ군과 실험Ⅳ군에서도 높게 관찰되었으나(항체가 40이상), PRRSV를 단독으로 접종한 실험Ⅰ군과 대조군인 실험Ⅴ군에서는 항체가 음성(40미만)으로 나타났다(Fig 2).

돼지 말초혈액의 면역세포 비율분포

PRRSV 또는 *A pleuropneumoniae* serotype 5의 접종에 따른 시기별 돼지 말초혈액 내의 면역세포인 MHC 발현세포와 림프구 아집단 분포율을 돼지 백혈구 표면 특이 단클론항체를 이용하여 검사한 결과는 Table 3과 같다.

MHC class II 발현세포의 비율은 PRRSV와 *A pleuropneumoniae*를 복합감염시킨 실험Ⅲ군과 실험Ⅳ군이 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 보였다($p < 0.1$). B 세포에 있어서 실험Ⅰ군과 실험Ⅲ군이 대조군에 비해서 유의성 있는 증가를 보였다($p < 0.1$). B 림프구와 바이러스감염 또는 종양형성시에 숙주 방어세포인 N(Non T/Non B) 림프구의 분포율에 있어서는 PRRSV 또는 *A pleuropneumoniae*를 단독감염 또는 복합감염시킨 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다($p < 0.1$). T 림프구인 PoCD2 세포, PoCD8 세포 및 과립구와 단핵구(G+M)의 분포비율은 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보이지 않았으나, PoCD4 세포에서 전반적으로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다($p < 0.1$).

고 찰

본 연구에서 혈청학적 검사는 최근 가장 널리 이용되고있는 ELISA를 이용하여 항체를 PRRSV와 *A pleuropneumoniae* serotype 5를 단독접종 또는 복합접종한 다음 1주 간격으로 채혈하여 실시하였다. PRRSV에 대한 항체가 검사 결과는 PRRSV를 단독감염시켰거나 PRRSV와 *A pleuropneumoniae*를 복합감염시킨 실험군에서 모두 PRRSV를 기관내 접종한 2주 후부터 양성 두수가 나타나기 시작하였다. 이 결과는 6주령의 자돈에 PRRSV를 접종한 Yoon 등²³⁾의 연구 및 Shimizu 등²⁴⁾이 SPF 돼지에서 연구한 결과와 유사하게 나타났다. 이는 감염일령, 품종, 바이러스주, 복합감염 여부에 관계없이 PRRSV의 항체형성시기는 비슷하다는 것을 의미한다.

돼지의 백혈구 표면항원에 특이적인 단클론항체의 연구에서 흉선세포의 60%가 말초혈액내 B 세포와 반응하지만 말초혈액 T 세포와는 반응하지 않는 α CD1, Th에 특이적인 α CD4, Tc/s에 특이적인 α -CD8 그리고 monocyte와 granulocyte에 특이적인 G+M 등을 작성했다고 보고하였다²⁵⁾.

Hammerberg와 Schurig²⁶⁾은 B 세포와 일부 T 세포에 특이적인 MHC class II와 T 세포에 특이적인 CD2를 작성하였다. Davis 등²¹⁾은 특이적인 PIg45A 등 30종의 단클론항체를 개발하였다. 본 연구에서도 Davis 등²¹⁾이 개발한 11종의 단클론항체를 개발하였다.

Shimizu 등²⁷⁾은 PRRSV에 자연감염된 돼지의 말초혈액 내 림프구에서는 주로

Table 3. Changes of average proportion of porcine leukocyte subpopulation in peripheral blood of pigs infected with PRRSV and/or *A pleuropneumoniae*

Specificity of MoAbs	Group	Proportion of porcine leukocyte subpopulations(%)					p-value*
		Weeks postinfection					
		0	1	2	3	4	
MHC class II	I	31.20±5.30**	16.42±8.23	21.90±2.41	16.54±5.26	18.92±4.03	0.18
	II	30.60±4.29	19.55±5.70	20.93±3.28	16.40±2.97	18.48±3.29	0.11
	III	34.96±5.15	22.98±10.93	23.88±7.47	19.86±4.34	21.88±2.90	0.01
	IV	30.80±4.53	19.44±8.01	22.58±4.45	15.15±1.32	18.10±0.74	0.09
	V	24.60±1.56	18.75±6.15	19.65±6.01	14.95±1.06	8.00±0.00	-
PoCD2	I	61.28±4.37	73.94±7.57	78.85±5.95	74.74±3.48	-	0.43
	II	70.15±5.61	77.0±4.54	78.25±4.94	67.5±1.97	-	0.34
	III	60.10±4.92	67.3±5.61	79.02±4.07	77.72±6.34	75.70±9.60	0.46
	IV	68.15±7.79	78.46±2.01	80.35±4.17	69.08±6.77	77.83±3.80	0.16
	V	55.60±7.35	79.05±5.16	76.0±0.71	73.70±1.70	72.70±0.00	-
PoCD4	I	18.62±6.52	28.72±5.70	36.43±3.72	30.54±4.81	32.36±6.93	0.02
	II	25.38±7.86	36.10±12.49	48.93±8.01	38.98±3.42	29.58±9.81	0.0005
	III	16.88±3.52	28.52±5.08	40.98±9.21	41.90±5.15	36.04±6.67	0.02
	IV	15.54±4.58	29.10±4.21	41.93±8.34	36.05±5.17	30.88±5.29	0.5
	V	18.75±5.16	20.30±0.00	28.90±11.88	30.65±4.03	14.95±2.76	-
PoCD8	I	32.80±9.75	44.74±11.52	49.98±9.83	33.06±6.23	37.86±4.45	0.18
	II	37.08±8.91	39.25±6.82	41.10±4.57	29.25±3.50	41.30±9.18	0.43
	III	28.64±5.55	39.22±6.05	47.90±8.39	36.18±6.69	38.10±4.68	0.31
	IV	33.60±14.75	45.5±5.43	51.40±8.37	26.35±2.05	56.25±3.73	0.24
	V	23.00±2.12	45.1±3.68	43.85±2.76	32.10±1.70	49.55±2.90	-
B	I	21.13±4.45	14.70±3.65	20.20±4.95	12.90±6.24	13.14±2.81	0.07
	II	21.73±5.98	12.53±2.26	17.53±2.22	11.53±1.83	10.83±1.38	0.18
	III	24.60±5.01	16.64±7.63	18.20±9.83	17.92±6.50	17.06±3.40	0.005
	IV	20.18±6.77	12.24±5.93	13.90±3.27	10.55±1.81	19.18±9.78	0.15
	V	16.90±5.23	14.05±7.99	15.50±1.56	9.30±2.69	9.10±6.65	-
N (Non T/ Non B)	I	39.14±3.24	22.60±4.93	28.85±9.29	24.44±8.58	26.24±5.44	0.07
	II	39.88±10.91	20.8±1.57	28.40±4.22	27.70±4.75	22.10±2.51	0.07
	III	43.82±4.42	28.36±5.44	31.68±10.39	24.60±4.62	24.36±3.51	0.11
	IV	40.32±7.49	24.2±6.84	23.08±2.65	27.58±2.48	19.78±2.37	0.07
	V	44.35±5.30	28.0±0.00	25.85±0.49	22.95±1.91	17.90±5.23	-
G+M	I	3.50±1.95	4.43±2.03	5.98±1.29	4.10±2.90	3.80±1.75	0.20
	II	4.95±0.72	5.35±5.02	5.45±0.75	4.28±4.44	3.28±0.76	0.13
	III	3.90±1.41	6.48±2.41	4.46±1.71	2.87±0.35	4.18±1.55	0.13
	IV	2.96±0.74	4.63±0.75	4.83±1.86	2.53±1.26	3.20±1.83	0.49
	V	1.90±0.42	4.85±0.92	6.25±1.77	1.85±0.21	3.20±2.40	-

* P-value : Bold numbers indicate significance(P<0.1) compared to Group V

** Mean±SD

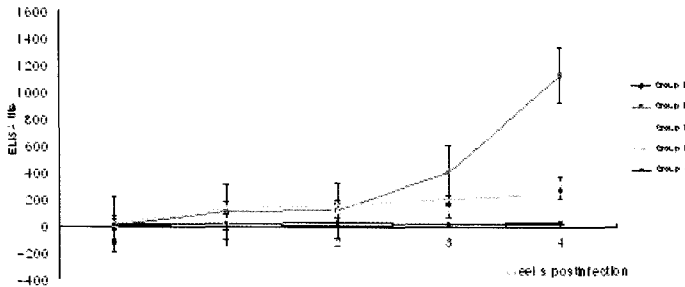


Fig 2. Antibody titers against *A. pleuropneumonia* serotype 5 detected by ELISA

T 림프구 아군에서 비정상적인 변화를 보였는데 CD2+ 세포와 CD8+ 세포의 분포율은 현저하게 증가되었고, CD2+/CD8+ 비는 감소하였으나 총림프구의 수와 sIgM를 산생하는 B림프구의 수의 변화는 없었다고 하였다. 이러한 변화는 Pescovitz 등²⁵⁾과 Christianson 등²⁸⁾의 CD2와 CD8의 변화에 대한 결과와 유사하였다. 그러나 SPF 돼지에 PRRSV를 인공감염시키면 총림프구, CD2+ 세포, CD4+ 세포, sIgM 세포의 수는 초기에는 감소하다가 시간이 경과하면서 정상 수치를 보였다.²⁹⁾ 이러한 초기의 변화는 Christianson 등²⁸⁾의 모돈에 PRRSV를 인공감염시켰을 때와 일치하였다. 반면에 Zhou 등²⁹⁾은 돼지에 PRRSV 바이러스를 접종하면 CD4+ 세포가 현저하게 증가하나 CD8+ 세포는 감소하였다고 보고하였는데 이러한 차이는 접종한 PRRSV의 차이 때문이라고 하였다. 제왕절개한 후 초유를 급여하지 않은 자돈에 PRRSV를 인공감염시키거나 말초혈액 유래의 단핵구를 세포배양한 다음 PRRSV를 접종하면 림프구 아군과 흉선구(thymocyte) 아군의 변화는 관찰되지 않는

데 이는 생리학적 자극에 의하여 CD8+ 세포의 유사분열 능력에 영향을 미치는 CD4+ 세포의 CD8 molecule에 대한 암호화된 유전자 때문이며³⁰⁾, 사람에서 CD4+ 세포에 IL-4 mediated CD8 molecule 유입과 같은 현상이다³¹⁾.

7주령의 초유를 섭취한 돼지를 대상으로 실험한 본 연구에서는 PRRSV를 감염시킨 후 2주까지 CD2, CD4, CD8의 비율이 증가하였으나 3주부터는 그 비율이 감소하는 경향을 보였다. PRRSV 감염 후 1주에 CD2 73.94%, CD4 28.72%, CD8 44.74%를 나타내고, 2주째는 CD2 78.85%, CD4 36.43%, CD8 49.98%로 증가하였으나 3주부터는 CD2 74.74%, CD4 30.54%, CD8 33.06%로 감소하였다. 이 결과는 Shimizu 등²⁷⁾이 SPF 돼지에 PRRSV를 접종하였을 때 CD2+, CD4+ 비율이 초기에 감소하다가 정상적인 수치로 돌아온다는 보고와는 다른 결과로서 이는 일반돼지와 SPF 돼지의 차이, 연령의 차이 또는 국내에서 분리된 바이러스주가 유럽이나 미국의 바이러스주와 다르기 때문이라고 사료되어 추후 지속적인 연구가 필

요하다고 본다.

문 등³²⁾은 *M hyopneumoniae*와 *P multocida*에 대한 혼합백신을 접종한 다음 *P multocida*를 인공감염을 시켰을 때 MHC class II 발현세포, CD4, CD8, sIgM, N, CD 11a 및 CD45 세포가 높게 관찰되었고, *M hyopneumoniae* 인공감염시에는 백신미접종군이 백신접종군에 비하여 CD2 세포, CD4 세포, CD8 세포 등의 T 림프구의 감소를 보였고, *P multocida*와의 복합감염시에는 T 림프구의 심한 감소와 sIgM 세포인 B 림프구도 매우 낮게 관찰된다고 하였으며, 돼지 오제스키병 백신 접종시에 MHC class I 발현세포, CD2 세포, CD8 세포, CD45 세포의 분포율이 증가되었고, AD 바이러스를 접종하면 초기에는 MHC class II 발현세포와 sIgM 세포가 높게 나타나다가 시기가 경과하면 MHC class I 발현세포와 CD 세포의 분포율이 차이가 난다고 하였다. 문 등³³⁾은 AD 바이러스를 접종하였을 시 MHC class II 발현세포와 성숙 B 림프구가 갖고 있는 sIgM이 증가하였다고 하였으나 황 등³⁴⁾은 돼지 콜레라 바이러스를 인공감염시킨 돼지의 림프구 아군별 분포율을 조사한 결과 MHC class II 발현세포와 sIgM 양성세포 수가 지속적으로 감소하는 경향이 있다고 하였으며, 이런 차이가 나타나는 것은 접종한 바이러스주, 접종량, 돼지의 연령, 건강상태 및 사양조건이 관여되기 때문이라고 하였다. AD 바이러스 접종시에 MHC class I, II 발현세포의 증가는 AD 바이러스가 숙주세포에 감염되면 MHC class I 세포가 변형을 일으키고 이렇게 변형된 세포를 cytotoxic T 림프구 즉 CD8 세포가 파괴한다고 하여 MHC class I 발현세포는 바이러스 감염시 세포성 면역기전과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다.

Chinsakchai와 Moliter³⁵⁾는 AD 바이러스에 대한 방어기전에서 감염초기에 NK 세포와 interferon의 비특이적인 면역반응이 관여한다고 하였다. 이와같이 혈액 및 림프계장기에 대한 림프구의 아군별 분포율 조사에서 연구자에 따라서 성적이 다르게 나타난 것은 시험방법과 조건의 차이에서 가장 큰 원인을 찾을 수있으며 기타 동물의 건강상태, 연령, 개체차 등이 관여된다고 하였다.^{18,23,27,36,37)}

백혈구 아집단을 분석한 본 연구에서 PRRSV만을 감염시킨 돼지에서는 PoCD4, B 세포, N 세포에서 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다(P<0.1). Shimizu 등²⁷⁾은 PRRSV에 자연감염된 돼지는 sIgM 및 B 세포는 변화가 없다고 하였으나 본 실험에서는 B 세포가 대조군에 비해서 증가하였다. 이는 일령 및 바이러스주의 차이에서 온 것으로 사료된다. PRRSV를 감염시키고 1주후 *A pleuropneumoniae*를 복합감염시킨 돼지에서 MHC class II, PoCD4, B 세포가 생리식염수만을 접종한 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다(P<0.1). *A pleuropneumoniae*만을 감염시킨 돼지는 PoCD4와 N세포에서만 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 보였다(P<0.1). *A pleuropneumoniae*를 먼저 감염시키고 1주후에 PRRSV를 복합감염시킨 돼지는 MHC class II, PoCD4, N 세포에서 대조군에 비하여 증가를 나타내었다(P<0.1). 본 연구에서 PRRSV와 *A pleuropneumoniae*를 복합감염시켰을 때 모두 MHC class II, PoCD4가 대조군에 비해 유의성있게 증가된 것은 각각 단독감염에 비하여 심한 큰포식세포 면역반응과 Th세포의 증가를 나타낸 것으로 이들 병원체에 의하여 형성된 조직병리학적 병변과 연관성이 주목된다. PRRSV 뿐만 아니라

*A pleuropneumoniae*를 인공감염시에도 N 세포가 증가하고 있어 돼지의 호흡기질병 감염시 바이러스 및 세균성 원인체에 의해 모두 1차 면역세포인 N세포의 구체적 기능 규명이 요구된다. 돼지 질병을 면역학적으로 분석하기 위한 백혈구 아집단의 연구가 각각의 질병을 대상으로 실시되었으나^{25,38)}, PRDC와 같은 복합호흡기질병 상태에서의 연구가 복잡한 호흡기질병의 병인을 규명하기 위하여 필요할 것으로 사료된다.

결 론

PRDC의 병인을 규명하기 위하여 바이러스성 호흡기질병의 원인체인 PRRSV와 세균성 호흡기질병의 원인세균인 *A pleuropneumoniae* serotype 5를 7주령 자돈의 기관대로 감염시켜 ELISA 항체가, 돼지 말초혈액내 백혈구 아집단 분포율을 검사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PRRSV를 접종하고 2주 후부터 PRRSV에 대한 항체가 양성을 나타내기 시작하였고, 양성두수가 계속 증가하였으며 PRRSV접종 1주 후에 *A pleuropneumoniae*를 접종한 돼지는 4주만에 전두수 양성을 나타내었다. *A pleuropneumoniae*를 접종하고 1주 후부터 항체양성 돼지가 나타나기 시작하였으며 항체가는 계속 상승하였다.
2. *A pleuropneumoniae*를 감염시킨 돼지에서 말초혈액에서 면역세포의 분포를 조사한 결과는 PoCD4 세포 및 N 세포의 분포율이 생리식염수만을 접종한 대조군에 비해서 증가되었으며, PRRSV 접종 1주 후 *A pleuropneumoniae*를 복합감염시킨 돼지에서는 MHC class II 발현세포, PoCD4 세포, B 세포가 유의성있게 증가되었다($P<0.1$).

이상의 결과에서 PRRSV와 *A pleuropneumoniae*를 복합감염시킨 돼지가 단독감염시킨 돼지에 비하여 강력한 포식세포와 Th 세포의 면역반응이 관찰되었다.

참고문헌

1. Bille N, Larsen JI, Sevendsen J. 1975. Prewaning mortality in pigs. 6. Incidence and causes of pneumonia. *Nord Vet Med* 27: 482-495.
2. Benfield DA, Hais L, Nelson E, et al. 1992. Properties of PRRS virus isolate ATCC VR-2332 in the United States and preliminary characterization of a monoclonal antibody to this virus. *Am Swine Pract News* 4: 19-21.
3. Pijoan C and Molitor T. 1992. *Viral-bacterial interactions in respiratory disease of pigs*. In Proc of 15th IPVS Con 29-31.
4. Yagahasi T, Nunoya, Mistui T, et al. 1984. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. *Jpn J Vet Sci* 46: 705-713.
5. Zeman DH. 1995. Concurrent respiratory infections in 221 cases of PRRS virus pneumonia : 1992"[1994. *Swine Heal Pro* 4(3): 143-145.
6. Galina L, Pijoan C, Sitjar M, et al. 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory

- syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec* 134(3): 60-64.
7. Pol JMA, van Leengoed LA, Stockhofe N, et al. 1997. Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet Microbiol* 55(1-4): 259-264.
 8. 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.
 9. Brandreth SR, Smith IM. 1985. Prevalence of pig herds affected by pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* in eastern England. *Vet Res* 117: 143-147.
 10. Hommez J, Devrise LA, Castryck F. et al. 1990. Slide precipitation, a simple method to type *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 24: 123-126.
 11. Tonegawa S. 1985. The molecules of the immune system. *Sci Am* 253: 122-131.
 12. Goverman J, Hunkapiller T and Hood L. 1986. A speculative view of the multicomponent nature of T cell antigen recognition. *Cell* 45: 475-484.
 13. van der Valk P and Herman CJ. 1987. Biology of disease. Leukocyte functions. *Lab Invest* 57: 127-137.
 14. Kohler G and Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256. 495-497.
 15. Davis WC, Hamilton MJ and Park YH. 1990. Ruminant leucocyte differentiation molecules In : Barta. MHC, differentiation antigen, and cytokines in animal and birds. Monographs in Animal Immunol. Blacksburg, VA : BAR-1, AB, Inc 47-70.
 16. ten Berge RJ, Sauerwein HP, Yong SL and Schellekens PTHA. 1984. Administration of prednisolone in vivo affects the ratio of OKT4/OKT8 and the LDH-isoenzyme pattern of human T lymphocytes. *Clin Immunol* 30: 91-103.
 17. Organ BC, Antonacci AC, Chiao J, Kumar A, de Riesthal HF, et al. 1989. Changes in lymphocyte number and phenotype in seven lymphoid compartments after thermal injury. *Ann Surg* 210: 78-89.
 18. Westermann J and Pabst R. 1990. Lymphocyte subsets in the blood : a diagnostic window on the lymphoid system. *Immunol Today* 11: 406-410.
 19. Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, et al. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 133: 477-483.
 20. Thacker B, Mulks M, Yamini B et al. 1987. Clinical, immunological, hematological, microbiological and pathological evaluation of percutaneous

- intratracheal injection of *Haemophilus pleuropneumoniae* challenge model. *Int Pig Vet Sci* 69-79.
21. Davis WC, Marusic S, Lewin HA, et al. 1987. The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leucocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol* 15: 337-376.
 22. 이승욱. 1998. 통계학의 이해. 자유아카데미. 125.
 23. Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT. 1992. Isolation of a cytopathic virus from weak-born pigs of farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 4. 139-143.
 24. Shimizu M, Yamada S, Murakami Y, et al. 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J Vet Med Sci* 56: 389-391.
 25. Pescovitz MD, Lunney JK and Sachs DH. 1984. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol* 133: 368-375.
 26. Hammerbeg C and Schurig GG. 1986. Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 11: 107-121.
 27. Shimizu M, Yamada S, Kawashima K, et al. 1996. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet Immunol Immunopathol* 50: 19-27.
 28. Christianson WT, Choi CS, Collins JE, et al. 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res* 57: 262-268.
 29. Zhou Y, Barghusen S, Choi C, et al. 1992. Effect of PRRS virus infection on leucocyte populations in the peripheral blood and on cytokine expression in alveolar macrophages of growing pigs. *Am Assoc Swine Pract Newsletter* 4:28.
 30. Carbone AM, Marrack P and Kappler JW. 1988. Demethylated CD8 gene in CD4+ cells suggests that CD4+ cells were developed from CD8+ cell precursors. *Science* 242: 1174-1176.
 31. Paliard X, Malefijt RW, de Vries JE, Spits H. 1988. Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4+ T-cell clones. *Nature* 335: 642-644.
 32. 문진산, 박용호, 정석찬 등. 1996. 돼지 *Mycoplasma hyopneumoniae*와 *Pasteurella multocida*의 정제항원과 Quill A를 이용한 ISCOM 접종시 백혈구 아집단 분포율 및 방어효과. *대한미생물학회지* 31(1) 45-54.
 33. 문진산, 박용호, 정석찬 등. 1996. 돼지 오제스키 바이러스 재조합단백질 gp50, gIII와 α -ADV를 이용한 Quill A-ISCOMs 접종시 백혈구아군 분포율

- 에 관한 연구. 대한수의학회지 36(2) 359-369.
34. 황의경, 김재훈, 윤순식. 1994. 돼지 콜레라 바이러스 접종이 돼지 혈액의 림프구 아군별 분포율에 미치는 영향. 농업과학 논문집 36: 576-586.
35. Chinsakchai S, Molitor TW. 1994. Immunology of pseudorabies virus infection in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 1994. 43: 107-116.
36. Johnson H Jr, Lunney JK, Sachs DH, Flye MW. 1980. Preparation and characterization of an antiserum specific for T cells of pigs. *Transplantation* 29: 477-483.
37. Salmon H. 1979. Surface markers of porcine lymphocytes and distribution in various lymphoid organs. *Int Archs Allergy Appl. Immunol* 60: 262-274.
38. Binns RM. 1978. Sheep erythrocyte rosettes in pigs, sheep, cattle and goat demonstrated in the presence of dextran. *J Immunol Methods* 21: 197-210.