家衛誌 第31卷 第1號
Kor J Vet Serv (2008) 31(1) : 57-70

Korean Journal
of Veterinary Service

개 전염성 기관기관지염에 대한 modified live vaccine의 방어효과

박영일, 노인순, 한정희*

강원대학교 수의학(부)대학 수의과학연구소*
(접수 2008. 3. 4, 게재승인 2008. 3. 25)

Effects of the modified live vaccines against *Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza virus

Young-Il Park, In-Soon Roh, Jeong-Hee Han*

Department of Veterinary Medicine and Institution of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701; Kangwon-Do, Republic of Korea
[1]*National Veterinary Research Institute*
(Received 4 March, 2008, accepted in revised from 25 March 2008)

Abstract

The purpose of this study was to investigate the protective effects of the modified live vaccines against canine *Bordetella bronchiseptica* (Bb) and canine parainfluenza virus (CPIV) in puppies by nasal administration. A total of 24 puppies were classified as 3 groups consisting of 8, and each one was divided into two subgroups; vaccinated (n=4) and unvaccinated (n=4). Group I, group II and group III were challenged with Bb, CPIV, and Bb+CPIV, respectively. In group I vaccinated puppies (n=4) were experimentally challenged with Bb 2 weeks after vaccination and unvaccinated puppies (n=4) were experimentally challenged with Bb alone. The same methods of the above were applied for group II and group III. We carried out several studies including serum tests, isolation, and histopathological examination. The vaccinated puppies showed higher antibody titers than unvaccinated puppies and the titer sustained during the experimental period. In the isolation test, recovery period was shorter in the vaccinated subgroup than in the other. In clinical signs, the unvaccinated puppies showed the typical signs of tracheobronchitis (coughing, nasal and occular discharge), but another subgroup showed delayed incidence and mild clinical signs. The typical gross lesions

* Corresponding author
Phone : +82-33-250-8691, Fax : +82-33-256-3722
E-mail : hanjh@kangwon.ac.kr

and histopathological findings were observed in the unvaccinated puppies. In immunohistochemical findings, the vaccinated puppies showed little intensive in reaction for CPIV antigen than the other. It could be concluded that intranasal vaccination of modified live Bb and CPIV vaccine to puppies is effective to prevent canine infectious tracheobronchitis.

Key words : Canine infectious tracheobronchitis, Modified live Bb and CPIV vaccine, Intranasal vaccination, Protective effect

서 론

개 전염성 기관기관지염 (canine infectious tracheobronchitis, CIT)은 일반적으로 kennel cough라고 불려진다. 이 질병은 개에서 전염성이 매우 높은 호흡기 질병으로 알려져 있다. 임상증상에 따라 주요 2가지의 형으로 구분되어 있다. Mild type의 경우, 잦은 마른기침(dry, hacking cough)의 증상을 발현한다. Severe type의 경우, 발작성 건성 기침이나 습성 기침(paroxysmal dry or mucoid cough)에서 진행되어 비루와 안분비물을 동반한 폐렴의 증상을 나타내며 종종 유견에서는 지속적인 구토와 현저한 체중감소를 보이기도 한다[1]. CIT를 유발하는 병원체로는 *Bordetella bronchiseptica* (Bb), canine distemper virus, canine adenovirus-1, canine adenovirus-2, 그리고 canine parainfluenzavirus-2 (CPIV)가 보고되었다.

그 중에서 CPIV와 Bb가 가장 일반적으로 CIT에 걸린 환축에서 분리되는 병원체로 알려져 있다[2,3]. 질병의 전파는 직접접촉 혹은 비말에 의해 전파되어 사육시설과 같은 제한된 공간에서는 높은 감염률을 보이며 CPIV와 Bb는 접촉에 의해 수평 전파되는 것으로 알려져 있다[4-6].

임상실험에서 Wright 등[7]은 디스템퍼 기관지폐렴 증상을 보이는 개에서 Bb를 분리, 배양하여 12주령의 실험견에 공격접종을 실시, 임상증상을 관찰하였다. 실험견은 마른기침 증세와 심한 경우 발작성 기침과 같은 호흡기 증세를 보였으며, 흥분하거나 운동 후 또는 기관 촉진시 더욱 두드러진 증세를 나타냈으며 일부 실험견 중에서는 점액화농성 비루가 관찰되었다. 또한 대조군과 공격접종군간 접촉시 감염되는 것을 확인하였으며, 이와 같은 방법으로 6주령, 12주령 자견에서의 실험에서도 급성 호흡기 감염을 일으키는 유사한 결과를 나타내었다[6].

CPIV는 1967년 호흡기 증세를 보이는 실험견에서 최초로 분리되었으며, 그 바이러스는 Simian virus (SV)-5와 유사하여 SV-5-parainfluenza라고 명명되었다[8]. 또한 Binn 등[9]은 급속도로 전염되어 기침, 장액성 및 점액화농성 비루, 피로 증상 등의 상부 호흡기 증세를 보이는 군견에서 동일한 SV-5-virus를 분리하였으며, Crandell 등[10]은 호흡기 증세를 보이는 개에서 유사한 CPIV를 분리, 두 마리의 6주령 자견에 비강내 공격접종하여 경미한 호흡기 증세를 관찰하였다. 임상실험에서 CPIV를 실험견에 공격접종 후, 1주일 동안 상부호흡기에서 CPIV를 분리하였으며 수일간 가벼운 기침 증세를 보였다[5,11].

CPIV를 공격접종한 후 마이코플라즈마와 Bb 또는 Bb만을 비강내로 혼합 공격접종 시 호흡기 증상은 더욱 심하게 나타내었다[1,11]. Wagner[12]은 Bb 감염증상을 보이지 않는 보균견과 미보균견에 CPIV를 공격접종하여 Bb 보균견에서 CPIV와 혼합감염시 임상증상, 방사선적 진단, 폐기능 검사 및 조직병리학적 검사를 통해서 증상이 더욱 악화된 것을 확인하였다.

Bb 사균 백신을 실험견에 2주 간격으로 근육주사한 후 2주일 뒤에 Bb로 공격 접종한 결과 백신을 접종하지 않은 군에 비하여 백신접종군의 임상증상 발현은 5일간 늦춰 졌지만 임상증상과 병리학적 소견을 비교시 감염에 대한 효과적인 방어를 하지 못하였다[3]. 그러나 aluminium hydroxide가 보조제로 첨가된 Bb 사균

백신을 같은 시험방법으로 시행시 효과적인 방어효과를 보였으며 순환혈액 중의 항체가가 거의 동등함을 보아서 보조제가 국소 체액성 면역반응 또는 세포매개성 면역반응을 유도함을 추정할 수 있었다[13]. 비강내 백신접종법은 편리하고 면역을 획득시키는데 안전한 방법으로 알려져 있으며, 부작용이 없고 우수한 방어효과를 나타내었다[14]. Bb-CPIV 생백신의 비강투여는 모체이행 항체에 의한 백신의 면역형성 억제현상을 효과적으로 차단할 수 있어, 특히 자견에 대해서 사용이 권장되고 있다[15]. Shade와 Goodnow[16]는 Bb strain S-55 생백신을 비강내 접종 후 14일 후에 Bb strain D-2로 공격접종한 결과 임상검사에서 기관기관지염이 95% 감소하였으며, 감기증세에 있어서도 백신접종군에서는 그 지속시간이 0.15일로 대조군에서의 9.73일에 비하여 현저히 단축되었다. Bb 생백신을 비강내 접종 후, 시기별로 Bb로 공격접종 시, 임상적으로 48시간 이후에 공격접종한 경우에서 방어효과를 관찰할 수 있었으며 백신접종 후 4일, 5일 및 14일 후에 공격접종한 군에서는 각각 56%, 83% 및 95%의 방어효과를 관측하였다[14]. CPIV-Bb 생백신을 비강내 접종 후 CPIV와 Bb 공격접종을 실시한 실험에서 대조군에 비해 기관기관지염 발생이 96% 감소하였다[1].

본 실험은 Bb와 CPIV 생혼합백신을 비강내 접종한 뒤 Bb와 CPIV를 단독 공격접종 또는 혼합 공격접종을 실시한 후에 백신투여에 따른 임상증상관찰과 더불어 미생물학적 및 조직 병리학적 방법을 이용하여 백신투여에 따른 CIT에 대한 방어효과를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

공시백신

시험에 사용된 kennel cough 백신은 0.4㎖ 당 Bb strain B-C2 $10^{8.3}$ cfu와 CPIV strain Cornell $10^{3.8}$ $TCID_{50}$ 이상되는 Kennel cough (KC) 백신 (NOBIVAC KC, INTERVET)을 사용하였다.

공시동물

생후 5주령의 잡종 자견 24마리를 2주일간 시험장소에서 적응 사육시킨 후, 각 8마리씩 3개의 시험군으로 나누어 Bb공격접종군은 I군, CPIV 공격접종군은 II군, Bb + CPIV 혼합 공격접종군은 III군으로 분류한 뒤, 각 시험군별로 4마리씩 백신접종군과 백신미접종군으로 나누어 시험에 사용하였다. 모든 시험견은 실험전에 Bb와 CPIV에 대해 혈청학적 항체검사와 미생물학적 분리검사를 통하여 Bb와 CPIV에 대해 음성반응을 확인하였다. 실험 전기간 동안 사료와 물은 자유급여하였다.

백신접종

백신은 백신분말과 백신희석액을 혼합한 뒤, 멸균주사기로 0.4㎖를 좌우 비공에 0.2㎖씩 비강 접종하였다.

공격접종

공격접종량은 CPIV strain D008 (AKZO NOBLE, INTERVET 분양)는 $10^{5.5}TCID_{50}$/㎖/puppy이며, Bb strain D-2(AKZO NOBLE, INTERVET 분양)는 $10^{7}CFU$/㎖/puppy이였다. 각각 1.0㎖를 좌우비공에 나누어 접종하였다.

실험설계

실험군은 크게 Bb 공격접종군(I군), CPIV 공격접종군(II군), Bb + CPIV 공격접종군 (III군)으로 나누어 실시하였다. 비강내로 공격접종한 백신미접종군(I-N, II-N 및 III-N)과 0.4㎖의 백신을 비강접종하고 2주 후에 Bb를 비강내로 공격접종한 군(I-V, II-V 및 III-V)으로 각각 구분하여 효능시험을 실시하였다.

실험기간은 총 28일이였으며 백신을 비강으로 접종전, 백신접종한 후 1주와 2주, 공격균주와 공격바이러스주를 비강내에 공격접종한 후 1주와 2주에 혈청검사를 위하여 채혈을 실시하

였으며, 공격균주와 공격바이러스주를 비강내로 공격접종을 한 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14일 이틀 간격으로 총 7회에 걸쳐 비강내에서 멸균된 면봉을 이용하여 시료 채취를 실시하였으며, 공격접종 후 7, 14일에 각 군별로 백신접종군과 백신미접종군에서 2마리씩 부검을 실시하였다(Fig 1).

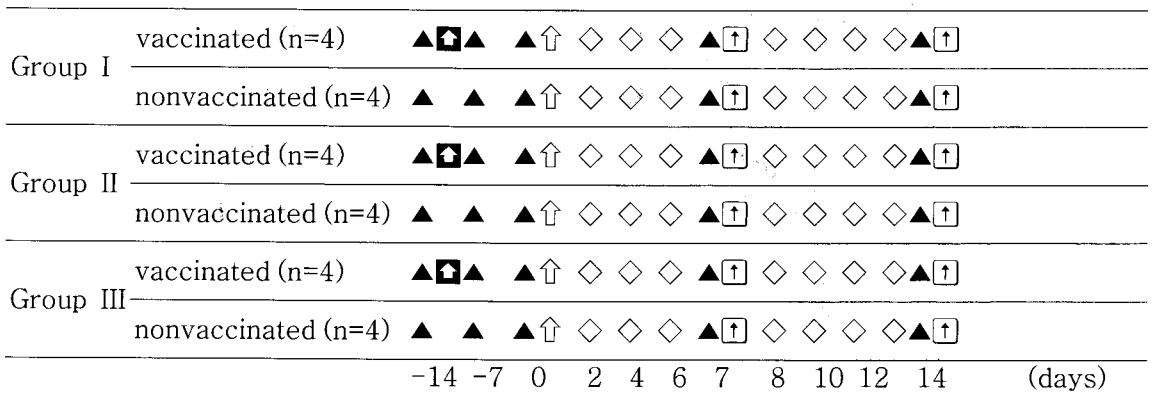


Fig 1. Schematic draws of experimental design

◘ : Puppies were administered with 0.4㎖ KC vaccine by intranasal inoculation.
⇧ : Group I puppies were challenged with *Bordetella bronchiseptica*.
Group II puppies were challenged with canine parainfluenza virus.
Group III puppies were challenged with *Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza virus.
▲ : Blood collection, ◇ : Nasal swab, ↑ : Two puppies were necropsied in each group.

혈청검사

생혼합백신접종 전, 백신접종한 후 1주와 2주, 공격균주와 공격바이러스주를 비강내 공격접종 후 1주와 2주에 혈청을 분리하여 Bb에 대하여는 microagglutination test를, CPIV에 대하여서는 serum neutralization test를 실시하여 시기별 항체역가를 각각 측정하였다.

Bb에 대한 혈청에서의 항체 역가 측정은 실험견으로부터 얻은 혈청을 96 well plate에서 혈청을 2배수 희석하였다. Bb 항원/well을 희석한 혈청에 더한 다음 37℃에서 두 시간 동안 배양하고 실온에서 하루 동안 반응시킨 다음 응집여부를 확인하였다. 응집반응을 일으킨 가장 높은 혈청희석 배수의 역수를 혈청역가로 판독하였다.

CPIV 에 대한 혈청에서의 항체 역가 측정을 위하여 우선 실험견으로부터 얻은 혈청을 분리한 뒤, 96 well plate에서 2배수 희석하였다. CPIV 50-300 $TCID_{50}$/well을 희석한 혈청에 더한 다음 37℃에서 한 시간 동안 배양하였다. 단층이 형성된 Vero cell에 혈청-바이러스 혼합액을 더한 다음, 세포유지 배지를 더하였다. 37℃에서 7일간 배양하며 세포변성효과를 관찰하여 바이러스에 의한 세포변성효과가 일어나지 않은 가장 높은 혈청 희석배수의 역수를 항체역가로 판독하였다.

백신균주와 바이러스주, 공격균주와 바이러스주 분리

생혼합백신을 비강내로 접종한 후에 백신 Bb 균주와 백신 CPIV주를, 공격균주와 공격바이러스주를 비강내로 공격접종을 한 후에 공격 Bb 균주와 공격 CPIV주를 일정한 기간동안 일정한 간격으로 비강내로 멸균된 면봉을 이용하여 비강시료를 채취하였다. Bb 분리시 1㎖의 멸균 생리식염수와 비강시료를 섞은 뒤 10배 계대희석하여 nitrofurantoin(20㎍/㎖)이 함유된 MacConkey 배지에 0.1㎖ 분주하여 배양된 세균의 형태와 그람염색, oxidase와 urease assay를 시행하여 그람음성의 간균으로 oxidase, urease 양성반응을 보이면 Bb로 확인하였다.

CPIV분리를 위해서는 채취한 비강시료를 brain-heart infusion broth에 분주하여 4℃에 1시간 배양한 뒤 Vero cell에 분주, 배양하여 기니픽 적혈구와 혈구침착반응을 시켜 세포변성효과를 확인하였다.

Table 1. Index of clinical sign score (Williams et al)[19]

Temperature	-38℃; 39-39.4℃; 39.5-40℃; 40℃-	2 pts; 1 pt; 2 pts; 3 pts per day
General impression	Anorexia : 1-4 days; 5- days	1 pt; 2 pts
	Anorexia and dehydration : 1-4 days; 5-days	3 pts; 4 pts
Eye	Clear discharge : 1-4 days; 5-days	1 pt; 2 pts
	Mucopurulent discharge : 1-4 days; 5-days	3 pts; 4 pts
Nose	Clear discharge : 1-4 days; 5-days	1pt; 2 pts
	Mucopurulent discharge : 1-4 days; 5-days	3 pts; 4 pts
Respiration	Spontaneous cough with exercise	1 pt per day
	Spontaneous cough at rest	2 pts per day
	Dypsnea	3 pts per day
Palpation trachea / larynx	Slight coughing	1 pt per day
	Severe coughing	2 pts per day
Auscultation	Congestion(nasal)1-4days; 5-days	1 pt; 2 pts
	Dry rales 1-2days; 3-days	1 pt; 2 pts
	Moist rales 1-2days; 3-days	2 pts; 3 pts
	Solid area(no sound)	2 pts per day

임상검사 및 병리학적 검사

임상증상

실험견은 시험기간 동안 전신증상(normal, depressed, dehydrated), 눈과 코의 점막충혈과 출혈 및 눈물과 비루(normal, clear discharge, mucopurulent discharge), 호흡곤란(normal, spontaneous coughing with exercise, spontaneous coughing at rest, dyspnea), 기침(normal, slight coughing, severe coughing) 등의 임상증상을 매일 일정한 시간에 관찰하여 clinical sign index에 따라 채점, 기록하였다(Table 1).

육안검사

실험견은 실험종료시 2.2㎎/㎏ ketamine (Katala®, 유한양행)과 3.5㎎/㎏ xylazine (Rompun®, 한국바이엘)으로 마취시킨 후 H_2SO_4 포화수용액으로 안락사 시킨 뒤 부검을 실시하여 육안소견을 관찰하였다.

병리조직학적 검사

육안소견으로 병변을 보이는 폐장, 기관, 비갑개의 조직은 10% neutral buffered formalin에 고정하여 파라핀 포매과정을 거친 뒤 4㎛ 두께로 조직절편을 제작한 다음 hemato-xylin & eosin (H&E) 염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학적 검사

자견에 KC 백신을 비강내 투여한 후 Bb와 CPIV를 공격접종시 효과적인 방어에 대한 국소면역의 형성 여부와 기관, 폐장에서 CPIV 항원분포를 알아보기 위해 ABC법을 이용하여 primary antibody로는 1 : 50으로 희석된 mouse anti-CPIV antibody (Biocortex, USA)를 사용하여 면역조직화학적 검사를 실시하였다.

결 과

신생자견의 주요 호흡기질병인 기관기관지염에 대한 비강내 백신투여의 방어효과를 관찰하기 위하여 신생자견에 Bb와 CPIV 생혼합백신을 비강내 투여하고 Bb 또는 CPIV를 각각 단독 또는 혼합 공격접종하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Table 2. Evaluation of serum antibody titers against *Bordetella bronchiseptica,* canine parainfluenza virus after vaccination and challenge

A (*Bordetella bronchiseptica*)

Group	Vaccination	Challenge	After vaccination		After challenge	
			before	2 weeks	1 week	2 weeks
I	+	Bb	<8	255.8	304.0	1024.0
	−	Bb	<8	<8	180.7	361.4
II	+	CPIV	<8	214.7	152.0	90.3
	−	CPIV	<8	<8	<8	<8
III	+	Bb + CPIV	<8	214.7	361.4	1479.1
	−	Bb + CPIV	<8	<8	214.7	256

B (Canine parainfluenza virus)

Group	Vaccination	Challenge	After vaccination		After challenge	
			before	2 weeks	1 week	2 weeks
I	+	Bb	<2	45.1	38.0	32
	−	Bb	<2	<2	<2	<2
II	+	CPIV	<2	63.9	53.7	180.7
	−	CPIV	<2	<2	26.8	90.3
III	+	Bb + CPIV	<2	76.0	90.3	361.4
	−	Bb + CPIV	<2	<2	31.9	64.0

A. Geometric mean titers against Bb. B. Geometric mean titers against CPIV.

혈청검사결과

백신접종 전 모든 실험군의 Bb에 대한 항체역가는 8 이하를 나타내었다. 백신 접종 2주 후 각 군에서 백신접종군의 Bb에 대한 항체역가는 214.7-255.8을 나타냈다, 백신미접종군은 8 이하를 나타내었다. 백신 후 Bb를 단독 또는 Bb+CPIV를 혼합하여 공격접종한 군은 공격접종 2주 후에 항체역가가 각각 1024.0과 1479.1을 나타냈다

백신접종 전 모든 실험군의 CPIV에 대한 항체역가는 2 이하로 나타났다. 백신 접종 2주 후 각 군에서 백신접종군의 항체역가는 45.1-76.0을 나타내었고, 백신미접종군은 2 이하를 나타내었다. 백신 후 CPIV 단독 또는 Bb + CPIV를 공격접종한 군은 공격접종 2주 후에 항체역가는 각각 180.7과 361.4로 나타났다 (Table 2).

백신균주와 바이러스주 및 공격균주와 바이러스주 분리

생혼합백신을 비강내로 접종한 후에 백신 Bb 균주와 백신 CPIV주를, 공격균주와 공격바이러스주를 비강내로 공격접종을 한 후에 공격 Bb 균주와 공격 CPIV주를 일정한 기간동안 일정한 간격으로 비강내로 멸균된 면봉을 이용하여 시료를 채취한 후 실험실내에서 분리하였다.

백신 접종 후 공격접종한 Bb는 Bb를 공격접종한 각 군에서 검출되었으나, I-V에서 Bb가 분리되는 기간을 일부 단축시켰고, 배양된 균수에 있어서도 I-V가 I-N에 비하여 적게 나타났다.

백신접종 2주 후에 각 백신군에서 백신한 CPIV는 분리되지 않았다. 백신 후 CPIV는 II-V와 III-V는 접종 후 6일까지 CPIV가 분리되었다. 백신을 접종하지 않은 군의 경우 II-N 또는 III-N의 경우 접종 후 10일 후까지 바이러스가 분리되었다(Table 3).

Table 3. Reisolation of *Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza virus after challenge

A (*B bronchiseptica*)

Groups	Vaccination	Challenge	Days after challenge						
			2	4	6	8	10	12	14
Group I	+	Bb	4/4[1]	4/4	4/4	2/2	2/2	1/2	1/2
	−	Bb	4/4	4/4	4/4	2/2	2/2	2/2	2/2
Group II	+	CPIV	0/4	0/4	0/4	0/2	0/2	0/2	0/2
	−	CPIV	0/4	0/4	0/4	0/2	0/2	0/2	0/2
Group III	+	Bb + CPIV	4/4	4/4	4/4	1/2	1/2	1/2	0/2
	−	Bb + CPIV	4/4	4/4	4/4	2/2	2/2	1/2	1/2

B (Canine parainfluenza virus)

Groups	Vaccination	Challenge	Days after challenge						
			2	4	6	8	10	12	14
Group I	+	Bb	0/4[1]	0/4	0/4	0/2	0/2	0/2	0/2
	−	Bb	0/4	0/4	0/4	0/2	0/2	0/2	0/2
Group II	+	CPIV	4/4	3/4	1/4	0/2	0/2	0/2	0/2
	−	CPIV	4/4	4/4	4/4	2/2	1/2	0/2	0/2
Group III	+	Bb + CPIV	4/4	3/4	2/4	0/2	0/2	0/2	0/2
	−	Bb + CPIV	4/4	4/4	4/4	2/2	2/2	0/2	0/2

A[1] = No of puppies detected with Bb /No of puppies tested
B[1] = No of puppies detected with CPIV /No of puppies tested

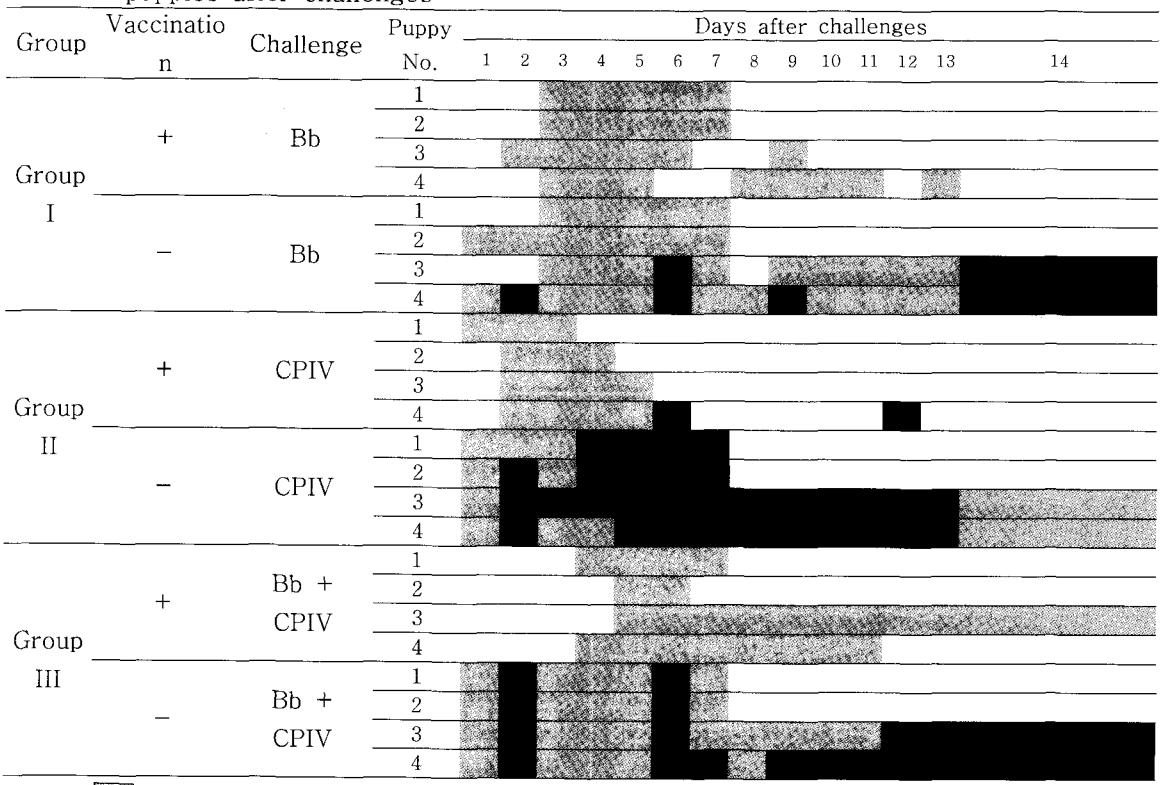
임상검사와 병리학적 검사결과

1) 임상증상

I-V와 II-V는 공격접종 후 비루와 눈물을 관찰할 수 있었으나 시간이 경과할수록 호전되었다. I-N와 II-N은 유백색의 장액성 맑은 비루와 눈물이 관찰되었으나 시간이 지날수록 황백색의 점도가 있는 점액화농성 비루와 눈물이 관찰되었다. III-V은 전반적으로 공격접종한 다음에 임상증상이 늦게 발현되었으며 유백색 장액성 비루와 눈물을 관찰할 수 있었고 시간이 경과하면서 1두는 점액화농성 비루와 눈물을 보였으나 다른 1두는 증상이 호전되었다. III-N은 공격접종한 후 초반부터 장액성의 비루와 눈물이 나타났으며, 시간이 경과할수록 증상이 심화되었다 (Table 4).

평균 임상증상지수합계 결과, 공격접종 후 7일간 측정시 I, II, III 군의 백신접종군은 각각 3.25, 7.5, 3인 반면, 백신미접종군은 각각 8, 24, 13.75를 나타내었다. 공격접종 후 14일간의 측정시 I, II, III 군의 백신접종군은 각각 5.5, 11, 10인 반면, 백신미접종군은 각각 18, 41, 27.5를 나타내어 백신접종군이 백신미접종군에 비해 평균 임상증상지수 치가 낮았다 (Fig 2, 3).

Table 4. Frequency and duration of clinical signs in the vaccinated and unvaccinated puppies after challenges



육안검사소견

생혼합백신을 비강접종한 다음 공격균주와 공격바이러스주를 접종한 후 1주와 실험종료시에 각 군당 2마리씩을 종료시에 부검하여 비강점막, 기관, 폐 등의 호흡기계를 육안적으로 검사하였다.

I-V, II-V & III-V에서 모두 비강점막의 가벼운 충혈을 보였고 폐장에 자적색의 1-3㎜의 반점들이 관찰되었다. 공격접종후 2주의 육안검사에서는 폐장에서만 담자적색의 직경 1-2㎜크기의 반점이 횡경막엽 표면에서 소수가 관찰되었다. I-N, II-N & III-N에서는 공격접종한 후 7일 후에는 비강점막은 자적색으로 발적, 종창되었고 비강내에는 황색의 끈적한 내용물이 붙어 있었다. 후두와 기관의 점막도 발적되었으며 황색의 끈적한 내용물이 기관지 가지의 내강까지 계속하여 관찰되었다. 폐장은 소엽성 내지 아대엽성의 자적색 경화소가 관찰되었고 흉막면에는 직경 2-3㎜크기의 적색 반점소들도 산재해 있었다. 공격접종한 후 2주의 육안소견으로는 1주의 육안소견보다 완화되었으나 기관강내에는 소량의 황백색의 끈적한 내용물이 들어 있었다. 폐에는 자적색 경화소와 흉막면에 회녹색의 반점들도 관찰되었다.

모든 실험군에 있어서 전반적으로 Bb 공격균주와 CPIV 공격바이러스주를 공격접종한 후 백신미접종군이 백신접종군에 비하여 육안적으로 심한 병리학적 소견을 보였으며, 공격접종한 후 1주의 병리학적 소견은 공격접종한 후 2주에 완화되는 경향을 나타내었다(Table 5).

I-V, II-V & III-V는 접종후 1주에 비강, 기관과 폐에서 모두 가벼운정도의 충혈이 관찰되었고 비강에서는 소수의 림프구의 침윤, 기관에서는 상피세포와 술잔세포의 가벼운 정도의 증식이 관찰되었다. I-V,에서는 소수의 호중구의 침윤, II-V에서는 림프구의 침윤 그리고 III-V에서는 호중구와 림프구의 침윤이 관찰되었다. 폐는 기관지와 세기관지 상피세포의 증식과 변성이 나타났으며, 일부의 강내에는 점액성 염증성 삼출물과 호중구가 침윤되어 관찰되었다. 일부 폐포벽은 비후와 호중구와 폐포큰포식세포가 침윤되어 있었다. 공격접종한 후 2주에 기관 점막하직층에서 가벼운 정도의 림프구가 침윤되었고, 폐장에서는 일부의 기관지와 세기관지 주위에 소수의 호중구와 림프구의 침윤이 관찰되었다.

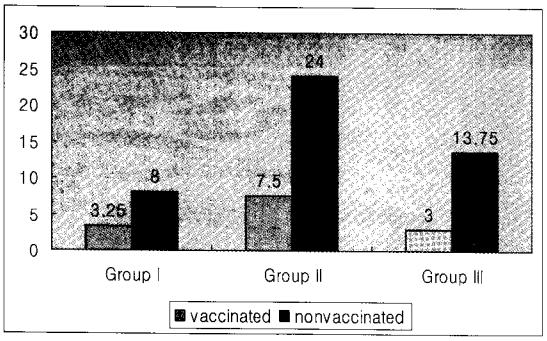


Fig 2. Mean score of clinical sign for 7 days after challenges

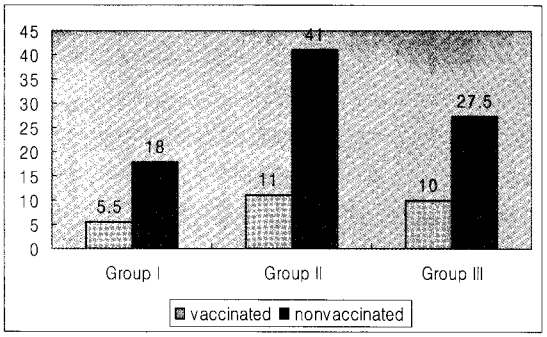


Fig 3. Mean score of clinical sign for 14 days after challenges

Table 5. Gross pathological findings in the respiratory tract of puppies after challenges

Groups	Vaccination	Challenge	Necropsy after challenge (week)	Gross pathological findings*		
				Rhinitis	Tracheitis	Pneumonia
Group I	+	Bb	1st	+(1/2)[1]	+(1/2)	+(1/2)
			2nd	±(0/2)	±(0/2)	+(0/2)
	-	Bb	1st	++(2/2)	++(2/2)	+++(2/2)
			2nd	+(2/2)	++(2/2)	+(2/2)
Group II	+	CPIV	1st	+(1/2)	±(0/2)	+(1/2)
			2nd	±(0/2)	±(0/2)	+(0/2)
	-	CPIV	1st	++(2/2)	++(2/2)	++(2/2)
			2nd	+(2/2)	+(2/2)	+(2/2)
Group III	+	Bb+CPIV	1st	+(1/2)	+(1/2)	+(1/2)
			2nd	±(0/2)	±(0/2)	±(1/2)
	-	Bb+CPIV	1st	++(2/2)	++(2/2)	+++(2/2)
			2nd	+(2/2)	++(2/2)	++(2/2)

* The degree of gross pathological changes : -;Within normal limits, ±;Slight, +;Mild, ++;Moderate, +++; Severe. [1] :No of positive puppies/No of puppies tested

공격접종한 후 7일에 I-N에서는 비강과 기관은 충혈과 주위의 수종소견을 보였으며 호중구의 침윤이 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 또한 두군 모두에서 상피세포와 술잔세포의 증식과 비후, 일부 섬모상피세포는 섬모의 소실, 세포질내의 공포변성, 괴사 및 탈락을 보였고, 강내에는 염증성 삼출물 및 주로 호중구와 큰포식세포 등이 관찰되었으며 선상피세포의 증생, 변성, 괴사 및 탈락과 주위에는 호중구가 침윤되어 있었다. Bb 백신미접종군의 폐장은 전형적인 기관지폐렴 소견을 보였다. II-N & III-N에서는 비강과 기관에서 호중구와 림프구의 침윤을 관찰할수 있었으며 폐장은 기관지 폐렴과 간질성 폐렴소견이 함께 보였다. 나머지 다른 소견은 I-N과 비슷하게 관찰되었다. 공격접종한 후 2주의 비강점막의 충혈, 상피세포의 증생, 선조직의 내강이 확장되어 상피세포는 위축되어 있었다. 기관 점막상피세포의 재생이 관찰되었으며 폐장은 1주의 소견에 비하여 완화되어 관찰되었으며 기관지와 세기관지의 상피세포는 재생이 확인되었다.

모든 실험군에 있어서 전반적으로 Bb 공격균주와 CPIV 공격바이러스주를 공격접종한 후 백신미접종군이 백신접종군에 비하여 심한 병리조직학 소견을 보였으며, 공격접종한 후 2주에 관찰된 병리학적 소견은 공격접종한 후 1주에 비하여 상당히 완화된 경향을 나타내었다(Table 6).

Table 6. Histopathological findings in the respiratory tract of puppies after challenges

Groups	Vaccination	Challenge	Necropsy after challenge (week)	Histopathological findings*			
				Rhinitis	Tracheitis	Broncho-pneumonia	Interstitial pneumonia
Group I	+	Bb	1st	+(1/2)[1]	+(1/2)	+(1/2)	-(0/2)
			2nd	±(0/2)	+(0/2)	±(0/2)	-(0/2)
	-	Bb	1st	++(2/2)	++(2/2)	++(2/2)	-(0/2)
			2nd	+(2/2)	++(2/2)	+(2/2)	-(0/2)
Group II	+	CPIV	1st	+(1/2)	+(1/2)	±(1/2)	+(1/2)
			2nd	±(0/2)	±(0/2)	-(0/2)	±(0/2)
	-	CPIV	1st	++(2/2)	++(2/2)	+(2/2)	+++(2/2)
			2nd	+(2/2)	+(2/2)	±(2/2)	++(2/2)
Group III	+	Bb+CPIV	1st	++(1/2)	+(1/2)	+(1/2)	+(1/2)
			2nd	+(0/2)	+(0/2)	+(1/2)	±(1/2)
	-	Bb+CPIV	1st	++(2/2)	++(2/2)	++(2/2)	++(2/2)
			2nd	+(2/2)	+(2/2)	+(2/2)	+(2/2)

*The degree of histopathological changes. : -; Within normal limits, ±; Slight, +; Mild, ++; Moderate, +++; Severe [1]:No of positive puppies/No. of puppies tested

4) 면역조직화학적 검사소견

자견에 생혼합백신을 비강내투여한 후 공격접종한 CPIV의 항원을 기관과 폐장에서 검출하고자 면역조직화학염색을 실시하였다. CPIV를 공격접종한 II, III군의 백신접종군에 비해서 백

신미접종군에서 CPIV 항원에 강한 양성반응을 나타내었다(Table 7). CPIV 항원은 기관과 폐장의 점막조직과 점막하조직에서 주로 관찰되었다(Fig 4, 5).

Table 7. Immunohistopathological findings of CPIV antigens in the respiratory tract of puppies after challenges

Groups	Vaccination	Challenge	Immunohistopathological findings*	
			Trachea	Lung
Group I	+	Bb	-(0/4)[1]	-(0/4)
	-	Bb	-(0/4)	-(0/4)
Group II	+	CPIV	±(0/4)	+(1/4)
	-	CPIV	++(2/4)	+++(3/4)
Group III	+	Bb+CPIV	+(1/4)	+(2/4)
	-	Bb+CPIV	++(2/4)	+++(3/4)

The degree of histopathological changes. : -; Within normal limits, ±; Slight, +; Mild, ++; Moderate, +++; Severe. [1] : No of positive puppies/No of tested puppies (X100)

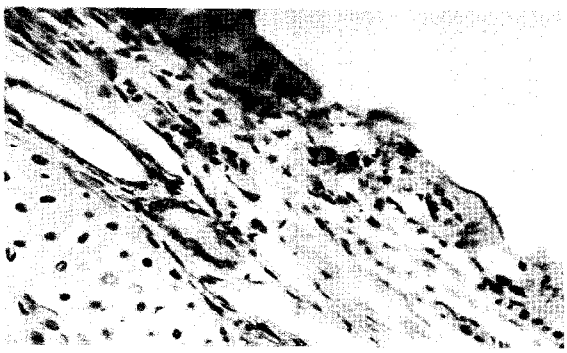


Fig 4. CPIV antigens are observed in the mucosal epithelium of trachea from unvaccinated puppy, ABC, ×400.

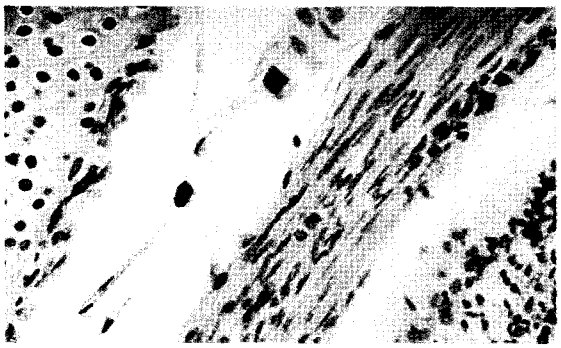


Fig 5. CPIV antigens are observed in the submucosa of lung from unvaccinated puppy, ABC, ×400.

고 찰

본 연구에서 비강내 Bb와 CPIV를 공격접종함으로써 자견에 호흡기 질환이 유발되는 것을 확인하였으며 이에 따른 호흡기 질환 감염을 예방 백신을 투여한 다음 공격접종시 그에 따른 호흡기 질환의 경감을 확인할 수 있었다.

Bb-CPIV 생혼합 백신의 비강내 투여는 국소 분비성 항체(IgA)와 전신 항체(IgG)의 생성을 유발하여 전염성 기관기관지염의 예방효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[15]. McCandlish와 Thomson[6]은 Bb 사독 백신을 비경구 투여 후, 백신접종에 따른 전신 면역 반응으로 고역가의 순환 응집항체가 형성되었으나 공격접종시 효과적인 방어효과를 기대하였으나 국소 면역 방어효과는 확인되지 않았다. Bb 생약독화 백신을 경구투여하면 숙주는 면역력을 획득하기 시작하면서 secretary IgA(sIgA) 항체가 형성되어 그 결과, 백신접종 후 2-3 주 동안 sIgA 평균 항체 역가가 1:64 으로 상승

되면 Bb 공격접종시 50% 정도의 방어효과를 나타내며, 1:157 이상 상승하면 95% 이상의 방어효과를 나타냈으며 sIgA가 상승하면 Bb 검출률도 감소하는 것으로 보고되었다[14]. Kontor 등1)은 백신의 비강내 투여와 비경구 투여 후 CPIV 공격접종시 체액성 항체역가를 조사한 결과 유사한 항체가를 나타냈으나 비강내 투여시 CPIV의 분리기간이 단축되었다. 이는 체액성 항체 반응 이외의 요인에 의해 바이러스 분리가 억제되며, Bey 등[14]이 보고한 결과와 같이 세포성 면역 반응이 병원체 감염 방어에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 본 실험의 혈청학적 검사에서 백신접종군의 경우 백신미접종군에 비해 Bb와 CPIV에 대한 항체역가가 공격접종 이전부터 공격접종 후까지 지속적으로 높은 수치를 보였으며 비강내에서 바이러스와 세균 분리 기간이 단축되었다. 이러한 결과는 비강내 백신접종이 국소 면역 반응을 유도하여 호흡기계 점막조직의 섬모에 의한 바이러스와 세균의 clearance를 유도한 결과라고 사료된다.

Bb 감염시 주요 임상증상은 건성 기침이며 심한 경우 발작성 기침이 유발되며 점액 화농성 비루가 나타난다[6,7]. CPIV 감염시 상부와 하부 호흡기 감염에 의한 기침, 쉰목소리(hoarseness), 비염, 발열 등의 증상이 나타난다[12,13,17]. Bb와 CPIV를 혼합 공격접종시에는 위에서 서술한 증세와 함께 식욕부진과 기면 증세를 동반하기도 하며 kennel cough 증세가 연장되는 상승작용이 일어난다[1,12]. 본 실험의 임상 증상 관찰에서는 전반적으로 각 공격접종군의 백신미접종군에서는 기관기관지염의 특징적인 증상을 공격접종 후 14일간 관찰되었으나, 백신접종군에서는 증상 발현이 늦게 나타났으며 증상 정도는 백신미접종군에 비해 정도가 미약했다. 시간이 경과할 수록 증상이 완화되었다. 이는 백신접종에 의한 면역력 획득이 공격접종에 따른 중증의 증세를 완화시키는 것으로 사료된다.

Bb 감염시 육안적 부검 소견은 기관기관지 점막의 충혈과 점액화농성 삼출물이 관찰되는 기관기관지염이 특징이다. 종대된 폐장에서 작은 적색 병소와 충혈소견이 산발적으로 관찰되며 기관지와 인두뒤 림프절의 부종이 관찰되었다[6,18]. CPIV 감염시 육안적 소견으로 주기관지 분지부 주위에 견고하고 둔탁한 회색-녹색의 병소가 산재하며 폐장의 절개면에서 경화부위가 관찰되었다[5]. Bb와 CPIV 혼합감염시 육안적 소견으로 후두기관기관지염, 세기관지염, 기관지 림프절의 증생과 기관지 폐렴이 관찰되었다[12]. 본 실험의 육안적 병리학적 소견은 모든 실험군에 있어서 전반적으로 Bb 공격균주와 CPIV 공격바이러스주를 공격접종시 백신미접종군이 백신접종군에 비하여 위 문헌에서 서술된 것과 동일한 심한 병리학적 소견을 보였으며, 공격접종한 후 1주의 병리학적 소견이 공격접종한 후 2주에는 그 정도가 상당히 완화되었다.

Bb 감염시 조직병리학적 소견은 호흡기 전반에 걸쳐 점막층에 다형핵 백혈구의 침착이 관찰되며, 특히 비갑개와 기관 및 기관지에 두드러지게 나타난다. 심한 경우 화농성 비염 및 기관지염이 나타난다[7]. 기관, 기관지 섬모상피에 그람 음성 세균이 부착된 것이 관찰되며 섬모상피에 화농성 삼출물이 유착되어 섬모의 활동이 억제되기고 하며 괴사가 관찰된다[4]. CPIV 감염시 조직병리학적 소견으로 후두, 기관과 주기관지에 림프구와 단핵구의 침윤이 나타나며, 호흡기도에 염증세포 침윤과 더불어 섬모상피의 탈락이 나타난다[12]. 폐포 중격세포의 증식과 더불어 폐포내 단핵구로 구성된 삼출물이 침착된 간질성 폐렴소견을 나타내며, 기관지 상피세포 증생과 더불어 기관지 주위 조직에 염증세포로 침윤된 급성 기관지염 소견이 나타난다[5]. Bb와 CPIV 혼합감염시 호흡기도 주위에 염증 반응이 단독 감염에 의한 것보다 심하게 나타나며 호중구와 단핵구의 침윤이 세기관지 주위와 폐포에 현저하게 나타나는 세기관지염이 관찰되며 그람 음성 간균의 점막면 부착이 관찰되기도 한다[13,19]. 본 실험의 조직병리학적 검사에서는 모든 실험군에 있어서 전반적으로 Bb 공격균주와 CPIV 공격바이러스주를 공격접종한 후 백신미접종군이 백신접종군에

비하여 위 문헌의 서술한 동일한 심한 병리조직학 소견을 보였으며, 공격접종한 후 1주의 병리학적 소견이 공격접종한 후 2주의 소견에 비하여 심하게 관찰되었다.

본 실험은 실험적으로 공격접종에 의한 전염성 기관기관지염 증세의 특성과 백신의 효능을 살펴본 바 이와 같은 결과를 토대로 Bb와 CPIV 생혼합 백신의 비강내 투여가 개 전염성 기관기관지염 감염에 대해 효과적인 방어효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

자견에서 많은 피해를 주고 있는 호흡기질병인 전염성 기관기관지염의 원인체인 Bb와 CPIV에 대한 예방대책으로 Bb와 CPIV 생혼합백신의 비강내 투여 효과에 대해 검사하였다.

Bb와 CPIV 생혼합백신을 5주령 자견에 비강접종한 후에 Bb와 CPIV를 비강내로 공격접종을 하여 예방효과를 보기 위하여 혈청검사와 백신의 균주와 독주 그리고 공격 균주와 독주의 분리, 임상증상과 병리학적 검사를 하였다.

혈청검사에서 Bb와 CPIV에 대한 백신접종 2주 후에 항체역가는 각각 214.7-255.8과 45.1-76.0을 나타내었고, 백신접종 후 Bb 단독 또는 Bb+CPIV를 혼합하여 공격접종한 군은 공격접종 2주 후는 각각 1024.0과 1479.1로 상승되었고, CPIV 단독 또는 Bb+CPIV를 공격접종한 군의 공격접종 2주 후에는 각각 180.7과 361.4로 나타나 CPIV 공격바이러스주와 Bb 공격균주에 대한 방어역가가 형성되었음을 알 수 있었다.

백신의 균주와 독주 및 공격 균주와 바이러스주의 분리에서는 백신접종 후 공격접종한 Bb는 Bb를 공격접종한 군에서 검출되었으나, 백신접종한 군에서 Bb가 분리되는 기간을 일부 단축시켰고, 배양된 균수에서 백신접종군이 백신미접종군에 비하여 적게 나타났다. 백신접종 2주 후, 백신바이러스주 CPIV는 분리되지 않았고 백신접종 후 CPIV를 단독 또는 CPIV + Bb를 혼합하여 공격접종한 군은 백신접종을 하지 않은 군보다 바이러스 분리기간을 단축시킬 수 있었다.

임상증상과 백신부작용에서는 백신접종 후 공격접종한 군은 백신미접종군에 비하여 전염성 기관기관지염의 특징적인 임상증상이 완화되었고 백신부작용은 관찰할 수 없었다.

병리학적 소견에서는 백신접종을 하지 않고 공격접종한 군은 백신접종군에 비하여 심한 육안소견과 병리조직학 소견을 보였으며, 공격접종한 후 1주의 소견이 공격접종한 후 2주의 소견보다 심하게 관찰되었다.

감사의 글

This work was supported by the Ministry of Commerce, Industry and Energy(MOCIE) / Korea Institute of Industrial Technology Evaluation and Planning(ITEP) Through the Regional Animal Industry Center at Jinju National University, Jinju, Korea

참고문헌

1. Kontor EJ, Wegrzyn RJ, Goodnow RA. 1981. Canine infectious trachebronchitis: Effects of an intranasal live canine parainfluenza-*Bordetella bronchiseptica* vaccine on viral shedding and clinical tracheornchitis (kennel cough). *Am J Vet Res* 42(10) : 1694 - 1698.
2. Ford RB, Vaden SL. 1978. *Canine infectious tracheobronchitis*: Greene CE. 2006. 3 eds. Infectious disease of the dog and cat. Philadelphia WB Saunders Co : 256-265.
3. McCandlish IA, Thompson H, Wright NG. 1976. Kennel cough: Vaccination against *Bordetella bronchiseptica* infection. *Vet Rec* 98(8) : 156-157.
4. Bemis DA, Greisen HA, Appel MJ.

1977. Pathogenesis of canine bordetellosis. *J Infect Dis* 135(5): 753-762.
5. Rosenberg FJ, Lief FS, Todd JD, et al. 1971. Studies of canine respiratory viruses: Experimental infection of dogs with an SV-5 like canine parainfluenza agent. *Am J Epidemio* 94(2): 147-165.
6. Thompson H, McCandlish IA, Wright NG. 1976. Experimental respiratory disease in dogs due to *Bordetella bronchiseptica*. *Res Vet Sci* 20(1) : 16-23.
7. Wright NG, Thomson H, Taylor D, et al. 1973. *Bordetella bronchiseptica*: A re-assessment of its role in canine respiratory disease. *Vet Rec* 93(18): 486-487.
8. Binn LN, Eddy GA, Lazar EC, et al. 1967. Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory diseases. *Proc Soc Exp Biol Med* 126 (1):140-145.
9. Binn LN, Lazar EC, Rogul M, et al. 1968. Upper respiratory disease in military dogs: Bacterial, mycoplasma, and viral studies. *Am J Vet Res* 29 (9) : 1809-1815,
10. Crandell RA, Brumlow WB, Davison VE. 1968. Isolation of a parainfluenza virus from sentry dogs with upper respiratory disease. *Am J Vet Res* 29(11) : 2141-2147.
11. Appel MJ, Percy DH. 1970. SV-5-like parainfluenza virus in dogs. J *Am Vet Med Assoc* 156(12):1778-1781.
12. Wagner JS, Sobonya R, Minnich L. et al. 1984. Role of canine parainfluenza virus and *Bordetella bronchiseptica* in kennel cough. *Am J Vet Res* 45(9) : 1862-1866.
13. Lemen RJ, Quan SF, Witten ML, et al. 1990. Canine parainfluenza type 2 bronchiolitis increases histamine responsiveness in beagle puppies. *Am Rev Respir Dis* 141(1):199-207.
14. Bey RF, Shade FJ, Goodnow RA, et al. 1981. Intranasal vaccination of dogs with live avirulent *Bordetella bronchiseptica*: Correlation of serum agglutination titer and the formation of secretary IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis. *Am J Vet Res* 42(7) : 1130-1132.
15. Keil DJ, Fenwick B. 1998. Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 212(2):200-207.
16. Shade FJ, Goodnow RA. 1979. Intranasal immunization of dogs against *Bordetella bronchiseptica*-induced tracheobronchitis(kennel cough) with modified live-*Bordetella bronchiseptica* vaccine. *Am J Vet Res* 40 (9) : 1241-1243.
17. Emery JB, House JA, Bittle JL. et al. 1976. A canine parainfluenza viral vaccine : Immunogenicity and safety. *AM J Vet Res* 37(11) : 1323-1327
18. McCandlish IA, Thompson H, Wright NG. 1978. Vaccination against *Bordetella bronchiseptica* infection in dogs using a heat-killed bacterial vaccine. *Res Vet Sci* 25(1) : 45-50.
19. Williams J, Laris R, Gray AW, et al. 2002. Studies of the efficacy of a novel intranasal vaccine against feline bordetellosis. *Vet Rec* 150(14) : 439-442.