

Bordetella 感染症의 血清學的診斷: 특히 保菌豚檢索을 위한 急速平板凝集反應의 實用化

康 炳 奎

全南大學校 農科大學

緒 論

飼料効率의 低下로 養豚界에 크다란 經濟的 損失을 끼치고 있는 慢性呼吸器疾患의 하나인 豚의 傳染性萎縮性鼻炎(Infectious atrophic rhinitis of swine, 以下 AR이라 略稱)이 *Bordetella bronchiseptica*(以下 B 菌이라 略稱)에 依한 感染病으로서의 位置가 確立된 以來^{4-7,21,22} 最近에 이르러서는 本疾患의 發生豫防策의 確立, 특히 保菌豚의 摘發,^{14,15,19} 有効한 vaccine의 開發^{10,18}, 그리고 B 菌의 感染 내지는 免疫機序의 究明 등^{9-12,16,27}에 關心이 이끌어 지고 있다.

著者 등^{14,15,28}은 臨床의 所見에 의하여 AR이라 診斷된 241例의 野外感染例 가운데의 173例(71.7%)에서 B 菌을 分離檢出하였고, 또 剖檢時 鼻腔病變이 뚜렷한 135例中 110例(77.3%)의 血清에서 B 菌에 對한 凝集抗體의 存在를 證明하여 B 菌이 AR의 主要한 原因菌으로 判여하고 있음을 밝힌 바 있다. 한편 試驗管法凝集反應(buillon法)(以下 試驗管法이라고 함)에 의한 實驗室內診斷이 感染豚摘發에 尤호하게 應用할 수 있으며, 그리고 鼻腔筋骨部位에서 唾로는 菌檢出이 陽性이었던 事實로, 繁殖杜豚이 重要한 感染源이 되고 있음을 指摘한 바 있다.^{14,15}

疾病對策은 보다 빠르고 確실한 診斷法의 確립이 그 근본이며, 또 가장 먼저 해결하여야 할 問題이다. 위 에 記述한 바와 같이 繁殖杜豚가운데에서 保菌豚을

摘發함과 동시에 이를 淘汰시킴이 AR의 發生豫防에 效果적인 方法이라 생각되어 本報에서는 AR에 對한 野外에서의 血清學的診斷法을 確립할 目的으로 우선 急速平板凝集反應(以下 平板法이라 함) 診斷用抗原液의 製作條件과 그 保存이 反應성에 미치는 影響, 平板法의 反應出現時間 그리고 平板法과 試驗管法凝集價 및 病變程度와 凝集價와의 關係성을 比較檢討하여 그 概要를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

供試菌株: AR自然感染豚分離由來의 *Bordetella bronchiseptica*, W-1029株(1相菌)를 使用하였다.

供試血清: 臨床所見上 AR症狀를 나타낸 自然感染豚 4例를 약 3個月間 사육하면서 凝集抗體의 推移를 平板法 및 試驗管法으로 관찰하였다. 또한 肥育中 또는 屠場出荷豚의 血清으로 試驗管法에 陽性을 나타낸 200例의 血清에 대하여 平板法으로 檢討하였다. 對照陽性血清은 上記菌株로 家兎에 免疫시킨 抗 *Bordetella*-K(生菌免疫) 血清과 對照陰性血清으로는 HPCD(hysterectomy produced colostrum deprived)豚血清(日本家衛試)을 供試하였다.

凝集反應: 平板法診斷用抗原은 Trypticase soy agar (Eiken)에 말血液을 5%로 加한 血液寒天培地에 37°C 48時間培養菌을 生理食鹽水에 20mg/ml로 부유시켜 다음과 같이 區分하여 이를 處理하였다. 즉 ① 培養菌을

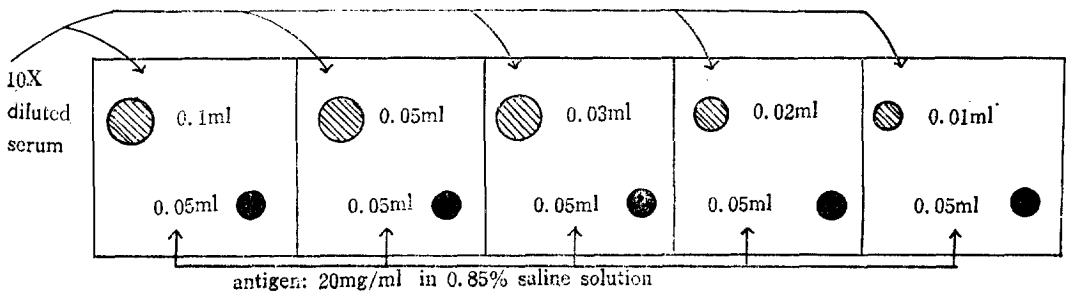


Fig. 1. Method of rapid plate agglutination test.

Table 1. Agglutinability of *Bord. bronchiseptica*. W-1029 Strains, Phase I Organism Prepared by the Various Treatment

Antigen Treatment	Test Serum*	Plate Agglutination**				
		0.1.	0.05	0.03	0.02	0.01
None (Living Antigen)	Naturally infected pig serum-69	##	##	##	+	—
	Naturally infected pig serum-121	##	##	##	##	##
	Immune rabbit serum anti-K	##	##	##	##	##
	HPCO pig serum-1	—	—	—	—	—
	HPCO pig serum-2	—	—	—	—	—
Formalin-killed (Formalin Antigen)	Naturally infected pig serum-69	##	##	##	##	—
	Naturally infected pig serum-121	##	##	##	##	##
	Immune rabbit serum anti-k	##	##	##	##	##
	HPCO pig serum-1	—	—	—	—	—
	HPCD pig serum-2	—	—	—	—	—
Merthiolate-killed (Merthiolate Antigen)	Naturally infected pig serum-69	##	##	##	+	—
	Naturally infected pig serum-121	##	##	##	##	##
	Immune rabbit serum anti-K	##	##	##	##	##
	HPCD pig serum-1	—	—	—	—	—
	HPCD pig serum-2	—	—	—	—	—

* Sera of AR naturally infected pig which showed the AG titers were 1 : 2560 in No. 69 and 1 : 10240 in No. 121 by the tube agglutination test. Rabbit immune serum of anti-K which showed the AG titer was 1 : 10240. Hysterec tomy produced colostrum deprived(HPCD) pig sera was used as a negative control.

** Numerals in table shows the volume of test serum which diluted in 1 : 10.

Table 2. Agglutinability of *Bord. bronchiseptica*, W-1029 Strain, Phase I Organism after Storing at 4°C on the Plate Agglutination.

Antigen Treatment	Test Serum*	Storing(in weeks)					
		1	4	6	8	9	10
None (Living Antigen)	Naturally infected pig serum-69	+	+	+	+	+	+
	Naturally infected pig serum-121	+	+	+	+	+	+
	Immune rabbit serum anti-K	+	+	+	+	+	+
	HPCD pig serum-1	—	—	—	—	—	+
	HPCD pig serum-2	—	—	—	—	—	+
Formalin-killed (Formalin Antigen)	Naturally infected pig serum-69	+	+	+	+	+	+
	Naturally infected pig serum-121	+	+	+	+	+	+
	Immune rabbit serum anti-K	+	+	+	+	+	+
	HPCD pig serum-1	—	—	—	—	—	trace
	HPCD pig serum-2	—	—	—	—	—	trace
Merthiolate-killed (Merthiolate Antigen)	Naturally infected pig serum-69	+	+	+	+	+	+
	Naturally infected pig serum-121	+	+	+	+	+	+
	Immune rabbit serum anti-K	+	+	+	+	+	+
	HPCD pig serum-1	—	—	—	—	—	trace
	HPCD pig serum-2	—	—	—	—	—	trace

* Remarks are same in Table 1.

食鹽水浮遊液 그대로 사용한 生菌抗原(living antigen),
 ② formalin을 0.5%로 加하여 殺菌시킨 formalin處理抗
 原(formalin-killed antigen)과 ③ 0.01%로 merthiolate
 를 加하여 殺菌한 merthiolate 處理抗原 (merthiolate-
 killed antigen)으로 區分使用하였다.

試驗管法의 反應術式과 剖檢時의 病變確認方法은 前

報^{14,15}에 準하였고, 平板法의 術式은 Fig. 1에 나타낸
 바와 같다.

結 果

抗原의 處理方法 및 保存이 反應性에 미치는 影響 :
 診斷用抗原液의 製作處理方法이 平板法의 反應性에 미

Table. 3. Results of the Appearance Rime of Reaction on the Plate Agglutination Test and its Relation to the Tube Agglutination Titers

Tube A.G. Titer	Nos. of Serum Examined	Appearance Time of Reaction in Minutes on Plate Test											Positive	Negative	
		0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10240	1	1*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
5120	3	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—
2560	9	1	2	1	1	—	1	1	—	—	—	—	2	9	—
1280	23	2	3	5	3	4	1	—	—	—	—	—	18	5	—
640	27	—	2	3	5	1	3	2	2	—	—	1	19	8	—
320	41	—	5	8	5	7	3	—	1	2	1	5	37	4	—
160	27	—	4	4	2	2	—	3	1	2	1	4	23	4	—
80	31	—	—	4	3	6	2	2	—	—	—	3	20	11	—
40	26	—	—	—	1	3	7	3	1	—	1	2	18	8	—
<40	12	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	2	10	—
Total	200	4	19	25	21	23	17	11	6	4	3	17	150	50	—

* Numbers of reactors.

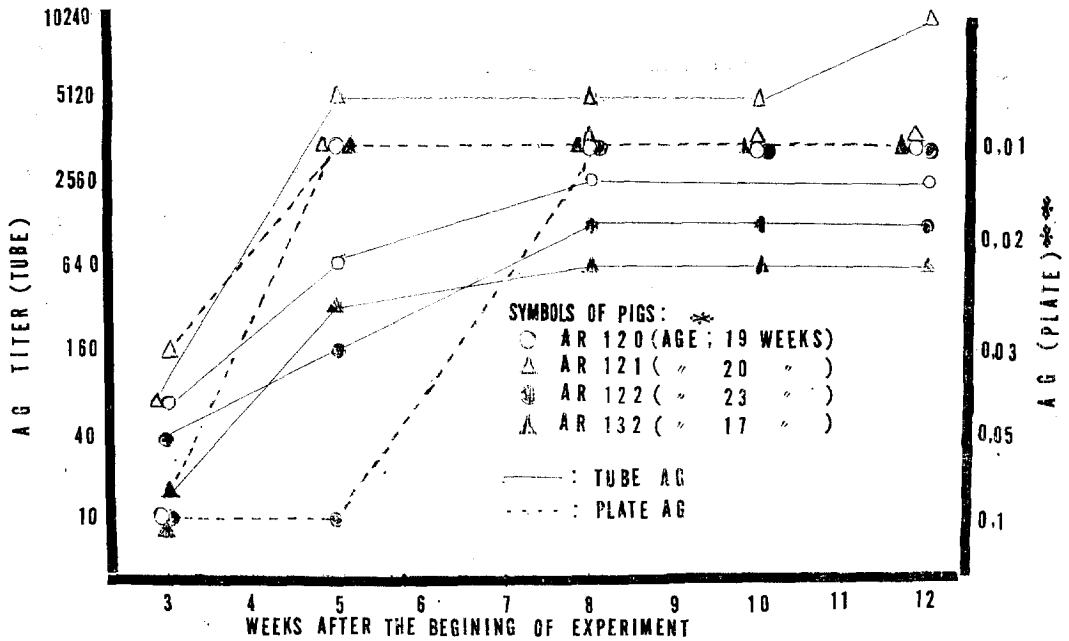


Fig. 2. Results of long term observation for the detection of *Bord. bronchiseptica* antibodies in the naturally infected AR pigs by the methods of plate and tube agglutination.

*: The pigs of this group were 15 to 21 weeks old at the beginning of this experiments.

** : Amounts of test serum for the plate method of agglutination.

Table 4. Relations Between the AR Pathological Lesions and the Tube Agglutination Titers

Tube A.G. Titer	Nos. of Examined	Degree of Pathological Lesion				
		Positive			Negative	
		Apparently Healthy	Moderate Symptom	Severely Affected	Total	Total
10240	1	—	—	—	1	—
5120	—	—	—	—	—	—
2560	6	3	2	1	6	—
1280	13	5	3	4	12	1
640	17	10	5	1	16	1
320	20	10	6	3	19	1
160	9	5	3	1	9	—
80	12	6	3	1	10	2
40	10	4	2	2	8	2
20	4	3	—	—	3	1
10	1	—	—	1	1	1
Total	93	46	25	14	85(91.4%)	8(8.6%)

치는 影響은 表 1에서 보는 바와 같이, formalin處理 抗原이 銳敏度가 높은 듯 하나 處理別間에 크다란 差異를 認定할 수 없었다. 단 表에는 나타나지 아니하였으나, 石炭酸處理抗原(0.5%)은 극도로 粘稠性이 높아져서 이를 使用하기에는 不可能하였다.

抗原液의 保存이 反應性에 미치는 影響을 抗原處理後 4°C의 冷藏庫에 10週間 保存하면서 經時的으로 이를 檢討한 結果는 表 2와 같다. 處理別抗原間에 保存日數 第9週까지는 다 같이 그 反應性에 별다른 影響이 나타나지 아니하였으나, 第10週에 이르러 對照陰性血清이 疑陽性으로 變轉되는 非特異的反應이 관찰되었다

平板法의 反應出現時間과 凝集價와의 關連性: 試驗管法에 陽性反應凝集價(40~10240)을 나타내었던 200例의 血清에 對한 平板法의 實施結果는 表3과 같다. 陽性反應出現은 30秒에 나타나기 始作하여 10분에 이르러 陽性을 나타내는 경우도 있었고, 平板法에서 陽性을 나타낸 150例中 109例는 5分以內에 反應이 나타났다. 다만 試驗管法에서 陽性이었던 50例가 平板法에 陰性結果를 보이고 있어, 양 方法의 一致率은 75.0%에 해당되었다. 平板法에서 陽性反應出現時間의 長短과 凝集價의 높고 낮음에는 어떤 關連性이 認定되지 아니하였고, 그리고 平板法에서 陰性結果로 나타난 血清의 凝集價는 거의 대부분이 凝集價 8.0倍以下에 속하여 있었다.

AR自然感染豚에 對한 凝集反應의 經時的觀察: 臨床症狀으로 AR感染豚이라 診斷된 自然感染豚에 對한 凝集反應의 方法別에 따르는 反應性을 經時的으로 檢討

한 結果는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다.

平板法에서 試驗管法보다 약 2週日後에 陽性을 나타낸 例가 있기는 하나, 試驗管法凝集價의 上昇에 따라 平板法에서도 反應이 銳敏하여지는 傾向이 뚜렷하였다. 이와같이 凝集反應性的 經時的 增加는 感染經過에 따른 變化라고 推定되어 진다.

病變程度와 凝集價와의 關連性: 剖檢時 病變의 程度와 凝集價를 동시에 측정하였던 93例에 대한 檢討結果는 表 4에서 보는 바와 같다. 凝集反應과 病變陽性一致率은 85/93例(91.4%)였고, 血清에는 陽性이었으나 病變은 전혀 관찰되지 아니한 例가 8/93例(8.6%)에 해당되었다. 다만 病變程度와 凝集價의 높고 낮음에는 직접적인 關連은 認定할 수 없었다.

考 察

AR의 診斷을 위해서는 臨床的診斷外에 細菌 및 血清學的診斷과 病理解剖 내지는 組織所見에 의한 診斷을 생각할 수 있으나, 어느 경우에도 一長一短이 있음이指摘되고 있다.²⁰⁾ 물론 위의 여러 方法 가운데에서 간단하면서도 확실한 方法은 鼻部切斷에 의한 鼻甲介의 萎縮을 관찰하는 方法이다. 그러나 종래의 여러가지 病因論에서 대두되었든 榮養障害說,²⁾ 기타 各種 微生物^{3,8,13,20,21,23-26)}과 封入體性鼻炎¹⁾과의 類症鑑別은 解剖所見단으로는 이를 診斷하기는 매우 어렵다.

한편 AR의 生前診斷法으로써 上述한 바와 같은 여러가지 診斷法이 응용되나, 細菌學的診斷에 있어서 B 菌은 感染以後(主로 哺乳時期) 豚日齡이 증가와 더불어

러 점차 그 菌檢出率이 낮아지는데¹⁵⁾, 이는 鼻甲介의 病變의 進行과 더불어 鼻腔 특히 篩骨部位로 菌이 定着移動하기 때문에 檢査材料를 채취할 때, 綿棒삼입 채취로는 菌檢出이 때로는 불가능하게 되기 때문이라고 생각된다. 이상과 같은 理由에서 繁殖豚에서의 診斷은 주로 血清學的 診斷이 주로 응용되어져야 한다고 생각된다.

平板法 診斷用 抗原은 表 1 및 2에서 보는 바와 같이, 處理別 및 保存性에는 금번 試作한 方法間에는 그 反應性에 큰 差異는 認定할 수 없었다. 生菌抗原을 試圖한 理由는 本菌屬의 특징인 K凝集素에 의한 反應을 보고자 함이었으나, 生菌抗原보다는 死菌抗原을 利用함이 보다 좋으리라 생각된다. 이는 著者등¹⁴⁾이 報告한 소위 "bouillon法"은 生菌이기 때문에 保存성이 없고, 또한 檢査할 적마다 調製할 필요가 있으며, 그리고 野外에서 生菌을 다룬다는 安全性의 문제도 있어서, 현재는 formalin死菌抗原을 사용하는 方法(試驗管法)¹⁴⁾이 報告되어 있다.

平板法 診斷用 抗原의 長期間保存성은 4°C 10週間以後에 非特異反應이 認定된 바(表 2), 이 점 보다 保存에 安全性이 있는 診斷液의 開發이 요망된다.

한편 自然感染豚에 대한 凝集反應性을 檢討한 結果에서 平板法은 試驗管法凝集價의 上昇과 더불어 그 反應度가 銳敏하여지는 하나 (Fig. 2) 表 3에서 보는 바와 같이 試驗管法陽性例中 50例가 平板法에서 陰性結果를 나타낸 事實은 診斷上 극히 주의를 하여야 할 문제라고 본다. 그런데 病變陰性例(8.6%)에서 凝集抗體를 증명할 수 있었던 점(表 4)은 血清反應이 診斷에 보다 有効한 方法임을 나타낸 結果라고 본다.

이상 보아 온 바와 같이 平板法과 試驗管法 사이에 相當例數가 一致하지 않는 結果를 보인 점은 앞으로 反應術式에 보다 改良을 요하는 것으로 생각되나, 다만 各種 診斷法의 장단점을 고려할 때, 血清反應 특히 平板法은 野外에서 急速診斷을 위한 screening test로 應用可能함이 示唆된 것으로 본다.

結 論

Bordetella bronchiseptica 感染豚의 血清學的 診斷을 위하여 平板法 및 試驗管法凝集反應을 200例의 血清材料와 AR自然感染豚 4例를 약 3個月間 抗體價와 反應性을 관찰하였고, 아울러 病變程度와 抗體價를 比較檢討한 바, 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 平板法凝集反應用 抗原으로서는 生菌抗原, formalin 및 merthiolate處理 抗原間에 그 反應性에 크다란 差異를 認定할 수 없었다.

2. 反應用 抗原은 4°C 10週間以內에는 抗原處理別間에 差異없이 安全性이 維持되었으나, 10週以後에는 非特異反應이 관찰되었다.

3. 平板法 및 試驗管法의 陽性反應一致率은 75.0%로, 試驗管法이 平板法보다 우수한 結果를 보였고, 한편 試驗管法凝集價의 上昇에 따라 平板法反應이 銳敏하여지는 경향이 認定되었다.

4. 病變程度와 凝集價의 比較檢討에서 AR感染의 診斷을 위하여 平板法凝集反應은 繁殖豚의 screening test로써 應用可能함이 示唆되었다.

參 考 文 獻

- Booth, J.C., Goodwin, R.F.W. and P. Whittlestone: Inclusion-body rhinitis of pigs: Attempts to grow the causal agent in tissue cultures. Res. Vet. Sci.(1967) 8:338.
- Brown, W.A., Krook, L. and W.G. Pond: Atrophic rhinitis in swine: Etiology, pathogenesis and prophylaxis. Cornell Vet. (1966): 56. Suppl. 1:1-108.
- Carter, C. R. and K.A. Mckary: A pleuropneumonia-like organism associated with infectious atrophic rhinitis of swine. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. (1953) 17:413.
- Cross, R.F. and Claflin, R.M.: *Bordetella bronchiseptica*-induced porcine atrophic rhinitis. J. Am. Vet. Med. Ass. (1962) 141:1467.
- Duncan, J.R., Ross, R.F.: Switzer, W.P. and Ramsey, F.K.: Pathology of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in swine: atrophic rhinitis. Am. J. Vet. Res. (1966) 27:457.
- Dunne, H.W. and Leman, A.D.: Diseases of swine. 4th ed., The Iowa State University. Ames. Iowa (1975) p. 687.
- Fetter, A.W., Switzer, W.P. and Capen, C.C.: Electron microscopic evaluation of bone cells in pigs with experimentally induced. *Bordetella* rhinitis (Turbinate osteoporosis) Am. J. Vet. Res. (1975) 36:15.
- Haris, D.L. and W.P. Switzer: Turbinate atrophy in young pigs exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and combined inoculum. Amer. J. Vet. Res.(1968) 29:777.
- Harris, D.L. and Switzer, W.P.: Nasal and tracheal resistance of swine against reinfection by *Borde-*

- tella bronchiseptica*. Am. J. Vet. Res. (1969) 30: 1161.
10. Harris, D.L.: Resistance to *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. Ph.D. Thesis, Iowa State University, Ames, Iowa (1970).
 11. Harris, D.L., Switzer, W.P. and Harris, R.A.: Suggested mechanism for the pathogenesis of infectious atrophic rhinitis. Can. J. Comp. Med. (1971) 35:318.
 12. Harris, D.L. and Switzer, W.P.: Immunization of pigs against *Bordetella bronchiseptica* infection by parenteral vaccination. Am. J. Vet. Res. (1972) 33:1975.
 13. Heddleston, K.L., Shuman, R.D. and F.L. Earl: Atrophic rhinitis. IV. Nasal examination for *Pasteurella multocida* in two swine herds affected with atrophic rhinitis. J. Am. Vet. Med. Ass. (1954) 125:225.
 14. Kang, B.K., Koshimizu, K. and Ogata, M.: Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. II. Agglutination test on *Bordetella bronchiseptica* infection. Jap. J. Vet. Sci. (1970) 32: 295.
 15. Kang, B.K., Koshimizu, K. and Ogata, M.: Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. III. Field survey by agglutination test in relation to incidence of *B. bronchiseptica* and turbinate atrophy. Jap. J. Vet. Sci. (1971) 33:17.
 16. Kang, B. K.: Studies on protective immunity against *Bordetella bronchiseptica* infection. Korean J. Vet. Sci. (1978) 18:51.
 17. Koshimizu, K., Kodama, Y. and Ogata, M.: Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. V. Experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in conventional piglets. Jap. J. Vet. Sci. (1973) 35:223.
 18. Koshimizu, K., Kodama, Y., and Ogata, M.: Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. VI. Effect of vaccination against nasal establishment of *Bordetella bronchiseptica*. Jap. J. Vet. Sci. (1973) 35:411.
 19. Ogata, M., Kodama, Y. and K. Koshimizu: Studies on the etiology of infectious rhinitis of swine. IV. Agglutination test with formalized antigen for *Bordetella bronchiseptica* infection in pigs. Jap. J. Vet. Sci. (1973) 35:149.
 20. Pearce, H.G. and C.K. Roe: Infectious porcine atrophic rhinitis: A review. Can. Vet. J. (1966) 7:243.
 21. Ross, R.F., Duncan, J.R. and Switzer, W.P.: Turbinate atrophy in swine produced by pure culture of *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Med. (1963) 58:566.
 22. Ross, R.F., Switzer, W.P. and Duncan, J.R.: Comparison of pathogenicity of various isolates of *Bordetella bronchiseptica* in young pigs. Canad. J. Comp. Med. (1967) 31:53.
 23. Schofield, F.W. and T.L. Jones: The bacteriology of infectious atrophic rhinitis in swine. J. Am. Vet. Med. Ass. (1950) 116:120.
 24. Switzer, W.P.: Studies on infectious atrophic rhinitis: IV. Characterization of a pleuropneumonia-like organism isolated from the nasal cavities of swine. Am. J. Vet. Res. (1955) 16:540.
 25. Switzer, W. P.: Studies on infectious atrophic rhinitis. V. Concept that several agents may cause turbinate atrophy. Am. J. Vet. Res. (1956) 17: 478.
 26. Switzer, W.P.: Atrophic rhinitis today. J. Am. Vet. Med. Ass. (1965) 146:348.
 27. 康炳奎: *Bordetella bronchiseptica*의菌體成分에 관한研究, 특히 DEAE-cellulose chromatography에 의한分劃精製에對하여. 大韓獸醫學會誌 (1973) 13:37.
 28. 尾形學, 興水馨, 康炳奎, 跡部ヒサエ, 山本孝史, 木津野南夫, 池田讚成: 豚の傳染性萎縮性鼻炎の病原學的研究. I. 鼻腔内細菌叢と疾病との關係, 日本獸醫學雜誌 (1970) 32:185.
 29. 態谷哲夫, 波岡茂郎, 丹羽太佐衛門, 笹原二郎: 豚疾病學. 日本近代出版 (1977) p.422.

**Serological Diagnosis of Bordetellosis:
Application of Rapid Plate Agglutination Technique for
the Detection of Carrier in Swine**

Byong Kyu Kang, D.V.M., M.S., Ph.D.

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture,
Jeonnam National University*

Abstract

The detection of *Bordetella bronchiseptica* which is supposed to be an agent of the infectious atrophic rhinitis of swine, is likely to receive more attention in the future as the pork industry comes to realize that eradication of this infection from breeding herds is a practical possibility. Experiments described here were carried out to establish the rapid plate agglutination test for the detection of the infectious atrophic rhinitis of swine in the field using the criteria of antigen preparation, effects on the antigenicity after storing of the antigen and reaction appearing time. Also, the agglutinabilities between the plate and tube method were compared and the degree of pathological lesions were recorded in relation to tube agglutination titers.

Obtained results were as follows:

1. No differences were noted in the agglutinabilities on the plate agglutination test between the treatments in antigen preparation-formolized, merthiolate-killed and living organism.
2. The agglutinability of the antigens did not show any significant changes until 10 weeks of storage at 4 C; however, after 10 weeks of storage, non-specific reaction was observed with the HPCD control sera.
3. The results of the plate and tube agglutination tests were not comparable but the effective use of the plate method in *Bordetella bronchiseptica* eradication programs in pigs especially in the sow is stressed as a screening test.