

호흡기 증상을 나타낸 송아지 및 산양에서 분리한 *Pasteurella haemolytica*의 생물형 및 혈청형

조 광 현·김 봉 환
경북대학교 수의과대학
(1991. 8. 3 접수)

Biovars and serovars of *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic calves and goats

Kwang-hyun Cho, Bong-hwan Kim
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
(Received Aug 3, 1991)

Abstract : The biovars and serovars of 57 strains of *Pasteurella haemolytica* (*P. haemolytica*) isolated from pneumonic calves and goats were investigated. The biovars were determined some biochemical and cultural properties and susceptibility to penicillin. All 57 isolates were considered to correspond to biovar A. Among 57 *P. haemolytica*, 39 isolates of them (68.4%) were serovar 1, 2(3.5%) were serovar 5 and 2(3.5%) were serovar 7, the remaining 14 isolates (24.6%) were untypable.

Key words : *Pasteurella haemolytica*, biovar, serovar.

서 론

동물의 종에 따라 여러가지 질병양상을 나타내는 *Pasteurella haemolytica* (*P. haemolytica*)에 대한 특성 및 병원성은 Florent와 Godbillier에 의해 본격적으로 연구되기 시작하여 어린 양에서는 패혈증을 일으키며, 소에서는 enzootic pneumonia 및 기회감염균으로서 shipping fever의 중요한 인자로 밝혀져 있고, 가금에서도 드물게 분리 보고되고 있다.^{1~9}

Biberstein et al¹⁰이 양의 패혈증 예에서 분리한 *P. haemolytica*의 집락특성을 기술한 이후 Smith⁶는 세균의 집락형태와 당분해능에 따라 2개의 biovar(A와T)로 분류할 것을 주장하였으며, biovar A는 소, 양의 enzootic pneumonia, biovar T는 어린 양의 패혈증을 유발시키는 것으로 보고하였다.

Biberstein과 Gills¹¹는 모든 *P. haemolytica*가 catalase 시험에 양성반응을 나타내는 것은 아니며 음성반응을 나타내는 균주도 있어 이를 biovar T로 분류할 것을 주장하여, Smith와 Thal¹²의 동조를 받았으며 그후 Biberstein¹³은 biovar A, T의 차이점을 당분해능, 페니실린 감수성,

감염숙주역, 질병형태에 기초하여 구별하였다.

Carter¹⁴가 indirect hemagglutination test(IHAT)로 소의 폐렴에서 분리한 *P. haemolytica*에 대한 협막혈청형을 동정한 이후, Biberstein et al¹⁵이 동일방법으로 협막 및 균체혈청형을 동정하여 12 serovar로 분류한 반면 Frank와 Wessman¹⁶, Frank¹⁷는 rapid plate agglutination test(RPAT)에 의해 15 serovar를 보고하였고, Biberstein¹⁸은 질병, 감염숙주역, biovar 등에 기초하여 serovar의 분포를 기술하였다. 또한 여러 연구자들은 소의 폐렴에서 type-A1이 가장 중요한 역할을 한다고 주장하였으며 양의 경우에는 biovar T가 편도에서 가장 흔하게 분리되며 병원성 인자로 작용한다고 보고하였다.^{2,3,18~21}

소에서 *P. haemolytica*에 의한 폐렴의 병원성을 알아보기 위한 실험적 감염은 직접 폐 또는 하부기도내에 세균을 주입하는 방법이 수행되고 있으나^{22~24}, 소수만이 폐렴을 유발시키는데 성공하였으며²⁵, 대부분의 연구자는 실패하였다. 그 이유는 명백하지 않지만 challenge strain이 실험실 배양에서 변이되거나 또는 스트레스를 받은 송아지의 비인두내 microbiological status와 동일조건을 갖추는데 실패했기 때문일 것으로 추측된다.^{2,26}

*P. haemolytica*의 병원성 인자는 cytotoxin, endotoxin, capsule, neuraminidase 및 다양한 단백질 분해효소로 알려져 있으며 이중 cytotoxin, endotoxin 및 capsule이 병원성에 가장 중요하게 작용하는 것으로 보고되고 있다.^{2, 21, 26-32}

소에서 가장 빈번하게 분리되는 *P. haemolytica* serovar 1은 cytotoxin과 capsule을 대수증식기에 산생하는데 이러한 serovar 1의 빠른 성장은 폐의 방어능 특히 폐포내의 대식세포를 무력화시키고 이 세균에서 분리되는 leukotoxin은 반추류의 leukocyte를 죽이거나 기능을 약화시키는 원인으로 알려져 있다.^{24, 31-38}

또한 *P. haemolytica* serovar 1은 leukotoxin 중화항체가 없고 surface specific antibody에 opsonization 되었을 때 폐포내의 대식세포의 탐식작용에 큰 피해를 주므로^{7, 37} 소에서 *P. haemolytica* 폐렴을 방어하려면 leukotoxin과 surface specific antigen에 동시에 면역이 이루어져야 하는데 시판 bacterin이 소의 *P. haemolytica* 폐렴의 면역에 만족할 만한 효과를 얻지 못하고 있는 것은 bacterial surface antigen에 대한 특이항체는 산생하지만 toxin 중화항체는 산생하지 않기 때문인 것으로 보고 있다.^{7, 39}

최근들어 우리나라에서도 밀집사육, 환기 등의 문제에 따른 호흡기 질병의 문제가 심각히 대두되고 있으며 소 및 산양에서 *P. haemolytica*에 기인한 폐렴의 피해가 상당할 것으로 추정되나 국내에서 아직까지 *P. haemolytica* 폐렴에 대한 연구는 이루어진 바가 없어 *P. haemolytica*의 병원성 및 면역원성의 규명은 물론 현재 우리나라에서 유행하고 있는 *P. haemolytica*의 혈청형조차 밝혀지지 않고 있어 이 병의 구체적인 병인론에 접근한 효과적인 방역을 기대하기가 어려운 실정이다.

이와같은 배경을 근거로 하여 본 연구는 우리나라에서 최근 그 발생이 증가하여 많은 피해를 입하는 것으로 추측되는 *P. haemolytica*에 기인한 폐렴의 정확한 진단 및 효과적인 예방을 목적으로 호흡기질병 감염 송아지 및 산양에서 분리한 *P. haemolytica*의 biovar 및 serovar를 동정하였다.

재료 및 방법

공시균: 1989년 9월부터 1991년 2월 사이에 영남지방 19개 농장에서 호흡기 증상을 나타내는 1~6개월령 송아지 142두와 3개 농장에서 폐렴으로 폐사된 2~3개월령 송아지 3두 및 3개 농장의 호흡기 증상을 나타내는 2~10개월령의 산양 24두를 포함하여 총 169두를 대상으로 분리한 *P. haemolytica* 57주 및 미국의 University of California, Davis에서 분양받은 reference strain 1~12 serovar를 biovar 및 serovar동정과 페니실린 감수성시험에 공시하였다.

*P. haemolytica*의 biovar 및 serovar 동정

1) Biovar 동정: *P. haemolytica*의 생화학적 특성에 의한 biovar를 결정하기 위해 Smith⁶, Biberstein¹³, Olmos와 Biberstein⁴⁰의 방법에 따라 reference strain biovar A, T 및 공시균 57주에 대하여 생화학적 성상시험과 페니실린 감수성시험 등을 실시하였다.

2) Serovar 동정

(1) 토끼 면역혈청의 제조: *P. haemolytica* 각 serovar에 대한 토끼 면역혈청은 Biberstein et al^{10, 15}, Ewing⁴¹의 방법에 따라 제조하였다. 혈액한천배지상에서 37°C 24시간 배양한 reference strain을 0.2% glucose가 함유된 heart infusion broth 50ml에 접종하여 4~5시간 배양한 후 formalin을 0.5%(V/V)되게 첨가하여 4°C에 보관하면서 토끼접종을 위한 항원으로 사용하였다. 항원의 접종은 약 2.5~3kg되는 재래종 토끼의 이정맥을 통해 4일 간격으로 6회 접종하였으며 항원의 양은 각 0.5, 1, 2, 3, 3, 3ml를 주사하였다. 최종접종후 5~6일째에 심장에서 채혈하고 혈청을 분리하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

(2) Serovar 동정: Frank와 Wessman¹⁶의 방법에 따라 RPAT로 serovar를 동정하였다. 각 serovar별 혈청 1방울(약 10 μ l)을 깨끗한 slide glass에 적하하고 혈액한천 배지에서 일야 배양한 신선배양균을 백금선으로 채균하여 혈청과 혼합한 후 응집여부를 실온에서 1분 이내에 관독하였다.

결과 및 고찰

*P. haemolytica*의 biovar를 결정하기 위해 Smith⁶, Biberstein¹³, Olmos와 Biberstein⁴⁰의 방법에 따라 공시균 57주의 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1에 있는 바와 같이 catalase시험에서는 공시균 모두 양성을 나타내었으며 당분해시험에서는 xylose에서 양성반응을 보인 반면 trehalose, salicin에서는 음성반응을 나타내는 등 모든 균주가 biovar A로 동정되었다. 한편 페니실린 감수성시험에서는 소에서 분리된 39주와 산양에서 분리된 8주가 감수성이 있는 것으로 나타났다.

P. haemolytica biovar A는 소, 양의 폐렴과 어린 양의 폐혈증을 유발하며 비인두에서 잘 분리되고, arabinose를 분해하며 페니실린에 감수성인 반면, biovar T는 양의 폐혈증을 일으키며 편도에서 잘 분리되고 trehalose를 분해하며 페니실린에 내성인 것으로 보고되어 있다.^{6, 40, 42} 송아지 및 양의 *P. haemolytica* 폐렴은 대부분이 biovar A에 의해 유발되는 것으로 알려져 있으며^{13, 18, 19, 43, 44}, Gilmour³는 양의 편도에서 biovar T가 많이 분리되며 폐, 간, 신장, 임파절, 심장혈에서는 biovar A가 많이 분리된다고 하였다.

Table 1. Biovars of 57 cultures of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves and goats

Differential Characteristics	Reference strains		Isolates No. of positive cultures(%)
	Biovar A	Biovar T	
Catalase	+	-	57(100)
Acid from trehalose	-	+	0(0)
arabinose	+	-	37(64.9)
xylose	+	-	57(100)
salicin	-	+	0(0)
Susceptibility to penicillin	+	-	47(82.5)

Biovar분류를 위한 페니실린 감수성시험에서 여러 연구자들은 거의 대부분의 biovar A가 감수성이 있는 것으로 보고하였으나^{11,40,45}, Nakazawa와 Ishino⁴⁶는 *P. haemolytica* biovar A, T 구별에 있어 당분해능의 경우 arabinose보다는 xylose가 더욱 더 유용하다고 주장하였으며 페니실린에 대한 감수성이 biovar A는 28.7%에 불과하다고 보고하였다. 한편 Chang과 Carter⁴⁷는 소 유래 *P. haemolytica* 중 61.4%가 페니실린에 내성을 나타낸다고 하였다.

이상의 성적을 비교해볼 때 본 실험에서 biovar A의 arabinose, xylose 분해율이 64.9%, 100%로 나타나 Nakazawa와 Ishino⁴⁶의 성적과 유사하였으며 biovar A로 동정된 모든 공시균중에서 페니실린에 감수성이 82.4%로 나타난 것은 Chang과 Carter⁴⁷가 보고한 바와 같이 페니실린 내성균에 의한 결과로 추측된다.

RPAT에 의한 *P. haemolytica* 혈청형 동정시험 결과는 Table 2에 있는 바와 같이 공시균 57주중 serovar 1이 39주(68.4%)로 가장 많았고, serovar 5가 2주(3.5%), serovar 7이 2주(3.5%) 그리고 동정이 되지 않은 균주가 14주(24.6%)로 나타났다.

축종별로보면 송아지의 경우에는 serovar 1이 68.7%, serovar 5가 4.2%, serovar 7이 4.2%, 동정되지 않은 균이 19.2%였으며, 산양의 경우에는 serovar 1이 66.7%, 동정되지 않은 균이 33.3%이었다.

Biberstein et al¹⁵은 *P. haemolytica*를 협막특이항원에 따

라 IHAT에 의해 12 serovar로 나누었으며 biovar A는 serovar 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, biovar T는 serovar 3, 4, 10으로 분류된다고 보고한 바 있다. 한편 Frank⁷는 IHAT에 의해 serovar가 결정되지 않은 소 유래 *P. haemolytica*를 RPAT로 Biberstein et al¹⁵이 구분한 12 serovar이외의 3 serovar로 구분하였으며 이들 serovar는 모두 biovar A에 속한다고 보고하였다.

최근에는 여러 학자들에 의해 DNA homology에 기초한 *Pasteurella*속에 대한 재분류 논의가 활발하게 이루어져 *P. haemolytica* biovar A, biovar T등은 *Pasteurella*속에서 제외되어야 하며 *Actinobacillus* group과 더욱 유사한 관계를 가지므로 이 genus로 대체되어야 한다는 주장이 대두되고 있다.^{48,49}

급성호흡기질병이 있는 소 및 양의 nasal swab나 폐렴에 걸린 송아지 및 양의 폐에서 가장 빈번하게 분리되는 혈청형은 serovar 1으로 알려져 있으며 Frank와 Smith¹⁹는 장거리수송후의 송아지에서 serovar 1의 분리율이 80~100%로 나타남을 보고하였고, Biberstein과 Thompson¹은 폐렴에 78%에서 biovar A가 분리되며 소 및 양에서 serovar 1의 분리율이 각각 77.7%, 52.9%임을 보고한 바 있다. 또한 Mwangota et al⁴⁵은 소와 산양에서 biovar A의 분리율이 각각 57.5%, 81%로 나타나며, 소에서 serovar 1의 분리율은 50%, 양, 산양에서는 각각 8.5%, 9.6%임을 보고하였으며, Nakazawa와 Ishino⁴⁶는 소에서 분리한 *P. haemolytica* 75.2%가 serovar 1이라고 하였다.

이상의 성적을 비교해 볼때 본 실험성적은 Biberstein과 Thompson¹, Nakazawa와 Ishino⁴⁶의 성적과는 유사하였으나 Mwangota et al⁴⁵의 성적과는 상당한 차이가 인정되었다.

결론

1989년 9월부터 1991년 2월사이에 영남지방 19개 농장에서 호흡기 증상을 나타내는 1~6개월령 송아지 142두로부터 채취한 nasal swab와 3개 농장에서 폐렴으로 폐사된 2~3개월령 송아지 3두의 폐 및 호흡기 증상을 나타내는 3개 농장의 2~10개월령 산양 24두의 nasal swab에서 *Pasteurella haemolytica*(*P. haemolytica*)의 분리를 시도하고

Table 2. Serovars of 57 *Pasteurella haemolytica* isolated from calves and goats

Sources of strains	No. of isolants	No. of isolants of each serovar												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	untypable
Calf nasal	3	2												1
Calf nasal swab	45	31				2		2						10
Goat nasal swab	9	6												3
Total	57	39				2		2						14

이들 분리균 57주의 biovar 및 serovar를 조사하였다.

공시한 57주에 대한 biovar 동정에서는 모든 균주가 catalase 시험에서 양성을 나타내었으며 당분해시험에서는 xylose에서 양성반응을 보인 반면 trehalose, salicin에서는 음성반응을 나타내는 등 분리균 모두 biovar A로 동정되었다.

공시균주에 대한 serovar 동정에서는 serovar 1이 68.4%로 가장 많이 나타났고 serovar 5가 3.5%, serovar 7이 3.5% 그리고 동정되지 않은 균주가 24.6%로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Biberstein EL, Thompson DA. Epidemiological studies on *Pasteurella haemolytica* in sheep. *J Comp Path* 1966; 76 : 83~94.
2. Frank GH. The role of *Pasteurella haemolytica* in the bovine respiratory disease complex. *Vet Med* 1986; 41 : 839~846.
3. Gilmour NJL. *Pasteurellosis* in sheep. *Vet Rec* 1978; 102 : 100~102.
4. Gourlay RN, Mackenzie A, Cooper JE. Studies of the microbiology and pathology of pneumonic lungs of calves. *J Comp Path* 1970; 80 : 575~584.
5. Shreeve BJ, Biberstein EL, Thompson DA. Variation in carrier rates of *Pasteurella haemolytica* in sheep (diseased flocks). *J Comp Path* 1972; 82 : 111~116.
6. Smith GR. The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions in sheep. *J Path Bact* 1961; 81 : 431~440.
7. Wilkie BN, Shewen P. Defining the role that *Pasteurella haemolytica* plays in shipping fever. *Vet Med* 1988; 43 : 1053~1058.
8. Rhoades KR, Hddleston KL. *Pasteurellosis*, in Hitchner SB, Domermuth CH, Purchase HG, Williams JE.(ed) : *Isolation and Identification of Avian Pathogens*, Endwell, Now York : Creative Printing Company 1980; 12~14.
9. Shaw DP, Cook DB, Maheswaran SK, et al. *Pasteurella haemolytica* as a copathogen in pullets and laying hens. *Avian Dis* 1990; 34 : 1005~1008.
10. Biberstein EL, Meyer ME, Kennedy PC. Colonial variation of *Pasteurella haemolytica* isolated from Sheep. *J Bact* 1958; 76 : 445~452.
11. Biberstein EL, Gills MG. The relation of the antigenic types to the A and T thpes of *Pasteurella haemolytica*. *J Comp Path* 1962; 72 : 316~320.
12. Smith JE, Thal E. A taxonomic study of the genus *Pasteurella* using a numerical technique. *Acta Pathol Microbiol. Scand.* 1965; 64 : 213~223.
13. Biberstein EL. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*, in bergan T, Norris R J,(ed) : *Methods in Microbiology*. New York : Academic Press Inc 1978; 10 : 253~269.
14. Carter GR. A serological study of *Pasteurella haemolytica*. *Can J Microbiol* 1956; 2 : 483~488.
15. Biberstein EL, Gills M, Knight H. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. *Cornell Vet* 1960; 50 : 282~300.
16. Frank GH, Wessman GE. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J Clin Microbiol* 1978; 7 : 142~145.
17. Frank GH. Serological groups among untypable bovine isolates of *Pasteurella haemolytica*. *J Clin Microbiol* 1980; 12 : 579~582.
18. Frank GH. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in sheep in the midwestern United States. *Am J Vet Res* 1982; 43 : 2035~2037.
19. Frank GH, Smith PC. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am J Vet Res* 1983; 44 : 981~985.
20. Grey CL, Thomson RG. *Pasteurella haemolytica* in the tracheal air of calves. *Can J Comp Med* 1971; 35 : 121~128.
21. Roth JA. How cattle defend themselves against *Pasteurella haemolytica* pneumonia. *Vet Med* 1988; 43 : 1067~1072.
22. Friend SCE, Wilkie BN, Thomson RG, et al. Bovine pneumonic *Pasteurellosis* : Experimental induction in vaccinated and nonvaccinated calves. *Can J Comp Med* 1977; 41 : 77~83.
23. Panciera RJ, Corstvet RE. Bovine pneumonic *Pasteurellosis* : Model for *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*-induced pneumonia in cattle. *Am J Vet Res* 1984; 45 : 2532~2537.
24. Wilkie BN, Markham RJF, Shewen PE. Response of calves to lung challenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. *Am J Vet Res* 1980; 41 : 1773~1778.
25. Gibbs HA, Allan EM, Wiseman A, et al. Experimental production of bovine pneumonic *Pasteurellosis*. *Res Vet Sci* 1984; 37 : 154~166.

26. Frank GH. When *Pasteurella haemolytica* colonizes the nasal passages of cattle. *Vet Med* 1988;43:1060~1064.
27. Fenwick BW. Virulence attributes of the liposaccharides of the HAP group organisms. *Can J Vet Res* 1990;54 : S28~S32.
28. Inzana TJ. Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. *Can J Vet Res* 1990;54 : S22~S27
29. Lo RYC, Strathdee CA, Shewen PE. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun* 1987;55 : 1987~1996.
30. Rimsay RL, Coyle-Dennis JE, Lauerman LH, et al. Purification and biological characterization of endotoxin fractions from *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res* 1981;42 : 2134~2138.
31. Shewen PE, Wilkie BN. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect Immun* 1982;35 : 91~94.
32. Shewen PE, Wilkie BN. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *Am J Vet Res* 1985;46 : 1212~1215.
33. Benson ML, Thomson RG, Valli VEO. The bovine alveolar macrophage. *In vitro* studies with *Pasteurella haemolytica*. *Can J Comp Med* 1978;42 : 368~369.
34. Berggren KA, Baluyut CS, Simonson RR, et al. Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine neutrophils. *Am J Vet Res* 1981;42 : 1383~1389.
35. Chang YF, Young R, Post D, et al. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 1987;55 : 2348~2354.
36. Corstvet RE, Gentry MJ, Newman PR, et al. Demonstration of age-dependent capsular material on *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *J Clin Microbiol* 1982;16 : 1123~1126.
37. Markham RJF, Wilkie BN. Interaction between *Pasteurella haemolytica* and bovine alveolar macrophages : Cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. *Am J Vet Res* 1980;41 : 18~22
38. Morck DW, Watts TC, Acres SD, et al. Electron microscopic examination of cells of *Pasteurella haemolytica* A1 in experimentally infected cattle. *Can J Vet Res* 1988;52 : 343~348.
39. Shewen PE, Wilkie BN. Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can J Vet Res*. 1988;52 : 30~36.
40. Olmos A, Biberstein EL. Differentiation of *Pasteurella haemolytica* biotypes A and T with growth inhibitors. *J Clin Microbiol* 1979;10 : 231~234.
41. Ewing WE. Edwards and Ewing's *Identification of Enterobacteriaceae*. New York : Elsevier 1986;374~380.
42. Biberstein EL, Francis CK. Nucleic acid homologies between the A and T types of *Pasteurella haemolytica*. *J Med Microbiol* 1968;1 : 105~108.
43. Wray C, Thompson DA. An Epidemiological study of *Pasteurella haemolytica* in calves. *Br Vet J* 1973;129 : 116~122.
44. Wilkie BN, Shewen P. Defining the role that *Pasteurella haemolytica* plays in shipping fever. *Vet Med* 1988;43 : 1053~1058.
45. Mwangota AU, Muhammed SI, Thomson RG. Serological types of *Pasteurella haemolytica* in Kenya. *Comell Vet* 1978;68 : 84~93.
46. Nakazawa M, Ishino S. Serovars and biovars of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. *Jpn J Vet Sci* 1982;44 : 459~463.
47. Chang WH, Carter GR. Multiple drug resistance in *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* from cattle and swine. *J Am Vet Med Assoc* 1976;169 : 710~712.
48. MacInnes JI, Borr JD. The Family *Pasteurellaceae* : Modern approaches to taxonomy. *Can J Vet Res* 1990;54 : S6~S11.
49. Mutters R, Ihm P, Pohl S, et al. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:309~322.