

돼지 단독균 인공감염 및 항생제 치료에 따른 Haptoglobin치의 변화

문진산 · 남향미 · 구복경 · 주이석 · 정석찬 · 김종염 · 박용호*

농촌진흥청 수의과학연구소
서울대학교 수의과대학*
(1996년 1월 29일 접수)

Changes in the concentrations of serum haptoglobin to infection with *Erysipelothrix rhusiopathiae* and antibiotics treatment in pigs

Jin-san Moon, Hyang-mi Nam, Bok-gyeong Ku, Suk-chan Jung,
Yi-seok Joo, Jong-yeom Kim, Yong-ho Park*

National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang, Korea
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, Korea*
(Received Jan 29, 1996)

Abstract : The changes of concentration of serum haptoglobin, body temperature, hematological result and antibody titers were compared in pigs given intravenously injection of *E. rhusiopathiae* and control pigs. Pigs administered with *E. rhusiopathiae* injections showed acute septicemia and arthritis. Also, statistically significant changes observed in the total white cell counts and body temperature. An increased haptoglobin concentration in serum was detected after *E. rhusiopathiae* infection, but not during antibiotics treatment. The results indicated that measurement of the concentration of serum haptoglobin may be useful in the early diagnosis of infectious disease, such as Erysipelas.

Key words : haptoglobin, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, pig.

서론

병원성 미생물에 의한 감염 또는 환경의 여러가지 오염원에 의한 오염시 생체의 자기방어의 일환으로서 비특이적으로 생성되는 여러가지 염증성 사이토카인 및 급성기 단백질을 분석함으로써 동물군의 감염상태를 파악하고

예측하는 기법이 개발되고 있다¹⁻³.

급성기 단백질은 어떤 질병에 특이적으로 반응하는 물질은 아니지만 염증 또는 감염시에 대식세포와 기타 세포에서 생성된 tumor necrosis factor(TNF), IL-1, IL-6, IL-8 등에 의해 간에서 생성되는 당단백질로서 이 물질은 조직 손상후 6시간 이내에 신속하게 증가하기 시작하여 2-3일내에 10-100배 정도의 상승치를 나타내므로써 체내에

서 면역글로블린의 생산과 조직재생, 촉진 등 많은 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁻⁵.

사람과 동물의 혈청으로부터 급성기 단백질 농도를 측정함으로써 전염병이나 수술후 스트레스에 대한 건강상태를 점검하는 진단적 지표로 이용되고 있다. 즉, 급성기 단백질의 농도는 조직손상의 정도에 따라 증가하며, 치료되면 신속히 감소하지만 회복되지 않는 경우에는 감소하지 않는다. 따라서 현재 선진국에서는 개체별 급성기 반응에 대한 정보가 질병의 임상적 진단과 예후, 도살장에서 사전 또는 사후검사의 보조기구로서 이용될 수 있을 것으로 보고되고 있다⁶⁻⁷.

돼지 단독은 *Erysipelothrix rhusiopathiae*에 의해서 발열, 피부병변, 관절염 및 패혈증 등의 증상을 보이며, 급성 또는 만성으로 경과되는 주요 전염병으로서, 페니실린 항생제에 대한 치료효율이 좋다^{8,9}.

본 연구에서는 감염상태에 대한 진단적 지표로서 haptoglobin치 측정의 유용성을 확인하기 위해 돼지 단독을 모델로 설정하였고, 돈단독균 인공감염 및 항생제 치료에 따른 돼지의 혈청으로부터 SDS-PAGE에 의해 단백질 양상을 분석하고, haptoglobin치와 혈액학적, 혈청학적 진단법들간의 상관성 및 진단효율을 비교 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 외관상 건강하게 보이는 2개월령의 돼지를 구입하여 실험전 혈액검사를 실시하였다. 혈액학적으로 정상범주를 지니며 돼지 단독 항체가 음성을 나타낸 돼지를 암·수 구별없이 8두를 선발, 실험군 5두, 대조군 3두로 분리하여 외부와 격리된 곳에서 제한급여를 하면서 실험을 실시하였다.

실험균주 : 돼지 단독을 인공적으로 감염시키기 위해 사용한 균주로는 수의학연구소에 보관중인 *E rhusiopathiae serotype 2* 표준균주를 사용하였다. 표준균주의 병원성 회복을 위하여 마우스에 반복 접종하여, 마우스 간 조직으로부터 면양혈액 한천배지에 접종한 다음, Ewald¹⁰ 및 Cowan¹¹의 방법에 의하여 분리한 돼지 단독균을 실험에 사용하였다.

실험설계 및 시료채취 : 실험전 모든 돼지로부터 혈액을 채취한 다음, 실험군 5두에 돼지 단독균 1×10^9 /ml를 전대정맥을 통하여 각 5ml씩 접종하였으며 대조군은 생리식염수를 주사하였다. 실험군 중 돼지 단독의 임상증상을

나타낸 개체에게는 치료에 대한 반응효과를 비교 조사하기 위하여, 체중 kg당 benzyl penicillin(6,000IU)이 함유된 항생제 3ml를 2회 근육주사 하였다.

돈단독 인공감염후 1, 2, 3, 4, 5일, 항생제 치료후 2, 4, 6, 12일째에 전대정맥으로부터 혈액을 무균적으로 채취하였으며 매일 체온 등 임상증상을 관찰하였다.

혈액검사 : 돼지의 전대정맥으로부터 채취한 혈액은 EDTA가 처리된 용기에 담았다. 혈액검사는 자동혈액화학 측정기인 Hematology blood-cell counter(system-9018, Scrono)를 이용하여 백혈구, 적혈구, 혈색소, hematocrit, 적혈구 용적, 적혈구 색소량 및 적혈구 혈색소 농도 등을 측정하였다. 백혈구 감별계수는 혈액을 슬라이드에 도말, Giemsa 염색하여 현미경하에서 백혈구 핵의 형태에 따라 조사하였다.

항체가 조사 : 항체가 검사는 Leman 등⁸의 방법에 준하여 growth agglutination test를 실시하였다. 즉, 4부시험관에 TSB 1ml과 가검혈청 1ml를 넣고 혼합한 다음, 각 시험관에 *E rhusiopathiae* Serotype 2를 Mcfarland scale No. 2로 맞추어 0.03ml씩 넣고 37℃ 항온실에서 18~24시간 반응시킨 후 응집여부를 판독하였다.

균 분리 동정 : Ewald¹⁰ 및 Cowan¹¹의 방법에 준하여, 면양혈액 한천배지에 접종한 후 37℃에서 48시간 배양하였다. 혈액배지에 자란 균중 등글과 작고 평활한 집락을 취하여 oxidase, catalase, urease, indol 시험 등을 실시하였다.

임상증상 및 병리학적 검사 : 실험이 진행되는 전 기간 동안 임상증상을 관찰하였다. 인공감염후 폐사된 돼지는 일반적인 부검술식에 의하여 조사하였으며, 부검시 나타난 병변부위를 절취하여 10% 중성포르말린용액에 고정한 다음 통상적인 조직처리 과정을 통하여 병리학적 검사를 실시하였다.

Haptoglobin치 측정 : 가검혈청내 haptoglobin의 정량 분석은 Jones & Mould¹²의 guaiacol-peroxidase 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, standard haptoglobin으로는 사람의 haptoglobin(Sigma)을, blank로는 증류수를 사용하였다. 검사방법은 먼저 flat-ELISA plate에 standard haptoglobin, 증류수, 가검혈청 50 μ l를 각각 분주한 뒤 0.5mg/ml의 methaemoglobin(Sigma)용액 50 μ l와 반응시킨다. 10분간 반응시킨 후 guaiacol 용액(guaiacol 6.82g, 1M acetic acid 183ml, D.W 700ml, pH, 4.0) 150 μ l를 모든 well에 분주한 다음, 곧바로 사용직전에 희석된 0.01M hydrogen peroxide 50 μ l를 첨가한다. 10분 후에 ELISA

(Ceres UV900) 흡광도 490nm에서 Curve fit program을 이용하여 측정하고 검사결과를 분석하였다. 모든 실험적은 2개 well의 평균치를 구하였다.

결 과

돼지 단독균을 정맥내에 인공감염시킨 후 체온 및 임상 증상을 매일 확인한 결과, 실험군 5두의 체온은 감염 1일째부터 상승하기 시작하여 지속적으로 정상치 이상의 높은 체온 상승을 나타내었다(Fig 1). 또한 감염 1일째부터 식욕결핍을 보인뒤 감염 2, 3일째에 각각 1마리가 갑자기 폐사하였다. 나머지 3마리는 보행이상 등 관절염 증상을 나타내었다(Table 1). 그러나 대조군 3두는 모두 정상적인 체온과 임상증상을 나타내었다.

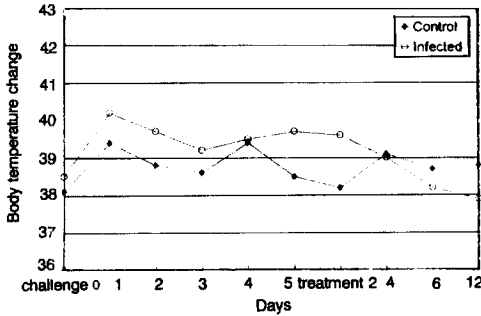


Fig 1. Variation of daily body temperature in infected and control pigs after a intravenously injection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and antibiotic treatment.

Table 1. Clinical signs induced by experimental infection with *Erysipelothrix rhusiopathiae* and antibiotic treatment in 2 months-old pigs

Group	Clinical signs										
	challenge*	0	1	2	3	4	5	treatment**	2	4	6(days)
Infected (n=5)	normal(5)***				anorexia(5)		death(2)				normal(3)
					Incoordination(3)						
Control (n=3)											normal(3)

* 5×10^9 /head, I.V injection

** Benzyl penicillin 6,000IU/kg, 3ml/head, I.M injection

*** No. of Positives

폐사된 2두에 대한 부검결과 비장의 종대 및 신장, 간에 충출혈이 있었으며, 관절에 활액이 많이 차있는 등 단독의 급성패혈증 증상을 나타내었다. 혈액검사 결과는 감염

후 1일째부터 미성숙 호중구의 급작스런 증가증을 보이는 등 일반적인 염증소견시 나타나는 것과 유사했다. 그러나 항생제 치료후 2일째부터는 차츰 정상수준의 혈액소견을 나타내기 시작했다(Fig 2).

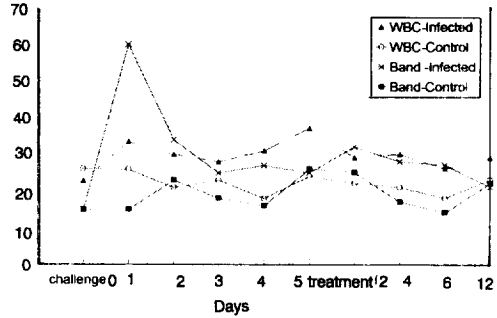


Fig 2. Variation of total WBC ($\times 1,000/\mu\text{l}$) and proportion of immature neutrophils(%) in infected and control pigs after intravenous-injection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and followed by antibiotic treatment.

한편 돼지의 혈청으로부터 단백질 양상을 비교 조사하기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 돼지 단독 감염 1일째부터 haptoglobin 밴드가 점점 뚜렷해져 3-4일째에 peak를 나타내었다. 그러나 항생제 치료 이후에는 밴드가 점차적으로 희미해져 감염전의 형태와 비슷하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig 3).

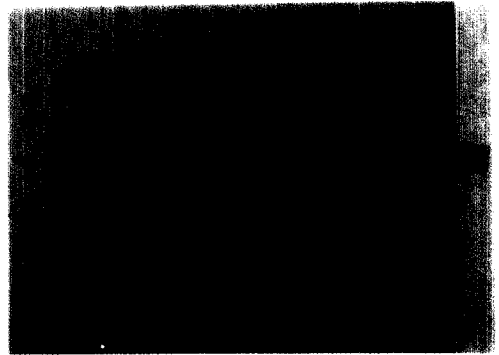


Fig 3. SDS-PAGE profile of haptoglobin in porcine sera obtained from infected pigs after intravenous-injection of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and followed by antibiotic treatment.

Lane 1 ; marker, 2 ; Haptoglobin(human), 3 ; before challenge, 4-8 ; 1, 2, 3, 4, 5 days after challenge, 9-10 ; 2, 4 days after antibiotic treatment, respectively.

이와같이 확인된 haptoglobin을 정량분석한 결과, 감염전에는 평균 28mg/dl의 농도를 나타내었으나, 감염 1일째부

터 증가하기 시작하여 감염 2일째에 86mg/dl의 농도로 최고치에 도달했다. 그러나 항생제 치료후에는 haptoglobin치가 점차적으로 감소되기 시작하여 치료 4일째에는 정상수준으로 돌아오는 것을 확인할 수 있었다(Fig 4).

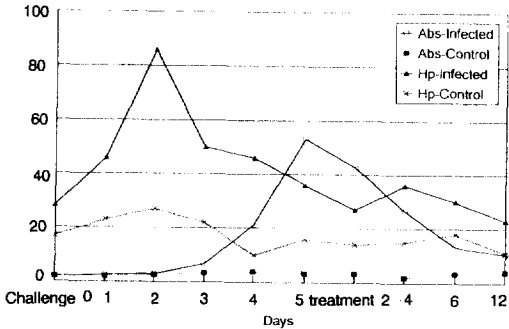


Fig 4. Comparison of antibody titers and haptoglobin concentrations(mg/dl) in infected and control pigs after intravenous-injection of *Erysiperothrix rhusiopathiae* and followed by antibiotic treatment.

돼지 단독에 대한 항체가는 감염전에는 20배 이하의 낮은 항체가를 나타내었으나 감염후에는 점차적으로 증가하기 시작하여, 감염 4일째에 40배 이상, 감염 5일째에는 80배로 peak를 나타내었다. 한편 혈청내 haptoglobin 농도와 체온, 총백혈구수 및 항체가와의 상호관계를 비교 조사하였던 바, 서로 밀접한 상관관계가 나타났으나 haptoglobin치의 상승이 감염후 가장 빠른 시간내에, 가장 높은 민감성을 나타내었다.

고 찰

사이토카인, 급성기단백질 등 염증매개물질들의 분석을 이용한 집단감염(herd health monitoring)의 이용 가능성은 아직까지는 실험실 수준에 머물고 있으며, 이 기법의 야외적용은 극히 초기적인 단계이다. 그러나 최근에 많은 연구들이 진행되면서 혈중의 급성기단백질 분석을 통하여 농장별 질병 발생양상을 파악하는데 이용하고자, 각 질병에 따른 급성기단백질 생성양상을 분석하기 위한 인공적인 동물감염시험 등이 많이 시도되고 있다^{3,13,14-16}.

따라서 본 연구에서는 최근 반추류에서 감염의 지침으로 널리 이용되고 있는 haptoglobin이 돼지의 급성감염 및 치료에 대한 반응의 indicator로서도 사용될 수 있는지를 조사하기 위하여, 급성질병이면서도 항생제 치료에 대한 감수성이 매우 높은 것으로 알려진 돼지 단독을 모델로

설정하였다.

먼저 돼지 단독균을 정맥내로 인공감염시킨 결과, 접종 2, 3일째에 각각 1마리가 폐사되고, 나머지 3두는 관절염 증상을 나타내었다. 이는 예와 석¹⁷이 혈관주사후 62시간에 폐사하였고 악하림프절, 간과 비장 종대 및 신장 충출혈 등의 부검소견을 보였다는 결과 등과 비추어 볼 때 실험군 5두의 돼지 단독감염이 확실한 것으로 여겨진다.

감염된 돼지의 혈청내 haptoglobin농도를 측정된 결과, 감염전에는 haptoglobin농도가 평균 28mg/dl이었던 것이 감염 1, 2, 3일째에는 각각 46, 86, 51mg/dl로 2배 이상의 높은 농도를 유지하였다. 이와같은 결과는 Eurell 등⁵이 임상적으로 건강한 비육돈과 성돈 80두의 혈액으로 부터 cyanomethemoglobin binding assay법으로 haptoglobin을 측정된 결과, 정상돼지의 haptoglobin범위가 1~50mg/dl(평균 24mg/dl)이었던 것과 비교해 볼 때 접종군 돼지와 대조군 돼지가 모두 건강한 상태였음을 나타내는 것으로 사료된다. 그러나 감염 1일째부터는 haptoglobin 농도가 증가하기 시작했는데, Eurell 등¹⁵이 *Pasueurella multocida* 인공감염 돼지에서 haptoglobin치가 감염전에 평균 30mg/dl이었던 것이 감염후 1, 3, 7, 14, 21일째에 각각 70, 104, 115, 65, 70mg/dl의 높은 농도를 보였다는 보고와 비교하면 본 연구의 결과치는 다소 낮은 것으로 나타났다. 이같은 차이는 접종균주의 병원성과 돼지의 건강상태 및 사양조건 등의 차이로 인한 것일 수 있다. 그러나 본 실험에서 감염후의 haptoglobin치는 감염전과 대조군에 비하면 현저한 차이를 보여줌으로써 돼지 단독감염증의 지표로서 haptoglobin이 매우 유용할 것으로 사료된다^{13,18}.

항생제 치료에 따른 haptoglobin 농도는 돼지 단독에 감염되었을 때에 비하여 점차적으로 감소하여 치료 4일째에는 정상수준으로 되돌아 왔다. 이와같은 결과는 Eurell 등⁵이 효과적인 치료 또는 자발적인 회복에 의해 급성기 단백질 혈청농도가 2~3일 이내에 정상치로 떨어질 수 있다고 보고했던 것처럼 치료의 지침으로서도 haptoglobin이 매우 유용할 수 있음을 시사하는 것으로 사료된다.

한편 haptoglobin 농도와 체온 등의 임상증상, 총백혈구수, 항체가들간의 상호관계를 조사한 결과 서로 밀접한 상관관계를 나타내었으나, haptoglobin이 가장 빠른 시간내에 가장 높은 민감성을 나타내었다. 이는 사람의 haptoglobin, C-reactive protein과 같은 급성기 단백질이 조직 손상후 사이토카인 등의 자극을 받아 6시간 이내에 상승될 수 있으며, 급성기 단백질이 PGE와 같은 염증매개물질 생산을 촉

진시켜 체온을 상승시킨다는 보고⁴⁻⁶등에 비추어 볼 때 감염초기에 질병감염 유무를 진단하는데 급성기 단백질인 haptoglobin이 매우 유용할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 급성기 단백질인 haptoglobin의 측정이 혈액학적 검사보다 검출 민감성과 특이성에 있어서 더 우수하며, 측정방법이 손쉽고 간편하게 수행할 수 있다. 또한 대량샘플을 동시에 검사할 수 있기 때문에¹⁹⁻²² 양돈장의 위생상태 및 감염유무를 점검하는데 매우 유용한 진단법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

돼지 단독균을 정맥내에 인공감염시킨 돼지 5두와 대조군 3두에서 급성기 단백질인 haptoglobin치, 체온, 혈액학치 및 항체를 비교하였다. 인공감염된 돼지는 급성패혈증으로 2두가 폐사되었고, 나머지 3두는 관절염의 증상을 나타내었다. 감염 돼지의 haptoglobin치는 감염후 1일째부터 증가하기 시작하여 2일째에 최고치에 도달했으며, 일반적으로 체온 및 혈액학치와 서로 밀접한 상관성을 나타내었다. 한편 항생제 치료후에는 감염된 돼지가 임상적으로 정상상을 회복하였으며, haptoglobin치도 점차적으로 감소하여 정상수준으로 되돌아 왔다. 이와같은 결과는 haptoglobin이 감염증에 대한 지표가 될 수 있음을 제시하였다.

참 고 문 헌

1. Carlton J. Measuring whole herd health with acute phase proteins. *Swine Practitioner*, 12-14, 1994.
2. Nakajima Y, Momotani E, Murakami T, et al. Induction of acute phase protein by recombinant human interleukin-6(IL-6) in calve. *Vet Immunol Immunopathol*, 35:385-391, 1993.
3. 유한상. cytokine 분석기법을 이용한 herd health monitoring. 한국축산환경안전성학회지, 2:27-36, 1995.
4. Verhoef J, Mattsson E. The role of cytokines in gram-positive bacterial shock. *Trends in Microbiology*, 3:136-140, 1995.
5. Eurell TE, Bane DP, Hall WF. Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs.

- Can J Vet Res*, 56:6-9, 1992.
6. Kemt J. Acute phase proteins : their use in veterinary diagnosis. *Br Vet J*, 148:279-282, 1992.
7. Saini PK, Webert DW. Application of acute phase reactants during antemortem and postmortem meat inspection. *JAVMA*, 198:1898-1991, 1991.
8. Leman AD, Straw B, Mengeling WL, et al. Erysipelas. p475. In:Disease of swine, 7th ed. *Iowa State Univ, Press. Iowa*, 1992.
9. Timony JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. The genus Erysipelothrix. p187. In:Hagan and Braner's Microbiology & Infectious disease of domestic animal, 8th ed. *Cornell Univ Press. Ithaca*, 1988.
10. Ewald FW. The genus Erysipelothrix. p1688. In:The prokaryotes, Vo2. *Springer-Verlag, Berlin*, 1981.
11. Cowan ST. Cowan & Steel's manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. *Cambridge Univ Press, Cambridge*, 1974
12. Jones GE, Mould DI. Adaptation of guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration system. *Research in veterinary science*, 37:87-92, 1984.
13. Eurell TE, Eurell JC, Bane DP, et. al. Serum haptoglobin is associated with experimentally-induced atrophic rhinitis in swine. *proc Minnesota swine Health program*, 18, 1990.
14. Pteffer A, Rogers KM, O'Keeffe L, et al. Acute phase protein response, food intake, live weight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. *Research in Veterinary Science*, 55: 360-366, 1993.
15. Skinner JG, Roberts L. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. *Veterinary Record*, 134:33-36, 1994.
16. Skinner JG, Brown RAU, Roberts L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Veterinary Record*, 128:147-149, 1991.
17. 예재길, 석호봉. 국내 돼지에서 분리한 Erysipelothrix rhusiopathiae의 정상 및 병원성에 관한 연구. 대한수의학회지, 31:201-208, 1991.
18. Krawer TT, Ahrens FA, Frank D. Acute phase response to Salmonella in a pig liver perfusion model.

- Vet Immunol Immunopathol*, 38:241-251, 1993.
19. Peeffer A, Rogers KM. Acute phase response of sheep : changes in the concentrations of ceruloplasmin, fibrinogen, haptoglobin and major blood cell types associated with pulmonary damage. *Research in Veterinary Science*, 46:118-124, 1989.
 20. Sheffield CL, Kamps-Holtzapfle C, De Loach JR, et al. Production and characterization of a monoclonal antibody against bovine haptoglobin and its use in an ELISA. *Vet Immunol Immunopathol*, 42: 171-183, 1994.
 21. Conner JG, Eckersall PD. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in Veterinary Science*, 44:82-88, 1988.
 22. Morimatsu M, Sarikaputi M, Syuto B, et al. Bovine haptoglobin : Single radial immuno diffusion assay of its polymeric forms and dramatic rise in acute phase sera. *Vet Immunol Immunopathol*, 33:365-372, 1992.
-