

忠南地域 屠畜豚의 肺病變으로 부터 分離한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 生物學的 및 免疫學的 特性

이종훈 · 안신욱 · 정영재 · 장경수* · 전무형*

충청남도 가축위생시험소 아산지소
충남대학교 수의학과*

Studies on biochemical and immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Isolated from the slaughter pigs with respiratory lesions in chungnam province

Jong-Hoon Lee, Shin-Uk An, Young-Jae Jung,
Kyung-Soo Chang*, Moo-Hyung Jun*

Asan Branch of Chungnam Veterinary Service Laboratory
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University*

Abstract

An epidemiologic study on pleuropneumonia in the slaughter pigs(Chonan and Asan area, Chungnam province, Korea) during the period of January 1994 through December 1995 was conducted. Isolation of *A pleuropneumoniae* was attempted in 425 pigs with pneumonic lesions. Biochemical properties, antimicrobial susceptibility, serotypes and pathogenicity of isolated *A pleuropneumoniae* were investigated.

In addition, outer membrane protein(OMP) of the isolates were extracted to determine its properties and immunogenicity in both mice and piglets

The results obtained through this study were summarized as followed ;

1. Of 3,395 slaughter pigs, pleuropneumonia was observed in 425 pigs(10.6%). *A pleuropneumoniae* was isolated from 22 pigs(5.2%) out of 425 pigs with pneumonic lesions. The biochemical properties of all isolates were same as those of reference *A pleuropneumoniae* strain.

- Among 22 isolates, 9, 1 and 12 isolates were serovar 2, 3 and 5, respectively.
2. The results of antimicrobial susceptibility test revealed that the isolates showed high susceptibility to ciprofloxacin and cephalothin, moderate susceptibility to amikacin, gentamicin, kanamycin and streptomycin, and low susceptibility to erythromycin, tylosin and sulfadimethoxin.
 3. The isolates were varied in pathogenicity to mice. Median lethal dose of LE9402(serovar 2) and LE9511(serovar 5) were 9.2×10^7 CFU and 2.8×10^7 CFU, respectively. Specific pneumonic lesions were observed from the infected mice with clinical signs. Bacteria recovery rate was high in the lung, but low in heart blood and tracheas.
 4. Serovar 2 was found to be more pathogenic than serovar 5 in guinea pig. Mortality on guinea pigs inoculated with serovar 2(5.4×10^8 – 5.4×10^6 CFU) and serovar 5(2.8×10^8 – 2.8×10^6 CFU) was 20~40% and 40~80%, respectively. A severe hemorrhagic lesions and focal pneumonic lesions were observed from dead guinea pigs. Bacteria recovery rate was relatively higher in the lung than that of other organs.
 5. In the SDS-PAGE analysis, OMP-enriched fractions of both isolates and reference strains contain common peptide bands equivalent to molecular weight of 17, 27, 42, 52 and 95Kd. In addition to common peptide bands, the bands which are specific to each isolate were also observed. The profiles of Sephadex G25 fractions showed 3 major peaks. The common peptide bands which were observed by SDS-PAGE of the crude OMPs were found in the peaks 1 and 2.
 6. The OMPs extracted from serovar 2(LE9402) and serovar 5(LE9511) provided high level of protection in mice(70~80%) and pigs(100%). All animals inoculated with OMPs were seroconverted, showing micro-agglutination titer of 640 to 1280.

Key words : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, OMP, Immunity

序 論

Actinobacillus pleuropneumoniae(*A. pleuropneumoniae*)는 돼지 흉막폐렴(swine pleuropneumonia)의 원인체이며, 그람 음성의 다양형 태성 단간균으로 통성혐기성균이며, 일반적으로 혈액배지에서 증식시 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD 또는 V factor)를 요구하며, 용혈성이 있고, CAMP(Christie, Atkins & Munch-Petersen)현상 및 ONPG(O-nitrophenyl-β-D-galacto-pyranocide) 양성을 나타낸다. 또한 Urease양성이며 H₂S를 생성하고, fructose, glucose, maltose, mannitol, sucrose, xylose 및 ribose등을 분해하나 운동성은 없다¹⁻³⁾.

이 병원체는 Pattison 등⁴⁾, Matthews와 Pattison⁵⁾이 돼지 폐렴병변에서 처음으로 분리하여 *Haemophilus-like organism*으로 보고하였으며,

Olander⁶⁾는 돼지의 유행성 패혈증 및 관절염에서, Shope 등⁷⁾은 급성 전염성 흉막폐렴병소에서 각각 분리하여 *Haemophilus parahaemolyticus*와 *Haemophilus pleuropneumoniae*로 명명하였으나, Nicolet와 Konig⁸⁾은 분리균의 배양 특성 및 생화학적 성상을 기초로 하여 이들이 같은 종의 균임을 확인하였다.

한편 Kilian 등¹⁾은 Pittman⁹⁾이 사람에서 분리한 *H. parahaemolyticus*는 돼지에서 분리한 *H. pleuropneumoniae*와 생화학적 성상 및 생리적 특성이 다르다고 주장하면서 돼지 흉막폐렴의 원인체를 *H. pleuropneumoniae*로 명명하기를 제안 하였으며, Pohl 등¹⁰⁾은 *H. pleuropneumoniae*의 DNA구조 및 phenotype 특성이 *Actinobacillus lignieresii*와 유사함을 연구하여 *Haemophilus genus*보다는 *Actinobacillus genus*에 더 가까움을 밝히고 *Actinobacillus pleuropneu-*

moniae로 명명할 것을 주장하였으며, The congress of 11th International Pig Veterinary Society에서는 돼지 흉막폐렴의 원인균을 *A pleuropneumoniae*로 통일하도록 명시한 바 있다.

*A pleuropneumoniae*에 기인하여 발병하는 돼지 흉막폐렴은 발열, 원기소실, 식욕부진, 호흡곤란, 복식호흡 등의 증상을 보이며, 밀집사육, 환기불량, 갑작스러운 환경변화, 높은 습도 또는 수송 등 스트레스가 가해져 항병력이 저하되었을 때 모든 일령에서 발병 가능하나 주로 3개월령 전후의 비육돈에서 발병하며, 성장지연과 사료효율의 저하 그리고 폐사로 인하여 양돈업에 많은 경제적 손실을 야기한다^{8,11,12}).

이환돈에 대한 부검소견으로는 기관, 기관지에 거품이 있는 혈액성 삼출물, 과다한 흉수와 심낭수, 폐 소엽간 결체적의 과다증식과 대엽성 괴사 및 출혈성 섬유소성 폐렴 등이 흔히 관찰되는 것으로 알려져 있으며^{7,11,13,14}), 감염에서 회복된 돼지는 임상적 증상없이 만성적으로 질병이 진행되어 보균돈이 된다^{11,14}).

본 병은 현재 전 세계적으로 발생보고가 있으며¹¹), 국내에서는 1979년 처음 보고된 이후 현재까지 지속적으로 발병되고 있다¹⁵⁻²⁵). 박 등¹⁵)과 마 등¹⁶)은 돼지의 폐렴병변으로부터 *H parahemolyticus*를 분리하였음을 보고하였고, 이 등¹⁹)은 경북지방의 한 양돈장의 비육자돈군 200두에서 폐렴예를 임상적 관찰 및 부검소견에 의해 흉막폐렴 발생을 보고하였다. 또한 박 등¹⁷)은 도축돈 90예 중 23예(26%)로부터 *H pleuropneumoniae*를 분리하여 혈청형 2, 3, 4 및 5임을 보고하였으며, 예 등¹⁸)은 경기도지역에서 발생한 흉막폐렴 이환돈으로부터 *H pleuropneumoniae*를 분리하고 분리주는 주로 혈청형 2와 5이었음을 보고하였다. 또한 정²³)은 영남지역에서 호흡기 이환돈 및 도축돈 393두 중 38두(9.7%)로부터 *A pleuropneumoniae*를 분리하여 혈청형 2, 5, 7, 10 및 12임을 보고하였으며, 박 등²⁰)과 조²⁵)은 흉막폐렴균의 면역원성을 조사하였다.

*A pleuropneumoniae*의 혈청형(serotype)은 cell envelope의 capsular poly-saccharide와 lipopolysaccharide의 성상에 따라 결정되며 현

재까지 1~12형의 혈청형이 알려져 있고^{26,27}) 국내에서는 2, 3, 4, 5, 7, 10 및 12형이 보고되었다^{17,21,23}). 이들 혈청형은 상호 교차반응하며, 1형은 9, 11형, 3형은 5, 6형, 4형은 7형 그리고 8형은 3과 6형에 대해 각각 교차반응이 일어나며²⁸⁻³⁰), 주로 lipopoly-saccharide와 out membrane protein(OMP)에 의해 기인된다고 보고된 바 있다^{31,32}).

한편 Niven과 Levesque³³)은 *A pleuropneumoniae*의 종을 biovar I (NAD-dependent strains)과 II (NAD-independent strains)로 구분하여 biovar I에 1~12형의 혈청형을 두었으며, biovar II은 NAD 생합성에 있어서 전구물질인 pyridine nucleotide를 요구함을 보고하였다. 한편 Nielsen³⁴)은 혈청형 5를 다시 2개의 subtype 5a 및 5b로 세분하였다.

돼지흉막폐렴의 병인기전은 capsular polysaccharide^{35,36}), lipopoly-saccharide^{37,38}), hemolysin과 cytotoxin³⁹), outer membrane protein⁴⁰) 등이 관여하는 것으로 알려져있다. 그리고 Nordstoga와 FjØIstad⁴¹)은 내독소에 의한 Schwartzman반응으로 신사구체의 혈전과 혈관의 섬유소성 혈전 및 혈관벽의 섬유소성 괴사와 폐장의 단핵구 및 호중구의 세포반응으로 인한 폐포벽의 비후가 일어나며, Fenwick와 Olander⁴²)은 마우스 폐장의 혈관 확장 및 수종성 변화와 출혈성 소견을 동반한 기관지폐렴 소견이 유사한 병인기전에 의해 발병한다고 지적하였다.

*A pleuropneumoniae*의 항원성상에 대한 연구는 여러 학자들에 연구된 바 있다⁴³⁻⁴⁵). 감염 동물에 면역반응을 일으킬 수 있는 주요 항원물질로는 cell envelope의 구성성분인 capsular polysaccharide, lipopolysaccharide 그리고 outer membrane protein이 있음이 보고되었다^{31,32}). 이중 OMP는 감염동물에서 균체의 다른 성분보다 먼저 lymphocyte와 반응함으로써 감염에 대해 주요한 방어항체를 생산하는 항원물질로 간주되었고⁴⁰), 혈청형에 특이하게 작용하는 capsular polysaccharide와는 대조적으로 OMP는 모든 혈청형에 대해 공통적으로 높은 수준의 항체를 형성하기 때문에 면역원으로 중요한 역할을 한다고 지적된 바 있다⁴⁴). 또한 Udeza와

Kadis⁴⁵⁾는 OMP가 lymphocyte의 cytotoxicity를 높이고 Richard와 Solomon⁴⁷⁾은 다형핵 백혈구의 식작용을 항진시켜 준다는 연구결과를 보고하였으며, 이들 OMP가 세포면역반응을 높여주는 면역원임을 지적한 바 있었다.

Nicolet 등⁴⁵⁾, Barenkamp 등⁴⁸⁾은 OMP는 *A pleuropneumoniae*의 집락형태, 배지성분, 배양 시간 및 계대수에 상관없이 동일한 단백질 패턴을 보였다고 보고 하였다.

Janet와 Søren⁴⁹⁾은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-phoresis(SDS-PAGE)로 *A pleuropneumoniae*의 OMP를 분석하고, 주요 단백질 분자량은 17K, 32K 및 42K라 하였으며, *A pleuropneumoniae* 5형의 균체로 면역한 항혈청에 대하여 1~8형의 균체항원으로 immunoblotting한 결과 공통적으로 이들 단백질이 존재함을 증명하였다. 또한 OMP의 합성과정에서 NAD의 이용능에 따라 영향을 받을 수 있음을 보고하였다.

또한 Vicki와 Richard⁴⁰⁾는 *A pleuropneumoniae*의 혈청형 1형부터 5형의 각 균체로 면역한 돼지 혈청형에 대하여 OMP 항원으로 immunoblotting한 결과 분자량 16.5K, 29K, 38.5K, 45K 및 66.5K의 단백질항원, 54K와 95K의 poly-saccharide항원을 증명하고 단백질항원을 분석하여 혈청형 특이성을 확인한 바 있다.

국내에서는 조²⁵⁾가 서울, 경기 및 경남지역 도축장에서 도축돈의 폐로부터 분리한 *A pleuropneumoniae*의 생물학적 성상에 대해 구명하고 분리주의 OMP 성상을 SDS-PAGE를 분석한바 17K, 22K, 27K, 32K, 38.5K, 42K 및 52.5K의 분획이 공통적으로 나타났고, 2형에서는 46K, 3형에서 26.4K와 63K, 6형에서 46K, 1과 5형에서 64.5K 그리고 2, 3, 4 및 6형에서 66K의 특이 분획이 관찰되었음을 보고하였다. 또한 추출한 OMP가 마우스와 자돈에서 면역원성이 있음을 보고한 바 있다. 그러나 아직 국내 분리주의 OMP성상을 평가하기 위해서는 실험자료가 부족한 실정이다. 또한 OMP의 조성성분과 항원성은 연구자가 사용한 균주에 따라 다르게 나타나며, 이는 돼지 흉막폐렴의 역학과 항원물질 개발에 중요한 요인이 된다고 지적된 바

있다¹¹⁾.

본 연구에서는 충남 북부지역의 도축돈에서 분리한 *A pleuropneumoniae*의 생물화학적 성상을 밝히고 아울러 분리균주로 부터 추출된 OMP의 단백질의 조성과 면역원성을 구명하고자 일련의 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시균주

가. 표준균주

수의과학연구소에서 분양받은 *A pleuropneumoniae* serotype 1(Shope 4074), serotype 2(S 1536), serotype 3(S 1421), serotype 4(M 62), serotype 5(K 17) 및 serotype 6(Fem ϕ)을 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD, Sigma)를 5 μ g/ml 농도로 첨가한 tryptic soy agar에 접종한 후 10% CO₂에 18시간 배양한 다음 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용하였다.

나. 분리균주

분리균주 22주 중 serotype 2(LE 9402, LE 9407), serotype 3(L 9403) 및 serotype 5(LE 9510, LE 9511)을 병원성 시험, 단백질 분획상 측정 및 면역원성시험 등에 공시하였다.

2. *A pleuropneumoniae* 분리

가. 가검 재료

1994년 1월부터 1995년 12월 사이에 충남북부지역(천안 및 아산지역)에서 도축장으로 출하되는 돼지중 도축시 육안적으로 흉막폐렴병변이 인정되는 425두의 폐장 장기를 균분리 재료로 사용하였다.

나. 사용배지

균분리 목적으로 사용한 배지는 brain heart infusion(BHI, Difco, NAD 5 μ g/ml 첨가), tryptic soy agar(TSA, Difco, NAD 5 μ g/ml), blood agar base(7% 면양혈액), chocolate agar(blood agar base, 7% 면양혈액, 80 $^{\circ}$ C에서 30분 처리) 등을 사용하였다.

다. 균분리

Kilian 등¹⁾, Olander⁶⁾ 및 Nicolet 등⁸⁾의 방법을 응용하여 수행하였다.

폐렴이 육안적으로 뚜렷이 인정되는 폐병변의 일부를 멸균된 스페시멘컵(녹십자)에 무균적으로 채취하여 실험실로 운반 즉시, 재료를 유제화하여 BHI broth(NAD 5 μ g/ml)에 10진법 계단으로 104배까지 희석한 다음 각 희석액 0.5 ml을 chocolate agar, TSA(NAD 5 μ g/ml)에 각각 접종한 후 10% CO₂ 분압하에서 18~24시간(37 $^{\circ}$ C) 배양한 뒤, 집락의 형태, 용혈성, 그람 염색성 및 균의 형태 등을 통해 *A pleuropneumonia*로 추정하고 동정실험을 실시하였다.

라. 생화학적 성상

Biberstein 등²⁾, Lombin 등³⁾ 및 Shope 등⁷⁾의 방법을 응용하여 수행하였다.

Blood agar(7% 면양혈액)에 균을 도말한 다음 V 및 X factor strip (BBL)을 떨어뜨려 밀착되게 하고, 10% CO₂ 분압하에서 18~24시간(37 $^{\circ}$ C) 배양하여 V factor(NAD)요구성 및 용혈성을 조사하였으며, 한편 *Staphylococcus aureus*(β -hemolysis)를 배지 중앙에 횡선 접종한 후 위와 같은 조건에서 배양하여 위성현상을 조사하였다. 당분해시험은 phenol red broth(BBL, NAD 5 μ g/ml)를 기초배지로 하여 adonitol, dulcitol, fructose, glucose, inositol, inulin, lactose, maltose, mannitol, raffinose, rhamnose, ribose, sorbitol, sucrose, trehalose 및 xylose 등을 0.1% 첨가하여 10% CO₂ 분압하에서 18~24시간(37 $^{\circ}$ C) 배양한 후 당분해능을 조사하였다. Catalase 생성능은 TSA(NAD 5 μ g/ml)에서 발육된 세균의 집락을 선택하여 그 집락위에 3% H₂O₂액 2~3 방울을 떨어뜨려 기포가 생성됨을 기준으로 삼았다. Urea 분해능은 NAD 5 μ g/ml를 첨가한 urease test broth (BBL)에 분리균을 접종하여 48시간만에 배양액이 적색으로 변하는 것을 양성으로 판정하였다.

3. 항균제 감수성

Penicillin-G(PCG), ampicillin(AM), cephalothin(CF), ciprofloxacin(CIP), amikacin(AK), gentamicin(GM), kanamycin(KM), streptomycin(SM), chlortetracycline(CTC), oxytetracycline(OTC), erythromycin(EM), tylo-

sin(TS), lincomycin(LM), sulfadimethoxine(SDM), tiamuline(TM) 및 spiramicin(SP) 등 16종의 항균제의 *A pleuropneumoniae*에 대한 minimum inhibitory concentration(MIC) 측정은 Sahm 등⁵⁰⁾의 방법에 따라 agar dilution method에 의해 실시하였으며, TSA(NAD 5 μ g/ml)를 공시배지로 사용하였다. 모든 약제는 Sigma제재를 사용하였고, Anhalt 등⁵¹⁾에 방법에 준하여 적합한 용매에 용해시킨 다음 희석하여 사용하였다. BHI broth(NAD 5 μ g/ml)에 10% CO₂ 분압하에서 24시간(37 $^{\circ}$ C) 배양한 균액을 멸균생리식염수로 100배 희석한 후 multi-inoculator를 사용하여 공시약제가 함유된 TSA(NAD 5 μ g/ml)에 접종하였으며, 접종배지를 10% CO₂ 분압하에서 24시간(37 $^{\circ}$ C) 배양한 후 접종부위에서 균의 발육유무를 관찰하여 약제의 MIC를 결정하였다.

4. 혈청형 동정

가. 토끼면역혈청 제조

심 등²⁴⁾, Gunnarsson⁵²⁾ 및 Rapp 등⁵³⁾의 방법에 준하여 제조하였다.

각 serotype별로 균주를 TSA(NAD 5 μ g/ml) 배지에 접종하여 10% CO₂ 분압하에서 18~24시간(37 $^{\circ}$ C) 배양한 후 멸균생리식염수로 채균하여 9,000 \times g에서 20분간 원심세척(3회)한 다음, 0.3% formalin에 ml당 균체를 100mg되게 부유시켜 항원을 제조하고 이들 항원을 4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 토끼에 대한 접종과 *A pleuropneumoniae*의 OMP로 면역한 마우스 및 돼지 혈청에 대한 항체조사를 위한 항원으로 사용하였다. 항원의 접종은 임상적인 호흡기증세가 없는 약 2.5~3.5kg되는 토끼(New Zealand White, ♂)에 항원을 5mg/ml되게 조정한 후 incomplete Freund's adjuvant를 동량 혼합한 것을 2.0ml씩 피하와 근육에 동시에 주사하고, 5일 간격으로 0.5ml, 1.0ml 및 2.0ml을 이정맥 내로 주사하였으며, 최종 주사후 7일에 전체혈하여 혈청을 분리한 후 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용하였다.

나. 면역확산시험

분리균의 혈청형을 동정하기 위하여 심 등²⁴⁾,

Mittal 등²⁶⁾ 및 Gunnarsson⁵²⁾ 방법을 응용하여 실시하였다.

TSA(NAD 5 μ g/ml)에 배양한 각 혈청형의 표준균주 및 분리균주를 멸균식염수로 채균하여 9,000 \times g에서 20분간 냉장원심한 후 상층액을 버리고 침전된 균량을 40배의 5mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)로 부유시켜 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 교반한 후에 9,000 \times g에서 20분 동안 냉장원심후 0.2ml filter 여과기로 여과하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하며 항원으로 사용하였다. 0.05M tris buffer(pH 7.2)에 agarose(Sigma)를 0.7% 되게 agar를 제조한 후 87mm \times 15 mm 페트리디쉬에 20ml씩 분주하고, 응고시킨 후 젤펀처를 이용하여 직경 3mm의 구멍을 6mm간격으로 만들었다. 이 구멍에 마이크로피펫으로 항원 또는 혈청을 0.02ml씩 주입하고, 습윤상자에 넣은 후 실온에서 48시간 반응시켜 침강선의 형태를 관찰하였다.

5. 분리주의 실험동물에 대한 병원성

가. 공시동물

마우스 및 기니픽을 균 접종시험에 공시하였으며, 4~5주령의 I.C.R.계 마우스 및 7~8주령의 Hartley계 기니픽은 사육온도 24 \pm 3 $^{\circ}$ C 유지하면서 마우스용 사료(삼양사료)를 자유급식하였다. 공시동물은 입식 후 10일간 관찰하여 호흡기 증상이 없는 것을 사용하였다.

나. 동물 접종

Sebuny와 Saunders^{54,55)} 및 Nakai 등⁵⁶⁾의 방법을 응용하여 수행하였다.

분리균 2주(2형과 5형)의 마우스 및 기니픽에 대한 병원성을 조사하기 위하여 분리균주를 BHI broth(NAD 5 μ g/ml)에 접종하여 10% CO₂ 분압하에서 18시간(37 $^{\circ}$ C) 배양한 다음 균액을 PBS(pH 7.0, NAD 5 μ g/ml)으로 3회 원심세척하고 균농도를 PBS(pH 7.0, NAD 5 μ g/ml)로 조정하여 접종하였다. Colony forming unit (CFU)는 TSA agar(NAD 5 μ g/ml)을 이용하여 drop plate count 방법으로 산정하였다.

처리군당 마우스 및 기니픽을 10수 및 5수씩 각각 배정하였으며, 1개의 대조군을 별도로 두어 접종시험을 실시하였다. 공시동물을 에테르로

마취한 후 흡기시에 세균 부유액을 마우스에는 0.1ml 그리고 기니픽에는 0.5ml씩을 비강내로 접종하고, 대조군은 세균 부유액 대신 동량의 PBS(pH 7.0, NAD 5 μ g/ml)를 접종하였다. 시험동물은 10일간 임상증상을 관찰하고, 관찰기간에 폐사된 동물과 시험종료시까지 생존한 동물은 부검하여 흉강장기를 관찰하였고, 균 분리 시험을 수행하였다. 한편, 마우스에 대한 중간 치사량(median lethal dose ; MLD)은 Reed와 Muench⁵⁷⁾의 방법에 따라 측정하였다.

6. OMP 추출

OMP 추출은 Vicki와 Richard⁴⁰⁾의 방법에 준하였으며, 분리 A *Pleuropneumoniae* 5주 및 표준균 3주를 BHI broth(NAD 5 μ g/ml)에 각각 배양한 후 1,200 \times g에서 30분간 원심하여 침전균체를 10mM HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid, Sigma) buffer (pH 7.4)로 10% 균 부유액을 만들었다. 균부유액은 고속 초음파 장치(Sonics model VC 375-VC 600, tapered microtip, 375 W)에서 20분 간격으로 2회 반복하여 균체를 파괴하였으며, 파괴 과정중의 재료는 얼음통에 보관하였다. 균체를 파괴시킨 후 500 \times g로 20분간 원심 침전한 다음 상층액을 취하여 560,000 \times g로 60분간 냉장원심한 후 침사를 1ml HEPES buffer (pH 7.4)에 부유시키고 1% (wt/vol) sarkosyl (sodium N-lauroyl-sarcosinate, Sigma)을 가하여 실온에서 30분간 정치한 후 560,000 \times g로 60분간 냉장원심하여 침전된 OMP-enriched extracts(OMP)을 회수하였다. OMP 정량은 Biuret반응법을 이용하였다. 약술하면, 표준용액을 bovine serum albumin으로 사용하여 파장 540nm에서 표준곡선을 정한 후 흡광도를 측정하여 OMP를 정량하였으며, deionized water로 OMP 농도 1mg/ml로 조절하여 -70 $^{\circ}$ C에 냉동보관하였다. 한편, OMP를 Sephadex G-25 column(PD-10, Pharmacia)을 사용gel-filtration하여 분획한 후 흡광도(540nm)를 측정하였으며, 또한 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)하였다. 즉, OMP 용액을 column의 상층에 가한 후,

인산완충생리식염수액(0.083M sodium phosphate, 0.9% NaCl, pH 7.2)으로 용출시키면서 용출액을 1ml씩 20개의 시험관에 모아 각 분획의 흡광도 및 SDS-PAGE로 단백질 패턴을 확인하였다.

7. SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Janet와 Søren⁴⁹⁾의 방법에 따라 수행하였다. 약술하면, BHI agar(NAD 5µg/ml)에 접종하여 10% CO₂ 분압하에서 18~24시간(37°C) 배양하여 얻어진 smooth colony를 인산완충식염수(PBS, pH 7.0)으로 회수한 다음 PBS를 1회 세척하여 얻어진 균체(whole-cell) 부유액과 위에서 준비된 OMP에 각각 sample buffer(0.125M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-ME)를 동량으로 가하여 100°C에서 5분동안 boiling한 후 2,000×g로 원심한 상층액을 전기영동 재료로 사용하였다. Separation gel 20ml, running gel buffer 15ml, 10% SDS 0.6ml, H₂O 24.1ml, ammonium persulfate 300µl, TEMED 20µl, stacking gel 등으로 구성된 10% polyacrylamide gel의 각 well에 재료 20µl를 넣고 60V에서 12~15시간 전기영동한 후 0.125% Coomassie brilliant blue로 염색하고 destaining solution I (5% methanol, 7% acetic acid, 88% H₂O)로 1차 탈색한 다음 다시 destaining solution II (10% methanol, 10% acetic acid, 80% H₂O)로 2차 탈색한 후 나타난 분획을 molecular weight marker [MW-SDS-L70 kit : β-galactosidase ; 116,000, phosphorylase B(rabbit muscle) ; 97,400, bovine albumin ; 66,000, egg albumin (ovalbumin) ; 45,000, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; 36,000, trypsinogen (bovine pancreas) ; 24,000, trypsin inhibitor (soybean) ; 20,100, α-lactoalbumin(bovine milk) ; 14,200]와 비교하여 단백질 분자량을 측정하였다.

8. OMP의 동물접종

접종용 OMP는 Thacker 등⁵⁸⁾의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 준비된 OMP 용액(1mg/ml)에 수산화알루미늄[Al(OH)₃]겔을 5배 되게 가한 다음 자석교반기를 이용하여 4°C에서 24시간

혼합한 후 다시 4°C에서 24시간 정치한 것을 공시하였다.

안전성 시험을 위해 준비된 OMP 항원을 마우스와 기니픽에 각각 1.0ml 및 3.0ml씩을 복강내에 접종하고 10일간 관찰하였다. 또한 면역원성 시험을 위해서 OMP항원을 마우스에는 0.2ml를 복강내, 그리고 자돈에는 1.0ml를 근육에서 2주 간격으로 2회 접종한 후 마이크로응집시험(MAT)으로 혈중항체가를 측정하였다. 또한, 방어능을 측정하기 위하여 10MLD의 병원성 분리주(LE 9511)를 ether로 흡입마취된 마우스에는 0.2ml 그리고 azaperone을 근육 주사하여 마취시킨 자돈에는 5.0ml를 각각 비강내로 공격접종한 다음 2주간 관찰하였다. 관찰이 종료된 시험돈은 도살부검하고 비강, 기관, 폐장 및 심장혈액으로 부터 균분리를 시도하였다. 또한 시험기간 중 마우스는 미정맥 그리고 자돈은 전대정맥으로 부터 정기적으로 채혈하여 혈청을 준비하였으며 -20°C에 보관하여 공시하였다. 공시자돈은 입식후 10일간 관찰하여 호흡기 증상이 없고 *A pleuropneumoniae* 대한 항체 음성인 5주령의 건강한 자돈을 사용하였다.

9. 마이크로 응집시험(micro-agglutination test : MAT)

분리 *A pleuropneumoniae*의 OMP로 면역한 마우스 및 자돈의 혈중 항체가 측정은 심 등²⁴⁾, Gunnarsson³²⁾ 및 Mittal 등³⁹⁾의 방법을 응용하여 micro-agglutination test(MAT)로 수행하였다. 약술하면 항원을 1.25mg/ml 농도로 조정하였으며, 각 혈청을 마이크로플레이트(U-bottomed 96 well microplate : 녹십자)에 배수회석법으로 0.05ml 되게 희석한 다음 동량의 항원을 가하고 습윤상자에 넣고 52°C에서 18시간 반응시킨 후 37°C에서 18시간 반응시켜 응집을 나타내는 최종희석배수의 역수를 역가로 산정하였다.

결 과

1. *A pleuropneumoniae* 분리 및 생화학적 성상

1994년 1월부터 1995년 12월 사이에 충남북부지역(천안 및 아산지역)에서도 축장에 도살되는 돼지에 대해 흉막폐렴의 발생빈도를 조

사하고, 병변 부위로 부터 *A pleuropneumoniae*를 분리한 결과는 Table 1과 같다. 도축돈 3,995두 중 425두(10.6%)에서 흉막폐렴 소견이 관찰되었고, 그 가운데 22주의 *A pleuropneumoniae*가 분리되었다. 지역적으로는 천안지역이 아산지역에 비해 높은 흉막폐렴 발생률과 균 분리율을 나타내었다.

Table 1. Isolation frequency of *A pleuropneumoniae* from 3,995 slaughter pigs by district

Districts	No of slaughter pig	No(%) of pig with lung lesions	No(%) of <i>A pleuropneumoniae</i> isolated
Chonan	2,318	269(11.6)	18(6.7)
Asan	1,677	156(9.3)	4(2.6)
Total	3,995	425(10.6)	22(5.2)

흉막폐렴의 발생률과 균분리율을 계절별로 분석한 바(Table 2), 발생률은 봄과 겨울에 163예(16.5%) 및 140예(13.7%)로 여름과 가을에 비해 높았으며, 균 분리율은 봄에 11주(6.7%), 겨울에 9주(6.4%), 여름에 1주(1.7%) 및 가을에 1주(1.5%)가 분리되어 봄과 겨울에 높은 분리율을 보였다.

Table 2. Seasonal frequency of isolation of *A pleuropneumoniae* from 3,995 slaughter pigs

Season	No of slaughter pig	No(%) of pig with lung lesions	No(%) of <i>A pleuropneumoniae</i> isolated
Spring	990	163(16.5)	11(6.7)
Summer	998	58(5.8)	1(1.7)
Fall	982	64(6.5)	1(1.5)
Winter	1,025	140(13.7)	9(6.4)
Total	3,995	425(10.6)	22(5.2)

분리균주 22주와 *A pleuropneumoniae* reference strain 6주에 대한 생화학적 성상 시험을 수행한 결과는 Table 3에 있는 바와 같다. V factor 요구성, 위성현상, CAMP 현상, ONPG 시험 및 urease 생성능은 모두 양성반응을 나타냈으며, X factor, Indole 생성 시험은 모두 음성반응을 나타냈고 운동성은 없었다. 한편,

용혈성은 표준균주 6주 모두 양성반응을 보였으나 분리균주는 20주(91%)만이 양성반응을 보였고, Catalase 생성반응에서는 분리균주중 4주(18%)가 양성반응을 보였으나 reference strain은 모두 음성반응을 보였다.

당 분해시험(Table 4)에서는 분리균주와 표준균주 모두 fructose, glucose, inulin, rhamnose, ribose, sucrose 및 xylose에서 양성반응을 보였으며, adonitol, dulcitol 및 trehalose에서는 모든 균주가 음성을 나타내었다. 한편, inositol, inulin 및 sorbitol에서 표준균주는 음성반응을 보인 반면 분리균주는 각각 9%, 18% 및 5%의 양성반응을 보였다.

Table 3. Biochemical properties of reference strains and isolates of *A pleuropneumoniae*

Properties	No(%) of positive	
	isolates(22)	reference strains(6)
V factor requirement	22(100)	6(100)
X factor requirement	0(0)	0(0)
Hemolysis(Sheep blood)	20(91)	6(100)
Satellitism in blood agar	22(100)	6(100)
CAMP reaction(Sheep blood)	22(100)	6(100)
ONPG test	22(100)	6(100)
Catalase	4(18)	0(0)
Indole production	0(0)	0(0)
Urease production	22(100)	6(100)
Motility	0(0)	0(0)

2. 분리균주에 대한 항균제 감수성

분리균 22주의 16종의 항균제에 대한 MIC 측정결과는 Table 5에 나타난 바와 같다. CIP 및 CF는 고도의 감수성(MIC : 0.02~0.39 µg/ml)을 보였으며, β-lactam 항균제인 PCG 및 AM은 높은 감수성(MIC : 0.10~12.5 IU or µg/ml)을 나타냈다. 그리고 aminoglycosides의 AK, GM, KM 및 SM은 중등도의 감수성(MIC : 0.20~25 µg/ml)을 보였으며, tetracycline의 CTC 및 OTC은 넓은 범위의 감수성(MIC : 0.05~100 µg/ml)을 나타냈다. 한편 macrolides의 EM, TS와 SDM은 낮은 감수성(MIC : 12.5~>100 µg/ml)을 보였다.

Table 4. Carbohydrate fermentation of reference strains and isolates of *A pleuropneumoniae*

Properties	No(%) of positive	
	isolates(22)	reference strains(6)
Adonitol	0(0)	0(0)
Dulcitol	0(0)	0(0)
Fructose	22(100)	6(100)
Glucose	22(100)	6(100)
Inositol	2(9)	0(0)
Inulin	4(18)	0(0)
Lactose	5(23)	2(33)
Maltose	21(96)	6(100)
Mannitol	20(91)	6(100)
Raffinose	7(32)	2(33)
Rhamnose	22(100)	6(100)
Ribose	22(100)	6(100)
Sorbitol	1(5)	0(0)
Sucrose	22(100)	6(100)
Trehalose	0(0)	0(0)
Xylose	22(100)	6(100)

3. 분리주의 혈청형

토기항혈청을 이용한 면역확산시험 방법으로 혈청형을 조사하였던 바, 표준 균주는 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 동종 항혈청에 특이적으로 양성반응을 나타냈으나, 이종 혈청에는 음성이었다. 분리균 22주는 혈청형 2형에 9주, 혈청형 3에 1주 및 혈청형 5에 12주가 특이적으로 반응하였다(Fig. 2 및 Table 6).

4. 분리주의 병원성

가. 마우스에 대한 병원성 및 중간치사량 측정

분리주 LE 9402(2형) 및 LE 9511(5형)의 마우스에 대한 병원성 시험을 실시한 결과는 Table 7과 같다. 분리균주 LE 9402를 마우스 수당 5.4×10^8 CFU를 접종하였던 바, 10수 모두 폐사하였다. 일자별로는 6수는 접종 2일 이내에 아무런 임상증상 없이 갑자기 폐사하였으며, 3수는 4일째, 나머지 1수는 5일째 식욕부진 및

Table 5. Susceptibility of 22 isolates of *A pleuropneumoniae* to various antimicrobial drugs

Antimicrobial drugs	No of isolate with indicated MIC _{1/4} µg/ml													
	0.02	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	1/3100
PCG*	—	—	—	4	2	3	6	6	—	1	—	—	—	—
AM	—	—	2	5	9	4	2	—	—	—	—	—	—	—
CF	1	5	12	1	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CIP	12	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AK	—	—	—	—	—	2	1	2	9	8	—	—	—	—
GM	—	—	—	1	9	1	2	—	4	5	—	—	—	—
KM	—	—	—	—	—	4	2	—	—	5	—	2	—	—
SM	—	—	—	—	—	—	1	—	7	2	12	—	—	—
CTC	—	2	4	—	4	2	—	1	—	3	1	5	—	—
OTC	—	—	3	1	2	2	1	—	3	9	1	—	—	—
EM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13	5	2	2	—
TS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	7	3	3	4
LM*	—	—	—	—	—	1	3	7	2	4	3	2	—	—
SDM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	18	—	3
TM	—	—	—	—	—	—	—	5	5	7	1	4	—	—
SP	—	—	—	—	2	—	2	6	1	4	—	7	—	—

*International unit per milliliter(IU/ml)

PCG : penicillin-G, AM : ampicillin, CF : cephalothin, CIP : ciprofloxacin,
 AK : amikacin, GM : gentamicin, KM : kanamycin, SM : streptomycin,
 CTC : chlortetracycline, OTC : oxytetracycline, EM : erythromycin, TS : tylosin,
 LM : lincomycin, SDM : sulfadimethoxine, TM : tiamuline, SP : spiramicin.

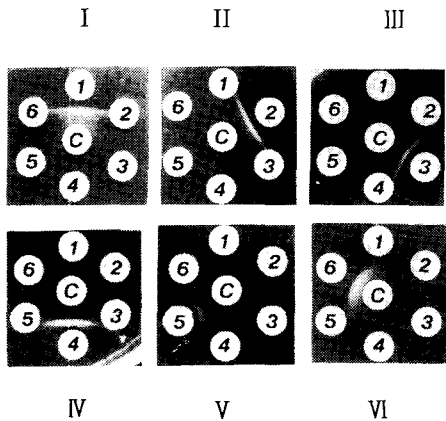


Fig 1. The precipitating patterns of *A pleuropneumoniae* reference strains in agar-gel immunodiffusion test.

Central wells and the surrounding wells were filled with rabbit antisera of serotype 1 to 6 and the EDTA antigens of the reference strains type 1 to 6, respectively.

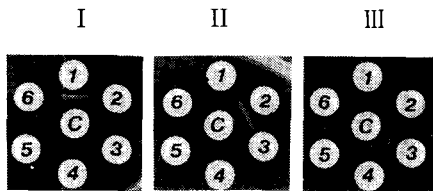


Fig 2. The precipitating patterns of *A pleuropneumoniae* isolates in agar-gel immunodiffusion test

Central wells and surrounding wells were filled with EDTA antigen of the isolates type 2, 3, 5 and the rabbit antisera type 1, 2, 3, 4, 5 and 6, respectively.

The picture I, II and III indicate type 2, type 3 and type 5, respectively.

원기소실의 임상증상을 보이면서 폐사하였다. 폐사한 마우스의 폐(7예), 심장혈액(3예) 및 기관(2예)으로 부터 균이 재분리되었으며, 폐사한 마우스에서 심한 출혈성 폐렴 병변이 인정되었다.

5.4×10^7 CFU를 접종한 군에서는 10수 중 4수가 폐사하였으며, 폐(5예), 심장혈액(3예) 및 기관(1예)에서 균이 재분리되었다. 폐병변은 출혈성 및 국소성 폐렴병변이 각각 4수이었으며, 병변이 없는 것은 2수이었다.

5.4×10^6 CFU를 접종한 군에서는 10수 중 2수가 폐사하였으며, 일자별로는 6일째 및 9일째 각각 1수가 폐사하였다. 나머지 8수는 10일 이상 생존하였으며, 이중 3수는 폐에 병변이 관찰되지 않았다.

분리균주 LE 9511을 마우스 수당 2.8×10^8 CFU를 접종하였던 바 10수 모두 폐사하였으며, 이중 7수는 균접종 후 2일 이내에 나머지 3수는 8일 이내에 폐사하였다. 폐(8예)와 심장혈액(1예)에서 균이 재분리되었으며, 균접종 후 2일 이내에 폐사한 7수는 출혈성 병변을 동반한 폐렴소견을 보였다.

2.8×10^7 CFU를 접종한 군에서는 5수만이 8일 이내에 폐사하였으며, 폐(6예), 심장혈액(2예), 기관(1예)으로 부터 균이 재분리 되었다. 폐병변은 4일 이내에 폐사한 4수 모두 출혈성 병변을 보였으며, 8일째 폐사한 1수는 국소성 폐렴병변을 보였다.

2.8×10^6 CFU를 접종한 군에서는 10수 중 3수가 폐사하였고, 7수는 생존하였으며, 기관(5예)에서만 균이 재분리 되었다.

분리균주의 중간치사량(MLD)을 계산한 결과 2형(LE 9402)은 9.2×10^7 CFU 그리고 5형(LE 9511)은 2.8×10^7 CFU이었다.

나. 기니픽에 대한 병원성

분리주 LE 9402 (2형) 및 LE 9511 (5형)

Table 6. Serotypes of 22 *A pleuropneumoniae* isolates from the pigs with pulmonary lesions

No of isolates	Serotypes*					
	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6
22	0	9	1	0	12	0

*Tested by agar-gel immunodiffusion

Table 7. Pathogenicity of *A pleuropneumoniae* isolates to mice

Serotypes (isolates)	Inoculum (CFU)*	No of mouse inoculated	No of death							Mortali- ty(%)	No of bacterial recovery			No of lung lesion		
			0	2	4	6	8	10**	T		L	HB	SHP	FP	NL	
2 (LE 9402)	5.4×10 ⁵	10	0	6	3	1	0	0	10(100)	2	7	3	6	4	0	
	5.4×10 ⁷	10	0	2	1	0	1	0	4(40)	1	5	3	4	4	2	
	5.4×10 ⁶	10	0	0	0	1	0	1	2(20)	0	6	1	1	6	3	
5 (LE 9511)	2.8×10 ⁸	10	0	7	1	1	1	0	10(100)	0	8	1	7	2	1	
	2.8×10 ⁷	10	0	2	2	0	1	0	5(50)	1	6	2	4	5	1	
	2.8×10 ⁶	10	0	0	0	2	0	1	3(30)	0	5	0	2	6	2	
Control	PBS	10	0	0	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0	10	

* : Inoculated intranasally

** : Days of observation

T : trachea, L : lung, HB : heart blood

SHP : severe hemorrhagic pneumonia, FP : focal pneumonia, NL : no lesions

Table 8. Pathogenicity of *A pleuropneumoniae* isolates to guinea pigs

Serotypes (isolates)	Inoculum (CFU)*	No of guinea pig inoculated	No of death							Mortali- ty(%)	No of bacterial recovery			No of lung lesion		
			0	2	4	6	8	10**	T		L	HB	SHP	FP	NL	
2 (LE 9402)	5.4×10 ⁸	5	0	1	1	0	0	0	2(40)	1	4	2	2	1	2	
	5.4×10 ⁷	5	0	1	1	0	0	0	2(40)	1	3	2	1	2	2	
	5.4×10 ⁶	5	0	0	0	1	0	0	1(20)	0	2	1	1	2	2	
5 (LE 9511)	2.8×10 ⁸	5	0	1	2	1	0	0	4(80)	2	4	3	3	0	2	
	2.8×10 ⁷	5	0	1	1	1	0	0	3(60)	1	4	2	2	2	1	
	2.8×10 ⁶	5	0	0	0	2	0	0	2(40)	1	2	1	1	1	3	
Control	BHI broth	5	0	0	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0	5	

* : Inoculated intranasally

** : Days of observation

T : trachea, L : lung, HB : heart blood

SHP : severe hemorrhagic pneumonia, FP : focal pneumonia, NL : no lesions

의 기니픽에 대한 병원성 시험 결과는 Table 8과 같다. LE 9402주를 기니픽에 5.4×10⁸ CFU를 접종한 바, 접종 후 4일 이내에 2수(40%)가 폐사하였으며 출혈성 폐렴병변이 인정되었다. 그리고 폐(4예), 심장혈액(2예) 및 기관(1예)에서 균이 재분리되었다.

5.4×10⁷ CFU를 접종한 군에서는 5수 중 2

수(40%)가 폐사하였으며, 1수는 심한 출혈성 폐렴병변을, 2수는 국소성 폐렴병변을 보였다.

5.4×10⁶ CFU를 접종한 군에서는 5수 중 1수(20%)만이 6일째 폐사하여 출혈성 폐렴소견이 관찰되었다.

LE 9511주를 기니픽에 2.8×10⁸ CFU 접종한 바, 접종 후 6일 이내에 4수(80%)가 폐사

하였으며, 이 중 3수는 출혈성 폐렴병변을 보였지만 나머지 2수에는 폐렴병변이 관찰되지 않았다.

2.8×10^7 CFU를 접종한 군에서는 5수 중 3수 (60%)가 폐사하였다. 폐(4예), 심장혈액(2예) 및 기관(1예)에서 균이 재분리 되었다.

2.8×10^6 CFU를 접종한 군에서는 5수 중 2수 (40%)가 6일째 폐사하였다.

5. SDS-PAGE에 의한 단백질 분획상

분리균주 중 혈청형 2형(LE 9402)과 5형(LE 9511) 그리고 표준균주 2형(S 1536)과 5형(K 17)의 단백질 분획상을 SDS-PAGE로 조사한 결과 Fig 3에서와 같이 균체(whole-cell)의 단백질 분획 패턴원으로 분리균주와 표준균주 사이에 특이한 차이가 인정되지 않았다.

OMP는 Fig 3과 Table 9에서 나타낸 바와 같이 주요 밴드는 17K, 27K, 42K, 52K 및 95K에서 관찰되었다. 그리고 2형의 표준균주 S 1536과 분리균주 LE 9402는 17K, 27K, 32K, 42K, 46K, 52K, 66K 및 95K에서 밴드가 인정되었으나 분리균주인 LE 9407은 46K 분획이 나타나지 않아 차이점이 있었다. 3형의 표준균주 S 1421 및 분리균주 L 9403는 17K, 22K, 27K, 32K, 42K, 52K, 64K, 66K 및 95K에서 밴드가 공히 인정되어 분획상에 차이점은 없었다. 한편 5형인 표준균주 K 17와 분리균주 LE 9510 및 LE 9511는 17K, 27K, 42K, 52K, 64K 및 95K에서 분획이 관찰되었다.

Table 9. SDS-PAGE patterns of OMP-enriched fractions of *A. pleuropneumoniae*

Serotypes	Strains	Molecular weight(KDa) of protein bands
2	S 1536 [*]	17, 27, 32, 42, 46, 52, 66, 95
	LE 9402 ^{**}	17, 27, 32, 42, 46, 52, 66, 95
	LE 9407 ^{**}	17, 27, 32, 42, 52, 66, 95
3	S 1421 [*]	17, 22, 27, 32, 42, 52, 64, 66, 95
	L 9403 ^{**}	17, 22, 27, 32, 42, 52, 64, 66, 95
5	K 17 [*]	17, 27, 42, 52, 64, 95
	LE 9510 ^{**}	17, 27, 42, 52, 64, 95
	LE 9511 ^{**}	17, 27, 42, 52, 64, 95

^{*} : Reference strains, ^{**} : Isolates

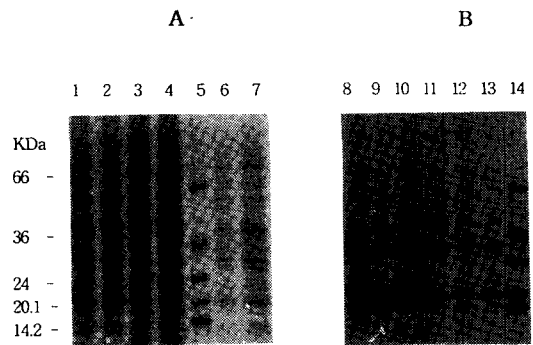


Fig 3. SDS-PAGE profiles of whole-cell proteins and OMP-enriched fractions of *A. pleuropneumoniae*.

(A, lane 1 to 4 : whole-cell protein, Lane 5 : Mw marker, Lane 6, 7 : OMP)

(B, lane 8 to 13 : OMP, lane 14 : Mw marker)

Lane 1 : serotype 2 of reference strain(S 1536)

Lane 2 : serotype 2 of isolate strain (LE 9402)

Lane 3 : serotype 5 of reference strain(K 17)

Lane 4 : serotype 5 of isolate strain (LE 9511)

Lane 5, 14 : molecular weight(Mw) marker

Lane 6 : serotype 3 of reference strain(S 1421)

Lane 7 : serotype 3 of isolate strain (L 9403)

Lane 8 : serotype 2 of reference strain(S 1536)

Lane 9 : serotype 2 of isolate strain (LE 9402)

Lane 10 : serotype 2 of isolate strain (LE 9407)

Lane 11 : serotype 5 of reference strain(K 17)

Lane 12 : serotype 5 of isolate strain (LE 9510)

Lane 13 : serotype 5 of isolate strain (LE 9511)

또한 분리주 LE 9402(2형)의 OMP를 Sephadex G-25 column으로 분획정제한 바, Fig 4에서와 같이 세개의 주요 Peak I, II 및 III이 인정되었으며, 분획별로 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig 5에 나타낸 바와 같이 Peak I 및 Peak II에서 얻어진 분획 1, 2, 3, 6, 7 및 8은 17K, 27K, 32K, 42K, 46K, 52K, 66K, 95K에서 밴드가 인정되어 crude OMP와 같은 패턴을 보였고, Peak III에 위치한 분획 14, 15 및 16은 46K 이상의 높은 분자량에서는 밴드가 인정되지 않았다.

6. OMP 항원 안전성 및 면역원성

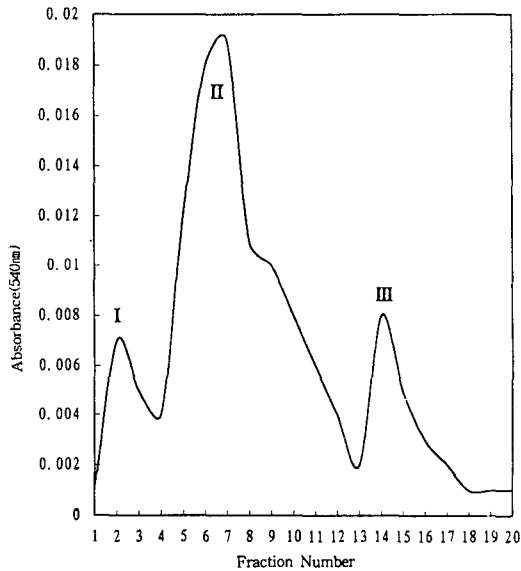


Fig 4. Profiles of the OMP-enriched fraction of the serotype 2 (LE 9402) by the Sephadex G-25 gel filtration as measured at 540nm

가. 실험동물에 대한 안전성

분리균주 LE 9402(2형) 및 LE 9511(5형)에서 얻어진 OMP를 마우스에는 1.0ml을 그리고 기니피크에는 3.0ml을 복강내로 각각 접종하고 10일간 관찰하였으나 특별한 임상증상은 없었다 (Table 10).

나. 마우스에 대한 면역원성

1) 병원성균 접종에 대한 방어효과

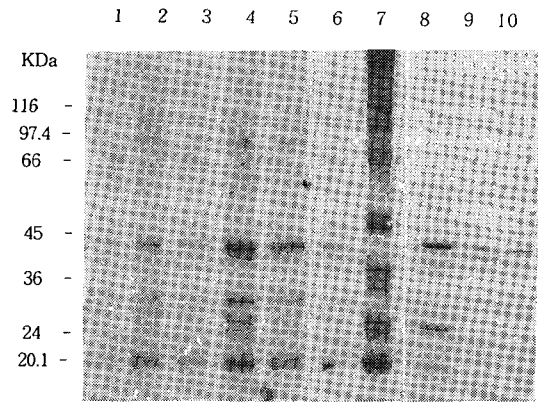


Fig 5. SDS-PAGE profiles of the fractions obtained by the Sephadex G-25 gel filtration of OMP-enriched fraction

- Lane 1 : fraction number 5.
- Lane 2 : fraction number 6.
- Lane 3 : fraction number 7.
- Lane 4 : fraction number 8.
- Lane 5 : fraction number 9.
- Lane 6 : fraction number 10.
- Lane 7 : molecular weight(Mw) marker.
- Lane 8 : fraction number 11.
- Lane 9 : fraction number 12.
- Lane 10 : fraction number 13.

분리한 *A pleuropneumoniae* 2형 및 5형의 OMP를 마우스에 2주 간격으로 수당 0.2ml씩 복강 내로 2회 접종하고, 2차 접종 3주 후에 각 혈청형 별로 면역시킨 마우스 20수, 면역시키지 않은 마우스 10수에 분리주(10 MLD/0.1ml) LE 9402(2형)와 LE 9511(5형)을 비강 내로 각각 공격 접종하고 2주 동안 관찰 조사하였다.

Table 11에서와 같이 혈청형 2형 OMP로 면역시킨 마우스는 동일군으로 공격 접종 후 20수 중 18수(90%), 이종형인 5형의 경우 20수 중 14수(70%)가 내과 생존하였다. 혈청형 5형 OMP로 면역시킨 마우스는 동종(5형) 및 이형(2형)군의 공격시 공히 20수 중 16수(80%)에서 방어효과를 나타내었다. 대조군 마우스는 공격 접종한 후 24시간 이내에 모두 폐사하였다.

Table 10. Safety of OMP of *A pleuropneumoniae* isolates in experimental animals

Experimental animals	No of animal	Serotypes of isolates	Inoculation of OMP		Clinical sign*
			Dose(ml)	Route	
Mice	15	2	1.0	IP**	None
Mice	15	5	1.0	IP	None
Guinea pigs	7	2	3.0	IP	None
Guinea pigs	7	5	3.0	IP	None

* : Observed for 10 days, ** : intraperitoneal, serotype 2 : LE 9402, serotype 5 : LE 9511

Table 11. Protectivity of the mice inoculated with the OMP antigens of *A pleuropneumoniae* isolates prepared with aluminium hydroxide gel

	Serotypes (strains)	No of mouse	Challenged with isolates	
			LE 9402	LE 9511
Immunized*	2(LE 9402)	20	18/20**(90%)	14/20(70%)
	5(LE 9511)	20	16/20 (80%)	16/20(80%)
Control	—	10	0/10	0/10

* : Each mouse was inoculated intraperitoneally with 0.2ml of the OMP antigen, boosted two weeks p.i. and challenged intranasally with 10MLD/0.2ml of serotype LE 9511 intranasally at 3rd weeks after the booster injection.

** : No of survivor / No of mouse tested

2) 항체가 변동

OMP의 마우스에 대한 항체형성능을 MAT로 조사한 결과(Table 12) 분리균주 LE 9402(2형)의 OMP 접종군의 항체는 1차 접종 후 1주와 2주에 40과 80이었으며, 2차 접종 후 1주 및 2주에 1,280의 높은 항체를 보였고, 3주에는 640으로 낮았다. 한편 강독균(LE 9511) 접종 후에는 1주와 2주에 1,280과 2,560으로 항체

가 다시 상승하였다.

분리균주 LE 9511(5형)의 OMP 접종군의 항체는 1차 접종 후 1주와 2주에 80과 160이었고, 2차 접종 후에는 1주와 2주에 640과 1,280의 항체를 보였으며, 강독균(LE 9511)접종 후에는 2,560의 높은 항체를 나타내었다. 대조군은 시험기간 중 항체가 전혀 인정되지 않았다.

Table 12. Antibody responses of the mice inoculated with the OMP antigens of *A pleuropneumoniae* isolates prepared with aluminium hydroxide gel

	Serotypes of isolates (Strain)	No of mouse	MAT ^a antibody titer (weeks)							
			0	1	2 ^b	3	4	5 ^c	6	7
Immunized*	2 (LE 9402)	10	<10	40	80	1,280	1,280	640	1,280	2,560
	5 (LE 9511)	10	<10	80	160	640	1,280	1,280	2,560	2,560
Control	—	5	<10	<10	<10	<10	<10	20	— ^d	— ^d

* : Each mouse was inoculated intraperitoneally with 0.2ml of the OMP antigen, boosted two weeks pi and challenged intranasally with 10MLD/0.2ml of serotype LE 9511 at 3rd weeks after the booster injection.

a : micro-agglutination test, b : booster injection, c : challenged, d : all control mice dead

다. 자돈에 대한 면역원성

1) 병원성균접종에 대한 방어효과

분리균주 LE 9402(2형)와 LE 9511(5형)의 OMP 1ml를 2주 간격으로 2회 근육 접종한 자돈에 10 MLD/5ml의 분리주 LE 9511을 비강내로 공격접종하여, 2주 동안 임상증상을 관찰하고, 도살처분하여 폐병변을 조사하는 한편, 각 장기로 부터 접종균의 회수 실험을 실시하여 방어 효과를 시험하였다. Table 13에서 나타난 바와 같이 혈청형 2형의 OMP로 면역된 자돈 3두중 1두만이 가벼운 식욕부진 및 원기소실

등의 증상을 보였으며, 2주 후에 도살 부검한 결과 3두중 1예의 횡격엽에서 국소적인 병변이 인정되었고 균이 재분리되었다. 혈청형 5형의 OMP로 면역된 자돈 3두 중 1두에서 침울증상이 접종 후 3시간에 관찰되었으나 회복하였다. 부검에서는 폐의 침엽과 횡격엽에서 병변이 인정되었으며 1예에서 균이 재분리되었다.

대조군의 2두는 공격 접종한 후 1주째에 고열을 동반한 심한 임상증상을 나타내었고 2주째에는 회복하였다. 부검에서 폐장기는 심한 괴사성 및 출혈성 폐렴이 인정되었고 기관과

Table 13. Protectivity of the piglets inoculated with the OMP antigen of *A pleuropneumoniae* isolates with aluminium hydroxide gel

	Serotypes (strains)	No of piglet	Clinical signs ^a							Recovery of the bacteriab				Pulmonary lesions at necropsy		
			BT(°C)	An	De	Vo	Dp	Cy	NC	T	L	HB	Apical+Cardiac lobes	Diaphragmatic lobes		
Immunized*	2(LE 9402)	3	38.9	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/30	31/30	3/3	0/3(-)	1/3(+)		
	5(LE 9511)	3	39.0	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/30	31/30	3/3	1/3(+)	1/3(+)			
Control	-	2	41.4	2/2	2/2	0/2	2/2	1/2	0/21	22/20	2/2	1/2(+)	2/2 (+~+++)			

* : Each piglet was inoculated intraperitoneally with 1 ml of OMP antigen, boosted two weeks p.i. and challenged intranasally with 10MLD/5ml of serotype LE 9511 at 3rd weeks after the booster injection.

BT : The highest body temperature during 2nd weeks after challenge

An : anorexia, De : depression, Vo : vomit, Dp : dyspnea, Cy : cyanosis,

NC : nasal cavity, T : trachea, L : lung, HB : heart blood

- : absent, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

a : Clinical signs observed during 2nd weeks after challenge

b : Bacterial examination at necropsy

c : No of positive/ No of examined

Table 14. Antibody responses of the piglets inoculated with the OMP antigens of *A pleuropneumoniae* isolates prepared with aluminium hydroxide gel

	Serotype OMP (strains)	No of piglet	MAT ^a antibody titers (weeks)							
			0	1	2 ^b	3	4	5 ^c	6	7
Immunized*	2(LE 9402)	3	<10	80	160	640	640	1,280	2,560	5,120
	5(LE 9511)	3	<10	80	320	1,280	1,280	640	1,268	2,560
Control	-	2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	320	1,280

* : Each piglet was inoculated intramuscularly with 1ml of OMP, boosted two weeks p.i. and challenged intranasally with 10 MLD/5ml of serotype LE 9511 at 3rd weeks after the booster injection.

a : micro-agglutination test b : booster injection c : challenged

폐병변에서 접종균이 재분리되었다.

2) 항체가의 변동

분리균주의 OMP를 집중한 자돈에 대한 항체형성능을 조사한 결과는 Table 14와 같다. LE 9402(2형)의 OMP 접종균의 항체가는 1차 접종 후 1주와 2주에 80 및 160이었고 2차 보강접종 후에는 640를 유지하였으며, 병원성균(LE 9511) 접종 후 1주에는 2,560 그리고 2주에는 5,120로 가장 높은 항체가를 보였다. LE 9511(5형)의 OMP 접종균은 1차 접종 후 1주와 2주에 80 및 320이었고 2차 보강접종 후에는 1,280의 항체가를 보였다. 한편, 병원성균(LE 9511) 접종 후에는 1,280 내지 2,560의 높은 항체가를 보였다. 대조균은 병원성균 공격전에는 항체가 음성이었다고 공격 후에는 320~1,280의 항체가를 나타내었다.

고 찰

돼지홍막폐렴은 1957년 영국에서 Pattison 등⁴⁾이 처음으로 보고한 이래, 아르헨티나, 스코틀랜드, 미국, 스위스, 폴란드, 덴마크, 인디아, 노르웨이, 캐나다, 오스트레일리아, 헝가리, 일본, 독일, 대만, 스웨덴, 벨지움 및 프랑스 등의 여러 나라에서 계속적으로 발생하고 있으며^{11,60)}, 폐사 및 불현성 감염에 의한 증체율 감소, 투약비용 등의 경제적 손실로 양돈업에 많은 피해를 주고 있는 돼지의 중요한 전염병이다^{11,12,61)}.

Mylrea 등⁶¹⁾은 폐렴 발생돈(30~50kg)에서 *H pleuropneumoniae*를 분리 보고하였고, Willson 등⁶²⁾은 도축돈 288두를 검사한바 106예(36.8%)에서 괴사성, 만성 홍막폐렴을 관찰하였고 이 가운데 39예(36.8%)에서 균분리가 되었음을 보고하였으며, Little⁶⁰⁾은 도축돈 120두 중 44두(36.7%)에서, 그리고 Kume 등⁸⁰⁾은 87개 농장의 건강한 돼지 619두 중 293두(47.3%)의 비강에서 균이 분리 되었음을 각각 보고하였다.

국내에서는 박 등¹⁷⁾은 1,332두의 도축돈을 육안검사하고 그중 74두(4.6%)에서 홍막폐렴의 병변을 확인하였으며, 병변재료 90예 중 23예(26%)로부터 *H pleuropneumoniae*를 분리하였고, 분리균주의 혈청형은 2, 3, 4 및 5형이었음을

보고하였다. 예 등²¹⁾은 339예의 홍막폐렴 병소로부터 *H pleuropneumoniae* 71주를 분리 동정하였으며, 분리주의 혈청형과 분리 빈도는 5형(38주), 2형(28주), 3형(2주) 및 7형(2주)의 순이었음을 보고하였고, 양 등²²⁾은 외관상 홍막폐렴 증상을 보이는 106두의 돼지의 비강점막에서 16주(15.1%)를 분리하였고 홍막폐렴 병변 48예에서 10주(20.8%)를 분리하였음을 보고하였다. 그리고 정²³⁾은 영남지방에서 호흡기증상을 나타낸 63두로 부터 17주(27.0%)를 분리하였고, 육안적 폐렴병변이 인정되는 도축돈 330두의 폐렴병소로 부터 21주(6.4%)의 *A pleuropneumoniae*를 분리 하였음을 보고하였다.

본 시험에서는 천안 및 아산지역에서 도축장으로 출하되는 돼지중 3,995두를 육안적으로 검사하여 홍막폐렴의 병변을 나타낸 425두(10.6%)로 부터 22주(5.2%)의 균이 분리되어 국내 여러학자들의 시험결과에 비해 다소 낮은 성적을 나타냈다. 그러나 만성 홍막폐렴에서는 균분리율이 저조하다는 Nicolet¹¹⁾의 보고와 chocolate agar와 blood agar를 분리배지로 사용하면 *Haemophilus* 속균의 분리율은 보통 5% 이하 이었으나, crystal violet 및 bacitracin을 첨가한 선택배지를 사용하면 30%수준이라는 Little⁶⁰⁾의 보고를 참고할 때 분리율이 사용배지와 가검물 채취시기와 밀접한 관련이 있다는 사실과 연관성이 있다고 사료된다.

Biberstein 등²⁾은 돼지홍막폐렴의 병원체에 대한 생화학적 특성중 porphyrin test, X 및 V factor의 요구성, 그리고 urease test결과에 따라 *H suis*, *H prarsuis* 그리고 *H parahaemolyticus*로 구분하였고, Lombin 등³⁾은 V factor 요구성, CAMP현상 및 urease 양성 반응만으로 *H pleuropneumoniae* 동정이 가능하다고 주장한 바 있다. 따라서 본 실험에서는 분리균 22주와 표준균주 6주에 대한 생화학적 성상검사를 실시하여 V factor 요구성, urease 생성, CAMP 현상, indole 생성 및 운동성 등을 확인하여 *A pleuropneumoniae*를 동정하였다. 한편, 용혈성에 있어서는 Gunnarson 등⁵²⁾은 혈청형 1형 및 5형 균주는 용혈성이 있고 2, 3 및 4형 균주는 용혈성이 없어 혈청형에 따라 용혈성에 차이가 있음을

보고한 바 있으며, 박 등¹⁷⁾은 분리균 23주 중 15주(65.2%), 양 등²²⁾은 분리균 26주 중 24주(92.3%), 정²³⁾은 분리균 38주(100%) 모두에서 용혈성이 있음을 보고하였다. 본 실험에서는 분리균 22주 중 20주(91%)가 용혈성을 보였다. Catalase 시험에서는 박 등¹⁷⁾은 18주(78%), 양 등²²⁾은 20주(76.9%), 정²³⁾은 12주(31.6%)가 양성을 보였다고 보고한 바 있으나 본 실험에서는 4주(18%)가 양성을 보여 비교적 낮게 나타났다.

당분해시험에서는 fructose, glucose, maltose, mannitol, rhamnose, ribose, sucrose 및 xylose에서는 분리균주의 90% 이상이 양성을 나타내었고, adonitol, dulcitol, inositol, sorbitol 및 trehalose에서는 분리균주의 90% 이상이 음성을 나타내어 Killian 등¹⁾, Biberstein 등²⁾, 박 등¹⁷⁾ 및 양 등²²⁾의 보고와 일치하였다.

*A. pleuropneumoniae*의 항균제에 대한 감수성에 대해 Libal 등⁶³⁾과 Gilbride 등⁶⁴⁾은 chloramphenicol, gentamicin, colistin, erythromycin, ampicillin 및 kanamycin에는 감수성이 높고 sulfanamide와 streptomycin에서는 낮다는 사실을 보고한 바 있다. 또한 Inoue 등⁶⁵⁾은 *A. pleuropneumoniae*에 의한 감수성이 높은 항생제로는 penicillin G, ampicillin, mecillinam 등이 있으며, tiamuline, tylosin, erythromycin 및 streptomycin은 낮음을 보고하였다. Nadeau 등⁶⁶⁾은 분리균주가 gentamicin, trimethoprim과 erythromycin에 감수성이 높고 spectinomycin, lincomycin, tiamulin 및 spiramycin등에는 감수성이 낮았음을 보고하였다. Gutierrez 등⁶⁷⁾은 rifampicin, fosfomycin, tiamulin은 감수성이 높았으며, 반면에 amoxicillin, ticarcillin, oxytetracycline, doxycycline과 metronidazole은 낮은 감수성이 있음을 보고한 바 있다.

국내에서 예¹⁸⁾는 분리균주가 ampicillin에 감수성이 가장 높았고, cephalothin, tetracycline 그리고 penicillin G 등은 중등도의 감수성을 보였으며, neomycin, gentamicin 및 erythromycin은 감수성이 가장 낮았다고 보고하였다. 박 등¹⁷⁾은 chloramphenicol, ampicillin, cephalothin 및 tetracycline이 감수성이 높았고, bacit-

racin 및 vancomycin은 낮았다고 하였으며, 양 등²²⁾은 분리균주가 ampicillin, carbenicillin, cephalothin, chloramphenicol, colistin, tetracycline 및 linsmycin에는 강한 감수성을 나타냈으며, kanamycin, streptomycin, tiamulin 및 tylosin에는 내성을 나타냈음을 보고하였다. 정²³⁾은 ampicillin, cephalotin, ciprofloxacin 및 cefotiofur는 고도의 감수성이 있었고, amikacin, chloramphenicol, erythromycin, kanamycin, methicillin, sulfamerazine 및 tyrosine은 내성을 나타내었음을 보고하였다.

본 시험에 있어서는 분리균주가 ciprofloxacin, cephalothin, penicillin 및 ampicillin에 대해 높은 감수성을 나타내었고 erythromycin, tylosin과 sulfadimethoxine에는 감수성이 인정되지 않았다. 본 균의 항균제에 대한 감수성이 연구자에 따라 차이가 있는 것은 사양환경과 지역에 따라 사용하는 항균제의 종류가 다르므로 인해 내성균 출현 양상이 다르기 때문이라 사료된다. 본 균의 내성균 형성기전과 이에 따른 문제점을 해결하기 위해 연구가 수행된 바 있다. Hirsh 등⁶⁸⁾ 및 Gilbride 등⁶⁹⁾은 *A. pleuropneumoniae*가 plasmid(pVM104, pVM105, pVM106)를 매개로 하여 penicillin, ampicillin, streptomycin 및 sulfadiazine에 대해 내성을 획득한다고 보고하였다. 한편, Ueda와 Suenaga⁷⁰⁾ 및 Ueda 등⁷¹⁾은 thiamphenicol로부터 추출하여 합성한 florfenicol과 새롭게 합성한 rifampicin, fosfomycin이 감수성이 높았음을 보고한 바 있다. 본 시험에서 얻어진 국내 분리주에 대한 항균제 감수성시험 결과는 야외에서 돼지 흉막폐렴에 대한 치료제 선정시 고려될 수 있는 기초자료가 될 것으로 사료된다.

분리균에 대한 혈청형동정 방법은 여러 연구자들에 의하여 보고된 바 있으며^{73~79)}, 그중 면역확산시험 및 coagglutination 시험법이 smooth colony type과 autoagglutinating type 모두 구별할 수 있기 때문에 일반적으로 사용되고 있다^{28,59)}. 따라서 본 실험에서는 분리균을 면역확산시험으로 동정한 바, serotype 5형이 12주, 2형이 9주 그리고 3형이 1주로 밝혀졌다. 현재까지 본 균에는 1~12형의 혈청형이 있음이

알려져 있으며¹¹⁾, 국내에서는 박 등¹⁷⁾이 2형, 3형, 4형 및 5형, 예 등²¹⁾은 2형, 3형, 5형 및 7형, 정²³⁾은 2형, 5형, 7형, 10형 및 12형의 혈청형을 동정하여 보고한 바 있다.

Sebunya와 Saunders⁵⁵⁾은 *A pleuropneumoniae*의 병원성과 사균백신의 면역원성을 시험하기 위한 실험동물로써 마우스가 적합하다고 지적하였다. 그 이유는 마우스에 인공감염시켜 발생하는 급성 또는 만성 폐렴은 돼지에서 자연발생되거나 실험적으로 일으킨 흉막폐렴의 병변과 유사하므로 병리학 및 면역학 연구에 마우스가 실험동물로 적절하다고 보고하였다. 한편, Nakai 등⁵⁴⁾은 *H pleuropneumoniae*의 실험동물로써 기니픽이 적합하고, *H pleuropneumoniae*의 배양상층액(cell free culture fluid)에 의하여 폐렴 병변이 일어난다고 보고하였다. Sebunya와 Saunders⁵⁴⁾은 *A pleuropneumoniae*의 균수를 달리하여 마우스 비강내로 접종하고 병원성을 조사한 결과 높은 농도의 균을 접종할 경우는 임상증상 및 폐 병변 소견없이 급격히 폐사하였으며, 낮은 농도를 접종할 경우는 폐사 직전까지 친화성 조직에서 균이 증식하여 출혈성 폐렴 병변을 일으켜 폐사하였고, 임상적으로 털이 거칠고 식욕부진 및 침울 등을 나타내고 폐사 직전에는 비출혈이 관찰됨을 보고하였다.

본 실험에서는 분리한 *A pleuropneumoniae* 혈청형 2 및 5형 균주를 균수를 달리하여 마우스 및 기니픽의 비강 내로 접종한 다음 임상증상 및 폐병변을 육안적으로 조사한 결과 접종균수가 많을 경우 임상증상없이 접종 후 갑자기 폐사하고 출혈성 폐렴병변을 보였으며, 접종 후 10일 동안 생존한 마우스를 부검한 경우에는 폐에 국소적인 농양과 괴사소견이 있었고, 병변조직으로부터 *A pleuropneumoniae*를 회수할 수 있었다.

Hsu 등⁷²⁾은 혈청형 5형 균주를 8주령 돼지에 비강 접종했을 때 12시간 이내에 폐사한 돼지의 폐장은 심급성 흉막폐렴을 나타내었고, 접종후 20~24시간 이내에 폐사한 예에서는 섬유소성 삼출액과 세포침윤반응을 동반한 급성 흉막폐렴을, 그리고 접종 7일 이후는 아급성 흉막폐렴

소견을 나타내었고, 접종 후 14일 또는 16일에는 만성 흉막폐렴 소견이 관찰 되었다고 보고하였다. 또한, Shope⁷⁾는 *A pleuropneumoniae*의 배양균액을 돼지의 비강내로 접종한 결과, 임상증상은 접종균량에 따라 심급성, 급성 또는 만성 경과 등 차이가 있었으며, 심급성 및 급성의 경우는 24시간 이내에 폐사하는 경우가 많았다고 보고 하였다. 또한 *A pleuropneumoniae*의 감염증상이 심급성과 급성일 경우는 고열, 식욕부진, 구토 및 청색증 등의 증상을 나타내었고 폐사돈의 폐는 심한 괴사성, 출혈성 및 섬유소성을 수반한 폐렴병변이 있었고, 만성인 경우는 폐에 국소성 괴사성 병변이 흔히 관찰되었으며, 병변부 조직으로부터는 *A pleuropneumoniae*가 재 분리되었다고 보고 하였다.

분리된 *A pleuropneumoniae*의 2형과 5형 그리고 표준균주에서 추출한 OMP의 분자량을 조사하기 SDS-PAGE로 전개한 결과 17K, 22K, 27K, 42K, 52K 및 95K가 공통적으로 나타났다. 이것을 조25)가 보고한 17K, 22K, 27K, 32K, 38.5K, 42K 및 52.5K 패턴과 비교해 보면 32K, 38.5K 및 95K에서만 차이점이 인정되었지만, 17K, 32K 및 42K의 공통분획만이 관찰되었다고 보고한 Janet와 Søren⁴⁹⁾과는 많은 차이점을 보였다. 이와 같이 OMP의 전개분획에 차이가 있는 것은 OMP의 합성과정에서 NAD의 이용능에 따라 OMP의 조성성분에 차이가 생기기 때문이라고 생각되며, 이와같은 차이가 분리균주의 cell envelope의 조성상 특징적으로 나타난 것인지 또는 배양조건이나 계대배양 횟수에 따라 야기되는 phenotype상 일시적 변화인지는 주어진 실험결과로는 해석하기 어렵다. 그러나 면역확산법에 의한 혈청형 동정결과와 표준균주와 비교하여 얻어진 생화학적 성상 검사 및 SDS-PAGE 시험 결과를 종합해 볼 때 분리균주는 *A pleuropneumoniae*의 일반적 OMP 조성을 가진 것이라 사료된다.

Vicki와 Richard⁴⁰⁾은 *A pleuropneumoniae*의 OMP는 혈청형간에 공통항원성을 가지며 면역된 동물에서 얻어진 혈청중 항체가 혈청형간에 특이한 차이가 없음을 보고하였다. 본 실험에서는 분리균 *A pleuropneumoniae* 2형 및

5형의 OMP로 면역한 마우스와 돼지에서 비교적 높은 항체가가 인정되었고 또한 병원성 균주를 이형간에 공격한 바, 방어능이 비교적 높게 나타나서 국내 분리주에서 얻어진 OMP의 공통항원 성상을 인정할 수 있었다. 그러나 OMP 접종 동물에서 얻어진 항체가 OMP의 SDS-PAGE의 분획중 어떤 peptides와 연관성이 있는지를 밝히기 위한 western blotting 시험이 추시되어야 한다. 또한 균체(whole-cell) 항원을 백신으로 사용할 때 야기되는 이종 혈청형간에 일어나는 방어 효능 감소 문제를 극복하기 위해 OMP를 항원물질로 이용할 수 있는지를 구명하기 위해 보다 폭 넓은 실험이 요구된다.

결 론

1994년 1월부터 1995년 12월 사이에 충남북부지역(천안 및 아산지역)에서 도축되는 돼지에 대해 흉막폐렴 발생예를 역학적으로 조사하였고, 폐렴병변을 가진 425두에 대하여 Actinobacillus pleuropneumoniae 균 분리를 시도하였고, 분리균주의 생화학적 성상, 항균제 감수성, 혈청형 및 병원성을 규명하였다. 또한 분리균의 outer membrane protein(OMP)을 추출하여 단백질의 성상과 마우스 및 자돈에 대한 면역원성에 대하여 일련의 시험을 수행하였다.

1. 공시한 도축돈 3,395두 중 흉막폐렴 소견을 나타낸 것은 425두(10.6%)였으며 이 중 22두(5.2%)에서 A pleuropneumoniae 균이 분리되었으며, 계절별로는 봄과 겨울에 분리율이 높았다. 분리균주의 생화학적 성상은 표준균주와 일치하였으며, 혈청형은 2형(9주), 3형(1주) 및 5형(12주)으로 밝혀졌다.
2. 분리균에 대한 항균제 감수성 시험결과 ciprofloxacin, cephalothin에는 고도의 감수성을, amikacin, gentamicin, kanamycin, streptomycin에는 중등도 감수성을 나타냈으며, erythromycin, tylosin 및 sulfadimethoxine에는 낮은 감수성을 보였다.
3. 분리균주의 마우스에 대한 병원성을 시험한 바, 중간 치사량은 2형(LE 9402)은 9.2×10^7 CFU 그리고 5형(LE 9511)은 2.8×10^7

CFU였으며 임상증세를 동반한 마우스는 특이한 폐렴병변을 나타냈다. 또한 균 회수율은 폐에서는 높았고 심장혈액 및 기관에서는 비교적 낮았다.

4. 분리균주를 기니픽에 접종한 결과 폐사율은 2형($5.4 \times 10^8 \sim 5.4 \times 10^6$ CFU)에서 20~40%, 5형($2.8 \times 10^8 \sim 2.8 \times 10^6$ CFU)에서 40~80%로 5형의 병원성이 2형에 비하여 높게 나타났다. 폐사한 기니픽은 심한 출혈성 병변 및 국소적인 폐렴병변을 나타냈으며, 균 회수율은 폐에서 비교적 높게 나타났다.
5. 분리균주 및 표준균주의 OMP 분획상을 SDS-PAGE로 조사한 바 공통적으로 17K, 27K, 42K, 52K 와 95K의 분획이 관찰되었으며, 분리주간에는 약간의 차이가 인정되었다. 또한 OMP를 Sephadex-G로 분석한 바 3개의 peak가 관찰되었고, 공통 분획은 1, 2번 peak에서 관찰되었다.
6. 분리균주 2형(LE 9402) 및 5형(LE 9511)으로부터 추출한 OMP를 마우스와 자돈에 접종한 바, 마우스에서는 70%~90%, 자돈에서는 100%의 방어효과가 있었고, 모든 접종동물에서 높은 응집항체가($640 \sim 1,280$)가 형성되었다.

참 고 문 헌

1. Kilian M, Nicolet J, Biberstein EL. 1978. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. *Int J Syst Bacteriol.* 28 : 20-26.
2. Biberstein EL, Gunnarsson A, Hurvell B. 1977. Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus spp* from swine. *Am J Vet Res.* 38(1) : 7-11.
3. Lombin LH, Rosendal S, DeMoor J. 1985. Biochemical and serological identification of strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol.* 10 : 393-397.
4. Pattison IH, Howell DG, Elloit JA. 1957.

- Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J Comp Pathol.* 67 : 320-329.
5. Matthews PRJ, Pattison IH. 1961. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumoniae and pleurisy in the pig. *J Comp Pathol.* 71 : 44-52.
 6. Olander HJ. 1963. A septicemic disease of swine and its causative agent *Haemophilus parahaemolyticus*. Ph. D. Thesis Univ of California.
 7. Shope RE, White DC, Leidy G. 1964. Porcine contagious pleuro-pneumoniae. II. Studies of the pathogenicity of the etiological agent *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J Exp Med.* 119 : 369-375.
 8. Nicolet J, Konig H. 1966. Zur *Haemophilus pleuropneumoniae* beim schwein. *Pathol Microbiol.* 29 : 301-306.
 9. Pittman M. 1953. A classification of the hemolytic bacteria of the genus *Haemophilus* : *Haemophilus haemolyticus* Bergey et al and *Haemophilus parahaemolyticus* nov. spec *J Bacteriol.* 65 : 750-751.
 10. Pohl S, Bertschinger HU, Frederiksen W, et al. 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int J Syst Bacteriol.* 33 : 510-514.
 11. Nicolet J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae* 1 : *Disease of swine. 7th ed. Iowa State University Press.* 401-408.
 12. Little TWA, Harding JDJ. 1980. The interaction of *Haemophilus parahaemolyticus* and *Pasteurella multocida* in the respiratory tract of the pig. *Br Vet J.* 136 : 371-383.
 13. Brandreth SR, Smith IM. 1985. Prevalence of pig herds affected by pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* in eastern England. *Vet Rec.* 117 : 143-147.
 14. Seburya TNK, Saunders JR, Osborne AD. 1983. A model aerosol exposure system for induction of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can J Comp Med.* 47 : 48-53.
 15. 박응복, 임창형. 1979. 양돈단지의 증식을 저하에 대한 병인학적연구. 2. 병리학적 조사. 서울대학교 수의대 논문집. 4(2) : 120.
 16. 마점술, 전운성. 1979. 양돈단지의 증식을 저하에 대한 병인학적연구. 3. 미생물학적 시험. 서울대학교 수의대 논문집. 4(2) : 93.
 17. 박정문, 김종염, 변정옥 등. 1985. *Haemophilus pleuropneumoniae*의 분리, 혈청형 및 항체조사. 농시논문집(축산,가위). 27(2) : 45-52.
 18. 예재길, 서익수. 1981. 섬유소성 흉막폐렴돈의 폐병변소로부터 분리한 *Haemophilus parahaemolyticus*에 관한 연구. 서울대학교 수의대 논문집. 6 : 41-57.
 19. 이현범, 이근우, 박후열 등. 1984. 돼지흉막폐렴의 발생. 대한수의학회지. 24(1) : 99-104.
 20. 박정문, 김종염, 조성근 등. 1986. 돼지흉막폐렴 유래 *Haemophilus pleuropneumoniae*의 면역원성에 관한 연구. 농시논문집. 28(2) : 67-76.
 21. 예재길, 서익수. 1989. 한국에서 돼지 *Haemophilus pleuropneumoniae* 감염병에 관한 연구. 서울대학교 수의대 논문집. 14 : 129-177.
 22. 양창근, 김순재, 조성근. 1990. 돼지의 *Haemophilus* 감염증에 관한 조사연구. 한국수의공중보건학회지. 14(1) : 21-33.
 23. 정병열. 1993. 돼지 폐렴병소에서 분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 생물화학적 특성 및 혈청형. 경북대학교 대학원.
 24. 심향섭, 우종태, 조현웅 등. 1994. 돼지에서 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청학적 진단법에 대한 비교연구. 한국가축위생

- 학회지. 17(2) : 95-113.
25. 조성근. 1994. 국내 분리 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 outer membrane protein의 면역원성. 서울대학교 대학원.
 26. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. et al. 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet Microbiol.* 32 : 135-148.
 27. Komal JPS, Mittal KR. 1990. Grouping of *Actinobacillus pleuro pneumoniae* strains of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet Microbiol.* 25 : 229-240.
 28. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J Clini Microbiol.* 18(6) : 1351-1354.
 29. Kamp EM, Popma JK, Van Leengoed LAMG. 1987. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the netherlands : With emphasis on heterogeneity within serotype 1 and(proposed) serotype 9. *Vet Microbiol.* 13 : 249-257.
 30. Nielsen R, O'Connor PJ. 1984. Serological characterization of 8 *Haemophilus parahemolyticus* strains and proposal of a new serotype : serotype 8. *Acta Vet Scand.* 25 : 96-106.
 31. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J Clini Microbiol.* 15(6) : 1019-1023.
 32. Rosendal S, McInnes JI. 1986. Proceedings of the 9th Congress, International pig Veterinary Society. Barcelona. 270.
 33. Niven DF, Levesque M. 1988. V-factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2(Berschinger 2008/76). *Int J Syst Bacteriol.* 38 : 319-320.
 34. Nielsen R. 1986. Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains : Establishment of subtypes A and B. *Act Vet Scand.* 27 : 49-58.
 35. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S, et al. 1987. Effect of heat treatment on the surface antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet Rec.* 120 : 62-65.
 36. Rosendal S, MacInnes JI. 1990. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1. *Am J Vet Res.* 51(5) : 711-717.
 37. Fenwick BW, Osburn BI, Olander HJ. 1986. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res.* 47(7) : 1433-1441.
 38. Udeze FA, Latimer KS, Kadis S. 1987. Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res.* 48(5) : 768-773.
 39. Rosendal S, Devenish J, MacInnes JI, et al. 1988. Evaluation of heat-sensitive, neutrophil-toxic, and hemolytic activity of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res.* 49(7) : 1053-1058.
 40. Vicki JR, Richard FR. 1986. Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. *Infect Immun.* 54(3) : 751-760.
 41. Nordstoga N, FjølIstad M. 1967. The generalized Shwartzman reaction and *Haemophilus* infections in pigs. *Path Vet.* 4 : 245-253.
 42. Fenwick BW, Olander HJ. 1984. Studies on the role on endotoxin in *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in swine. *Int Pig Vet Soci.* 94.
 43. Rosendal S, Mittal KR. 1985. Serological

- cross-reactivity between a porcine *Actinobacillus* strain and *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can J Comp Med.* 49 : 164-170.
44. Inzana TJ, Mathison B. 1987. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun.* 55 : 1580-1587.
 45. Nicolet J, Paroz P, Krawinkler M. 1980. Polyacryl gel electrophoresis of whole cell protein of porcine strain *Haemophilus*. *J Syst Bacteriol.* 30 : 69-76.
 46. Udeza FA, Kadis S. 1988. Proceedings of the 10th Congress, *International Pig Veterinary society*. Brazil. 64.
 47. Richard NT, Solomon K. 1991. Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the proteins. *Infect Immun.* 59(2) : 544-549.
 48. Barenkamp SJ, Munson RS, Granoff DM. 1961. Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer membrane protein profile. *J Infect Dis.* 143 : 668-676.
 49. Janet IM, Scren R. 1987. Analysis of major antigens of *Haemophilus(Actinobacillus) pleuropneumoniae* and related organisms. *Infect Immun.* 55(7) : 1626-1634.
 50. Sahn DF, Washington JA. 1991. Antibacterial susceptibility test : dilution methods. *Manu. Clin. Microbiol.* 5th ed. 1105-1106.
 51. Anhalt JP, Washington JA. 1991. Preparation and storage of antimicrobial solutions. *Manu Clin Microbiol.* 5th ed. 1199-1200.
 52. Gunnarsson A. 1979. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus(pleuropneumoniae)* ; Extraction of type-specific antigens. *Am J Vet Res.* 40(4) : 469-472.
 53. Rapp VJ, Ross RF, Zimemermann Erickson B. 1985. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am J Vet Res.* 46(1) : 185-192.
 54. Sebunya TNK, Saunders JR. 1982. Studies on immunity to *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in mice. *Am J Vet Res.* 43(10) : 1793-1798.
 55. Sebunya TNK, Saunders JR. 1982. Pulmonary clearance of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *serratia marcescens* in mice. *Am J Vet Res.* 43(10) : 1799-1801.
 56. Nakai T, Sawata A, Kume K. 1984. Pathogenicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for laboratory animals and possible role of its hemolysin for production of pleuropneumonia. *Jpn J Vet Sci.* 46(6) : 851-858.
 57. Reed LJ, Muench J. 1938. A sample method of estimating fifty percent end point. *Am J Hyg.* 27 : 493-497.
 58. Thacker BJ, Mulks MH, Jolie RAV. 1988. Development of improved *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines. *10th IPVS.* 81.
 59. Mittial KR, Higgins R, Lariviere S. 1988. Some serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 5. *Curr Microbiol.* 17 : 305-313.
 60. Little TWA. 1970. *Haemophilus* infection in pigs. *Vet Rec.* 87 : 399-402.
 61. Mylrea PJ, Grance G, MnacQueen P. 1974. Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. *Aust Vet J.* 70 : 255-259.
 62. Willson PJ, Gloria F, Sandra K. 1987. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Can Vet J.* 28(3) : 111-116.
 63. Libal MC, Gates CE. 1982. Antimicrobial sensitivity patterns of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates from pigs with pneumonia. *J Am Vet Med Assoc.* 180 : 399.
 64. Gilbride KA, Rosendal S. 1984. Antimicro-

- bial susceptibility of 51 strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can J Comp Med.* 48 : 47-50.
65. Inoue A, Yamamoto K, Hirano N, et al. 1984. Drug susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs. *Jpn J Vet Sci.* 46(2) : 175-180.
 66. Nadeau M, Lariviere S, Higgins R, et al. 1988. Minimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res.* 52 : 315-318.
 67. Gutierrez CB, Rodriguez Barbosa JI, Tascón RI, et al. 1995. Serological characterisation and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Spain. *Vet Rec.* 137 : 62-64.
 68. Hirsh DC, Martin LD, Libal MC. 1982. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res.* 43(2) : 269-272.
 69. Gilbride KA, Rosendal S, Brunton JL. 1989. Plasmid mediated antimicrobial resistance in Ontario isolates of *Actinobacillus (Haemophilus) Pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res.* 53 : 38-42.
 70. Ueda Y, Suenaga I. 1995. In vitro Antibacterial activity of florfenicol against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Med Sci.* 57(2) : 363-364.
 71. Ueda Y, Ohtsuk S, Narukawa N. 1995. Efficacy of florfenicol on experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J Vet Med Sci.* 57(2) : 261-265.
 72. Hsu FS, Hu J, Ro KH. 1982. Pathogenesis of pleuropneumonia in swine caused by *Hemophilus pleuropneumoniae*. *Int Pig Vet Soci.* 78.
 73. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1983. Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J Clin Microbiol.* 17(5) : 787-790.
 74. Piffer IA, Carter GR, Botovchenco AAF. 1986. Identification of serotypes of *Haemophilus pleuropneumoniae* by counterimmunoelectrophoresis. *Vet Rec.* 118 : 292-294.
 75. Inzana TJ, Clark GF, Todd J. 1990. Detection of serotype-specific antibodies or capsular antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by a double-label radioimmunoassay. *J Clin Microbiol.* 28(2) : 312-318.
 76. Hennessy KJ, Iandolo JJ, Fenwick BW. 1993. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 31(5) : 1155-1159.
 77. Rosendal S, Lombin L, DeMoor J. 1981. Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique. *Can J Comp Med.* 45 : 271-274.
 78. Mittal KR, Higgins R, Lariviere S. 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J Clin Microbiol.* 18(6) : 1351-1354.
 79. Homme J, Devriese LA, Castryck F, et al. 1990. Slide precipitation a simple method to type *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol.* 24 : 123-126.
 80. Kume K, Nakai J, Swata A. 1984. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. *Jpn J Vet Sci.* 46(5) : 641-647.