大韓獸醫學會誌(2000) 第40卷 第4號
Korea J Vet Res(2000) 40(4) : 707~717

돼지 위축성 비염백신의 효과에 관한 연구

지영철 · 로 승 · 한정희 · 한태욱

강원대학교 수의학과

(2000년 11월 6일 게재승인)

Efficacy of atropic rhinitis vaccine in pigs

Yongzhe Chi, Cheng Lu, Jeong-hee Han, Tae-wook Hahn

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, 192-1 Hyoja-dong, Chuncheon, 200-701, Kangwon-do, Korea

(Accepted by November 6, 2000)

Abstract : Atropic rhinitis (AR) is one of major respiratory diseases in pigs. AR causes a great economic losses and is considered to be a multifactorial disease in which herd management, heredity, and environment. Several vaccines against have been developed commercially and used in pig farms but the efficacy of each vaccine is still questionable. In this study, one of commercial AR vaccines, which contains inactivated *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* type D and their toxoid was evaluated for vaccine efficacy by challenge test. Twenty piglets were divided into four groups as follows; group I was piglets from vaccinated sows (twice before parturition); group II was piglets from vaccinated sows (same as group I) and were vaccinated at 1 day old; group III and IV were piglets without any vaccination. Groups I, II, and III were challenged by intranasal instillation of 5.3×10^7 CFU of *B bronchiseptica* twice and 1×10^9 CFU of *P multocida* five times. Group IV was control group without any vaccination and any challenge. We compared serological results, recovery rate of *P multocida* by polymerase chain reaction, clinical signs and pathological findings between vaccinated groups and unvaccinated groups for efficacy of the vaccine. Serological responses against *B bronchiseptica* and toxigenic *P multocida* type D were not showed evident discrepancy between vaccinated groups and unvaccinated groups assuming that the antibody responses against the vaccine is very delayed. However, growth rate, clinical signs and snout lesion grading in vaccinated groups showed more favorable than those in unvaccinated group. Therefore, AR vaccination in this study is considered to be effective in the prevention of AR in pigs.

Key words : Atropic rhinitis, *B bronchiseptica*, *P multocida*, AR vaccine, efficacy.

서 론

위축성 비염(atrophic rhinitis; AR) 또는 전염성 위축성 비염(infectious AR)은 돼지의 호흡기 질병으로 1830년 독일의 Franque에 의해 처음 보고된 이래 거의 모든 양돈국가에 상재화되어 사료효율과 증체율을 감소시켜 많은 경제적 손실을 준다[1-4]. 국내에서도 1997년에 AR에 의한 경제적 손실이 437억원으로 추산되며 출하돈에서 감염율은 30% 이상을 보였고 대부분의 경우에서 중등도 이상의 비갑개골 위축병변을 보였다.

AR은 기침, 재채기, 비루, 비출혈, 비갑개골 위축, 상악골 발육부전에 의한 안면 변형 등을 특징으로 하며, 유전적 요인, 영양, 병원체, 사육환경, 화학물질에 의한 자극 등의 다양한 인자들에 의해 발생된다[5,6]. 발생인자들 중에서 병원체인 *Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida*의 감염에 의해 AR이 발현되어 원인체라고 하였다[7]. *B bronchiseptica*의 감염에 의해서 유발되는 AR은 *P multocida*의 감염에 의한 경우에 비해 상대적으로 병원성이 약하며, *B bronchiseptica*와 *P multocida*의 복합감염은 병변을 더욱 악화시킨다[8,9]. *B bronchiseptica*에

Address reprint requests to Dr. Tae-wook Hahn, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

의한 호흡기 점막의 손상 없이 acetic acid와 같은 화학물질에 의한 손상으로도 *P multocida*의 병원성이 발현된다[10]. AR은 *B bronchiseptica* 단독감염에 의해 일어나는 비진행성 AR(nonprogressive AR; NPAR)과 *P multocida* 단독감염 또는 *B bronchiseptica*나 다른 병인체와의 복합감염, 암모니아 가스로 인한 환기불량, 스트레스 요인 등에 의해 발병하는 진행성 AR(progressive AR; PAR)로 분류된다[11].

*B bronchiseptica*는 비강점막의 섬모에 강하게 부착한 후 증식하여 비강점막의 염증, 섬모상피세포의 증생과 탈락을 일으킨다[12-14]. 점막에 부착된 *B bronchiseptica*는 독소를 분비하여 말초혈관을 수축시켜 국소적 충혈, 부종과 주위조직의 괴사와 융해 및 조골기능의 저하를 초래하여 비갑개골의 위축을 일으키며, 이차적으로 비강점막에 독자적으로 부착할 수 있는 능력이 없는 *P multocida*가 쉽게 정착하여 증식하므로서 독소를 분비하여 비갑개골의 위축을 더욱 악화시키고 간과 비장에도 손상을 주어 발육지연을 초래한다[15].

*P multocida*는 독소생산여부에 의해 독소생산형과 독소비생산형으로 구분하며 PAR은 독소생산형에만 의해 유발되므로 정확한 진단을 위해서는 독소를 검출하는 것이 가장 중요하다[16]. 독소생산형 *P multocida*가 분비하는 독소는 조골세포의 생성을 억제하는 dermonecrotic toxin(DNT)이며, 염색체상의 *toxA* 유전자에 의해 발현되는 145-kD 크기를 갖고 있다[17].

*B bronchiseptica*의 불활화한 항원을 돼지에 접종한 후 공격접종시에 높은 혈중항체가와 방어효과를 나타냈고[18], 임신모돈에 접종하여 초유를 통해 혈중항체가가 이행된 자돈에 공격 접종하였을 시에도 높은 방어효과를 나타냈다[19]. 강[20]은 *B bronchiseptica*의 사균항원으로 면역시킨 돼지는 비강점막에 *B bronchiseptica*의 정착을 저지할 수 있었다고 하였다. *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 면역원으로 이용한 혼합백신을 접종하면 높은 방어효과를 보였다[9,21].

현재까지 국내 양돈장에서 AR을 예방하기 위해서 여러 종류의 백신을 사용하고 있으나 방어효과가 다양하게 나타나고 있어 백신의 효능을 확인하기가 매우 어려운 실정이다.

따라서 본 연구는 최근에 국내에서 시판되고 있는 독소생산형 *B bronchiseptica* 사독균주와 톡소이드, 독소생산형 *P multocida* type D 사독균주와 톡소이드를 함유한 AR 백신의 방어효과를 확인하고자 백신을 접종한 후 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종하여 혈청검사, PCR에 의한 균체검출 및 병리학적 검사를 실시하였다.

재료 및 방법

AR 백신

실험용 AR 백신은 독소생산형 *B bronchiseptica* 사독균주와 톡소이드, 독소생산형 *P multocida* type D 사독균주와 톡소이드를 함유한 시중에서 판매되는 B 사의 제품을 사용하였으며 모돈에는 분만 6주 전과 2주 전에 2 ml 씩 2회 근육주사하였고, 자돈은 생후 1일령에 1 ml씩 1회 근육주사하였다.

시험균주

B bronchiseptica 표준균주, 독소생산형 *P multocida* type D 표준균주, *P multocida* type D 야외분리주, *P multocida* type A 표준균주 등은 국립수의과학검역원에서 분양받아 -70°C에 보관하며 사용하였다. 공격접종균주의 준비로는 *B bronchiseptica*는 10% sheep blood를 함유한 bordet gengou agar(Difco Lab)에 접종한 후, 37°C incubator에서 2일간 배양한 다음 멸균한 0.01M PBS(pH 7.2)로 집균하여 사용하였다. 독소생산형 *P multocida* type D는 7% sheep blood를 함유한 tryptose blood agar (Difco Lab)에 접종한 후, 37°C incubator에서 18시간 배양한 다음 Mueller Hinton broth(Difco Lab)로 집균하여 사용하였다.

시험동물 및 시험설계

공격접종실험을 위해 Landrace와 Yorkshire를 교잡시켜 얻은 20두의 3주령 자돈(LY, F1)을 선발하여 실험사육돈방(2.5 m×2.5 m×0.5 m)으로 이동하여 사육하였다. 사육돈방은 주위환경과 통제되게 하였고 돈사의 온도와 습도는 일정하게 유지시켰으며 환풍기를 통하여 환기시켰다.

실험군은 4개군으로 구분하여 각 군당 5두씩 1주일간 적응시킨 후 4주령에 비강내로 공격접종실험을 실시하였다. 실험 I 군은 백신을 접종한 모돈에서 분만된 자돈으로 *B bronchiseptica* 및 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 군, 실험 II 군은 백신을 접종한 모돈에서 분만된 자돈으로 생후 1일령에 백신을 접종한 다음 *B bronchiseptica* 및 독소생산형 *P multocida* type D를 공격 접종한 군, 실험 III 군은 모돈과 자돈에 모두 백신 접종을 하지 않고 *B bronchiseptica* 및 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 군, 실험 IV 군은 모돈과 자돈에 백신접종을 하지 않고 생리식염수를 접종한 군으로 구분하였다. 자돈의 비강내 감염은 생백신 분무접종기(クリソテツク株式會社, 日本)를 사용하여 *B bronchiseptica*는 5.3×10^7 CFU/ml로 1 ml /회씩 2회, 독

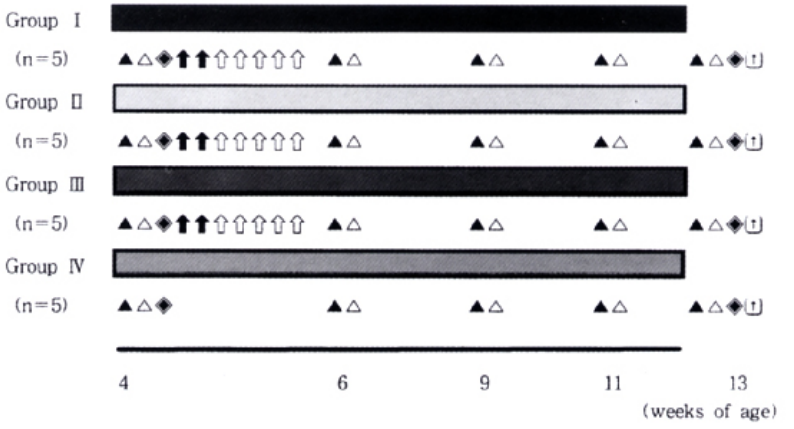

Fig-text 1. Experimental design.

Group I : piglets from vaccinated sows were challenged with *B bronchiseptica* and *P multocida*

Group II : piglets from vaccinated sows were vaccinated at 1 day old and challenged with *B bronchiseptica* and *P multocida*

Group III : piglets without vaccination but were challenged with *B bronchiseptica* and *P multocida*

Group IV : piglets without vaccination and any challenge

▲ : collection of nasal swab △ : collection of blood ◆ : measurement of body weight

↑ : infection of *B bronchiseptica* intranasally ⇧ : infection of toxigenic *P multocida* type D intranasally

⍐ : autopsy

소생산형 *P multocida* type D는 1.1×10^9 CFU/ml로 1 ml/회씩 5회 비강내 공격접종하였다. 4주령, 6주령, 9주령, 11주령, 13주령에 비강에서 멸균 swab을 사용하여 비강재료를 채취하였고 혈청검사를 위하여 채혈을 실시하였다(Fig-text 1). AR 백신 이외에 실험 돈군에 대한 백신접종은 하지 않았으며 모돈의 경우 분만전 2회에 걸쳐 전염성 위장염 백신을 접종하였다. 전 실험기간 동안에는 항생제가 섞이지 않은 갓난 돼지사료를 급여하였고 음수는 자유 급여토록 하였으며 사육돈방 주위는 정기적으로 소독하였다.

공격접종균 분리

독소생산형 *P multocida* type D를 검출하기 위하여 돼지를 보정한 다음 비강주위의 피부를 알콜솜으로 깨끗이 닦고, 알콜면봉으로 비강내벽을 닦은 후 건조한 멸균 gauze로 비강을 닦았다. 멸균 swab을 넣어 제 2 구치까지 4-5회 회전시켰다. 비강재료는 Brain heart infusion broth (Difco Lab)에 접종한 후 DNA를 분리하여 PCR에 사용하였다. 혈청검사를 위하여 혈액은 경정맥에서 채취하여 응고시킨 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 eppendorf tube에 옮긴 다음 56°C에서 30분간 비동화 시킨 뒤 사용하였다.

*B bronchiseptica*에 대한 혈청검사

*B bronchiseptica*에 대한 항체검사는 국립수의과학검역원에서 분양받은 *B bronchiseptica* 응집반응용 항원을 사용하여 microplate agglutination 법을 실시하였다[22]. 50% 이상의 응집을 보이는 well의 혈청희석배수를 항체가로 판정하며 항체가가 80배 이상일 때 양성으로 판정하였다.

P multocida type D anti-toxin 항체검사

P multocida anti-toxin 항체검사는 PMT ELISA kit (DAKO A/S, Denmark)를 사용하여 실시하였다. 이 kit는 competitive ELISA 원리를 이용한 것으로 검사혈청의 OD(optical density)가 $OD_{cut\text{-}off}$ 수치보다 작을 때 양성항체로 판정하였다.

P multocida type D의 *toxA* 유전자 검출을 위한 PCR

1) Genomic DNA의 분리

Brain heart infusion(BHI) broth(Difco Lab) 2 ml에 표준균주 또는 비강재료를 접종한 후 37°C에서 1~2일간 배양하였다. 배양액 1 ml을 6,000×g에 1분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하였다. 침전된 pellet을 50 μl의 멸균증

류수로 부유하고 100°C에서 5분간 끓인 뒤 바로 얼음속에 옮겨 급냉시켰다. 부유액을 18,000×g에서 1분간 원심분리한 뒤 상층액을 수거하여 template로 사용하였다.

2) Primers

Oligonucleotide primer는 *P multocida* type D의 염색체에 위치한 *toxA* 유전자 중 846 bp 크기의 fragment가 증폭되도록 합성하였다. Forward primer는 5'-CTTAGATGAGCGACAAGG-3', reverse primer는 5'-GAATGCCACACCTCTATAG-3'이 되게 합성하여 사용하였다[23].

PCR은 Amigot 등[24]의 방법을 변형하여 실시하였다. PCR 반응물은 template DNA를 1~10 μl, 1 unit *Taq* DNA polymerase, 10×PCR buffer, 0.4 mM dNTP, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.1 μM의 forward primer와 reverse primer 및 멸균증류수를 총 25 μl의 반응용량이 되게 넣어 증폭시켰다.

임상, 병리학적 검사

1) 성장률과 임상증상

실험군의 돼지는 공격접종하기전부터 실험종료까지의 성장률, 폐사율 및 식욕감퇴, 의기소침, 재채기, 기침, 비출혈, 안면변형 등의 각 임상증상을 4단계로 구분하여 매일 아침과 저녁에 2회 관찰하여 기록하였다.

2) 육안 및 병리조직학적 검사

실험종료 후 돼지는 ketamine(상품명: Katala, 유한양행)과 xylazine(상품명: Rompun, 한국바이엘)으로 안락사시킨 후 부검을 실시하였다. 특징적인 육안소견인 비갑개골의 위축병변을 관찰하기 위하여 상악의 제 1 구치와 견치의 중간에서 구강면에 수직으로 절단하였으며, 비갑개골 위축지수는 Runnels[25]의 snout lesion grading에 따라 위축의 정도를 0~5로 구분하여 판정하였다.

비갑개골 조직은 10% neutral buffered formalin과 10% formic acid를 1:1로 혼합한 탈회용액을 사용하여 탈회시킨 뒤 일상적인 파라핀 포매과정을 거쳐 4 μm로 조직절편을 제작한 다음 hematoxylin & eosin(H&E) 염색을 실시하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

통계학적 처리

백신 접종 실험군과 비접종 실험군간의 통계학적 유의성 검사는 Mann-Whitney 검정법을 실시하였다[26].

결 과

국내의 양돈산업에 막대한 경제적 손실을 주고 있는 호흡기질병인 AR을 예방하기 위하여 독소생산형 *B bronchiseptica* 사독균주와 톡소이드, 독소생산형 *P multocida* type D 사독균주와 톡소이드를 함유한 AR 백신의 방어효과를 확인하고자 4주령의 자돈에 공격접종을 실시하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

*B bronchiseptica*에 대한 항체가

Microplate agglutination을 이용한 *B bronchiseptica*에 대한 응집항체 검사에 대한 결과는 모돈에만 백신을 접종한 실험 I군은 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종 전에는 40%의 항체양성율을 보였고, 공격접종한 후 5~9주에는 20%의 항체양성율을 나타났다. 모돈과 자돈에 백신을 접종한 실험 II군은 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종전에는 80%의 항체양성율을 나타났으나 공격접종한 후에는 항체가 관찰되지 않았다. 백신접종을 하지 않고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 III군과 대조군인 실험 IV군은 전기간에 걸쳐 0%의 항체양성율을 나타났다(Table 1).

P multocida type D의 anti-toxin 항체가

ELISA를 이용한 *P multocida* type D의 anti-toxin 항체는 모돈에만 백신을 접종한 실험 I군은 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 뒤 항체양성율이 약 20% 수준으로 나타났고, 모돈과 자돈에 백신을 접종한 실험 II군은 약 50%~60% 수준으로 나타났으나 백신을 접종하지 않은 실험 III군과 대조군인 실험 IV군은 전기간에 걸쳐 항체가 나타나지 않았다(Table 2).

PCR에 의한 독소생산형 *P multocida* type D의 검출

PCR을 이용하여 비강재료에서 독소생산형 *P*

Table 1. Seropositivity against *B bronchiseptica* in pigs by agglutination test

Group*	Weeks postinfection				
	0	2	5	7	9
I	2/5(40)**	0/5(0)	1/5(20)	1/5(20)	1/5(20)
II	4/5(80)	0/4(0)	0/2(0)	0/2(0)	0/2(0)
III	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)
IV	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)

*I : piglets from vaccinated sows were challenged with *B bronchiseptica* and *P multocida*. II : piglets from vaccinated sows were vaccinated at 1 day old and challenged with *B bronchiseptica* and *P multocida*. III : piglets without vaccination but were challenged with *B bronchiseptica* and *P multocida*. IV : piglets without vaccination and any challenge.
**No. of positive samples/tested samples(%).

Table 2. Seropositivity against toxin of toxigenic *P multocida* type D in pigs by ELISA

Group*	Weeks postinfection				
	0	2	5	7	9
I	0/5(0)**	1/5(20)	1/5(20)	1/5(20)	2/5(40)
II	3/5(60)	2/4(50)	1/2(50)	1/2(50)	1/2(50)
III	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)
IV	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)

*The explanation of each group is referred to Table 1.
**No. of positive samples/tested samples (%).

Table 3. Detection of toxigenic *P multocida* type D in pigs by PCR

Group*	Weeks postinfection					Cumulative positivity
	0	2	5	7	9	
I	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5	3/25(12)**
II	0/5	1/4	0/2	0/2	0/2	1/15(9)
III	0/5	1/5	2/5	1/5	0/5	4/25(16)
IV	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/25(4)

*The explanation of each group is referred to Table 1.
**No. of positive samples/tested samples (%).

multocida type D를 검사하였던 바 모돈에만 백신을 접종하고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 I군에서는 3예, 모돈과 자돈에 백신을 접종한 실험 II군에서는 1예, 백신을 접종하지 않았지만 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 III군에서는 4예, 실험 IV군에서는 1예에서 검출되었다(Table 3).

병리학적 결과

1) 성장률

대조군인 실험 IV군의 사료요구율(feed conversion)은 1.72에 반하여 모돈에만 백신을 접종하고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 I군은 1.50, 모돈과 자돈에 백신을 접종하고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 II군은 1.68, 백신을 전혀 접종하지 않고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 III군은 1.80로서 모돈에만 백신을 접종한 실험 I군에서 가장 낮은 사료요구율을 보였으며 대조군에 비하여 사료요구율 지수(feed conversion index)가 14.7% 높았으나 실험 III군은 4.4% 낮았다(Table 4).

2) 임상증상

식욕감퇴, 재채기, 눈꼽, 기침, 비출혈, 안면변형 등의 임상증상은 백신을 전혀 접종하지 않고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 III군이 백신을 접종한 실험 I군과 실험 II군에 비하여 뚜렷하게 관찰되었고, 전 실험기간 실험 II군에서 3두의 실험돼지가 심한 설사로 인하여 실험기간에 폐사하였다(Table 5).

Table 4. Growth performance of pigs with infection of *B bronchiseptica* and *P multocida* type D

Group*	Feed conversion**	Feed conversion index (%)***
I	1.50	114.7
II	1.68	102.4
III	1.80	95.6
IV	1.72	100

*The explanation of each group is referred to Table 1.
**Total feed weight (Kg)/total body weight (Kg).
***(Group IV feed conversion/each group feed conversion) ×100.

3) 육안적 소견

Runnels[25]의 snout lesion grading에 따라 비갑개골의 위축병변을 관찰하였던 바 모돈에만 백신을 접종한 실험 I군은 배측 비갑개골의 정상적인 상태와 복측 비갑개골의 매우 가벼운 정도의 위축과 더불어 비강확장을 보였으며(Fig 1) 평균 비갑개골 위축지수는 1.4±0.6을 보였다. 모돈과 자돈에 모두 백신을 접종한 실험 II군은 배측 비갑개골의 정상적인 상태와 복측 비갑개골의 가벼운 정도의 위축과 비강확장을 보였으며(Fig 2) 평균 비갑개골 위축지수는 1.5±0.7을 보였다. 백신을 접종하지 않고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 III군에서는 복측과 배측 비갑개골의 심한 위축과 거의 소실되어 천공형태를 보였으며 비중격은 변형, 만곡되어 관찰되었고(Fig 3) 평균 비갑개골 위축지수는 3.4±0.9을 보였다. 대조군인 실험 IV군에서는 일부 비갑개골의 가벼운 위축과 비강의 확장을 보였으나 대부분 정상소견을 보였고(Fig 4) 평균 비갑개골 위축지수는 0.4±0.5을 보였다. 백신접종군인 실험 I군과 실험 II군의 비갑개골 위축지수를 통계학적으로 비교하였을 시 실험군간 유의성은 없었으나 백신비접종군인 실험 III군에 비하여는 유의성 있게 낮게 관찰되어 ($P<0.05$) AR에 대한 예방효과가 있음을 알 수 있었다(Table 6).

4) 병리조직학적 소견

모돈에 백신접종한 실험 I군은 주로 복측 비갑개골을 중심으로 일부 비강점막상피세포의 탈락과 점막고유층의 충혈, 점막하직층에 가벼운 림프구의 침윤을 보였으며(Fig 5), 일부에서는 선상피세포의 증생과 술잔세포의 증가를 보였다. 모돈과 자돈에 백신접종한 실험 II군에

Table 5. Clinical signs and mortality of pigs with infection of *B bronchiseptica* and toxigenic *P multocida* type D

Group*	Clinical signs	Weeks postinfection				Mortality (%)
		0-2	2-5	5-7	7-9	
I	Anorexia	-/+**	-/-	-/-	-/-	0/5(0)***
	Sneezing	-/+	-/+	-/-	-/-	
	Eye patch	-/-	-/-	-/-	-/-	
	Cough	-/+	-/+	-/+	-/-	
	Nose bleeding	-/-	-/-	-/-	-/-	
	Snout deformation	-/-	-/-	-/-	-/-	
II	Anorexia	-/++	-/++	-/+	-/-	3/5(60%)
	Sneezing	-/+	-/-	-/-	-/-	
	Eye patch	-/+	-/+	-/-	-/-	
	Cough	-/+	-/-	-/-	-/-	
	Nose bleeding	-/-	-/-	-/-	-/-	
	Snout deformation	-/-	-/-	-/-	-/-	
III	Anorexia	-/+	-/+	-/+++	-/++	0/5(0)
	Sneezing	-/+	-/+	-/-	-/-	
	Eye patch	-/-	-/+	-/+	-/+	
	Cough	-/-	-/++	-/++	-/++	
	Nose bleeding	-/-	-/-	-/+	-/+	
	Snout deformation	-/-	-/-	-/+	-/++	
IV	Anorexia	-/-	-/+	-/-	-/-	0/5(0)
	Sneezing	-/-	-/-	-/-	-/-	
	Eye patch	-/-	-/-	-/+	-/+	
	Cough	-/-	/-	-/-	-/-	
	Nose bleeding	-/-	-/-	-/-	-/-	
	Snout deformation	-/-	-/-	-/-	-/-	

*The explanation of each group is referred to Table 1.
**The degree of clinical signs; -: without normal limits, +: mild, ++: moderate, +++: severe.
***No. of dead pigs/No. of examined pigs (%).

Table 6. Results of snout lesion grading against atrophic rhinitis in pigs

Group*	snout lesion grading						Mean±SD
	0	1	2	3	4	5	
I	0/5**	3/5	2/5	0/5	0/5	0/5	1.4±0.6
II	0/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	1.5±0.7
III	0/5	0/5	1/5	1/5	3/5	0/5	3.4±0.9
IV	3/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0.4±0.5

*The explanation of each group is referred to Table 1.
**No. of positive samples/tested samples.

서는 복측 비갑개골을 중심으로 일부 비강점막상피세포의 탈락과 점막고유층의 충혈, 점막하직층에 가벼운 림프구의 침윤을 보였고 선상피세포의 증생, 조골세포의 증식, 술잔세포의 증가가 특징적으로 관찰되었다(Fig 6). 백신을 접종하지 않고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 III군에서는 점막층과 점막하직층의 다량의 림프구 침윤, 선상피세포의 증생에 따른 다량의 분비선 형성과 결합조직의 증식에 따른 섬유화 및 다수의 파골세포에 의한 골융해소견과 골아세포의 증식 등이 관찰되었으며 더욱 진행된 병변으로 골양조직이 단편화되어 연속성을 상실하였다(Fig 7). 실험 IV군에서는 가벼운 비강점막상피세포의 탈락, 선상피세포의 증생, 충혈소견을 보였다(Fig 8). 병리조직학적 소견에 대한 결과는 Table 7과 같다.

고 찰

AR의 병인론에 대해서 학자들의 주장이 아직까지 일치하지 않고 있지만 AR을 예방하기 위한 백신은 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 다같이 면역항원으로 사용함으로써 좋은 효과를 기대할 수 있다[27,28]. Kobisch와 Pennings[9]는 *B bronchiseptica*와 *P multocida* type A와 type D에 대한 혼합백신을 접종한

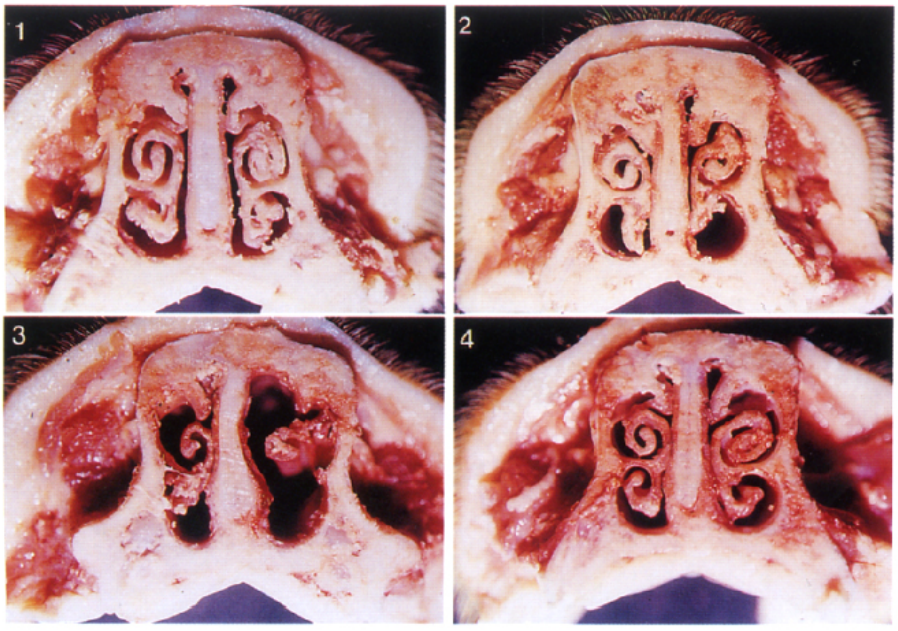

Fig 1. Turbinate showing mild atrophy of the ventral scrolls in piglet which was from vaccinated sows and was challenged.
Fig 2. Turbinate showing moderate atrophy of the ventral scrolls in piglet which was from vaccinated sows and was vaccinated and challenged.
Fig 3. Turbinate showing marked atrophy of both ventral and dorsal scrolls and deviation of the nasal septum in piglet which was not vaccinated but was challenged.
Fig 4. Turbinate showing slight atrophy of the ventral scrolls in piglet without vaccination and challenge.

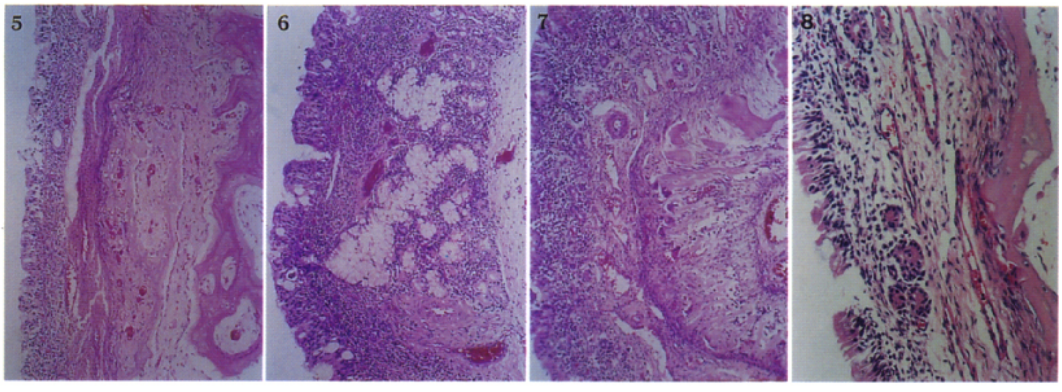

Fig. 5. Turbinate of the piglet which was from vaccinated sows and was challenged. Notice partial desquamation of nasal mucosal epithelial cell, congestion in the laminia propria and mild infiltration of neutrophil and lymphocyte in the submucosa. HE, ×100.
Fig. 6. Turbinate of the piglet which was from vaccinated sows and was vaccinated and challenged. Notice hyperplasia of nasal epithelial cell and goblet cell in the mucosa and congestion and hyperplasia of glandular epithelium in the submucosa. HE, ×100.
Fig. 7. Turbinate of the piglet which was not vaccinated but was challenged. Notice infiltration of lymphoid cell and hyperplasia of glandular epithelium in the submucosa and loss of bone tissue by osteoclast and replacement by proliferated connective tissue. HE, ×100.
Fig. 8. Turbinate of the piglet without vaccination and challenge. Notice mild desquamation of nasal mucosal epithelial cell and congestion, hyperplasia of glandular epithelium and infiltration of lymphoid cell in the submucosa. HE, ×100.

Table 7. Histopathological findings in the nasal turbinate of pigs at autopsy

Tissues	Histopathological findings	Group*			
		I	II	III	IV
Epithelium	Metaplasia	+**	+	++	-
	Hyperplasia	+	++	++	+
	Desquamation	+	+	++	+
	Increased goblet cells	+	+	+	-
Submucosa	Cellular infiltration	+	+	++	+
	Fibrosis	+	-	++	-
	Proliferation of the glands	+	++	+	+
	Congestion	++	++	+	-
Bone tissue	Bone resorption by osteoclast	+	+	+++	-
	Osteoblastic dedifferentiation	-	+	+++	-

*The explanation of each group is referred to Table 1.
**The degree of histopathological findings; - : without normal limits, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe.

모돈의 분만자돈에서 *B bronchiseptica* 응집항체가는 2048, *P multocida* type D toxin 항체가는 8을, *B bronchiseptica*와 *P multocida* type D의 DNT 톡소이드 혼합백신을 접종한 모돈의 분만자돈에서는 *B bronchiseptica* 응집항체가 2048, *P multocida* type D의 toxin 항체가는 1024를 나타났으며 백신을 접종하지 않은 모돈의 분만자돈은 *B bronchiseptica* 응집항체가와 *P multocida* type D toxin에 대한 항체가는 모두 8 이하로 낮게 나타났다고 보고하였다. AR 백신은 *B bronchiseptica* 균 및 독소, *P multocida* type D균 및 독소를 동시에 방어할 수 있어야 하며 특히 독소에 대한 항체를 충분히 형성하여야 한다[29]. 현재 국내에서 AR을 예방하기 위해 *B bronchiseptica*와 *P multocida* type D의 혼합백신을 널리 사용하고 있는데 본 실험에서는 *B bronchiseptica* 및 톡소이드, *P multocida* type D 및 톡소이드를 함유한 백신의 방어효과에 대하여 확인하였다. 실험기간 중에는 일체의 항생제를 사용하지 못하였기 때문에 모돈과 자돈에 백신을 접종한 후 공격접종한 실험 II군에서 3두의 자돈이 심한 설사와 위축 등의 이유자돈 설사증후군 소견을 보이면서 폐사하였다.

Microplate agglutination에 의한 *B bronchiseptica* 응집항체가는 공격접종 전에 있어서 모돈에만 백신을 접종한 실험I군은 항체양성율이 40%, 모돈과 자돈에 모두 백신을 접종한 실험 II군은 항체양성율이 80%로 나타났다. 박 등[30]은 *B bronchiseptica* 항체양성율이 모돈과 자돈에 백신을 접종한 돈군과 모돈에만 백신을 접종한 돈군은 100%, 백신접종을 하지 않은 돈군은 58.2%, 백신접종상태가 불분명한 돈군은 53.3%로 나타났다고 보고하였다. 본 연구의 실험결과와 박 등[30]의 실험결과를 비교하여 보면 항체가 크기에서는 큰 차이가 있었는데 모돈과 자돈에 백신을 접종한 실험군은 모돈에만 백신을 접종한 실험군보다 더 높은 항체양성율을 보유하고 있었다는 점에서는 일치하였다. 따라서 모돈과 자돈에 모두 백신을 접종하는 것이 모돈에만 백신을 접종하는 것보다 더 효과적임을 알 수 있었다. 실험 I군에서 공격접종 후 항체양성율이 20%로 낮게 나타난 것과 실험 II군, 실험 III군에서 공격접종 후 2주에서 9주까지 항체양성율이 나타나지 않은 것은 牛島 등[31]이 2주령 자돈에서 *B bronchiseptica*가 높게 분리되었지만 4~8주령에서는 *B bronchiseptica* 항체가가 20미만으로 나타났고하여 *B bronchiseptica*에 대한 항체는 매우 늦게 형성되는 것으로 판단되며 응집항체가 80미만으로 나타난 것은 모체이행항체가 소실되었기 때문으로 사료되어진다. 실험 I군에서 항체양성을 보인 한 개체가 공격접종 후 5~9주에 걸쳐 응집항체가 320~5120로 나타난 것은 백신에 의해 형성된 방어항체보다는 공격접종의 지속 감염에 의한 항체가일 수도 있다. 이에 반해 실험 II군의 경우 *B bronchiseptica*에 대한 항체양성율은 공격접종전에 높게 나타났을 뿐 공격접종이후에는 거의 항체 양성율이 나타나지 않았다. 유감스럽게도 5마리의 자돈중 3마리가 설사로 인해 폐사되어 2마리의 자돈을 대상으로 추적조사하였는데 그중 1마리에서 5주부터 40의 항체가가 미약하게 검출되기 시작하였다.

본 연구에서 *B bronchiseptica*와 *P multocida* type D를 공격접종에 따른 실험 I군의 *P multocida* type D의 독소에 대한 항체양성율이 20-40%을 보인데 반해 실험 II군의 항체양성율은 50-60%로 나타났는데 이는 모체이행항체에 따른 자돈에 있어서 항체가 효과적으로 형성되었음을 알 수 있었다. Chanter 등[27]은 독소생산형 *P multocida* type D를 비강감염시킨 자돈에서 감염 후 39

일동안 비강내 *P multocida* type D의 정착과 비갑개가 위축된 돼지에서조차도 독소중화항체의 상승을 볼 수 없었다고 보고하였다. 牛島 등[31]은 AR 감염으로 의심되는 양돈장에서 독소중화항체가를 측정하고 비강내 독소생산형 *P multocida*를 분리하였던 바 자돈의 일령이 증가할수록 독소중화항체가와 항체양성율이 감소하였으며 독소생산형 *P multocida*가 높게 분리된 4주령 자돈이 시간이 경과하여 8~12주령에서는 독소중화항체와 항체양성율의 상승을 볼 수 없었다고 보고하였다. 본 연구의 실험 III군에서 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종후 항체양성율이 0%로 나타난 것으로 볼 때 *P multocida*에 대한 항체는 감염 후 곧바로 형성되지 않고 3개월 이후에 형성되리라 사료되는데 이러한 결과는 Chanter 등[27]과 牛島 등[31]의 결과와 유사하였다. Kobisch와 Pennings[9]에 의하면 *B bronchiseptica*의 경우 감염 또는 백신접종후 항체의 형성은 비교적 신속하게 일어나지만 *P multocida*의 경우 감염 또는 백신을 접종하더라도 항체의 형성이 매우 느리게 나타난다고 하였다. 공격접종전 동일한 실험군내에서도 각각의 세균에 대한 항체 검출에 있어서 차이가 있는 것은 아마도 개체에 따른 차이, 예컨대 초유를 제대로 충분히 급여하였는지 또는 초유를 섭취하였다 하더라도 개체에 따라 모체 이행항체의 소실정도가 서로 다르게 나타났기 때문으로 사료된다.

공격접종후 독소산생 *P multocida*의 검출을 위해 PCR을 이용하였다. 세균을 비강내에서 직접 검출할 경우 비강내에 존재하고 있는 여러 가지 상재균들이 혼합감염되어 분리가 제대로 일어나지 않을 뿐더러 분리 및 동정에 있어서 많은 시간이 소요된다. PCR에 의한 *P multocida*의 검출은 본 연구팀에서 이미 발표한 방법으로 직접 세균을 분리 동정하는 것보다 여러 가지 면에서 이점이 많다[32]. Table 3에서 PCR에 의한 독소생산형 *P multocida* type D의 검출율이 백신비접종군이 16% 인데 반해 백신접종군인 실험 I군과 실험 II군은 12%와 9%로 낮게 검출되었는데 백신접종에 따른 효과에 의한 것으로 보여진다. 추후 *B bronchiseptica*에 대한 PCR 법을 개발하여 앞의 방법과 동일한 조사가 필요하다고 사료된다.

AR은 자돈에 있어서 재채기, 수양성 비루, 눈물이 초기 증상이며 심할 경우는 비출혈을 동반하여 돈사바닥, 돈사벽, 돼지의 몸에서 피가 묻어 관찰되고 이유후에는 눈주위에 눈꼽이 생겨 안면이 지저분하며 상악골의 발육이 지연되여 비뚤어지고 안면이 변형된다[7,33]. 일당증체율은 평균 5~15%, 중증에서는 20~25% 저하된다[33]. 본 연구에서 식욕감퇴, 재채기, 눈꼽, 기침, 비출혈, 안면변형 등의 임상증상은 백신을 접종하지 않고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 III군이 백신을 접종한 실험 I군과 실험 II군에 비하여 뚜렷하게 관찰되었다. 사료요구율에 있어서는 백신접종한 실험 I군이 실험 III군에 비해 유의성있게 낮게 나타났으나($P<0.05$) 실험 II군의 사료요구율은 실험 III군과 차이가 나타나지 않았다.

비갑개골의 위축병변에서 백신비접종군의 실험 III군은 평균위축지수가 3.4로 백신접종군인 실험 I군의 1.4와 실험 II군의 1.5에 비하여 높게 나타났다. 이는 北槽 등[34]이 출하돈의 비갑개골 위축지수는 모돈과 자돈에 백신을 접종한 실험군은 1.2, 모돈에만 백신을 접종한 실험군은 위축지수 1.0, 대조실험군은 3.5로 나타났다고 보고한 결과와 매우 유사하였으며 백신을 접종함으로 인해 효과적으로 비갑개골의 위축이 예방되었음을 알 수 있었다.

병리조직학적 소견을 보면 경증의 예에서는 주로 비강 점막상피세포의 탈락, 점막고유층의 충혈, 가벼운 염증세포의 침윤, 중등도 예에서는 상피세포의 화생, 점막하직층의 섬유화 및 선상피세포의 증생, 골조직의 재흡수, 중증 예에서는 상기 소견들 이외에도 osteoblastic dedifferentiation이 특징적으로 관찰되었다[35]. 吳 등[36]은 가벼운 소견으로는 점막하직층에 호중구와 단핵구의 침윤, 점막고유층의 선상피세포의 수적 감소, 조골세포의 현저한 감소, 골판이 얇아지고 골간격의 확장, 중등도 소견으로는 점막상피세포의 손상과 화생, 점막고유층의 호중구, 단핵구, 림프구의 산재성 침윤, 골판의 현저한 소실과 소실된 골조직의 결합조직으로 대체, 중증 소견으로는 비갑개골의 골판 위축에 의한 산발적인 골소판의 형성과 결합조직으로의 대체, 조골세포의 소실, 점막고유층 선상피세포의 소실과 가벼운 염증세포의 침윤, 점막상피상피의 중층편평상피로의 화생 등을 볼 수 있었다고 보고하였다. 본 연구에서 모돈에만 백신을 접종한 실험 I군과 모돈과 자돈에 백신을 접종한 실험 II군에서는 비강점막상피세포의 탈락과 점막고유층의 충혈, 선상피세포의 변성과 괴사, 점막하직층에 호중구와 림프구의 가벼운 침윤, 상피세포의 증생, 조골세포의 증식, 비갑개골의 얇아진 골판을 볼 수 있어 김 등[35]과 吳 등[36]의 결과의 가벼운 소견 내지 중등도 소견에 속하였으나 백신을 접종하지 않았고 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종한 실험 III군에서는 다수의 파골세포에 의한 골융해소견과 골아세포의 증식, 골양조직의 단편화, 비중격의 섬유아세포의 증식과 골흡수, 비강점막하직층의 림프구 침윤, 선상피세포의 화생 등을 볼 수 있어 중증 소견에 해당하였다.

이상의 결과로 볼 때 *B bronchiseptica* 사독균주와 톡소이드 및 독소생산형 *P multocida* type D 사독균주와

톡소이드가 함유된 혼합백신이 돼지의 호흡기 질병인 AR을 예방하는데 효과가 있었음을 알 수 있다. 본 연구에서는 사육시설의 제약으로 말미암아 11주령까지에서의 AR 백신의 효과를 보았지만 향후 실제 농장에서 많은 돼지를 대상으로 출하때까지의 백신의 효과에 대한 정밀한 조사가 필요하리라 사료된다.

결 론

돼지에 있어서 *B bronchiseptica* 사독균주와 톡소이드 및 독소생산형 *P multocida* type D 사독균주와 톡소이드가 함유된 혼합백신의 AR에 대한 예방효과를 확인하기 위해 *B bronchiseptica*와 독소생산형 *P multocida* type D를 공격접종하고 혈청검사, PCR, 병리학적 검사를 실시 하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 공격접종 후 *B bronchiseptica*와 *P multocida* type D의 DNT에 대한 항체는 매우 늦게 형성되었다.

2. 혈청검사와 PCR에서는 백신접종군과 백신비접종군간의 *B bronchiseptica*에 대한 응집항체가와 *P multocida* type D의 anti-toxin에 대한 항체양성율 및 PCR 검출율에서는 유의성 있는 차이는 없었다.

3. 성장률, 임상증상, 비갑개골 위축병변에 대한 육안적 및 병리조직학적 검사에서는 백신접종군이 백신비접종군에 비해 개선된 소견을 보였다.

이상의 결과로 *B bronchiseptica* 사독균주와 톡소이드 및 독소생산형 *P multocida* type D 사독균주와 톡소이드가 함유된 혼합백신이 돼지의 호흡기질병인 AR을 예방하는데 효과가 있었음을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. Hasebe H. Occurrence and epizootiological surveys of infectious atrophic rhinitis in swine. *Nippon Vet Zootech Col Bull.* 19:92-102, 1971.
2. Jenkins EM, Anthony V, Cleveland J and Gbadamosi SG. Prevalence of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine of southeastern Alabama. *Am J Vet Res*, 38:2071-2074, 1977.
3. Nielsen NC. Prevalence and economic significance of atrophic rhinitis of pigs. *Comm. Eur. Communities Rep EUR 8643 EN. Luxembourg*, 35, 1983.
4. Shashidhar BY, Underdahl NR and Socha TE. Serologic survey for *Bordetella bronchiseptica* in Nebraska specific-pathogen-free pigs. *Am J Vet Res*, 44:142-148, 1983.
5. Shewen PE and Conlon JA. Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa. 216-225, 1993.
6. de Jong MF. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL and Taylor DJ ed, Diseases of swine, 8th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa. 355-384, 1999.
7. Sakano T, Okada M and Taneda A. Experimental atrophic rhinitis in 2 and 4 month old pigs infected sequentially with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida. Vet Microbiol*, 31:197-206, 1992.
8. Rutter JM and Rojas X. Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets: differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combined infections with *Bordetella bronchiseptica. Vet Rec*, 110:531-535, 1982.
9. Kobisch M and Pennings A. An evaluation in pigs of Novi-Vac AR and an experimental atrophic rhinitis vaccine containing *P multocida* DNT-toxoid and *B bronchiseptica*. Vet Rec, 124:57-61, 1989.
10. Socha NR and Doster AR. Longterm effect of *Bordetella bronchiseptica* infection in neonatal pigs. *Am J Vet Res*, 43:622-625, 1982.
11. de Jong MF and Nielsen JP. Definition of progrssive atrophic rhinitis. *Vet Rec*, 27:93, 1990.
12. Duncan JR, Ross RK, Switzer WP and Ramsey RK. Pathology of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in swine: atrophic rhinitis. *Am J Vet Res*, 27:457-466, 1966.
13. Edington N, Smith IM, Plowright W and Watt RG. Relationship of porcine cytomegalovirus and *Bordetella bronchiseptica* to atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets. *Vet Rec*, 98:42-45, 1976.
14. Yokomizo Y and Shimizu T. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence. *Res Vet Sci*, 27:15, 1979.
15. Switzer WP. Studies on infectious atrophic rhinitis. V. Concept that several agents may cause turbinate atrophy. *Am J Vet Res*, 17:478-484, 1956.
16. Rutter JM. Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica. Res Vet Sci*, 34:287-295, 1983.
17. Buys W, Smith HE, Kamps A, Kamp EM and Smits MA. Sequence of the dermonecrotic toxin of *Pasteurella multocida. Nucleic Acids Res*, 18:2815-2816, 1990.
18. Harris DL and Switzer WP. Immunization of pigs against *B bronchiseptica* infection by parenteral vaccination. *Am J Vet Res*, 33:1975-1984, 1972.
19. Kasuga T, Nakasa Y, Ukishima K and Takatsu K. Studies of the *Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida*, and combined inoculum. *Am J Vet Res*, 29:777-785, 1953.
20. 강병규. *Bordetella bronchiseptica*의 감염 면역에 관한 연구. 대한수의학회지, 18:51-60, 1978.
21. Rutter JM and MacKenzie A. Pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs. A new perspective. *Vet Rec*, 114:89-90, 1984.
22. 류영수, 박최규, 장정호. 가축 질병 진단. 초판. 이공 WORLD, 서울. 107-109, 1997.

23. Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, Polson DD and Vimr ER. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol*, 34:3035-3039, 1996.
24. Amigot JA, Torremorell M and Pijoan C. Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multodica* strains from pigs. *J Vet Diagn Invest*, 10:169-173, 1998.
25. Runnels LJ. Infectious atrophic rhinitis of swine. *Vet Clin of North Am*, 4:301-319, 1982.
26. 이승욱. 통계학의 이해. 2판. 自由아카데미, 서울. 418-422, 1998.
27. Chanter N, Magyar T and Rutter JM. Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. *Res Vet Sci*, 47:48-53, 1989.
28. Cowart RP, Backstrom L and Brim TA. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis and pneumonia in swine. *Can J Vet Res*, 53:295-300, 1989.
29. 河合 透. 豚萎縮性鼻炎の移行抗信 による予防. 熊本縣獸醫師會だより, 28:7-9, 1999.
30. 박세종, 안식욱, 신인환, 정태수, 전무형. 충남 서부지역 돈군에서 분리된 *Bordetella bronchiseptica*의 성상에 대한 연구. 대한가축위생지, 18:133-151, 1995.
31. 牛島稔大, 河合 透, 長尾和哉, 高漱公三, 種子野 章, 山田進二. 豚からの*Bordetella bronchiseptica*および*Pasteurella multocida*の分離. 日本獸醫師會雜誌, 47:390-393, 1994.
32. 지영철, 이동석, 한정희, 한경수, 한태욱. Polymerase chain reaction을 이용한 독소생산성 *Pasteurella multocida*의 검출. 대한수의학회지, 40:56-62, 2000.
33. 中瀨安淸. 豚病學. 第三版. 株式會社 近代出版. 東京:407-416, 1987.
34. 北檜山町, 高橋貞光, 檜山家保. ワクチンを用いた進行性AR對策について. 北海道養豚研究會報, 30:8-11, 1998.
35. 김순복, 정운익, 임창형. 돼지 위축성 비염에 관한 병리조직학적 연구. 농사시험연구보고. 가축위생편, 1:99-109, 1976.
36. 吳銘芳, 涑堅, 林文華, 邱仕炎. 台灣地區猪萎縮性鼻炎之感染調查. 台灣省家畜衞省試驗所研究報告, 26:35-40, 1990.