



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



碩士學位論文

제주지역 돼지 흥막폐렴에 대한  
병리학적 연구 및 원인체의 혈청형

濟州大學校 大學院

獸醫學科

金 基 昇

2011年 12月



제주지역 돼지 흥막폐렴에 대한  
병리학적 연구 및 원인체의 혈청형

指導教授 金 哉 勳

金 基 昇

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2011年 12月

金基昇의 獸醫學 碩士論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

濟州大學校 大學院

2011年 12月

초 록

# 제주지역 돼지 흉막폐렴에 대한 병리학적 연구 및 원인체의 혈청형

지도교수 : 김 재 훈

김 기 승

제주대학교 대학원 수의학과

*Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae*에 의한 돼지 흉막폐렴은 전 세계적으로 양돈산업에 경제적으로 매우 큰 피해를 주는 질병이다. 현재까지 본 균체는 2개의 생물형과 15개의 혈청형으로 분류된다. 흉막폐렴의 효과적인 예방과 적절한 치료를 시작함에 있어 빠른 진단과 혈청형의 동정은 매우 중요하다. 따라서 본 연구는 제주도 돼지에서 발생한 흉막폐렴에 대한 병리학적 특징과 병변형성에 관여하고 있는 균체의 혈청형을 규명하기 위하여 수행하였다. 검사 시료는 2007년부터 2011년까지 제주도 내 24개 양돈장으로부터 제주대학교 수의병리학교실에 의뢰된 돼지 중 중합효소연쇄반응을 이용하여 *A. pleuropneumoniae* 감염으로 진단된 총 50개의 돼지 폐장을 실험에 공여하였다. 부검을 통해 채취한 폐장은 10% 중성완충포르말린에 고정하였고 일반적인 조직처리과정에 따라 병리조직학적 검사를 실시하였다. 흉막폐렴 병변에서 출현하는 특징적인 귀리세포(oat cell)의 세포기원을 규명하고자 급성형 병변을 보이는 폐장조직에 대해 CD3, MHC class II 및 lysozyme 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 실시하였다. 또한 중

합효소연쇄반응을 이용하여 폐렴 병변에 존재하고 있는 균체의 혈청형을 분류하였고, 세균배양검사를 통해 분리된 균체에 대하여 항생제 감수성 검사를 실시하였다. 육안적으로 폐장에서 흉막폐렴 병변의 분포는 양측성보다 편측성인 경우가 많았다. 병리조직학적으로 심급성 및 급성 병변에서는 미만성의 부종, 섬유소 석출, 출혈, 중성호성 백혈구 침윤, 혈전형성, 괴사 등의 특징을 보이고 있었다. 만성 병변에서는 큰포식세포 침윤, 대상 괴사(zonal necrosis) 주위로 섬유화 및 폐 흉막에 결합조직의 증식을 나타내고 있었다. 면역조직화학염색 결과, MHC class II 및 lysozyme 항체에 대하여 귀리세포 주위에서 약한 양성반응을 나타내었다. 50건의 흉막폐렴에 대한 혈청형 동정 결과 혈청형 5가 92%(46/50)로 가장 많았으며, 혈청형 2가 6%(3/50), 2형과 5형의 혼합감염이 2%(1/50)의 순으로 분포하였다. 균체에 대한 항생제 감수성 검사 결과 ceftiofur, amoxicillin, colistin은 매우 우수한 감수성을 보이고 있었으나, ampicillin, penicillin, tylosin 등은 내성을 보였다. 이상의 연구 결과를 종합해 볼 때 제주도 지역의 돼지 흉막폐렴에는 *A. pleuropneumoniae* 혈청형 5가 가장 많이 감염되고 있으며, 괴사 병변에 나타나는 귀리세포는 폐포큰포식세포에서 유래하는 것으로 사료된다.

---

중심어 : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 돼지 흉막폐렴, 면역조직화학염색, 중합효소연쇄반응, 항생제 감수성 검사, 혈청형



## 목 차

I. 서 론	-----	1
II. 재료 및 방법	-----	4
III. 결 과	-----	11
IV. 고 찰	-----	16
V. 결 론	-----	21
VI. 참고문헌	-----	27
영문초록	-----	32

## I. 서 론

*Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae*는 그람 음성이며, 비운동성의 형태가 다양한 소형의 구균양(cocoid) 혹은 간균(rod) 모양의 세균이다 [25, 31]. *A. pleuropneumoniae*는 돼지가 유일한 자연 숙주이며 [31], 돼지 흉막폐렴(porcine pleuropneumonia)의 원인체로 전 세계적으로 양돈산업에서 막대한 경제적 피해를 주고 있다 [32]. 이 균이 처음 분리되었을 당시에는 사람의 *Hemophilus (H.)* strain과 유사하여 *H. parahemolyticus*로 명명되었다 [26]. 이후 Shope [30]은 아르헨티나의 돼지 농장에서 발생한 흉막폐렴 병소에서 분리한 균을 병변의 특징에 따라 *H. pleuropneumoniae*로 명명하였다. 그러나 최근에는 DNA 조성과 phenotype이 *Hemophilus*속 보다는 *Actionbacillus*속에 가깝다는 것이 밝혀져 *A. pleuropneumoniae*라고 개명되었다 [32].

*A. pleuropneumoniae*는 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD 또는 V factor) 요구성에 따라 2개의 생물형(biotype)과 균체 협막을 구성하는 다당류의 차이에 의해 15개의 혈청형(serotype)으로 분류된다. NAD 요구형인 생물형 I에는 혈청형 1~12 및 15가 있으며, 혈청형 13 및 14는 NAD 비요구형인 생물형 II에 속한다 [17].

*A. pleuropneumoniae*는 건강한 돼지의 상부호흡기도 및 편도에서도 검출되며 [31], 밀집사육, 환기불량, 장거리 수송, 온도의 급변, 갑작스런 환경변화 등의 스트레스 요인이 가해졌을 때 돼지의 저항력 저하로 인하여 흉막폐렴이 발생하게 된다 [17]. 이 균의 전파는 감염돈에 의한 공기전파 및 직접접촉으로 이루어진다 [31]. 임상적으로 심급성, 급성 및 만성형으로 구분되어 진다 [8]. 심급성형은 소수의 개체가 산발적으로 무증상 또는 고열 및 식욕부진을 보이며 특별한 호흡기 증상 없이 바닥에 누워 있다. 순환부전으로 인해 코, 귀, 사지말단에서 시작하여 시간이 경과하면서 전신 피부가 발적되는 청색증을 나타낸다. 또한 개구호흡, 견좌자세 등을 보이며 폐사 직전에 코와 입으로부터 거품이 섞인 혈액성 삼출물을 보인다. 급성형은 다수의 개체가 감염되는데, 고열에 의해 피부가 발적되고 활동성이 저하되며 사료와 음수의 섭취가 현저하게 줄어든다. 호흡곤란, 기침과 같은

심한 호흡기 증상이 나타난다. 만성형은 급성형의 증상이 사라진 후에 나타나는 데 열은 미약하거나 없으나 간헐적인 기침과 식욕저하로 증체량과 사료효율이 감소하여, 출하일령이 증가된다 [13, 17, 30].

육안적으로 돼지 흉막폐렴은 폐장의 모든 엽에 걸쳐 경계가 명료한 암적색조의 경화된 병변을 보인다 [25]. 병리조직학적 병변은 초기에는 출혈, 괴사, 중성호성 백혈구의 침윤, 폐포큰포식세포와 혈소판의 활성화, 혈전형성, 광범위한 수종, 섬유소성 삼출물의 석출 등을 특징으로 한다. 만성으로 경과 시 큰포식세포 침윤, 괴사소 주위의 섬유화 및 섬유성 흉막염 등의 특징적인 소견을 보인다 [17]. 또한 폐장 실질에 형성되는 대상 괴사소(zonal necrosis) 주위로는 농염된 핵과 세포질을 가지고 소용돌이치는 형태를 가지는 방추형의 귀리세포(oat cell)를 특징적으로 관찰할 수 있다 [6, 8, 23]. Liggett 등 [23]은 이 세포들에 대한 면역조직화학염색(immunohistochemistry; IHC) 및 전자 현미경 검사 결과 중성호성백혈구에서 유래하였을 가능성이 있음을 보고하였으며, 폐장의 기관지염, 폐포염 및 국소적인 괴사 등과 같은 초기 병변 형성에 있어 중성호성백혈구가 중요한 역할을 한다고 주장하였다. 반면에 정과 한 [6]은 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)를 접종한 후 *A. pleuropneumoniae*를 혼합감염시킨 실험군에서 폐포강내에 큰포식세포가 서로 융합되어 함포체를 형성하거나 귀리세포 형태를 나타내기도 한다고 보고하였다.

*A. pleuropneumoniae*에 의한 흉막폐렴은 급성의 경과를 취하며 막대한 피해를 주고 있기 때문에 본 질병에 대한 신속하고 정확한 진단이 매우 중요하다. 균체의 혈청형을 구분하는 진단 기법으로는 보체결합시험(complement fixation test), 간접혈구응집법(indirect hemagglutination test), 효소면역법(enzyme-linked immunosorbent assay), 라텍스응집반응법(latex agglutination test), 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody test), 면역확산법(immunodiffusion test) 및 링침강반응(ring precipitation reaction) 등으로 매우 다양하다 [2, 3, 34]. 이러한 기존의 면역학적 기법에 의한 혈청형 동정은 혈청형 간 교차반응이 자주 발생하고 있기 때문에, 최근에는 보다 신속하고 신뢰성이 높은 검사 기법인 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 이용하여 질병 진단 및 혈청형의 동



정에 활용하고 있다 [4, 9, 29, 34]. 흉막폐렴 균체에 대한 국내 연구에 따르면 각 지역별로 다소간의 차이는 있으나 주로 혈청형 2 및 5가 가장 문제시되고 있으며, 간헐적으로 혈청형 3, 7, 10 및 12가 보고되기도 하였다 [1, 2, 3, 4].

이 질병을 치료하기 위하여 양돈장에서는 항생제가 주로 사용하고 있으며, 비교적 양호한 치료 효과를 보이고 있다 [24]. 그러나 때때로 과도한 항생제의 사용으로 인한 내성균의 출현이라는 큰 문제점이 발생하고 있는 실정이다. 또한 흉막폐렴 균체는 단독 감염 시에도 높은 이환율과 폐사율을 나타내지만, PRRSV 등의 바이러스와 함께 복합감염될 때 그 피해는 더욱 심해진다 [17].

이 연구는 제주도에서 발생하는 돼지 흉막폐렴의 정확한 진단과 적절한 치료 및 예방을 위한 기초자료를 마련하기 위하여 수행하였다. 돼지 흉막폐렴에 대한 병리학적 연구를 통하여 병변의 특징을 파악하였으며, 병변을 유발하는 *A. pleuropneumoniae*의 혈청형을 분석하였다. 또한 배양된 균체에 대한 항생제 감수성 검사를 실시하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료

2007년에서 2011년까지 제주도 소재 24개 양돈장으로부터 제주대학교 수의과 대학 병리학교실에 병성감정 의뢰된 돼지에서 육안 및 병리조직학적으로 흉막폐렴으로 진단된 시료를 우선적으로 선별하였다. 이 중, PCR을 이용하여 *A. pleuropneumoniae* 감염으로 최종 확인된 총 50두의 폐장 시료를 실험에 공여하였다. 50두 돼지를 지역에 따라 세분하여 보았을 때 제주시 지역 46두(한림읍 22두, 애월읍 17두, 한경면 5두, 조천읍 2두) 및 서귀포시 지역 4두(대정읍 3두, 표선면 1두)로 확인되었다.

### 2. 병리조직학적 검사

의뢰된 돼지는 일반적인 절차에 따라 부검을 수행하여 각 장기의 육안소견을 세밀하게 살핀 다음, 폐장을 포함하여 병변이 확인된 장기를 채취하였다. 채취한 폐장의 일부는 따로 분리하여 세균배양검사 및 PCR을 실시하였으며, 일부는 10% 중성완충포르말린에 고정하였다. 고정이 완료된 폐장 조직은 통상적인 처리 과정에 따라 파라핀 포매하여 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 각 폐장 조직은 흉막폐렴의 특징적인 소견을 확인한 뒤, 병변의 정도를 평가하기 위해 각각의 소견을 4 단계(none, mild, moderate 및 severe)로 나누어 조사하였다. 또한 돼지 흉막폐렴 병변의 진행 단계는 Ajito 등 [8]의 보고를 참고하여 수종 및 출혈이 특징적인 심급성(peracute), 섬유소 석출 및 괴사가 주된 병변인 급성(acute) 및 괴사부 주위 또는 흉막에 섬유화까지 동반되는 만성(chronic)으로 구분하여 조사하였다.

### 3. PCR

#### 1) 검사 시료의 핵산 추출

돼지 50두의 폐장에서 흉막폐렴의 원인균인 *A. pleuropneumoniae*의 혈청형 동정을 위하여 PCR을 실시하였다. 유전자 검사를 위하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관된 폐장 조직의 일부를 채취하여 DNase RNase free distilled water (Invitrogen, USA)와 1:10 비율로 혼합하여 균질화 시킨 후 상층액을 이용하였다.

DNA추출은 G-spin™ DNA extraction kit (iNtRON biotechnology, Korea)를 이용하였다. 시료의 상층액 200  $\mu\text{l}$ 에 G-buffer 400  $\mu\text{l}$ 을 잘 혼합한 다음  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 방치하고 binding buffer 400  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 column에 800  $\mu\text{l}$ 를 넣고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Collection tube에 여과된 용액을 제거하고 500  $\mu\text{l}$ 의 washing buffer를 분주하여 12,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상기 과정을 1회 반복하였다. 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 column을 넣고 100  $\mu\text{l}$ 의 elution buffer를 첨가하여 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 하였다. 최종 추출물은 PCR검사 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동보관 하였다.

#### 2) Oligonucleotide primer의 제작

*A. pleuropneumoniae*의 진단과 혈청형 2, 5, 6형 동정을 위한 primer는 Jessing 등 [20]의 방법에 준하여 제작하였으며, 1형 동정을 위한 primer는 Schuchert 등 [29]의 방법, 3형 동정을 위한 primer는 Zhou 등 [34]의 방법, 7 및 12형 동정을 위한 primer는 Angen 등 [9]의 방법에 준하여 제작하였다(Table 1).

### 3) PCR 반응조건

혈청형 동정을 위한 반응조건은 추출한 DNA 2  $\mu$ l와 동정하고자 하는 혈청형의 primer 각각 0.5  $\mu$ l (20 pmol) 및 DNase RNase free water 17  $\mu$ l를 PCR premix (Maxime PCR premix, iNtRON biotechnology, Korea)에 첨가하여 최종 반응용량이 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. 각 혈청형에 대한 PCR 반응에 대한 온도와 시간 조건은 Table 2와 같이 설정하였다. PCR의 증폭은 PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa, Japan)을 이용하였다.

### 4) PCR 증폭산물의 확인

반응 종료 후, 각각의 반응액 7  $\mu$ l를 1.5% agarose gel상에서 전기영동을 실시한 다음, ethidium bromide 용액(0.5  $\mu$ l/ml in DW)으로 염색하였다. UV transilluminator (Mupid-Scope WD, TaKaRa, Japan)로 각각의 혈청형에 대한 특이적인 밴드의 유무를 확인하였으며, 증폭산물을 확인하기 위하여 100 bp DNA Ladder (iNtRON, Korea)를 molecular size marker로 이용하였다.

**Table 1.** Oligonucleotide primers used in PCR test for identification and serotyping of *A. pleuropneumoniae*

Target agent	Primer	Sequences (5' to 3')	product size (bp)
APP	HPF	AAG GTT GAT ATG TCC GCA CC	950
All Serotype	HPR	CAC CGA TTA CGC CTT GCC A	
APP	Ap1U <sub>1</sub>	AGT GGC TGG ATG AGA CGA GAC	1,603
Serotype 1	Ap1L <sub>2</sub>	TAG TTT GTT ATG GTA TTT CTG TA	
APP	Ap2F	ACT ATG GCA ATC AGT CGA TTC AT	500
Serotype 2	Ap2R	CCT AAT CGG AAA CGC CAT TCT G	
APP	AP3NF	TTT GCG CTG TAG TGC TCC AAT	921
Serotype 3	AP3NR	AAC AAA TAA AGT TGC TCG AAA GTA	
APP	Ap5A	TTT ATC ACT ATC ACC GTC CAC ACC T	1,100
Serotype 5	Ap5B	CAT TCG GGT CTT GTG GCT ACT AA	
APP	SGJ14	AAC CAC TCA CTT TCC ACA TTA G	720
Serotype 6	SGJ5	AAT CGG AAG GTT TTG GTC TCG TG	
APP	Ap7F	GGT GAC TGG CGT ACG CCA AA	396
Serotype 7	Ap7R	GGG CTG CAG ACT GAC GTA A	
APP	Ap12F	GGT TCT CCA GAT GAC TCT GAA A	559
Serotype 12	Ap12R	GCT ATT GGA TGA AGA TGA CTC AT	

**Table 2.** PCR conditions for the classification of *A. pleuropneumoniae*

Agents	PCR conditions		
	Pre-cycle heating	Cycle reactions	Post-extension
APP Serotype 1	95°C, 3min	95°C for 1min, 56°C for 1min, 72°C for 2min (33 cycles)	72°C, 10min
APP All Serotype, Serotype 2, 5, 6	94°C, 5min	94°C for 1min, 63°C for 1min, 72°C for 1min 20sec (33 cycles)	72°C, 10min
APP Serotype 3	95°C, 15min	94°C for 1min, 62°C for 1min, 72°C for 1min 30sec (30 cycles)	72°C, 7min
APP Serotype 7, 12	94°C, 5min	94°C for 1min, 63°C for 1min, 72°C for 1min (33 cycles)	72°C, 10min

#### 4. 면역조직화학적 검사

급성형을 보이는 폐장의 흉막폐렴 병변에 특징적으로 출현하는 귀리세포의 기원을 규명하고 세포학적 변화상을 확인하기 위하여 Envision polymer reagent (Dako, USA) 방법으로 면역조직화학염색을 수행하였다. 폐장 파라핀 조직을 4~5  $\mu\text{m}$  두께로 절편하여 silane 코팅 슬라이드에 부착한 후, 탈파라핀 및 함수과정을 거쳤으며, 조직 내 존재하는 peroxidase를 제거하기 위해 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 10분간 반응시켰다. 귀리세포군 내 세포의 분포 및 변화 양상을 확인하기 위한 1차 항체로는 CD3, MHC class II 그리고 lysozyme antibody를 사용하였다(Table 3). 이들 항체를 조직위에 적하하여 37°C에서 1시간 처리한 다음 2차 항체에 40분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS 수세를 거친 뒤 3, 3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB; Dako, USA)로 발색하였으며, 대조염색은 Mayer hematoxylin (Sigma, USA)으로 염색하였다. 염색이 끝난 조직 슬라이드는 광학현미경으로 관찰하여 세포표지자에 양성인 세포의 분포를 확인하였다.

**Table 3.** Primary antibodies used for the characterization of oat cells

Antibody	Target cell	Source	Dilution	Antigen retrieval
CD3	T lymphocyte	Dako A0452	1:50	10 nmol/L citrate buffer, pH 6.0: 95~99°C, 1h
MHC class II	Macrophage B lymphocyte Dendritic cell	Dako M0746	1:40	10 nmol/L citrate buffer, pH 6.0: 95~99°C, 1h
Lysozyme	Macrophage	Dako A0099	1:400	Proteinase K 0.002%: 37°C, 30min

## 5. 세균배양검사

병변이 확인된 폐장에서 *A. pleuropneumoniae*를 배양하고자 병변부 단면의 오염부위를 제거한 뒤, 무균적으로 소량의 시료를 채취하여 chocolate agar plate (HANIL CO MED, Korea)에 도말하였다. 도말을 마친 배지는 candle jar에 넣은 상태로 37°C에서 24~48시간 배양하였다. 전체 50두의 폐장에 대한 세균배양검사를 실시한 결과 총 28개의 균체를 분리하였다.

## 6. 항생제 감수성 검사

병변에서 분리한 28개의 *A. pleuropneumoniae* 균체에 대하여 항생제 감수성 검사를 실시하였다. 항생제 감수성 디스크는 BBL사 제품으로 amoxicillin/clavulanic acid (AmC-30, 20/10 µg), ampicillin (AM-10, 20 µg), colistin (CL-10, 10 µg), enrofloxacin (ENO-5, 5 µg), gentamicin (GM-10, 10 µg), penicillin (P-10, 10U), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, 1.25 µg/23.75 µg) 와 Rosco Diagnostica A/S 제품으로 tylosin (Tylo, 150 µg), lincospectin (Li-SP, 15/200 µg), lincomycin (LincoM, 19 µg), ceftiofur (CFTIO, 30 µg), tiamulin (Tiamu, 30 µg), 등 12종의 항생제를 사용하였으며, 감수성 여부는 각각의 제조회사에서 제시한 감수성 판정 기준을 따랐다. 균체는 0.5 McFarland 혼탁도 기준으로 조정하여 chocolate agar plate에 접종균액을 멸균면봉으로 배지 전체에 골고루 도말한 다음 항생제 디스크를 20 mm 간격으로 배지표면에 부착시키고 candle jar를 사용하여 37°C에서 24시간 배양하였으며, 디스크 주위에 형성된 억제대의 직경으로 감수성 여부를 판정하였다.



### Ⅲ. 결 과

#### 1. 홍막폐렴 발생 상황

홍막폐렴에 감염된 50두에 대하여 계절별 발생 분포를 분석한 바, 겨울과 봄철이 각각 28%(14/50) 및 38%(19/50)로 나타나 여름(22%, 11/50)이나 가을(12%, 6/50)에 비하여 좀 더 많이 발생하는 경향을 보이고 있었다. 발생 돼지의 연령에 따라서는 2개월령 4%(2/50), 3개월령 56%(28/50), 4개월령 30%(15/50), 5개월령 6%(3/50), 6개월 이상 4%(2/50)로 구분되어 주로 3~4개월령에 집중적으로 발생하였다.

#### 2. 육안검사 결과

임상적으로 홍막폐렴에 감염된 돼지들은 비강으로부터 거품이 섞인 혈액성의 삼출물과 함께 귀, 꼬리, 사지말단 및 흉부에서 하복부까지의 피부에 담적색 또는 자적색의 발적 부위가 관찰되었다. 부검 시 육안 병변으로 폐장의 홍막면에는 담황색내지 유황색의 거친 거미줄과 같은 삼출물이 부착되어 있었다. 폐장의 소엽간 결합조직은 현저하게 확장되어 있고, 편측 혹은 양측 폐장의 전엽(첨엽 및 심엽) 또는 횡격막엽에는 광범위한 암적색의 경화소가 대엽성으로 산재해 있으며, 일부 폐장에서는 단면 절개 시 꽃잎 무늬의 전형적인 괴사대가 매몰되어 있었다. 폐문 림프절은 자적색조로 발적되고 현저하게 종창되어 있었다.

육안검사를 통하여 홍막폐렴 병변의 폐장 내 분포를 살펴본 결과, 50두의 폐장 중 편측성이 35두(70%, Fig. 1A), 양측성이 15두(30%, Fig. 1B)로 나타나 한 쪽 폐엽에 국한된 편측성 병변이 더욱 많은 것으로 확인되었다. 그러나 폐장을 전엽 및 후엽으로 구분하여 폐렴 병변의 분포 비율을 비교한 결과 큰 차이점을 나타

내지는 않았다.

### 3. 병리조직학적 검사 결과

병리조직학적 검사 결과, 흉막폐렴의 주요 병변은 흉막염, 출혈, 대상괴사소, 괴리세포, 섬유소 석출 및 이로 인한 림프관의 확장 등 이었다(Table 4). 병리조직학적 특징을 토대로 50두의 흉막폐렴 예를 병변의 진행 단계별로 분류한 결과, 심급성 23두(46%), 급성 22두(44%) 및 만성 5두(10%)로 확인되었다.

심급성 흉막폐렴으로 분류된 폐장의 조직학적 소견으로는 폐포강과 소엽간 결합조직에 광범위한 출혈과 섬유소의 석출, 미만성의 수중 및 중성호성 백혈구의 침윤이 주로 관찰되었고(Fig. 2), 이로 인해 소엽간 결합조직이 현저하게 확장되어 있었다(Fig. 3). 일부 폐장에 분포하고 있는 작은 혈관에는 호산성의 균질 무구조한 혈전이 형성되어 내강을 막고 있거나 맥관염이 진행되기도 하였으며(Fig. 4), 폐흉막에는 다량의 염증세포 침윤 및 섬유소가 미만성으로 분포하고 있었다(Fig. 5).

급성 흉막폐렴으로 분류된 폐의 실질에 호염성으로 진하게 염색되는 세포들이 무리를 이루어 대상 괴사 병소를 만들고 있었고, 그 내부에는 진하게 농염된 핵과 세포질을 가지며 소용돌이치는 듯한 방추형의 괴리세포가 군집을 이루고 있었다(Fig. 6 및 7).

만성으로 분류된 폐장의 조직학적 소견은 대상 괴사소 주위 및 폐 실질에 결합조직이 증식하고 있었고, 일부에서는 세기관지 주위로도 결합조직이 증식하고 있었다(Fig. 8). 폐흉막에도 광범위한 결합조직의 증식이 관찰되었다(Fig. 9).

**Table 4.** Histopathologic characteristics of 50 porcine lungs infected with *A. pleuropneumoniae*

Microscopic lesions	Grade			
	None	Mild	Moderate	Severe
Pleuritis	0	30	13	7
Hemorrhage	5	23	15	7
Zonal necrosis	10	5	21	14
Oat cell	5	9	19	17
Fibrin	5	13	21	11
Lymphatic dilation	1	1	25	23

#### 4. PCR 결과

50두에 대한 *A. pleuropneumoniae* 혈청형 동정 결과 5형이 46두(92%)로 가장 많이 분포하였으며, 2형은 3두(6%), 2형 및 5형의 혼합감염이 1두(2%)로 확인되었다. 나머지 1, 3, 6, 7 및 12형은 모두 음성으로 판명되었다(Table 5).

Table 5. Results for serotype analysis of *A. pleuropneumoniae*

	Type 2	Type 5	Type 2 & 5	Total
No. of cases	3	46	1	50
%	6	92	2	100

#### 5. 면역조직화학적 검사 결과

돼지 흉막폐렴의 대상피사소 주위에서 관찰되는 귀리세포에 대한 기원을 알아보고자 CD3항체에 대한 면역조직화학염색 결과, 세기관지 주위 림프소절의 T림프구에는 강한 양성반응을 보였으나 귀리세포에는 음성반응을 나타내었다(Fig. 10). 그러나 MHC class II 및 lysozyme 항체에 대해서는 일부 귀리세포 주위에서 약한 양성반응을 나타내었다(Fig. 11 및 12). 비교적 정상적인 폐포 강에 침윤된 폐포큰포식세포는 MHC class II 및 lysozyme 항체 모두에서 강한 양성반응을 나타내고 있었다.

## 6. 항생제 감수성 검사 결과

*A. pleuropneumoniae* 분리균 28주로 12종의 항생제에 대한 감수성 여부를 검사한 결과 균체에 가장 효과적인 항생제는 ceftiofur (100%), amoxicillin/clavulanic acid (96.4%), colistin (96.4%) 및 lincospectin (96.2%)임을 알 수 있었으며, tiamulin (89.3%), trimethoprim/sulfamethoxazole (89.3%), enrofloxacin (85.2%), gentamicin (71.4%) 및 lincomycin (71.4%)은 중등도의 감수성을 나타내었다. 그러나 ampicillin (32.1%), penicillin (21.4%) 및 tylosin (21.4%)은 높은 내성을 가지고 있는 것으로 확인되었다(Table 6).

**Table 6.** Antimicrobial susceptibility of *A. pleuropneumoniae* isolates from porcine pneumonic lungs

Antimicrobial agents	Disc content ( $\mu\text{g}$ )	No. of isolates				Sensitivity (%)
		R	I	S	Total	
Amoxicillin/clavulanic acid	20/10 $\mu\text{g}$	1	1	26	28	96.4
Ampicillin	20 $\mu\text{g}$	19	1	8	28	32.1
Colistin	10 $\mu\text{g}$	1	7	20	28	96.4
Gentamicin	10 $\mu\text{g}$	8	12	8	28	71.4
Penicillin	10 U	22	3	3	28	21.4
Enrofloxacin	5 $\mu\text{g}$	4	2	21	27	85.2
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1.25/23.75 $\mu\text{g}$	3	3	22	28	89.3
Ceftiofur	30 $\mu\text{g}$	0	3	22	25	100
Lincomycin	19 $\mu\text{g}$	8	10	10	28	71.4
Lincospectin	15/200 $\mu\text{g}$	1	3	22	26	96.2
Tiamulin	30 $\mu\text{g}$	3	2	23	28	89.3
Tylosin	150 $\mu\text{g}$	22	2	4	28	21.4

R: resistant; I: intermediate; S: susceptible.

Susceptible and intermediate isolates were combined to calculate sensitivity to *A. pleuropneumoniae*

#### IV. 고 찰

우리나라의 양돈산업은 전업화, 집약화, 자동화 등으로 괄목할 만한 성장을 이루었으나, 양돈선진국들과 비교했을 때 아직까지 생산성에서 많은 차이를 보이고 있다. 최근 몇 년 전까지 이우 후 전신 소모성 질병으로 인해 이우 초기에서 후기 자돈들에서 많은 피해가 있었다. 그러나 썬코바이러스 백신이 상용화되고 효과를 발휘하여 이우 구간에서의 소모성 질병은 현재 큰 문제가 되고 있지 않다. 따라서 많은 양돈장에서 생산성 향상이 크게 기대되었으나 일부에서는 이전과 비교하여 생산성이 크게 증가되지 않고 있는 실정이다. 그 이유로는 육성 구간에서 농장에 만연되어 있는 돼지 호흡기 복합질병이나 소화기 질병으로 인한 피해가 상대적으로 증가되었기 때문으로 생각된다. 호흡기 질병 중 돼지 흉막폐렴은 연령대가 높은 육성 또는 비육구간의 돼지에 급성으로 발병하여 높은 폐사를 유발하기 때문에 큰 경제적 손실을 주게 된다. 따라서 효과적인 사전 예방과 질병 발생 시 적절한 치료 대책 마련이 매우 중요하다. 그러므로 환돈에 대한 신속하고 정확한 진단과 혈청형 동정 및 항생제 감수성 검사는 피해를 최소화하기 위한 대책 마련에 필수불가결한 요소라 할 수 있다.

Pijpers 등 [27]은 흉막폐렴에 감염된 돼지에서는 비강으로부터 포말성 혈액성 비루, 피부적변, 침울, 식욕부진, 기침 및 복식호흡 등의 증상이 있다고 하였다. 이 실험에 의뢰된 돼지들도 비강으로부터 거품이 섞인 혈액성 비루, 흉부에서 하복부에 걸친 피부 자반 형성, 발열, 침울, 기침, 식욕감퇴 및 호흡곤란 등의 임상 증상을 나타내었다.

병리조직학적으로 흉막염, 출혈, 대상괴사, 괴리세포, 섬유소 및 림프관의 확장 등과 같은 흉막폐렴의 특징적인 병변을 질병의 단계별로 세분하여 출혈과 부종이 주병변인 심급성, 섬유소의 석출과 괴사가 특징인 급성 및 섬유화를 동반한 괴사를 보이는 만성으로 분류하였다. 총 50두 중 심급성 23두(46%), 급성 22두(44%), 만성 5두(10%)로 분류되어 본 실험에서는 흉막폐렴이 주로 심급성 및 급성 형태임을 알 수 있었다.

흉막폐렴은 거의 모든 연령의 돼지에서 감염이 되지만 주로 12~16주령의 육

성 및 비육돈에서 가장 자주 진단된다 [25]. 이번 연구에서 연령에 따른 흉막폐렴의 발생양상을 살펴보았을 때 전체 50두 중 43(86%)두가 3~4개월령에 집중되어 있음을 알 수 있었다. 혈청학적으로 흉막폐렴 항체 양성인 농장에서 모든은 초유를 통하여 자돈에게 고농도의 모체이행항체를 넘겨준다. 그러나 자돈에서의 모체이행항체는 반감기가 있어 점차 항체 역가가 낮아지며 약 9주령 경에는 거의 사라지게 된다 [25]. 이 때 백신 접종이 없는 상황에서 군체에 노출될 경우 흉막폐렴이 다발할 가능성이 높을 것으로 판단된다.

제주도에서 돼지 흉막폐렴은 연중 발생하지만 겨울철부터 2~4월경의 봄철 환절기에 많이 발생하고 있음을 알 수 있었다. 정 등 [7]은 양돈장내 상대습도와 폐렴발생의 상관성을 검사한 결과 상대습도가 낮은 군에서 섬유소성 흉막폐렴이 발생하고, 상대습도가 높은 군에 비하여 열악한 사육환경이 조성되어 낮은 성장률로 이어진다고 보고하였다. 또한 Gorden [16]과 Bille 등 [12]은 고온다습한 상태에서는 호흡기내의 점액분비가 왕성하여 침입한 병원체의 배출을 용이하게 하고 점막을 보호하여 주기 때문에 폐렴의 발현율과 병변정도가 감소하지만 저온 건조한 계절에는 점액분비가 용이하지 않고 점막도 쉽게 건조하기 때문에 호흡기 병원체에 감염 시 폐렴의 발현율이 높아지고 병변도 심하게 된다고 하였다.

*A. pleuropneumoniae*는 혈청형에 따라 다양한 병원성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이는 혈청형 구분의 기준이 되는 협막 다당류뿐만 아니라 각 혈청형들이 분비하는 외독소 차이 때문인 것으로 판단된다 [13]. 군체 독소 중 ApxI은 105~110 kilodalton(kDa)의 분자량을 가진 강한 용혈성과 세포독성을 가진 단백질이며, 혈청형 1, 5, 9, 10, 11, 14에서 생산 분비된다 [14, 15, 22]. ApxII는 103-105 kDa의 분자량을 가진 약한 용혈성과 세포독성을 가지고 혈청형 10, 14를 제외한 모든 혈청형에서 생산 분비된다 [14, 21, 22]. ApxIII는 분자량이 120 kDa이고 비용혈성이지만 강한 세포독성을 가지고, 혈청형 2, 4, 6, 8, 15에서 생산 분비된다 [21]. 다른 병원성 인자로는 lipopolysaccharide(LPS)와 협막이 있다. LPS는 균의 부착에 관여하는 것으로 알려져 있고 [11], 협막은 숙주의 공격으로부터 방어하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [19].

폐장에 침입한 *A. pleuropneumoniae*는 폐포큰포식세포에 탐식되어 ApxI, ApxII 및 ApxIII 등의 독소를 생산하게 되고 이들 독소들은 폐포큰포식세포, 혈

관내피세포, 폐포 상피세포 및 간질의 모세혈관 등에 작용하여 용혈과 괴사 등의 손상을 입히게 된다. 그러나 탐식된 *A. pleuropneumoniae*는 피막으로 싸여 있어서 폐포큰포식세포가 소화시킬 수 없으며, 보체에도 저항성이 있는 것으로 알려져 있다 [28]. 폐장의 괴사소에 출현하는 귀리세포는 농염된 핵과 세포질을 가지고 소용돌이치는 형태를 가진 방추형의 세포로서 [6, 8, 23], 중성호성백혈구, 림프구, 유괴사 단핵세포 또는 변성된 큰포식세포 등으로 표현되었다. 본 연구에서는 이 세포의 기원을 알아보기 위하여 급성병변을 가지는 조직절편에 대하여 면역조직화학염색을 실시하였다. CD3 항체에 대한 면역조직화학염색 결과 세기관지 주위 림프소절에는 양성반응을 보였으나 귀리세포에는 음성반응을 나타내었다. 그러나 MHC class II 및 lysozyme 항체에 대해서는 귀리세포 주위에서 약한 양성반응을 나타내는 반면 폐포 강에 분포하는 폐포큰포식세포는 강한 양성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 유추해 보면 폐포큰포식세포가 파괴되기 전에 lysozyme이 폐포큰포식세포 내부에 존재할 때는 양성반응을 보이지만 파괴된 후에는 lysozyme이 세포 밖으로 유출되어 귀리세포 주위에만 약한 양성 반응을 나타내는 것으로 생각된다. 따라서 대상 괴사소에 출현하는 귀리세포는 큰포식세포에서 유래한 것으로 추정할 수 있었다.

각각의 나라와 지역에 따라 문제시되고 있는 *A. pleuropneumoniae*의 혈청형은 매우 다양하다. 일본은 1형과 2형 [10], 스페인은 2형과 4형 [18], 타이완은 1형과 2형이 주로 발생하는 것으로 보고되었다 [33]. 우리나라 경우, 정 등 [5]은 1992년부터 1993년까지 38주의 분리균주에 대하여 혈청형을 분석한 결과, 2형 47.4%, 5형 44.7% 및 7, 10, 12를 각각 2.6%라고 보고하였다. 이 등 [4]은 1995년부터 1997년까지 99주의 분리균주에 대하여 혈청형을 분석한 결과, 5형이 54.6%, 2형은 45.4%로 확인하였다. 그러나 최근 신 등 [2]은 2009년부터 2010년까지 37개의 분리균주에 대한 혈청형 동정 결과, 5형이 83.8%로 가장 많았고 1형은 10.8%, 2형은 5.4%의 순으로 검출되었다. 따라서 국내에서는 1990년대에 비하여 최근 들어 혈청형 2형의 분포가 감소하는 반면 5형이 현저하게 증가하고 있음을 알 수 있다. 제주도 지역의 경우 1995년에서 1996년 사이 김 등 [1]의 보고에 따르면 총 24주의 분리균주 중 5형 50%, 2형 45.8% 및 7형 4.2%로 분포하고 있어 2형과 5형이 거의 동등하게 분포하고 있었다. 그러나 이번 연구에서는 중복 감염



을 포함하여 5형이 94%로 월등히 많은 반면 2형은 현저하게 감소하였음을 알 수 있었다. 따라서 제주도를 포함한 국내 전 지역에서 유행하고 있는 흉막폐렴 균체의 혈청형이 변화하였음을 시사하고 있다. 특히 혈청형 5는 혈청형 2에 비해 병원성이 높기 때문에 양돈농가에 더욱 큰 피해를 줄 수 있으므로 본 질병의 예방에 더욱 만전을 기해야 할 것으로 판단된다 [2].

일반적으로 흉막폐렴 균체에 감수성이 있는 항생제로는 penicillin, ampicillin, cephalosporin, colistin, sulfonamide, cotrimoxazole (trimethoprim +sulfamethoxazole), gentamicin 등이 알려져 있다. 그러나 베타락탐계 항생제는 보통 좋은 효과를 보이지만 내성이 자주 발견되는데 주로 혈청형 1, 3, 5 및 7형에서 좀 더 빈번하게 나오는 것으로 알려져 있다 [17].

국내에서 정 등 [5]은 1992~1993년 사이 돼지에서 분리한 흉막폐렴균에 대한 감수성 검사 결과 ampicillin, cephalothin, ciprofloxacin, ceftiofur에는 높은 감수성을 보이고 amikacin, chloramphenicol, erythromycin, kanamycin, methicillin, penicillin-G 및 streptomycin 등에는 중등도의 감수성을 보이는 반면, sulfadimethoxine, sulfamerazine, tylosin에는 강한 내성을 나타냄을 보고하였다. 타이완에서 Yang 등 [33]은 2002년에서 2007년까지 흉막폐렴균에 대한 항생제 감수성 검사 결과 ceftiofur, cephalothin, chloramphenicol에는 높은 감수성, amoxicillin, ampicillin에는 중등도의 감수성, lincospectin과 gentamicin에는 내성을 나타내고 있음을 보고하였다. 이와 같이 흉막폐렴 균체에 대한 항생제 감수성 검사 결과가 차이가 나는 것은 돼지를 사육하는 지역에 따라 사용하는 항생제가 다르고 그에 따라 균체가 내성을 획득하기 때문으로 생각된다.

제주도에서는 1990년대 중반 김 등 [1] 보고에 의하면 흉막폐렴 균체가 ampicillin, cephalotin, oxacillin에 대해서는 높은 감수성을, cefazolin, kanamycin, chloramphenicol, gentamicin, penicillin에는 중등도의 감수성을 보였다. 그러나 erythromycin, streptomycin, neomycin, lencomycin, sulfamethoxazole에는 내성을 나타내었다. 반면 본 연구에서는 ceftiofur (100%), amoxicillin/clavulanic acid (96.4%), colistin(96.4%) 및 lincospectin (96.2%)에 높은 감수성을 나타냈었지만 ampicillin (32.1%), penicillin (21.4%) 및 tylosin (21.4%)은 내성을 보이는 것으로 나타났다. 양돈장에서 자주 사용되고 있는 ampicillin과 penicillin의 경우 1990

년대에는 각각 75.0% 및 62.5%의 감수성을 보이고 있었지만 [1], 최근에는 강한 내성을 나타내고 있음이 확인되었다. 이는 국내 양돈배합사료에 주로 사용되었던 tylosin과 제주지역에서 예전부터 오랫동안 호흡기 질병의 치료와 예방에 사용되었던 페니실린계 항생제에 대한 내성이 증가된 것으로 생각되어진다. 또한 베타락탐계의 항생제가 내성이 잘 생기고, 제주도의 주된 혈청형이 내성이 잘 발생하는 5형이라는 점도 항생제의 내성의 변화에 영향을 주었을 것이라고 생각된다. Gutiérrez-Martin 등 [18]도 2000년 이후 흉막폐렴 균체의 항생제 감수성을 1980년대와 비교한 결과 tetracyclin 및 gentamicin에 대한 내성이 발현되고 있음을 보고하였다.

양돈장에서 흉막폐렴을 예방하기 위해서는 본 질병이 상재되어 있는 농장에서 후보돈이나 임신돈을 도입해서는 안된다 [17]. 또한 기본적인 농장의 방역과 위생관리가 철저히 유지되어야 할 것이다. 질병 예방을 위한 백신은 농장에서 문제되고 있는 흉막폐렴의 혈청형에 맞는 백신을 사용하고, 균체의 감염 이전에 두 번에 걸친 정확한 백신접종이 이루어져야 할 것이다. 질병 발생 초기에 항생제의 투여는 폐사율을 낮출 수 있는 좋은 치료법이기는 하지만, 임상증상을 보이는 돼지의 경우 사료와 음수 섭취를 거부하기 때문에 사료 및 음수 투여보다는 개체별로 근육이나 피하주사로 항생제를 투여하는 것이 보다 나은 효과적인 치료방법이 될 것이다 [27]. 양돈장에서 흉막폐렴이 의심되는 상황에서는 일단 위에서 언급된 감수성이 높은 항생제가 일차적으로 선택되어야 하고, 내성 문제를 극복하기 위한 방안으로 환돈에서 분리된 균체에 대한 항생제 감수성 검사를 통하여 감수성이 높은 항생제를 선택하여 사용하는 것이 바람직할 것이다.

이 실험에서 얻어진 흉막폐렴균에 대한 혈청형 분포와 항생제 감수성 결과는 제주도내 양돈현장에서 이 질병의 예방과 치료제 선정 시 고려할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

제주지역 24개 농장으로부터 의뢰된 돼지 중 흉막폐렴으로 진단된 50두의 폐장에 대한 균체 혈청형 조사, 항생제 감수성 검사, 병리조직학적 검사 및 면역조직화학염색을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제주도 돼지에서 흉막폐렴균의 혈청형은 5형이 92%(46/50), 2형 6%(3/50), 5형 및 2형의 중복감염이 2%(1/50)로 분류되었다.
2. 면역조직화학염색 결과 귀리세포의 기원은 폐장의 다른 염증세포들보다 폐포큰포식세포와 더 밀접하게 관련되어 있었다.
3. 분리된 흉막폐렴 균체에 대한 항생제 감수성 결과 ceftiofur, amoxicillin, colistin 및 lincospectin은 높은 감수성을 가지고 있었으나, ampicillin, penicillin 및 tylosin은 내성을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 흉막폐렴의 효과적인 예방과 적절한 치료를 위해서는 신속하고 정확한 진단과 혈청형 동정뿐만 아니라 항생제 내성을 방지하기 위한 지속적인 질병 모니터링이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## Legends for Figures

Figure 1. Gross lesions of porcine pleuropneumonia. Distributions of pneumonic lesions were unilateral (A) or bilateral (B).

Figure 2. Severe diffuse hemorrhagic pneumonia in per-acute case. H&E, X100.

Figure 3. Interlobular septal dilatation due to infiltration of inflammatory cells and fibrin deposition in lymphatics. H&E, X100.

Figure 4. Note vascular thrombosis and vasculitis (arrow) in per-acute case. H&E, X200.

Figure 5. Severe diffuse fibrino-purulent pleuritis with intra-lesional bacterial colonies (arrows). H&E, X200.

Figure 6. Zonal necrosis in pulmonary parenchyma of acute case. H&E, X100.

Figure 7. Note streaming oat cells in zonal necrotic lesions. H&E, X200.

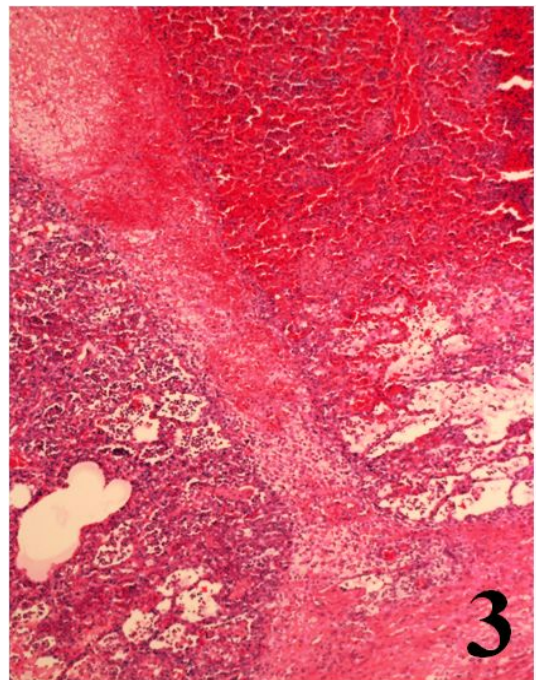
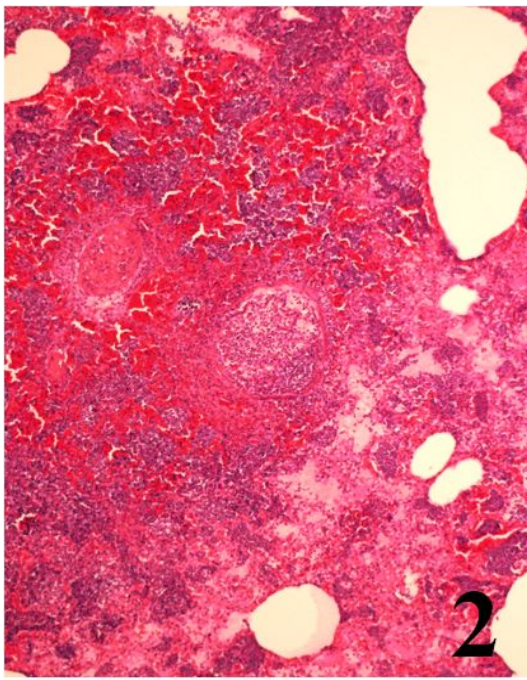
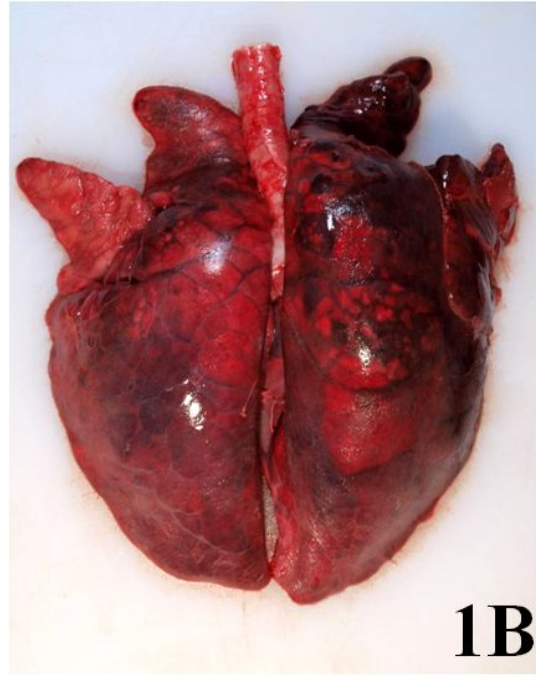
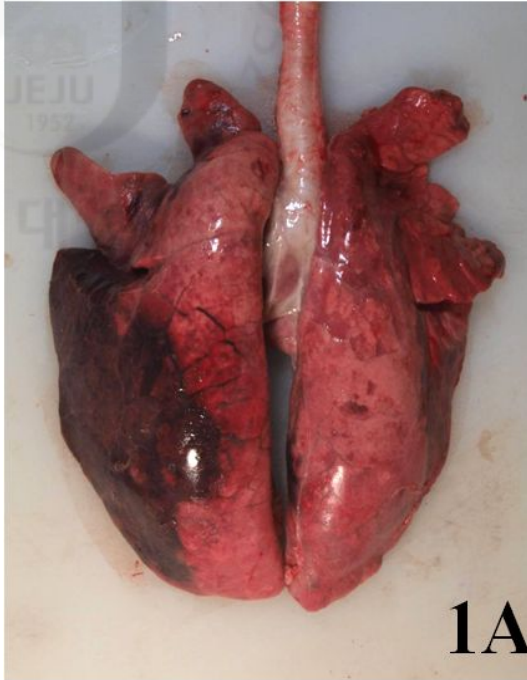
Figure 8. Severe multi-focal fibrosis around zonal necrosis and peri-bronchiolar area (insert) in chronic case. H&E, X100.

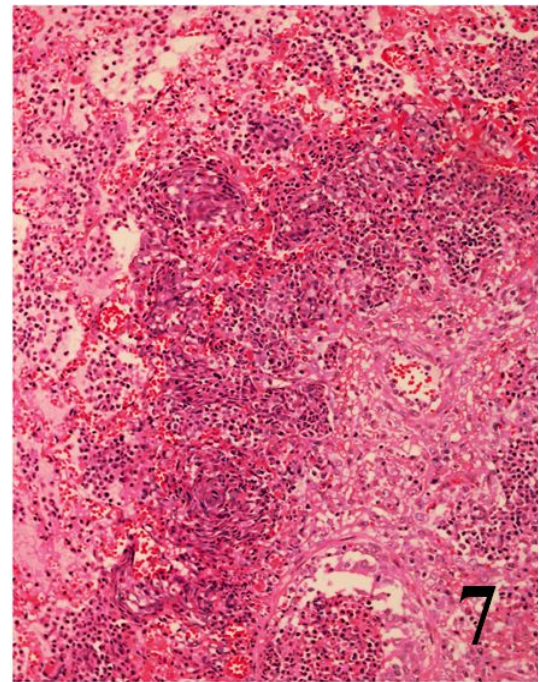
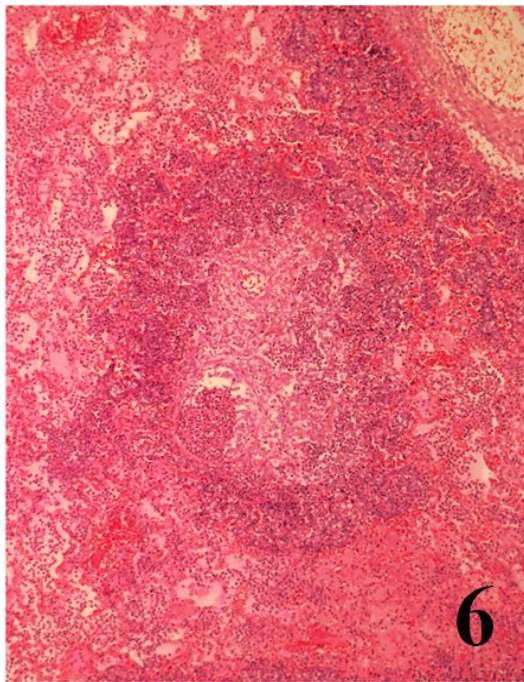
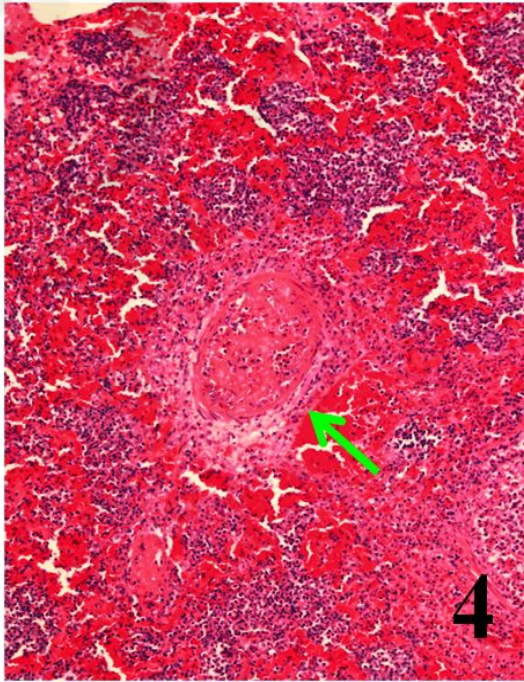
Figure 9. Note pleurisy characterized by dense fibrosis and neo-vascularization. H&E, X100.

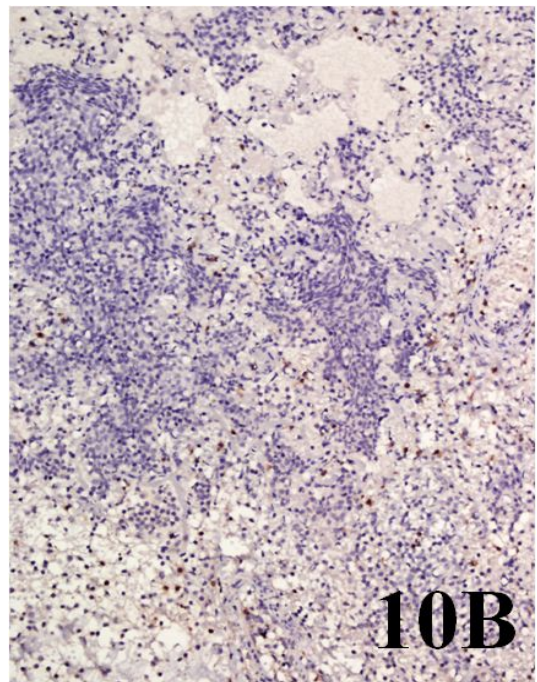
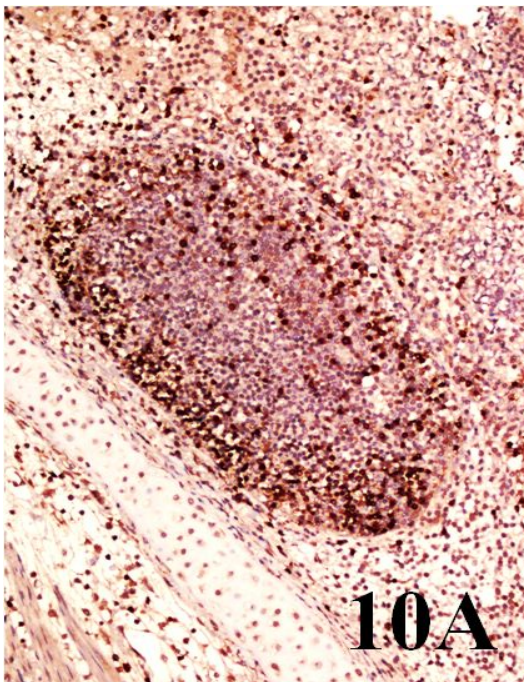
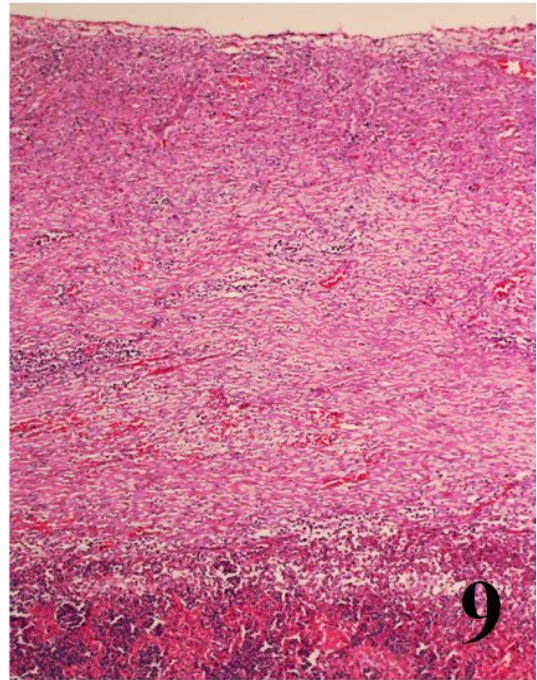
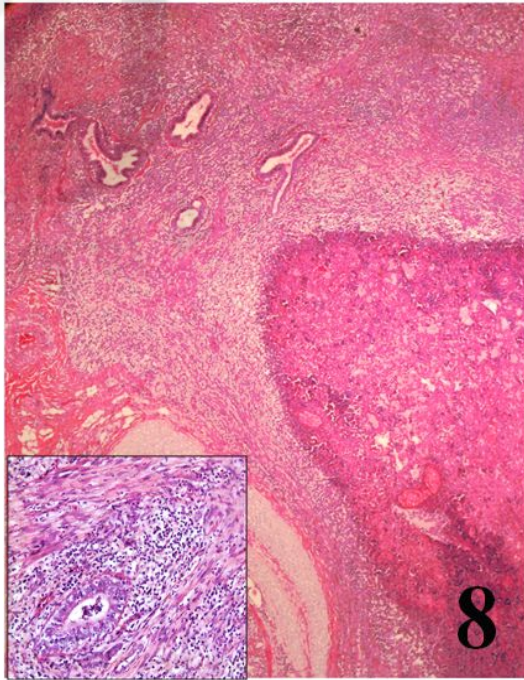
Figure 10. Note positive reaction in peri-bronchiolar lymphoid nodule (A) and negative reaction in oat cells (B) for CD3 antibody. IHC, X100.

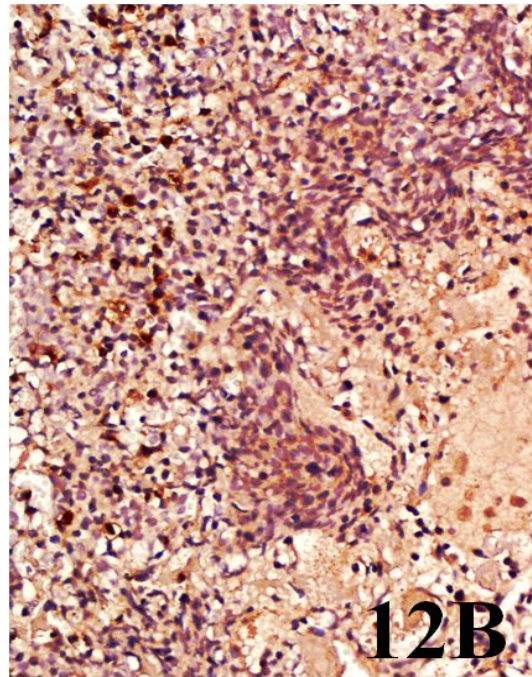
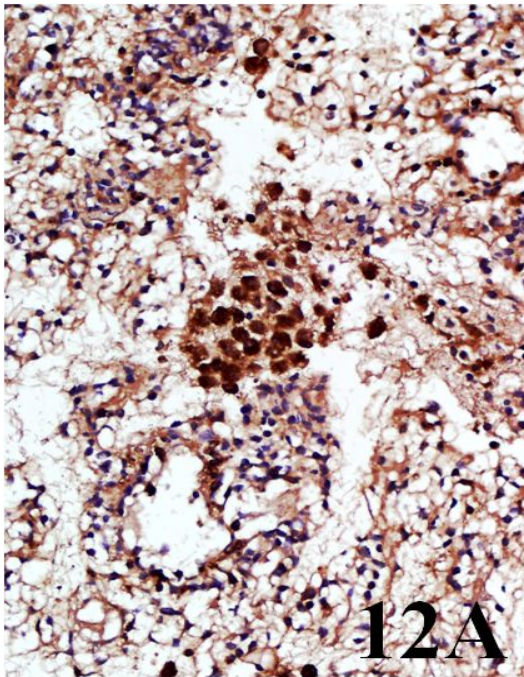
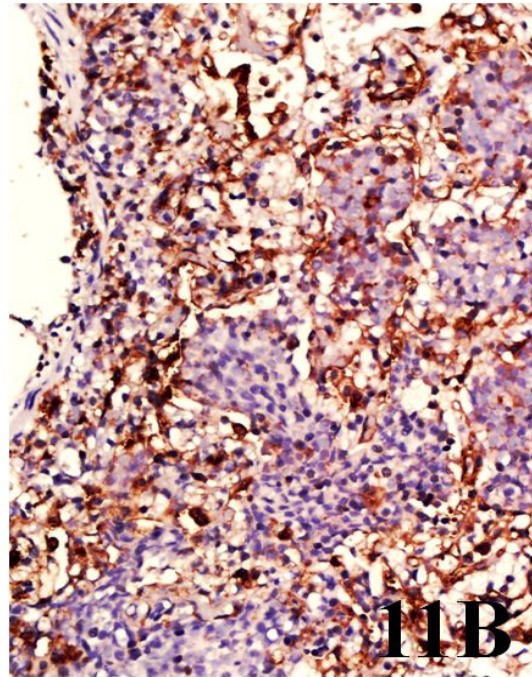
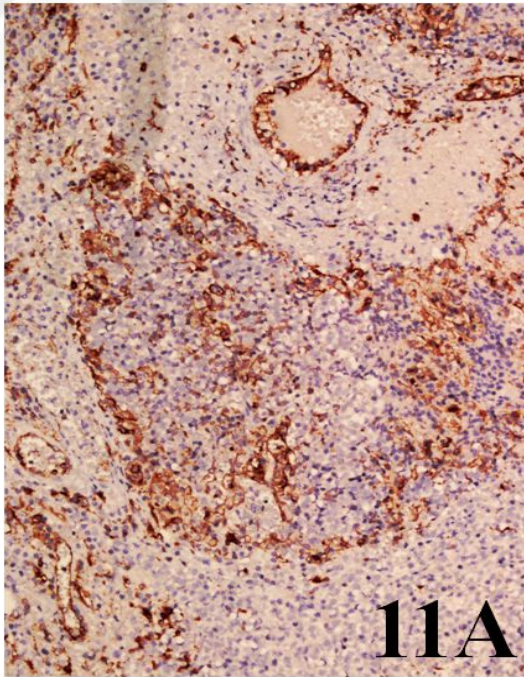
Figure 11. Note partial positive reactions in oat cells for MHC class II antibody. IHC, X200 (A) and X400 (B).

Figure 12. Note strong positive reactions in alveolar macrophages (A) and partial positivities in oat cells (B) for lysozyme antibody. IHC, X400.











## VI. 참고문헌

1. 김주아, 김승일, 우호춘, 임윤규, 배종희, 김희석, 이두식. 제주지역 돼지 폐렴 병소에서 분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 생물화학적 특성 및 혈청형에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 1998, **22**, 147-155.
2. 신동호, 변재원, 김하영, 김대근, 장원남, 문운경, 이오수, 정병열. 돼지 흉막폐렴균의 유행 혈청형과 biofilm 분포도. 한국수의공중보건학회지 2011, **35**, 7-12.
3. 예재길. Coagglutination 반응법에 의한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청형 조사. 한국임상수의학회지 1997, **14**, 37-41.
4. 이정희, 정중율, 전용수, 석호봉. Multiplex PCR 기법 및 면역확산법을 이용한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청형 분류에 관한 연구. 한국동물자원과학회지 1999, **41**, 387-396.
5. 정병열, 조길재, 김봉환, 조광현. 돼지 폐렴병소에서 분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 특성에 관한 연구. 대한수의학회지 1996, **36**, 181~186.
6. 정현규, 한정희. 돼지생식기호흡기증후군과 돼지 흉막폐렴의 복합감염에 따른 병리학적 연구. 한국수의병리학회지 2003, **7**, 27-41.
7. 정현규, 한정희, 김재훈. 돈사의 상대습도가 돼지흉막폐렴의 병인에 미치는 영향. 대한수의학회지 1996, **36**, 131-142.
8. Ajito T, Haga Y, Homma S, Goryo M, Okada K. Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. J Vet Med Sci 1996, **58**, 297-303.

9. **Angen Ø, Ahrens P, Jessing SG.** Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. *Vet Microbiol* 2008 **132**, 312–318.
10. **Asawa T, Kobayashi H, Mitani K, Ito N, Morozumi T.** Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from piglets with pleuropneumonia. *J Vet Med Sci* 1995, **57**, 757–759.
11. **Bélanger M, Dubreuil D, Harel J, Girard C, Jacques M.** Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect Immun* 1990, **58**, 3523–3530.
12. **Bille N, Larsen JL, Svendsen J, Nielsen NC.** Prewaning mortality in pigs. 6. Incidence and causes of pneumonia. *Nord Vet Med* 1975, **27**, 482–495.
13. **Frey, J.** Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* 1995, **3**, 257–261.
14. **Frey J, Nicolet J.** Purification and partial characterization of a hemolysin produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* type strain 4074. *FEMS Microbiol Lett* 1988, **55**, 41–45.
15. **Frey J, Nicolet J.** Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1990, **28**, 232–236.
16. **Gorden WAM.** The effect of housing on the degree and incidence of pneumonia in bacon pigs. *Br Vet J* 1963, **119**, 307 - 314.

17. **Gottschalk M, Taylor DJ.** *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (ed.). Diseases of swine. 9th ed. p.563-576, Blackwell Publishing, Ames, 2006.

18. **Gutiérrez-Martín CB, del Blanco NG, Blanco M, Navas J, Rodríguez-Ferri EF.** Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Vet Microbiol* 2006, **115**, 218-222.

19. **Inzana TJ, Ma J, Workman T, Gogolewski RP, Anderson P.** Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun* 1988, **56**, 1880-1889.

20. **Jessing SG, Angen Ø, Inzana TJ.** Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J Clin Microbiol* 2003, **41**, 4095-4100.

21. **Kamp EM, Popma JK, Anakotta J, Smits MA.** Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1991, **59**, 3079-3085.

22. **Kamp EM, Vermeulen TM, Smits MA, Haagsma J.** Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect Immun* 1994, **62**, 4063-4065.

23. **Liggett AD, Harrison LR, Farrell RL.** Sequential study of lesion development in experimental haemophilus pleuropneumonia. *Res Vet Sci* 1987,

42, 204-212.

24. **MacInnes JI, Rosendal S.** Prevention and control of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *Can Vet J* 1988, **29**, 572-574.

25. **Marsteller TA, Fenwick B.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. *Swine Health Prod* 1999, **7**, 161-165.

26. **Olander HJ.** A septicaemic disease of swine and its causative agent, *Haemophilus paraahaemolyticus*. Ph.D. Thesis, University of California, Davis, 1963.

27. **Pijpers A, Vernooij JACM. van Leegoed LAMG, Verheijden JHM.** Feed and water consumption in pigs following an *Actinobacillus pleuropneumoniae* challenge. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 1990, **11**, 39.


28. **Rycroft AN, Cullen JM.** Complement resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection of swine. *Am J Vet Res* 1990, **51**, 1449-1453.

29. **Schuchert JA, Inzana TJ, Angen Ø, Jessing S.** Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004, **42**, 4344-4348.

30. **Shope RE.** Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J Exp Med* 1964, **119**, 357-368.

31. **Songer JG, Post WJ.** *Veterinary Microbiology. Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease.* pp. 174-180, Elsevier Saunders, St. Louis, 2005.

32. Wilson PJ, Gloria F, Klashinsky S. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. Can Vet J 1987, **28**, 111-116.
33. Yang CY, Lin CN, Lin CF, Chang TC, Chiou MT. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and minimal inhibitory concentrations of *Actionbacillus pleuropneumoniae* isolated from slaughter pigs in Taiwan (2002-2007). J Vet Med Sci 2011, **73**, 205-208.
34. Zhou L, Jones SC, Angen Ø, Bossé JT, Nash JH, Frey J, Zhou R, Chen HC, Kroll JS, Rycroft AN, Langford PR. Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. J Clin Microbiol 2008, **46**, 800-803.



# Pathologic Studies for Porcine Pleuropneumonia in Jeju and Serotypes of the Agents

Ki-Seung Kim

(Supervised by professor Jae-Hoon Kim)

College of Veterinary Medicine

Graduate school, Jeju National University, Jeju, Korea

## Abstract

*Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae* is the etiological agent of a porcine pleuropneumonia and have great economic importance to the global swine industry. At present, 2 biobars and 15 different serotypes have been described. Early detection of disease and identification of the causative serotype are very important in controlling the spread of pleuropneumonia in pig herds and the initial proper treatment. In this study, we conducted to investigate the causative serotypes and pathologic studies for porcine pleuropneumonia in Jeju. From 2007 to 2011, a total of 50 pleuropneumonia cases of 24 pig farms were selected from pig lungs submitted to the College of Veterinary Medicine, Jeju National University using polymerase chain reaction (PCR) analysis. Collected lungs were fixed in 10% neutral phosphate-buffered formalin and processed for histological examination. To clarify the origin of oat cells, the characteristic cell in zonal necrosis of pleuropneumonia, immunohistochemistry using CD3, MHC class II and

lysozyme antibodies was applied in replicated lung sections. The serotype of *A. pleuropneumoniae* in lung lesions was analyzed by PCR methods. And the antimicrobial susceptibility of *A. pleuropneumoniae* isolates was determined by disc diffusion test. Grossly, unilateral distribution of hemorrhagic or necrotic pneumonic lesions was more common than bilateral distribution in lungs. In peracute or acute cases, histopathologic changes were characterized by necrosis, hemorrhage, neutrophils infiltration, vascular thrombosis, widespread edema and fibrinous exudates. Following the acute response, macrophage infiltration, marked fibrosis around zonal necrotic areas, and marked fibrous pleuritis were characteristic in chronic cases. Immunohistochemically, the oat cells were slightly positive to MHC class II and lysozyme. A total of 50 pleuropneumonia were associated with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 in 46 cases (92%), serotype 2 in 3 cases (6%), and both 2 and 5 in 1 case (2%). More than 90% of collected isolates showed high sensitivity to ceftiofur, amoxicillin, and colistin. However, ampicillin, penicillin, and tylosin showed low susceptibility. The results of this study demonstrated that *A. pleuropneumoniae* serotype 5 was the predominant isolates at the porcine pleuropneumonia in Jeju and the origin of oat cell was more closely associated with pulmonary macrophage than other inflammatory cells in lung.

---

Key words : *Actinobacillus pleuropneumonia*, antimicrobial susceptibility, immunohistochemistry, PCR, porcine pleuropneumonia, serotype