

도축돈의 마이코플라즈마성 폐렴에 관한 연구

1. 육안적 폐병변과 dot-ELISA에 의한 계절별 조사

임영택, 석호봉*

단국대학교 생명자원과학부 동물자원 전공
(게재승인 : 2002년 4월 24일)

Studies on the mycoplasmal pneumonia in slaughter pigs.

1. Seasonal detection by gross finding of lung lesion and dot-ELISA technique

Young-Taek Lim, Ho-Bong Seok*

Department of Animal Science, College of Life Sciences, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea

(Accepted : April 24, 2002)

Abstract : We report the seasonal prevalence of the mycoplasmal pneumoniae of swine (MPS) in slaughter pigs from July of 1999 to June of 2000. Gross finding of lung lesion observed and examined by dot-ELISA. In gross finding of lung lesion from 750 pig samples, 465 (62.0%) was MPS, and 129 (17.2%) was single or double infection with actinobacillosis and pasturellosis. However, 156 (20.8%) had no lesion. In seasonal detection, the prevalence was found to be winter (69.5%), autumn (63.5%), summer (60.0%) and spring (54.7%) in orderly frequency. In dot-ELISA, the result was showed the positive reaction ($x16 > \text{titre}$) with 58.0% and negative ($x4 < \text{titer}$) with 42.0% among a total of 1,710 pigs from 62 farms. In seasonal patterns by dot-ELISA, the prevalence was increased orderly in autumn (61.2%), winter (59.4%), spring (57.8%) and summer (54.4%). Accordingly, the new preventive strategies for MPS are necessary because the prevalence was relatively high especially in winter and autumn.

Key words : mycoplasmal pneumoniae, seasonal detection, slaughter pigs, gross lesion, dot-ELISA

서 론

돼지 마이코플라즈마성 폐렴(Mycoplasma pneumoniae of swine ; MPS)은 만성 호흡기성 유행성 폐렴 (Swine Enzootic Pneumoniae ; SEP)으로 *Mycoplasma hyopneumoniae*에 의해 감염되며 돼지에 발생하는 세균성 호흡기 질병 가운데 가장 많이 볼 수 있는 질병으로서 양돈 산업이 발달된 선진국가에서 35~50% 정도가 마이코플라즈마성 폐렴의 병변을 보이는 것으로 조사되었다.^{1,2}

*M. hyopneumoniae*에 감염되면 숙주인 돼지는 지속적인 마른기침, 성장지연, 사료효율 저하, 면역억제 등의

특징을 나타내고 높은 발병률과 전이율을 나타내나 폐사율은 매우 낮으며, 모든 연령에 걸쳐 발병을 보이며, 2차 감염에 대한 감수성을 증가시켜 다른 세균이나 바이러스와의 복합감염의 형태를 나타낸다.²

*M. hyopneumoniae*는 독자적으로 성장과 증식을 할 수 있는 가장 작은 세균으로 크기는 약 $0.2\mu\text{m} \sim 0.5\mu\text{m}$, genome의 크기는 600~1,350 kbp이며 G+C의 염기 함유 비율이 23~40%로 낮으며, 종 특이성이 높고, 성장속도가 매우 느려 균의 분리동정 및 취급이 매우 까다로운 것으로 알려져 있다.^{3,4}

*M. hyopneumoniae*의 감염경로는 감염돈에 의한 공기

이 연구는 2000학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

* Corresponding author : Dr. Ho-Bong Seok, Department of Animal Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
Phone : +82-41-550-3654, Fax : +82-41-553-1618 (E-mail : hobong@dankook.ac.kr)

전과나, 동거에 따른 접촉감염으로 모든 감염시 자돈에게 쉽게 감염되고⁵, 감염된 이유자돈이 농장에 새로 들어와 기존 농장을 감염시키는 경우가 전체 감염의 80% 정도를 차지하는 것으로 보고되었다.¹⁶

*M. hyopneumoniae*는 호흡기도를 통하여 들어와 10~14일의 잠복기를 거쳐 주로 기관지와 세기관지 상피세포 표면 위 점막에 유착되어 만성폐렴을 유발한다.¹ 점막에 유착 후 감염이 점차 증가되면 2차 세균 즉 *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Actinomyces pyogenes* 등이 감염된다.

마이코플라스마성폐렴의 진단방법으로는 도축한 사체인 경우 폐병변에서의 육안적 진단 및 조직을 이용한 진단과 생체인 경우 혈청학적 진단, PCR법으로 가능하다. 마이코플라스마성 폐렴에 감염된 경우, 폐의 심엽과 침엽의 끝부분에 자주색의 특징적인 병변 부위를 쉽게 관찰 할 수 있다. 조직을 이용한 대표적인 진단법으로는 immunofluorescent antibody assay가 있는데, 이는 폐조직에서 *M. hyopneumoniae*를 직접검출 할 수 있는 신뢰성 있는 진단방법이나 만성으로 진행되는 경우 민감도가 떨어지는 단점이 있다.^{7,8} 혈청학적 진단방법으로는 CF, indirect hemagglutination, ELISA방법 이 사용되고 있다. 전자의 두 방법은 *M. flocculare*와 *M. hyorhinis*와의 교차반응과 만성 진행 시 정확한 진단을 내리는데 어려움이 있다.^{9,10,11} 이러한 문제를 해결하고자 SDS, tween-20을 이용하여 추출한 항원을 사용한 ELISA기법이 사용되었으며, 최근들어 단크론 항체를 이용한 blocking ELISA기법도 사용되고 있다.^{12,13} Dot-ELISA법은 sample수가 많을 때 간단하고 신뢰성이 높으며 speedy 하게 screening 할 수 있는 최상의 혈청학적 진단방법으로 알려져 있다.^{14,15,16}

따라서 도축돈의 폐장과 혈청재료에서 육안적 진단과 dot-ELISA기법에 의한 MPS의 계절별 피해상황을 조사함으로써 일반육성돈의 MPS의 년중 피해 pattern과 MPS폐장의 특이병변의 정도를 파악하고 자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 *Mycoplasma hyopneumoniae* Vpp11(ATCC 25617)로서 미국 Minnesota대학으로부터 구입하였다. 균주의 배양은 Friis medium을 사용하여 37℃, 5% CO₂조건 하에서 2주간 배양하였다.

사용배지

Friis medium¹⁷을 사용하였으며 제조방법은 Brain Heart

Infusion (Difco, USA)에 HBSS (Hank's balanced salt solution, Gibco, USA) 35%, yeast extract solution (Gibco) 0.2%, 16% lactalbumin hydrolysate (Gibco) 0.2%를 첨가한 후, 55℃에서 불활화시킨 porcine serum (Sigma, USA)과 horse serum (Sigma)을 10%씩 첨가하였다. 항생제로는 penicillin G (Sigma) 1,000U/ml와 thallium acetate (Sigma) 0.2g/ml을 첨가하였으며, indicator로 0.5% phenol red (Gibco) 0.05%를 첨가하였다. 혈청과 항생제는 여과하여 사용하였고 조성된 배지는 여과 멸균하여 5℃ 냉장고에 보관하였다.

가검재료 채취 및 육안적 조사

1999년 8월부터 2000년 7월까지 충남지방 도축장을 대상으로 계절별로 구분하여 750두의 폐와 1710두의 혈액을 채취하여 마이코플라스마성 폐렴의 감염상태를 조사하였다. 폐에 대한 감염상태의 조사는 도살 직후 육안적 검사를 실시하였으며, Straw등¹⁸과 Morrison 등¹⁹의 방법에 따라 lung lesion score를 백분율로 표시하였다. Pneumonia scores는 Straw등의 방법으로 lung lobe score를 1-10%, 11-25%, 26-50%로 도축돈 검사법에 준하여 육안적으로 판정하였다. 혈액은 도축돈의 경정맥을 절단한 후, 시험관을 이용하여 채취하였으며, 수집된 혈액은 실험실로 옮겨와 5℃에서 6시간 안정 후, 3000rpm으로 원심분리하여 상청액만을 회수하여 -60℃에서 보관하며 사용하였다.

혈청학적 조사

항원 제조 도축돈의 혈액검사에 사용할 *M. hyopneumoniae* 항원제조는 Nicolet 등¹²의 방법을 수정·보완하여 실시하였으며, 과정은 다음과 같다. *M. hyopneumoniae* 배양액을 20,000rpm으로 4℃에서 30분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 3회 원심세척 후 실온에서 30분간 건조하였다. 건조된 균체에 멸균 0.15M PBS (0.02M phosphate buffer, 0.13M NaCl, pH 7.2)를 첨가하여 재부유시킨 후, 세포 단백질의 농도를 측정하였다. 단백질 농도 측정은 Robert 등²⁰의 방법에 의거하여 실시하였으며, 농도 측정 후, 2%(v/v) tween-20이 첨가된 멸균 0.15M PBS를 이용하여 세포 단백질의 농도가 2mg/ml의 수준이 되도록 희석하였다. 이를 항온수조에서 37℃, 150rpm의 조건으로 30분간 처리한 후, 3000rpm으로 4℃에서 30분간 원심분리하여 상청액만을 취하였다. 상청액은 pore size 0.2μm membrane filter로 여과한 후, 상기와 동일한 방법으로 단백질 농도를 측정한 뒤 -60℃에 보관하며 사용하였다.

Dot-ELISA

혈액내 항체는 Dot-ELISA를 이용하여 조사하였으며, Mariano 등²¹의 방법을 수정·보완하여 실시하였다. 본 시험 전에 적정 항원농도와 적정 conjugate희석량을 checkerboard titration방법으로 측정하였다. 우선 여과지(Watman No.2)와 nitrocellulose membrane (pore size 0.45 μ m, Gibco)를 증류수에 충분히 적신 후 Blot-Apparatus기(Millipore Co., USA)와 함께 조립하였다. Tween-20 용해 항원을 0.5 μ g/ml이 되도록 carbonate bicarbonate buffer (pH9.6)로 희석한 후, nitrocellulose membrane에 피복된 plate의 각 well에 100 μ l씩 분주하여 실온에서 30분간 피복 하였다. TBS-T (0.2M tris buffered saline, pH 7.2 containing 0.05% tween20)를 이용하여 3회 세척하고, 3% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma)가 첨가된 TBS (0.2M tris buffered saline, pH 7.2)를 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 정치하였다. 세척 후 1% BSA를 첨가한 TBS용액을 이용하여 도축돈의 혈청을 4배, 16배, 64배, 256배의 4배수로 희석하여 각각 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 45분간 반응시켰다. 재 세척한 후 TBS용액을 이용하여 2차 항체인 horse radish peroxidase-conjugated anti-swine IgG (Kappel Co., USA)를 4,000배 희석하여 100 μ l씩 37 $^{\circ}$ C에서 45분간 반응하였다. 기질용액으로 0.03% 4-chloro-1-naphthol을 함유한 methanol을 사용하였

고, 1% 과산화 수소를 사용하여 20분간 반응한 후, 멸균 증류수를 이용하여 5분간 세척하고 가시화된 dot의 특이반응을 각 희석농도별로 비교하였다. 16배 이상에서 dot양성반응으로 판정하였다.

결 과

육안적 계절별 감염 조사.

1999년 8월부터 2000년 7월까지 충남지방 도축돈을 대상으로 계절별 마이코플라스마성 폐렴의 육안적 감염 정도를 조사한 결과, 전체 750두 가운데 465두 (62.0%)가 마이코플라스마성 폐렴에 감염된 것으로 조사되었으며, 156두 (20.8%)만이 어떠한 폐렴에도 감염되지 않은 것으로 나타났으며, 나머지 129두 (17.2%)의 경우 흉막 폐렴 및 마이코플라스마성 폐렴과의 혼합감염 등 다른 원인에 의한 폐렴증상을 보였다. 계절별 마이코플라스마성 폐렴의 감염 정도를 보면, 여름 150두 중 90두 (60%), 가을 200두 중 127두(63.5%), 겨울 200두 중 139두 (69.5%), 봄 200두 중 109두 (54.5%)로 계절간의 차이는 보이질 않았으나, 가을과 겨울철에 감염비율이 약간 높은 것으로 조사되었다(Table 1).

마이코플라스마성 폐렴에 감염된 조직을 gross lung lesion score를 1-11%, 11-25%, 26-50%로 세분하여 본 결

Table 1. Prevalence of mycoplasmal pneumoniae (MP) by gross lung lesion in slaughter pigs

Season	No. of collected	No. of MP positive(%)	Others* (%)	No. of no lesion(%)
Summer	150	90 (60.0)	34 (22.7)	26 (17.3)
Autumn	200	127 (63.5)	30 (15.0)	43 (21.5)
Winter	200	139 (69.5)	23 (11.5)	38 (19.0)
Spring	200	109 (54.5)	42 (21.0)	49 (24.5)
Total	750	465 (62.0)	129 (17.2)	156 (20.8)

* Others were shown in primary or secondary infective lesions with actinobacillosis and pasteurellosis by the gross finding detection.

Table 2. Seasonal prevalence of mycoplasmal pneumoniae (MP) by gross lung lesion score in cases.

Season	No. of MP positive	No. of lung damage(%)		
		26-50%	11-25%	1-10%
Summer	90	11 (12.2)	22 (24.4)	57 (63.4)
Autumn	127	13 (10.2)	27 (21.3)	87 (68.5)
Winter	139	12 (8.7)	33 (23.7)	94 (67.6)
Spring	109	10 (9.2)	27 (24.8)	72 (66.0)
Total	465	46 (9.9)	109 (23.4)	310 (66.7)

과 육안적 감염소견을 보이는 전체 465두 중 1-10%가 360두(66.7%), 11-25%가 109두(23.4%), 26-50%가 46두(9.9%)로서 lesion score가 낮은 경향이 많았다. 감염정도가 심한 26-50%의 높은 lesion score가 여름과 가을에 개체별로 분포되었으나 큰차이는 없었다(Table 2).

Dot-ELISA법을 이용한 계절별 감염 조사

1999년 8월부터 2000년 7월까지 충남지방 도축돈의 혈액을 채취하여, dot-ELISA 기법을 사용하여 마이코플라스마성 폐렴의 감염정도를 계절별로 조사하였다. 혈청회석율 4배, 16배, 64배, 256배의 4배수로 회석하여 16배 이상에서 dot 양성반응으로 처리하였다. 전체 1,710개의 샘플 중 992개 (58.0%)가 마이코플라스마성 폐렴에 양성반응을 보였으며, 718개 (42.0%)가 음성을 나타냈다. 양성반응을 계절별로 보면, 여름 530개 중 288개 (54.3%), 가을 393개 중 244개 (62.1%), 겨울 395개 중 234개 (59.2%), 봄 392개 중 226두 (57.7%)로 가을과 겨울철이 다소 높은 것으로 조사되었다(Table 3).

16배이상 혈청회석에 의한 양성반응돈 992두 중 16배에서 749두(75.5%), 64배에서 236두(23.8%), 256배에서 7두(0.7%)를 각각 나타내었고, 계절별 256배의 높은 titer

는 육안적 lung lesions score가 26-50%인 경우와 같이 가을과 여름이 겨울과 봄에 비하여 상대적으로 높은 것으로 나타났다.

고 찰

돼지 마이코플라스마성 폐렴은 체중저하, 성장지연, 출하기간 연장 등 경제성 질병으로 알려져 있고 돼지 복합성 호흡기질환의 1차 원인균으로 매우 중요한 전염병이다. 과거 국내에서 여러 학자에 의하여 병인과 병리적소견, 진단방법 등을 보고하였으나 세균자체의 분리방법이 까다로워 지속적인 질병 파악을 못하고 있었다. MPS의 감염정도를 충남지방 도축돈을 대상으로 조사한 결과, 육안적 진단의 경우 전체의 62.0%, 혈청학적 조사는 전체의 58.0%가 마이코플라스마성 폐렴에 양성반응을 보였다. 이는 조 등 (1999)²²이 보고한 영남지방의 감염율과도 유사한 성적을 얻었다. Dot-ELISA방법은 특히 항체 추적 및 확인목적의 immunoblotting(Western blot)을 ELISA와 병행한 방법으로 mycoplasma균은 물론 다른 세균과 바이러스 등에 널리 이용되며, 시술 시 적정항원과 conjugate량만 결정된다면 많은 samples수를 speedy하게 처리할 수 있고 신뢰도가 높고 비교적 간단한 진단

Table 3. Prevalence of mycoplasmal pneumoniae (MP) by dot-ELISA using serum of slaughter pigs

Season	No. of collected	No. of MP positive(%)	No. of negative(%)**
Summer	530	288 (54.3)	242 (45.7)
Autumn	393	244 (62.1)	149 (37.9)
Winter	395	234 (59.2)	161 (40.8)
Spring	392	226 (57.7)	166 (42.3)
Total	1,710 [†]	992 (58.0)	718 (42.0)

* Slaughter pigs were come from 62 piggery farms.

** The lower serum titer (1:4<) by dot-blot.

Table 4. Seasonal prevalence of mycoplasmal pneumoniae (MP) by dot-ELISA in positive sera (titer:x16>)

Season	No. of MP positive(%)	No. of positive(%) [†]		
		x256	x64	x16
Summer	288	2 (0.7)	82 (28.5)	204 (70.8)
Autumn	244	3 (1.2)	55 (22.5)	186 (76.2)
Winter	234	1 (0.4)	51 (21.8)	182 (77.8)
Spring	226	1 (0.5)	48 (21.2)	177 (78.3)
Total	992	7 (0.7)	236 (23.8)	749 (75.5)

* Titers are expressed as reciprocal of the serum dilution

법으로 알려져 있다.^{14,15,16} 특히 양돈장 단위로 일부돼지의 소량의 혈액sample로 MPS감염유무를 파악함으로써 피해를 조기에 차단할 수 있으리라 본다.⁵ 계절별로는 가을과 겨울에 감염율이 다소 높은 것으로 조사되었는데, 이러한 계절별 차이는 마이코플라스마성 폐렴의 전파가 공기나 직접 접촉을 통해 이루어지기 때문에^{2,18} 주변의 환경조건 및 사양관리로부터 커다란 영향을 받기 때문으로 보아진다. 국내의 경우 가을과 겨울철에 기온의 급변, 일교차의 변화와 돈사 내 환기 불량, 사육밀도 증가, 암모니아가스 증가, 먼지 증가 등의 문제로 이 시기가 타 계절보다 높은 감염율을 보이는 것으로 생각된다. 여름과 가을이 MPS소견의 폐장병변 정도나 혈청학적 titer가 비교적 높은 이유는 알 수 없으나 2차감염, 미생물증식 조건, 스트레스등 내외부의 영향이 있을 것으로 추측된다.

본 실험은 충남지방 도축돈을 대상으로 마이코플라스마성 폐렴의 감염을 육안적 방법과 dot-ELISA를 이용한 혈청학적 방법으로 계절별 감염율과 감염정도를 조사하였다. 1999년 8월부터 2000년 7월까지 충남지방 도축돈 750두의 폐를 조사한 결과, 465두(62.0%)가 마이코플라스마성 폐렴에 감염되었으며, 129두(17.2%)는 다른 원인으로 인한 폐렴증상을 보였으며, 156두(20.8%)는 폐렴병소가 없었다. Dot-ELISA법으로 도축돈 혈액 1,710두를 조사한 결과 992(58.0%)두가 마이코플라스마성 폐렴에 16배 이상의 양성반응을 보였고, 718두(42.0%)는 음성을 나타내었다. 마이코플라스마성 폐렴의 계절별 감염 pattern은 가을과 겨울철이 여름과 봄에 비하여 다소 높았고 감염정도는 여름과 가을이 높았다.

참고 문헌

- Ross RF. Mycoplasmal disease. In:Leman AD, Straw BE, Mengeling et al ; *Diseases of Swine*, 7th ed. Ames, Iowa : *Iowa State University Press*, 537-551, 1992.
- Maes D, Verdonck M, Deluyker H et al. Enzootic pneumoniae in pigs. *Vet. Q.* 18, 104-109, 1996.
- Weisburg WG, Tully JG, Rose DL et al. A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas : Basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171, 6455-6467, 1989.
- Tully JG, Bove JM, Laigret F et al. Revised taxonomy of the class ordinal rank(Entomoplasmatales, ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology from helical species, and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 378-385, 1993.
- Seok HB, Joo HS. Investigation of seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection and establishment of on-farm eradication protocol. *Kor. J. Vet. Res* 39(6): 1218-1223, 1999.
- Pullar EM. Infectious pneumoniae of pigs. General description, differential diagnosis and epidemiology. *Aust. Vet. J.* 24, 320-330, 1948.
- Livingston CW Jr, Stair EL, Underdahl NR et al. Pathogenesis of mycoplasmal pneumoniae in swine. *Am.J.Vet.Res.* 33:2249-2258, 1972
- Amanfu W, Weng CN, Ross RF at al. Diagnosis of mycoplasmal pneumoniae of swine : Sequential study by direct immunofluorence. *Am. J. Vet. Res.* 45, 1349-1352, 1984.
- Amstrong CH, Freeman MJ, Sands-Freeman L et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemmagglutination nad complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* 47, 464-470, 1983.
- Ross RF, Whittlestone P. Recovery, identification of, and serological response to porcine mycoplasmas. In: Tully JG, Razin S *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. 2. New York: *Academic Press*, 1983.
- Piffer IA, Ross RF. Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 45, 478-481 1984.
- Nicolet J, Paroz P, Bruggmann S. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* 29, 305-309, 1980.
- Le Potier MF, Abiven P, Kobisch M. A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Ann. Rech. Vet.* 23, 239-247, 1994.
- Kotani H, Huang H, McGarrity GJ. Identification and isolation of mycoplasmas by immunobinding. *Israel. J. of Med.* 23:752-758, 1987
- Charles SD, Sreevatsan S, Bey RF et al. A dot immunobinding assay(dot-ELISA)for the rapid serodiagnosis of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:310-314,1996
- Afshar A, Wright PF, Dulac GC. Dot-enzyme immunoassay for visual detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *J of Clinical Microbiol.* 23(3):563-567, 1986

17. Friis NF, Kobisch M. Swine mycoplasmoses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15(4), 1569-1605, 1996.
18. Straw BE, Backstrom L, Leman AD. Examination of swine at slaughter. Part II. Finding at slaughter and their significance. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 8:S106-S112, 1986.
19. Morrison PB, Pijoan C, Hilley HD. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can. J. Comp. Med.* 49, 129-137, 1985.
20. Robert EA, Rocky ST. Ultrafast protein determinations using microwave enhancement. *Molecular Biotechnology. Humana Press. Inc.* 17-24, 1995.
21. Mariano Z, Charles LJ. Routine dot-blot assay of multiple serum samples using a simple apparatus. *J. Immunological Methods.* 101, 261-264, 1987.
22. 조광현, 최정수, 김봉환. 영남지방 도축돈의 *Mycoplasma* 페렴조사 및 분리균에 대한 약제 감수성. *대한수의학회지.* 39(1), 96-103, 1999.