

## 도축돈의 폐병변에서 *Streptococcus suis* 1 (+14)형, 2 (+1/2)형, 7형 그리고 9형의 Multiplex PCR을 통한 검출

구경민, 임재향, 고흥범<sup>\*</sup>  
전남대학교 동물의학연구소  
(게재승인 : 2002년 12월 2일)

### The detection of *Streptococcus suis* serotype 1 (+14), 2 (+1/2), 7 and 9 from pneumonic lungs in slaughtered pigs by a multiplex PCR

Kyung-Min Koo, Jae-Hyang Lim and Hong-Bum Koh<sup>\*</sup>

Research Institute of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Accepted : December 2, 2002)

**Abstracts :** *Streptococcus suis* is an important swine pathogen in nearly all countries with an extensive pig industry. It is associated with meningitis, arthritis, endocarditis, septicaemia, bronchopneumonia and sudden death. Attempts to control the disease are still hampered the lack of effective vaccines and sensitive diagnostic tools. A PCR method which can be used for the detection of virulent strains of serotype 2, which is most prevalent serotype, and serotype 1 was developed. However, serotype 1, 2, 7 and 9 strains are frequently isolated from diseased pigs. In European countries, *S suis* serotype 2 is the most prevalent type isolated from diseased pigs, followed by serotype 9 and 1. In Japan, capsular serotype 2 was also the most prevalent serotype, followed by capsular serotype 7. Most of *S suis* isolated from diseased pigs belong to a limited number of capsular serotype, often those between 1 and 9.

We investigated the distribution of *S suis* serotype 1, 2, 7 and 9 from 740 pig lungs at abattoir in Jeolla and Chungcheong by rapid multiplex PCR assay. Fifty of 740 lung samples, 6.8%, were *S suis* positive and identified *S suis* were divided by 38% (19/50) in serotype 2, 2% (1/50) in serotype 7 and 4% (2/50) in serotype 9. The distribution of *S suis* serotype in Korea was similar to other countries. Moreover, the multiplex PCR assay may be an useful diagnostic tool for the detection of pigs carrying serotype 1, 2, 7, 1/2, 9 and 14 strains in epidemiological and transmission studies and facilitate control and eradication programs.

**Key words :** *Streptococcus suis*, Serotype, Multiplex PCR

## 서 론

우리나라 양돈산업의 사육형태가 점차 집단다두화 및 밀집화 사육으로 변화해 가고 있는 시점에 다른 질병보다 발생빈도가 높고 전파속도가 빠른 호흡기질환의 발생이 심각한 문제로 대두되고 있다. 돼지의 호흡기질환

은 급성 발병에 의한 폐사돈으로 인한 피해도 크지만, 만성호흡기질환에 의한 위축돈과 증체율 감소, 출하일령 지연 등에 의한 경제적 피해가 더욱 심각하며, mycoplasma성 폐렴이 만연되어있는 우리나라 양돈 산업의 현실을 감안할 때, 돼지호흡기질환복합증 (porcine respiratory disease complex; PRDC)과 관련하여 최근

\* Corresponding author: Hong-Bum Koh

Research Institute of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Yongbong-dong, Puk-gu, 500-757, Korea  
E-mail : hbkoh@chonnam.ac.kr

*Streptococcus suis* 감염의 역할이 주목되고 있다.

*S. suis*는 혈액천천배지 상에서  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -용혈을 일으키는 Gram 양성균의 구균으로 돼지의 경우 뇌막염, 패혈증, 폐렴, 심내막염, 질염, 그리고 유산 등을 유발하는 병원체<sup>1</sup>로서, 우리나라를 위시하여 전 세계적으로 분리되고 있다.<sup>2-7</sup> 특히 *S. suis*는 숙주범위가 넓어 돼지 뿐만 아니라 반추수, 말, 개, 고양이 등의 다양한 숙주에 감염되고 있으며,<sup>8-11</sup> 상처를 통해 도축업자, 양돈장 인부, 정육점 직원, 수의사 등 양돈관련업무 종사자들에게 감염을 일으켜 뇌막염, 패혈증, 심내막염 등을 일으킨 예가 보고되고 있는 인수공통병원체이다.<sup>12-14</sup> 1987년 Kilpper-Balz와 Schleifer<sup>15</sup>에 의해 처음으로 새로운 균주로 공식화된 *S. suis*는 네덜란드에서 Jansen과 Van Dorssen<sup>16</sup> 그리고 영국에서 Field *et al*<sup>17</sup>이 최초로 보고하였다. 이후 de Moor가 패혈증 소견의 환돈에서 분리한  $\alpha$ -용혈성 연쇄상구균이 이전까지 알려진 연쇄상구균의 Lancefield group A~Q와는 상이한 단수화물로 세포벽이 구성되어 있어 이들 분리균을 Lancefield group S, R, SR, T로 분류하였다. 그러나 Elliot<sup>18</sup>은 de Moor가 분류한 group S와 자신이 분리한 PM 연쇄상구균의 세포벽의 구성성분인 lipoteichoic acid가 유사함에 근거하여 이들을 Lancefield group D로 재분류하였으며, 이 균을 *S. suis* 1형으로 명칭하였고, Windsor와 Elliot<sup>19</sup>은 de Moor의 R 균을 *S. suis* 2형으로 분류하였다. 원래 de Moor가 분류한 RS 균에 속하던 연쇄상구균은 1형과 2형의 항혈청 모두에 반응하므로 1/2형으로 분류되었다. 1983년부터 1995년 사이에 Perch *et al*<sup>20</sup>과 Higgins *et al*<sup>21</sup>에 의해 32종의 새로운 혈청형이 분류되어 지금까지 혈청형 1~34 그리고 1/2을 합하여 총 35종의 혈청형이 알려졌다. 주요 혈청형은 de Moor의 T군과 Clifton-Hardley *et al*<sup>22</sup>과 Gottschalk *et al*<sup>23</sup>에 의해서 편도, 질 그리고 포피에서 분리된 연쇄상구균을 15형으로 분류하였다. 14형은 사람으로부터 분리되었고, 17형, 18형, 19형 그리고 21형은 임상적으로 건강한 돼지로부터 분리되었으며, 20형과 30형은 송아지로부터 그리고 33형은 양으로부터 분리되었다.<sup>21,23</sup> 각국의 *S. suis*의 혈청형 보고를 살펴보면 1형부터 9형까지가 전체의 약 75%를 차지할 정도로 높은 분포를 보이고 있고, 7형, 9형 그리고 4형이 가장 많이 분포되어 있는 스칸디나비아<sup>20</sup>와 호주<sup>24</sup> 및 인도<sup>25</sup>를 제외하면 대부분의 나라에서는 뇌막염과 폐렴 등에 이환된 돼지로부터 2형이 가장 많이 분리되고 있다. 이들 분리된 2형은 임상병리학적으로 14형과 매우 유사한 특성을 가지고 있다.<sup>26</sup>

*S. suis*는 자돈의 뇌막염과 관절염의 원발성 원인체로

잘 알려져 왔고, 근래에 와서 호흡기 질환의 원인체중 하나로 그 중요성이 부각되고 있다. Hommez *et al*<sup>27</sup>은 *S. suis* 감염이 돼지의 호흡기 질환에서 더 많은 문제를 일으킨다고 하였다. 또한 많은 연구자들은 돼지의 폐렴병변으로부터 분리한 *S. suis*는 주로 2형으로 보고하였다.<sup>28-30</sup> 감염은 주로 건강보균돈이 돈군내의 주전파원으로 접촉과 호흡기 경로 등으로 균을 전파시키고,<sup>31</sup> 모돈에 의한 자돈의 감염<sup>32</sup>과 쥐나 파리 등의 다른 감수성 매개체에 의해서도 전파될 수 있는데, 특히 파리는 *S. suis* 2형을 5일 동안 전파시킬 수 있다고 알려져 있다.<sup>33</sup> 그외에 밀집다우사육, 환기불량, 추위 스트레스 등의 요인에 의해서 발생은 증가한다. 이 질병의 발병기전에 대한 가장 설득력 있는 가설로는 *S. suis*가 돼지의 편도나 비강에 침입하여 발병없이 상재균으로 존재하다가, 호흡기 세균이나 porcine reproductive respiratory syndrome virus (PRRSV), 암모니아 가스 등에 의해 유발된 비강 내 염증반응으로 모여든 단핵구나 대식세포에 탐식된 후 이들 탐식세포에서 살아남은 *S. suis*가 혈류를 따라 여러 장기로 전이하여 다양한 증상과 병변을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>34</sup>

*S. suis*의 병원성 인자로는 균체벽에 부착된 136 kDa의 muramidase released protein (MRP)과 균체밖으로 유리되는 110 kDa의 extracellular factor (EF), hemolysin (sulysin), capsule, fimbriae, hemagglutinin 등이 알려져 있다.<sup>35-40</sup> 특히 Vecht *et al*<sup>36</sup>은 *S. suis* 2형 중에서 MRP와 EF를 산생하는 균주 (MRP+, EF+)는 환돈에서 많이 분리되며 대식세포와 단핵구의 탐식에 저항하여 병원성도 강한 반면, MRP와 EF를 산생하지 않는 균주 (MRP-, EF-)는 건강돈에서 많이 분리되며 병원성도 약하여 좋은 병원성 지표라고 주장하였다. 한편 병원성 균주와 비병원성 균주를 구분하기 위하여 DNA fingerprinting,<sup>41</sup> ribotyping,<sup>42</sup> multilocus enzyme electrophoresis<sup>43</sup> 등도 이용되고 있다. ELISA<sup>44,45</sup>를 이용한 혈청형 동정이나 항체가 측정 등이 보고되어 있으나 모든 혈청형에 적용할 수 없다는 단점이 있다. 혈청형 동정에는 slide agglutination test,<sup>27</sup> immunodiffusion test<sup>46</sup> 그리고 coagglutination reagent<sup>47</sup>를 이용하기도 하나 35종의 많은 혈청형이 밝혀져 있을 뿐 아니라, 기존의 항혈청에 반응하지 않는 균들도 많아 혈청형 동정에는 한계가 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 양돈산업에서 돼지 폐렴의 주요 병원체인 *S. suis*의 감염상태를 파악하고, 전세계적으로 널리 분포되어 있으며 환돈으로부터 많이 분리되는 *S. suis* 1(+14)형, 2(+1/2)형, 7형 그리고 9형을 동시에 진단할 수 있는 multiplex PCR을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

1999년 9월부터 10월까지 2개월 동안 전라도와 충청도 지역의 74개 농장으로부터 출하된 740두의 돼지 폐를 실험 재료로 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 가. 재료채취

도축된 돼지의 폐에서 육안적으로 폐렴병변이 보이는 부분을 무균적으로 채취하여 실험실로 옮긴 다음 폐 표면을 알콜램프로 가열한 압설자로 소락 멸균하였다. 멸균된 부위를 외과도로 깊이 자른 후 멸균된 백금이를 이용하여 채취한 후 이 재료를 5% 면양혈액이 첨가된 혈액배지 및 Carter 방법<sup>48</sup>을 변형하여 제조한 ISOVitalax<sup>TM</sup> (BBL<sup>TM</sup>, USA) 첨가배지에 접종하였다.

#### 나. 연쇄상구균 분리

균분리에 사용한 ISO 배지는 400 ml의 증류수당 GC medium base (BBL<sup>TM</sup>, USA) 28.8 g을 넣어 녹였고 다른 플라스크에 증류수 400 ml당 8 g의 dried bovine hemoglobin (BBL<sup>TM</sup>, USA)을 녹인 후 121°C, 1 기압에서 15분간 멸균한 후 8 ml의 ISOVitalax<sup>TM</sup> (BBL<sup>TM</sup>, USA)를 멸균된 GC medium base에 첨가한 다음 멸균된 dried bovine hemoglobin을 혼합하여 사용했다. 채취한 실험 재료를 접종한 배지는 5% CO<sub>2</sub>의, 37°C에서 18~24시간 동안 호기 배양한 뒤 유사 집락을 취하여 초대배양에 사용된 배지와 동일한 배지에 계대하여 동일한 조건에서 18~24시간 배양하였다. 배양된 세균은 *S. suis* 동정을 위해 catalase 시험, oxidase 시험, VP 시험, sodium hippurate 가수분해능 시험, bile esculin 가수분해능 시험, amylase 생성시험, β-galactosidase 생성시험, alkaline phosphatase 반응시험, 0.65% NaCl broth의 발육능 시험과 같은 생화학 성장시험과 그 외 12종의 당분해 시험을 MacFaddin의 방법<sup>52</sup>에 준하여 실시하였다.

### 3. Genomic DNA 분리

분리된 균으로부터 PCR을 위한 genomic DNA 추출은

Murray와 Thompson의 방법<sup>49</sup>에 준하여 실시하였다. 18~24시간 동안의 세균배양액을 12,000 × g로, 30분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 후 TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 1 ml을 넣어 pellet을 부유시켰다. 12,000 × g로, 10분 동안 원심시킨 후 상층액을 제거하고 다시 TE buffer 300 μl를 분주한 다음 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) 100 μl, proteinase K (20 mg/μl, Sigma, USA) 40 μl 그리고 lysozyme (10 mg/ml, Sigma, USA) 100 μl를 첨가시킨 후 56°C의 항온수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 12,000 × g로, 10분 동안 원심 후 상층액을 제거한 후 540 μl의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1, Sigma, USA)을 혼합하여 12,000 × g, 20분 원심시켜 새로운 튜브에 상층액과 isopropanol (Merck, Germany) 500 μl를 혼합하여 12,000 × g로, 10분 원심하고 상층액을 제거하였다. 70% ethanol (Merck, Germany)로 DNA pellet을 부유시킨 다음 7,500 × g, 10분간 원심수세를 2 회 실시한 후 공기 건조시켰다. TE buffer 30 μl에 추출된 DNA를 부유시킨 후 55°C의 항온수조에서 10분간 정치시킨 후 PCR에 이용시까지 -20°C에 보관하였다.

### 4. Primer의 제작과 PCR의 조건

#### 가. PCR을 통한 *S. suis*의 확인

특이 primer (Genotech Ins, Korea)는 정 등<sup>7</sup>이 보고한 염기서열에 기초하여 *mvp* 유전자에 대한 primer를 Table 1과 같이 제작하여 사용하였다. PCR은 thermocycler (MWG Biotech AG Primus 96, Germany)에서 10× PCR buffer (Bio Basic Ins, Canada) 5 μl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub> (Bio Basic Ins, Canada), 0.25 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTP; Bio Basic Ins, Canada), 10 pmol의 forward와 reverse primer, 100 ng의 template DNA, 2.5 unit의 *Taq* DNA polymerase (Bio Basic Ins, Canada)를 첨가하고 최종량이 50 μl가 되도록 멸균 증류수를 넣었다. Predenaturation은 95°C에서 3 분, denaturation은 95°C에서 30 초, annealing은 64°C에서 1 분, extension은 72°C에서 1 분으로 하여 30 회 반복하였으며 최종 extension은 72°C에서 5 분간 실시하였다. PCR 증폭산물은 ethidium bromide (0.05 μl/ml; Sigma, USA)를 포함한 1% agarose

Table 1. PCR primer sequences and positions on the *Streptococcus suis* specific *mvp* gene<sup>7</sup>

Primer	Nucleotide sequence	Location (bp)	Products
Forward	5' -GGC-GGT-CTA-GCA-GAT-GCT-CG-3'	1913~1932	517 bp
Reverse	5' -GCG-AAC-TGT-TAG-CAA-TGA-C-3'	2409~2429	

**Table 2.** *Streptococcus suis* multiplex PCR primer sequences and their positions on the serotype 1, 2, 7 and 9 specific *cps* genes

Serotype genes	Primers	Nucleotide Sequences	Positions	Products
<i>cps</i> 1I	Forward	5' -GGC-GGT-CTA-GCA-GAT-GCT-CG-3'	4398 ~ 4417	440 bp
	Reverse	5' -GCG-AAC-TGT-TAG-CAA-TGA-C-3'	4839 ~ 4821	
<i>cps</i> 2J	Forward	5' -CAA-ACG-CAA-GGA-ATT-ACG-GTA-TC-3'	13791 ~ 13813	675 bp
	Reverse	5' -GAG-TAT-CTA-AAG-AAT-GCC-TAT-TG-3'	14465 ~ 14443	
<i>cps</i> 7H	Forward	5' -AGC-TCT-AAC-ACG-AAA-TAA-GGC-3'	3334 ~ 3354	250 bp
	Reverse	5' -GTC-AAA-CAC-CCT-GGA-TAG-CCG-3'	3585 ~ 3565	
<i>cps</i> 9H	Forward	5' -GGC-TAC-ATA-TAA-TGG-AAG-CCC-3'	4106 ~ 4126	390 bp
	Reverse	5' -CCG-AAG-TAT-CTG-GGC-TAC-TG-3'	4494 ~ 4475	

gel에 전기영동한 후 자외선 조사기로 특이적인 *mrp* 유전자 증폭산물을 확인하고 사진촬영을 하였다.

나. Multiplex PCR을 통한 *S. suis* 1 (+14)형, 2 (+1/2)형, 7형 그리고 9형 검출

특이 primer (Genotech Ins, Korea)는 Smith *et al.*<sup>50,51</sup>이 보고한 염기서열을 기초로 하여 *cps* 유전자에 대한 primer를 사용하였고 Table 2에 나타난 바와 같다. PCR은 thermocycler (MWG Biotech AG Primus 96, Germany)를 사용하였으며 10× PCR buffer (Bio Basic Ins, Canada) 5 μl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub> (Bio Basic Ins, Canada), 0.25 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTP; Bio Basic Ins, Canada), 각각의 10 pmol forward와 reverse primers, 100 ng의 template DNA, 2.5 unit의 *Taq* DNA polymerase (Bio Basic Ins, Canada)를 첨가하고 최종량이 50 μl가 되도록 멸균 증류수를 넣었다. Predenaturation은 95°C에서 10 분, denaturation은 95°C에서 1 분, annealing은 56°C에서 1 분, extension은 72°C에서 1 분으로 하여 30 회 반복하였다. PCR 증폭산물을 ethidium bromide (0.05 μl/ml; Sigma, USA)를 포함한 1% agarose gel에 전기영동한 후 자외선 조사기로 *cps* 유전자 증폭산물을 확인하였다.

## 결 과

### 1. *Streptococcus* spp.의 분리

1999년 9월부터 1999년 10월까지 2개월 동안 전라도와 충청도 지역의 74개 농가로부터 채취한 740개의 폐에서 Gram 염색상, catalase 시험, oxidase 시험, lactose

분해 시험, VP 시험 등을 거쳐 110주의 *Streptococcus* spp를 분리하였다.

### 2. PCR을 통한 *S. suis*의 확인

*Streptococcus* spp.로 분리된 110개 균주를 대상으로 *mrp* 유전자에 대한 primer를 이용하여 PCR 적용한 결과 50개의 균주 (55%)에서만 517 bp의 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

### 3. Multiplex PCR을 통한 *S. suis* 혈청형 분류

PCR을 통하여 확인된 *S. suis* 50주를 대상으로 multiplex PCR을 적용한 결과 fig. 2에 나타난 바와 같이 2 (+1/2)형, 7형 그리고 9형에 대하여 특이적인 675, 250, 390 bp의 PCR 증폭산물을 확인할 수가 있었다. multiplex PCR을 적용한 결과는 Table 3과 같이 2형이 19 (38%)주로 가장 많은 분포를 보였고 7형과 9형은 각각 1 (2%)주와 2 (4%)주 확인되었다. 1 (+14)형은 PCR 증폭산물을 확인할 수 없었으며, 그 이외의 혈청형이 28 (56%)주 분포하였다.

**Table 3.** Serological distribution of 50 *Streptococcus suis* isolates from pneumonic lungs of slaughtered pigs

Serotypes	NO. of Positive (%)
2 (+1/2)	19/50 (38)
7	1/50 (2)
9	2/50 (4)
others	28/50 (56)

**fig. 2.** Specific amplification of *cps* gene of *Streptococcus suis* serotype 1 (+14), 2 (+1/2), 7 and 9 by multiplex PCR. M, marker (100 bp); Lane 1 and Lane 2, *S. suis* serotype 2 (+1/2); Lane 3, *S. suis* serotype 9; Lane 4 and Lane 5, *S. suis* serotype 7.

#### 4. *S. suis*의 생화학적 특성

분리된 *S. suis* 50주에 대한 생화학적 성상은 Table 4와 같았다. *S. suis*는 Gram 양성 연쇄상 구균으로, 강한 용혈성을 나타내는 1 mm 이하의 아주 작은 크기의 집락을 형성하며, 혈액천배지상에서 잘 자랐다. 분리된 *S. suis* 모두는 catalase 시험, oxidase 시험, VP 시험, sodium hippurate 가수분해에 있어서 모두 음성반응을 보였으며, 0.65% NaCl broth에서 모든 균주가 자라지 않았으며, bile esculin 가수분해, amylase 생성,  $\beta$ -galactosidase 생성, alkaline phosphatase 생성능은 매우 높은 양성반응을

나타내었다. 특히 *S. suis* 2형에 대한 bile esculin 가수분해,  $\beta$ -galactosidase 생성, alkaline phosphatase 생성능은 모두 100%의 양성을 나타내었다. 분리된 *S. suis* 50주의 당분해능은 Table 5와 같았다. 분리된 50주의 *S. suis*에서 ribose, arabinose, mannitol, sorbitol에 대해서는 모든 균주가 음성을 나타낸 반면, lactose에 대해서는 모두 양성이었다. 또한 trehalose, inulin, raffinose, glucose는 70% 이상의 높은 양성율을 나타냈으나 sucrose, maltose, salicin은 15% 이하의 매우 낮은 양성율을 나타냈다. 특히 *S. suis* 2형의 경우 trehalose, inulin, raffinose는 다른 혈청형들에

Table 4. Biochemical characteristics of 50 isolates of *Streptococcus suis* from pneumonic lungs in slaughtered pigs

Properties	Positive (%)		
	Serotype 2 (+14)	Others	Total
Catalase	0	0	0
Oxidase	0	0	0
Voges-Proskauer (VP) reaction	0	0	0
Hydrolysis of sodium hippurate	0	0	0
Hydrolysis of bile esculin	100	75.0	85.4
Arginine dehydrolase activity (ADH)	17.8	20.8	19.5
Amylase production (AMD)	82.4	87.5	85.4
$\beta$ -Galactosidase production ( $\beta$ -GAL)	100	83.3	90.2
Alkaline phosphatase activity (PAL)	100	62.5	78.0
Growth on 0.65% NaCl broth	0	0	0

Table 5. Fermentative characteristics of 50 isolates of *Streptococcus suis* from pneumonic lungs in slaughtered pigs

Fermentable substrates	Positive (%)		
	Serotype 2 (+1/2)	Others	Total
Ribose	0	0	0
Arabinose	0	0	0
Mannitol	0	0	0
Sorbitol	0	0	0
Lactose	100	100	100
Trehalose	93.3	75.0	82.1
Inulin	93.3	62.5	74.4
Raffinose	93.3	83.3	87.2
Glucose	79.2	66.7	74.4
Sucrose	6.7	0	2.6
Maltose	6.7	12.5	10.3
Salicin	0	4.2	2.6

비해 90% 이상의 매우 높은 양성율을 나타내었고 salicin에 대해서는 모두 음성으로 나타났다.

## 고 찰

*S. suis*는 사료내에 항생제가 첨가되어 있거나 혈중순환 항체가 있어도 돼지의 편도에서 생존가능하며, 돈군 사이의 감염은 건강보균돈의 이동으로 전파가 이루어진다. 보균돈과 비감염돈과의 혼합 사육 시 5일 이내에 비감염돈에 감염되며 자연 감염된 돼지는 보균돈으로 6개월 이상을 지속 할 수 있다.<sup>54</sup>

*S. suis*는 임상증상을 보이는 돈군뿐만 아니라 건강돈군에서도 감염률이 높는데 외국의 경우 임상적으로 건강한 이유자돈의 개체별 검사 시 90% 이상의 높은 감염률이 보고되었고, 돈군별로는 100%의 감염률이 보고되었다.<sup>55-57</sup> 국내의 경우 석 등<sup>3</sup>은 건강한 포유자돈 및 이유자돈을 대상으로한 조사에서 63%의 감염률을 보고하여 국내에서도 *S. suis*가 건강돈군에 널리 분포되어 있음을 알 수 있었다. Clifton-Hadley<sup>54</sup>와 Higgins *et al*<sup>1</sup>은 *S. suis*의 감염은 다소의 차이는 있으나 일반적으로 각각 3~12 주령과 5~10 주령의 자돈에 감수성이 높으며, 석 등<sup>3</sup>은 5~7 주령의 돼지에 감염률이 높다고 보고하

였으나 월별, 계절별 발생률의 차이는 크게 인정되지 않는다고 하였다.

Clifton-Hadley *et al*<sup>63</sup>과 정 등<sup>8</sup>은 건강한 돼지의 비강, 편도에서의 *S. suis* 분리율이 각각 12.8%, 27.5%로 나타나 비강보다 편도에서 *S. suis* 분리율이 높다고 보고하였으나 보균돈이라 할지라도 비강, 편도에서 동시에 *S. suis*가 분리될 확률은 낮으며<sup>58</sup> 따라서 실험재료 채취시 비강과 편도에서 동시에 균분리를 시도하는 것이 타당하다.

분리된 *S. suis* 50주에 대한 생화학적 성장실험에서 sodium hippurate 가수분해능에 있어 조 등<sup>59</sup>은 관절염 환돈과 건강모돈에서 분리한 균주는 모두 음성이라고 보고하였으며, 본 실험에서도 분리된 균주 모두가 음성을 나타냈다. VP 시험과 0.65% NaCl broth의 발육능 시험에서 다른 연구자들의 보고<sup>3-5</sup>와 마찬가지로 모두 음성을 나타내었으며 bile esculin의 가수분해능은 소 등<sup>4</sup>이 보고한 바와 같이 모두 양성을 나타냈으나 amylase의 생성능은 소 등<sup>4</sup>은 모두 양성이라 하였으나 본 실험에서는 85%의 양성만을 보였다. 또한 당분해능 실험에서 소 등<sup>4</sup>과 윤 등<sup>6</sup>이 보고한 것과 같이 ribose와 arabinose에서 모두 음성을 나타내었고, lactose는 모두 양성을 나타내었으며 trehalose, inulin 그리고 glucose는 매우 높은 양성률을 나타냈다. 그러나 소 등<sup>4</sup>이 salicin에 대해 *S. suis*의 분리균 모두가 양성이라 보고하였으나 본 실험에서는 매우 낮은 양성률을 나타내 상당한 차이가 인정되었다. Devriese *et al*<sup>8</sup>은 반추수와 말 등에서 분리한 *S. suis*는 sorbitol 양성인 반면, 돼지에서 분리된 *S. suis*는 sorbitol 음성이라 보고하였고 본 실험에서도 모든 분리 균주가 sorbitol 음성으로 나타나 일치하는 결과를 나타내었다. 그러나 maltose, mannitol 그리고 sucrose는 본 실험에서 10.3%, 0% 그리고 2.6%의 매우 낮은 양성률을 나타내었으나 소 등<sup>4</sup>은 96.8%, 67.7% 그리고 93.5%의 매우 높은 양성률을 나타내 본 실험 결과와는 매우 많은 차이를 나타내었다. 이 실험에서의 실험결과와 차이는 실험에 사용된 균의 분리 부위 및 건강돈 분리주 등의 차이에서 의한 것이라 생각된다.

분리한 *S. suis*의 정확한 혈청형을 알기 위해서 항혈청을 이용하기도 하나 *S. suis*처럼 혈청형이 많은 균주에 적용하기에는 시간과 노력이 많이 소요될 뿐만 아니라 혈청형 미동정균들이 계속 보고됨에 따라 항혈청 이용에 많은 제약이 따른다. 또한 전분 분해능, VP 시험, 6.5% NaCl 발육능시험, salicin 및 trehalose 분해능 등 *S. suis*를 동정하는데 많이 이용되는 생화학적 검사가 있으나 균이 분리된 축종이나 장기에 따라 분리균주의 생화학적 성상이 다양하여 이를 이용한 균동정에도 한계가 있다.

그러나 *S. suis* 35종의 모든 혈청형에 *mrp* 유전자가 존재하여 혈청형에 상관없이 PCR 기법으로 *S. suis*의 *mrp* 유전자를 확인하여 신속하고 정확하게 균을 동정할 수 있다.<sup>7</sup> PCR 진단법은 다른 균종에서는 특이적이 PCR 증폭산물이 검출되지 않아 특이성이 인정되고, 다양한 분리장기에 대해서도 동일한 결과를 보여주므로 *S. suis*를 확인하는 유효한 방법으로 생각되어 본 실험에 PCR 진단법을 적용하여 50주의 *S. suis*를 확인할 수 있어 6.8%의 분리율을 보였다. 이는 소 등<sup>4</sup>과 정 등<sup>5</sup>은 도축돈의 폐병변에서 *S. suis*의 분리율이 8.0%와 7.8%이었다고 보고하여 국내의 *S. suis*의 분포는 지역별로 크게 차이가 나타나지 않았다. 폐병변으로부터 유사한 *S. suis* 분리율을 나타냈으나, PCR을 이용한 방법이 생화학학적 시험보다 *S. suis* 진단과 혈청형을 확인함에 있어 더욱 더 신속하며 정확하여 이 PCR을 이용한 진단기법이 매우 유용한 방법으로 생각된다.

이 연구에서는 *S. suis* 2형이 분리된 50개 분리주중 19(38%)주로 가장 많이 분리되었다. 이러한 결과는 *S. suis* 2형이 가장 많은 분포를 보였다는 Homme *et al*,<sup>27</sup> Kataoka *et al*,<sup>60</sup> Sala *et al*<sup>61</sup> 그리고 Vecht *et al*<sup>62</sup>의 보고와 유사하였으며, 국내에서는 소 등<sup>4</sup>이 분리한 *S. suis*의 혈청형이 2, 1/2, 1, 3, 5 순이었다는 보고와 유사하였다. 그 외 외국의 경우 캐나다<sup>62</sup>에서는 혈청형 3, 4, 8, 2 순으로 분포가 보고되었고, 덴마크<sup>22</sup>에서는 7형과 8형, 네덜란드<sup>63</sup>에서는 2형이 그리고 북이탈리아<sup>60</sup>에서는 혈청형 2, 1, 9, 1/2 순으로 주요 분포를 보인다고 보고되었으며, 인도<sup>25</sup>에서는 다른 국가들과는 달리 혈청형 4, 3, 8, 18 순으로 분포를 보이고 있어 국가별로도 혈청형의 분포는 조금씩 차이를 알 수 있었다. 그러나 지금까지의 *S. suis*에 대한 연구는 주로 2형에 집중되었다. 비록 2형이 대부분의 국가에서 가장 우세한 혈청형이고,<sup>27,59-61</sup> 높은 병원성을 나타내나 균 분리율이 돈군별로 다양하게 나타나며, 특정한 혈청형과 병원성 발현간의 상관관계에 대한 정확한 규명이 아직 없으므로 일부 혈청형만 한정하여 분리를 시도하는 것은 타당하지 않다고 생각된다.

따라서 이 연구에서는 세계 여러나라에서 많은 발생 분포를 보이는 *S. suis* 1 (+14)형, 2 (+1/2)형, 7형 그리고 9형에 대해 국내에서는 최초로 multiplex PCR 기법을 이용하여 이들에 대하여 신속하고 정확하게 동정할 수 있었다. 이러한 진단기법은 역학과 전파경로 그리고 박멸계획 수립에 매우 유용한 진단기법으로서 활용될 것으로 기대된다. 또한 multiplex PCR 기법은 백신의 개발이나 인수공통전염병의 예방노력을 위한 *S. suis*의 다양한 혈청형을 보다 신속하게 구별할 수 있는 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

전라도와 충청도 지역의 74개 농가에서 출하된 740두의 폐를 실험 재료로 사용하여 *S. suis*를 분리하였고, 이를 PCR을 통해 확인하였다. 분리된 *S. suis*는 multiplex PCR을 통해 혈청형 2 (+1/2), 7 과 9로 분류하였으며 이들 분리주에 대한 생화학적 성상을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 전체 740개 폐 장기에서 PCR을 적용한 결과 50 (6.8%)주의 *S. suis*가 분리되었다.
2. 분리된 50주의 *S. suis*의 생화학적 특성은 catalase 시험, oxidase 시험, VP 시험, sodium hippurate 가수분해능 시험, 0.65% NaCl broth 발육능 시험에서 모두 음성을 나타내었으나, bile esculin 가수분해능 시험, amylase 생성시험,  $\beta$ -galactosidase 생성시험, alkaline phosphatase 반응시험에서는 100%, 82.4%, 100%, 100%의 높은 양성을 나타냈다. 당분해능은 ribose, arabinose, mannitol, sorbitol에 대해서는 모든 균주가 음성을 나타낸 반면, lactose에 대해서는 모두 양성이었다. 또한 trehalose, inulin, raffinose, glucose는 70% 이상의 높은 양성률을 나타냈었으나 sucrose, maltose, salicin은 15% 이하의 매우 낮은 양성률을 나타냈다.
3. 740개 폐조직에서 분리된 50주 *S. suis*에 대한 multiplex PCR을 이용한 혈청형 분류 결과 *S. suis* 2 (+1/2)형이 19 (38%)주 분리되어 가장 많은 분포를 보였고, 7형이 1 (2%)주 분리되었으며, 9형이 2(4%)주 분리되었으나 1 (+14)형은 분리되지 않았다.

## 참고문헌

1. Higgins R, Gottschalk M, Mittal KR, et al. *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. *Can J Vet Res*, 54: 170-173, 1990.
2. 석호봉, 예재길. 자돈에서의 연쇄구균성 감염증에 관한 연구 I. 이환돈에서의 *Streptococcus suis* type II에 의한 돼지뇌막염의 실태와 약제 감수성. 한국수의공중보건학회지, 14: 35-45, 1990.
3. 석호봉, 이관형, 예재길. 자돈에서의 연쇄구균성 감염증에 관한 연구 II. 정상돈에서의 *Streptococcus suis* type II에 의한 감염 실태와 약제 감수성. 한국수의공중보건학회지, 16: 169-178, 1992.
4. 소신희, 김봉환, 조길재. 도축돈의 폐렴병소로부터 분리한 *Streptococcus suis*의 생물화학적 특성 및 혈막혈청형. 대한수의학회지, 35: 297-306, 1995.
5. 정병열, 정석찬, 김봉환 등. 국내 돼지의 *Streptococcus suis* 감염을 조사 및 혈청형 동정. 대한수의학회지, 37: 577-582, 1997.
6. 윤선중, 고흥범. 도축돈에서 분리된 *Streptococcus suis*에 관한 연구. 한국 가축 위생 학회지, 20: 281-288, 1997.
7. 정병열, 정석찬, 김종엽 등. *Streptococcus suis* 신속동정을 위한 PCR 기법. 대한수의학회지, 38: 771-776, 1998.
8. Homme J, Wullepit J, Cassimon P, et al. *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. *Vet Rec*, 123: 626-627, 1988.
9. Devriese LA, Haesebrouck F. *Streptococcus suis* infections in horses and cats. *Vet Rec*, 130: 380, 1992.
10. Hayakawa Y, Komae H, Nakazawa M, et al. An occurrence of equine transport pneumonia caused by mixed infection with *Pasteurella caballi*, *Streptococcus suis* and *Streptococcus zooepidemicus*. *J Vet Med Sci*, 55: 455-466, 1993.
11. Devriese LA, Cruz Colque JI, De Herdt P, et al. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *J Appl Bacteriol*, 73: 421-425, 1992.
12. Bungeber W, Bialek R. Fatal *Streptococcus suis* septicemia in an abattoir. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 8: 306-308, 1989.
13. Hanston P, Vekmans MC, Gautier P, et al. Fetal *Streptococcus suis* meningitis in man. *Acta Neurol Belg*, 91: 165-168, 1991.
14. Peetermans WEC, Moffic BG, Thompson J. Bacterial endocarditis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Inf Dis*, 159: 595-596, 1989.
15. Kilpper-Balz R, Schleifer KH. *Streptococcus suis* sp. nov. nom. rev. *Int J Sys Bacteriol*, 37: 160-162, 1987.
16. Jansen EJ, Van Dorssen CA. Meningoencephalitis bij varkens door streptococci. *Tijdschr Diergergen*, 76: 815-882, 1951.
17. Field HI, Buntain D, Done JT. Studies on piglet mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis. *Vet Rec*, 66: 453-455, 1954.
18. Elliott SD. Streptococcal infection in young pigs. I. An immunological study of the causative agent (PM *Streptococcus*). *J Hyg Camb*, 64: 205-212, 1966.



19. Windsor RS, Elliot SD. Streptococcal infection in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *J Hyg Camb*, 5: 69-78, 1975.
20. Perch B, Pedersen KB, Henrichsen J. Serology of capsulated Streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*. 17: 993-996, 1983.
21. Higgins R, Gottschalk M, Henrichsen J, et al. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest*, 7: 405-406, 1995.
22. Clifton-Hadley FA, Alexander TJL, Enright MR, et al. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs. *Vet Rec*, 115: 562-564, 1984.
23. Gottschalk M, Higgins R, Henrichsen J, et al. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 27: 2633-2636, 1989.
24. Gogolewski RP, Cook RW, O'Connell CJ. *Streptococcus suis* serotypes associated with disease in weaned pigs. *Aust Vet J*, 67: 202-204, 1990.
25. Sigh DP, Chaturvedi VK, Gupta RN. Prevalence of *Streptococcus suis* in pig in India. *Proc 13th IPVS congress*, Bologna, 207, 1994.
26. Health PJ, Hunt BW, Wilkinson JD, et al. *Streptococcus suis* serotype 14 as a cause of pig disease in the UK. *Vet Rec*, 139: 450-451, 1996.
27. Hommez J, Devriese LA, Castryck F, et al. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol*, 11: 349-355, 1986.
28. Koehne G, Maddux RL, Cornell WD. Lancefield group R streptococci associated with pneumonia in swine. *Am J Vet Res*. 40: 1640-1641, 1979.
29. Vecht U, van Leengoed LA, Verheijen ER. *Streptococcus suis* infections in pigs in the Netherlands (Part I). *Vet Q*, 7: 315-321, 1989.
30. Ossowicz CJ, Pointon AM, Davies PR. *Streptococcus suis* isolated from pigs in South Australia. *Aust Vet J*, 66: 377-378, 1989.
31. Clifton-Hadley FA, Alexander TJL. The epidemiology, diagnosis, treatment and control of *Streptococcus suis* type 2 infection. *Proc Am Assoc Swine Pract*, 473-491, 1986.
32. Roberston ID, Blackmore DK, Hampson DJ, et al. A longitudinal study of natural infection of piglets with *Streptococcus suis* types 1 and 2. *Epidemiol Infect*, 107: 119-126, 1991.
33. Enright MR, Alexander TJ, Clifton-Hadley FA. Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of *Streptococcus suis* type 2. *Vet Rec*, 121: 132-133, 1987.
34. Williams AE. Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Microb Pathog* 8: 189-196, 1990.
35. Vecht U, Wisselink HI, Jellema ML, et al. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun*. 59: 3156-3162, 1991.
36. Vecht U, Wisselink HI, Reek FL, et al. Diagnosis of several casular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. *Proc Int Congr Pig Vet*, 14: 298, 1996.
37. Gottschalk MG, Lacouture S, Dubreuil JD. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology*, 141: 189-195, 1995.
38. Elliott SD, Tai J. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *J Exp Med*, 148: 1699-1704, 1978.
39. Jacques M, Gottschalk M, Higgins R, et al. Ultrastructural study on surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol*, 172: 2833-2838, 1990.
40. Gottschalk M, Lebrun A, Higgins R, et al. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 28: 2156-2158, 1990.
41. Mogollon JD, Pijoan C, Cleary PP, et al. Identification of epidemic strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 29: 782-787, 1991.
42. Smith HE, Rijnsurger M, Stockhofe-Zurwieden, et al. virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 2 and high virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 1 can be recognized by a unikeribotype profile. *J Clin Microbiol*, 35: 1049-1053, 1997.
43. Hampson DJ, Trott DJ, Robertson ID, et al. Population structure of Australian isolates of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 31: 2895-2900, 1993.
44. Serhir B, Higgins R, Lallier R, et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Streptococcus suis*, *Can J Vet Res*, 57: 19-24, 1993.
45. Kataoka Y, Yamashita T, Nakazawa M, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against *Streptococcus suis* type 2

- in infected pigs. *J Vet Med Sci*, 58: 369-372, 1996.
46. Rosendal S, Breton J, Henriksen J, *et al.* Isolation of *Streptococcus suis* using a selective medium. *Can J Vet Res*, 50: 537-539, 1986.
  47. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 31: 2192-2194, 1993.
  48. Carter GR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4th ed. 126-135, 1984.
  49. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acid Res*, 8: 4321-4325, 1980.
  50. Smith HE, van Bruijnsvoort L, Buijs H, *et al.* Rapid PCR test for *Streptococcus suis* serotype 7. *FEMS Microbiol Lett*. 178: 265-270, 1999.
  51. Smith HE, Veenbergen V, Smits MA, *et al.* The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays. *J Clin Microbiol*, 37: 3146-3152, 1999.
  52. MacFaddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins 2nd ed, 1980.
  53. Clifton-Hadley FA, Alexander TJL, Upton I, *et al.* Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *Vet Rec*, 114: 513-518, 1984.
  54. Clifton-Hadley FA. *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br Vet J*, 139: 1-5, 1983.
  55. Flores JLM, Jiggins R, D'allaire S, *et al.* Distribution of the different capsular types of *Streptococcus suis* in nineteen swine nurseries. *Can Vet J*, 34: 170-171, 1993.
  56. Brisebois LM, Charlebois R, Nadeau M, *et al.* Prevalence of *Streptococcus suis* in four to eight week old clinically healthy piglets. *Can J Vet Res*, 54: 174-177, 1990.
  57. Breton J, Mitchell WR, Rosendal S. *Streptococcus suis* in slaughter pigs and abattoir workers. *Can J Vet Res*, 50: 338-341, 1986.
  58. Moreau A, Higgins R, Nadeau M, *et al.* Rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2 in weaned pigs. *Am J Vet Res*, 50: 1667-1671, 1989.
  59. 조현주, 여상건. 관절염 이환자돈과 건강한 모돈으로부터 분리한 *Streptococcus*의 균종 및 항균제 내성. *대한수의학회지*, 29: 315-324, 1989.
  60. Sala V, Antonini M, Vischi O, *et al.* Distribution of capsular types and hemolysin production of *Streptococcus suis* isolates in northern Italy. *Proc 14th IPVS congress*, Bologna, 307, 1996.
  61. Vecht U, van Leengoed LAMG, Verheijen ERM. *Streptococcus suis* infections in pigs in the Netherlands(Part 1). *Vet urterly*, 7: 315-321, 1985.
  62. Tarradas C, Arenas A, Maldonado A, *et al.* Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine proposal for biochemical parameters. *J Clin Microbiol*, 32: 578-580, 1994.
  63. Kataoka Y, Sugimoto C, Nakazawa M, *et al.* Epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan from 1987 to 1991. *Natl Inst Anim Health Q*, 305: 623-626, 1993.