

돼지 폐염유래 *Pasteurella. spp*의 특성 및 Plasmid profiles에 대한 연구

이강록 · 이우원 · 김근규

가축위생시험소

돼지 肺炎由來 *Pasteurella* spp.의 特性 및 Plasmid profiles에 대한 研究

家畜衛生試驗所

이강록 · 이우원 · 김근규

A Study of *Pasteurella* spp. and Their Plasmid Profiles Isolated from Pneumonic Lungs of Slaughtering Pigs.

Veterinary Service Laboratory

Lee. Kang-Rok, Lee. Woo-Won, Kim. Keun-Kyu

緒 論

1880年 Louis Pasteur가 fowl cholera에 感染된 닭에서 *Pasteurella*(P.) *multocida*를 分離 報告한 이래로 여러 species가 分離 報告되었으며, 이중 P.*multocida*는 돼지

肺炎이나 fowl cholera로부터, *P. haemolytica*는 주로 어린 송아지에게 纖維素性肺炎을 誘發한다고 알려져있다.^{1,2)}

특히 *P. multocida*는 돼지 呼吸器 疾病의 原因菌 또는 2차 感染菌으로 주로 作用하여 呼吸器 症狀과 出血性 敗血症을 誘發한다.^{3,4)}

한편 *P. multocida*는 5種의 capsule serogroup(A,B,D,E,F)과 16種의 somatic serogroup(1~16)이 알려져있으며, 이중 capsule serogroup A와 D型이 돼지 萎縮性鼻炎肺炎의 原因菌으로 大多數를 차지한다고 報告되어있다.^{4,5,6)}

근래와서는 우리 養豚業이 集團化 및 多頭 飼育化의 經營形態로 變換되어 이에 다른 돼지의 密集飼育, 環境 衛生의 不良, 疾病豫防의 소홀로 呼吸器 疾病에 의한 經濟的 損失을 無視할수 없는 實情이다.

따라서 본 研究는 管内 屠畜場에 出荷된 肺炎 돼지의 肺病變으로부터 *Pasteurella*菌을 分離하여 菌分離率, 生化學的인 特性, 血清型 및 Plasmid DNA 保有 與否를 調査하였기에 다음과 같이 報告합니다.

材料 및 方法

菌分離 材料: 1996年 3월부터 11月 사이 管内 屠畜場에 出荷된 肺炎 病變이 있는 돼지 357頭를 菌分離 材料로 使用하였다.

材料 採取: 肺 病變 部位를 잘라서 滅菌병에 넣어 즉시 實驗室로 가져와 菌分離 培養을 實施하였다.

菌分離: Tryptose blood agar base에 7% 綿羊 血液을 加한 평판배지에 菌分離 材料를 接種하여 37℃ overnight 培養 後 疑心되는 집락에 대하여 MacConky agar 평판배지에 確認培養한 結果 자라지 않는 집락에 대하여 gram 染色, 萊膜 染色性 및 菌 形態를 確認한 후 生化學的 性狀檢査를 實施하였다.

生化學的 性狀檢査: Cowan의 方法⁷⁾에 따라 catalase, oxidase, indol, H₂S 產生試驗, 溶血性, urease 產生試驗, nitrate 還元試驗, 運動性, gelatin 液化試驗, VP 試驗 및 기타 糖分解 試驗등을 實施하였다.

萊膜血清型 調査 : P.multocida의 capsular serotype A는 Carter와 Rundell의 方法⁸⁾에 따라 分離菌을 tryptose blood agar에 5~10mm 간격으로 획선 塗抹後 즉시 Staphylococcus(S.) aureus로 수직도말하여 37℃ 18~24시간 培養한 다음 S.aureus 집락주위의 P.multocida가 萎縮 또는 消失된 것을 陽性으로 判定하였다. type D는 Carter와 Subronto의 方法⁹⁾에 준하여 分離菌을 brain heart infusion broth 3ml에 接種하여 37℃, 18시간 培養後 3,000rpm에서 30분간 遠心 分離한 다음 얻은 沈殿菌液 0.5ml에 1,000배의 acriflavin neutral을 同量 混合하여 5~30분간 放置한 다음 楕圓 棒 모양의 沈澱物이 形成되는 것을 陽性으로 判定하였다.

Plasmid DNA의 分離 및 Gel 電氣泳動 : 分離된 P.multocida의 plasmid 分離는 Birnboim과 Doly의 alkaline lysis 方法¹⁰⁾에 준하였으며, 電氣泳動은 tris-acetate buffer (0.04M tris-acetate, 0.002M EDTA)를 使用하여 0.8% 水平 agarose gel로 50V에서 2時間 동안 實施한 後 gel을 ethidium bromide로 染色한 後 UV light上에서 調査 하였다.

結 果

1996年 3月부터 11月 사이 釜山管内 屠畜場에 出荷된 肺炎 病變이 있는 돼지 375頭로부터 Pasteurella 菌을 分離試圖한바 Table 1에서와 같이 75頭에서 Pasteurella 菌이 分離되어 21%의 分離率을 나타내었으며, 分離된 Pasteurella菌의 菌種은 P. multocida가 73株로 97%를 차지하였고, 기타 Pasteurella가 2株 分離되었다.

Table 1. The isolation frequency and species of Pasteurella spp isolated from 375 pneumonic lungs of slaughtering pigs

Species	No. of isolated lungs
P.multocida	73
Other Pasteurella spp	2
Total	75(21%)

분리된 *P.multocida*의 생화학적 성질 및 당 분해성 시험을 실시한 결과 Table 2. 에서와 같이 catalase, oxidase, indol, H₂S 產生試驗 및 nitrate 還元試驗에서는 대부분 陽性 反應을 나타내었으나, MacConky agar에서의 成長이나 溶血性, urease 產生試驗, gelatin 液化試驗, 運動性 및 VP試驗에서는 陰性을 나타내었다. 또한 糖分해 試驗에서는 glucose, galactose, sucrose, mannitol 등에서는 대부분 陽性이었으나, lactose와 raffinose는 分解하지 않았다.

Table 2. Biochemical and cultural property of 73 *P.multocida* isolated from pneumonic lungs of slaughtering pigs

Characters	No. of positive(%)
Growth on MacConky agar	0 (0)
Catalase production	73 (100)
Oxidase production	73 (100)
Indol production	71 (97)
H ₂ S production	73 (100)
Haemolysis of sheep blood agar	0 (0)
Ureas production	0 (0)
Nitrate reduction	73 (100)
Gelatin liquifaction	0 (0)
Motility	0 (0)
VP test	0 (0)
Gas from glucose	73 (100)
Lactose fermentation	0 (0)
Galactose fermentation	72 (99)
Sucrose fermentation	70 (90)
Raffinose fermentation	0 (0)
Mannitol fermentation	69 (94)

분리된 *P.multocida*의 萊膜 血清型을 調査한 結果는 Table 3과 같이 公試菌株 7 3株중 58주(79%)가 type A, 11주(15%)가 typr D가 나타났으며, 未同定 菌株도 4 株(6%)있었다.

Table 3. Capsular serotype of 73 *P.multocida* isolated from pneumonic lungs of slaughtering pigs

Total examined strains	Type A	Type D	Untypable
73	58(79%)	11(15%)	4(6%)

분리된 *P.multocida* 73株에 대하여 plasmid DNA 保有 狀況을 調査한 結果 61株 (84%)에서 한개 以上の plasmid DNA를 保有하고 있었으며, 61株중 43株(71%)가 1개를, 16株(26%)가 2개를 保有하고 있었으며, 2株에서는 3개의 plasmid DNA를 保有하고 있음을 確認하였다.

Table 4. Plasmid DNA patterns of 73 *P.multocida* isolated from pneumonic lungs of slaughtering pigs

No. of plasmid DNA	No. of strains
0	12(16.4%)
1	43(58.9%)
2	16(21.9%)
3	2(2.8%)
Total	73(100%)

考 察

Pasteurella 屬菌은 家畜의 鼻腔, 扁桃, 口腔에 棲息하는 正常 細菌叢으로 存在하면서, 環境의 變化에 의하여 呼吸器 疾患을 誘發한다.^{1,2,3)}

*P.multocida*는 소에서는 出血性 敗血症, 닭에서는 fowl cholera, 토끼에서는 snuffles의 原因菌으로 널리 알려져있다.^{1,2,3)}

특히 돼지에서는 *Bordetella bronchiceptica*와 함께 萎縮性 鼻炎을 誘發하거나 때로는 다른 細菌이나 virus와 混合感染하여 限局性 肺炎이 主症이나 경우에 따라서는

氣管支肺炎이나 胸膜肺炎을 隨伴할때도 있으며, 現在는 우리나라 돼지 呼吸器 疾病 가운데서 아주 重要視되고 있을뿐아니라, 最近 多頭 飼育, 集團飼育, 密集事育등의 非衛生的인 飼育環境으로 그 發生이 增加되고있어 養豚農家에 상당히 問題視되고 있다.^{3, 1, 9, 10, 11, 12)}

본 研究에서 돼지 肺炎病變으로부터 分離한 *Pasteurella* 屬菌의 97%가 *P.multocida* 로 이는 先人들이 돼지 肺炎由來의 *Pasteurella*는 *P.multocida*가 主種을 이룬다는 報告와 一致하는 것이다.^{3, 13)} 돼지 肺炎으로부터 分離된 *P.multocida*의 分離率은 20.4%로서 國內 先人들의 報告와는 類似하였으나,^{14, 15, 16)} Pijoan등¹⁷⁾의 70.8%, Osborne 등¹⁸⁾의 55.0%보다는 상당히 낮아 이는 國內에서는 疾病豫防目的으로 抗生物質 使用이 많아 菌이 潛在되어있는 結果라 思料된다.

分離菌에 대한 生化學的 性狀檢査를 實施한 結果 Cown의 分類基準¹⁹⁾에 適合하였으며, 國內에서만의 特異한 菌株는 發見되지 않아 先人들의 研究 結果와 一致하였다.^{14, 15, 16)}

*P.multocida*의 莖膜物質은 病原性和 밀접한 關係가 있음이 밝혀진 이후 많은 研究者들에 의하여 血清學的 分類가 이루어지고 있으며, type A와 type D는 돼지 肺炎에 주로 關與하는 血清型일 뿐만아니라, 비교적 쉽게 同定이 可能하기에 *Pasteurella*性 肺炎의 疫學的 研究에 많이 응용되고 있다.^{4, 5, 6)} 본 研究에서는 type A가 79%, type D가 15%로 金등¹⁰⁾이 type A와 type D가 37.0%, 29.0%, 박등¹⁹⁾의 40.0%, 26.7%, 오 등¹⁴⁾의 60.4%, 18.6%등과는 약간의 차이가 있었으나, Kielstein²⁰⁾의 23.0%, 12.0%, Pijoan등²¹⁾의 97.3%, 2.7%등과는 상당한 差異가 있어 이는 地域間의 常存해있는 血清型的 差異로 思料되나, 大陸間의 分離型的 差異인지, 型別에 따라 病原性에 差異가 있는 것인지는 더욱더 研究해야할 課題라 思料된다.

分離菌의 疫學的 同質性을 糾明하기 위하여 pladmid DNA를 分離하여 調查한 結果 대부분인 84%가 1개 以上の plasmid DNA를 保有하고 있었기에 國內 돼지 肺炎 由來 *P.multocida*의 대부분인 plasmid DNA를 保有하고 있음이 確認되었으며, plasmid DNA 保有 菌株의 71%가 1개의 plasmid DNA만 保有하고 있음을 알수 있었다. 앞으로 plasmid DNA 保有 菌株 및 保有 plasmid DNA의 分子量 測定 등에 관하여 더욱더 研究한다면 *P.multocida*에 의한 돼지 肺炎의 疫學 研究에 좋은 資料가 되리라 思料된다.

結 論

1996年 3月부터 11월까지 釜山管内 屠畜場에 出荷된 肺炎病變이 있는 屠畜場 35 7頭에 대하여 *Pasteurella* 屬菌에 대하여 研究한 結果

1. 75頭(21%)에서 75주의 *Pasteurella* 屬菌의 分離되었으며, 分離率의 97%인 73株가 *P.multocida*로 同定되었다.
2. 分離菌의 生化學的 性長檢査를 實施한 結果 Cown의 分類基準과 거의 一致하였다.
3. 分離된 *P.multocida* 73株에 대한 莖膜 血清型을 調查한 結果 type A가 58株(79%), type D가 11株(15%), 기타 4株(6%)이었다.
4. *P.multocida* 73株에 대하여 plasmid DNA를 調查한 61株(84%)가 1개 以上の plasmid DNA를 保有하고 있으며, plasmid DNA를 1개 保有가 43株로 71%를 차지하였다.

참고문헌

1. Gillespie J H, Timoney J F 1981. Hagan and Bruner's infectious disease of domestic animals. 7th. Cornell Univ. Press 105-112
2. Rhoades K R, Rimler R B 1984. Disease of poultry. 8th. Ames Iowa State Univ. Press 141-164
3. Farrington D O 1986. Disease of swine. 6th Iowa State Univ. Press 436-444
4. Carter G R, Cole J R 1990. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5th Academic Press Inc. 129-139
5. Carter G R, rundell S W 1975. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using *Staphylococcal* hvaluronidase. Ver Rec 96 : 343

6. Carter G R, Subronto P 1973. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavin. *Am J Vet Res* 34 : 293-294
7. Cowan S T 1974. *Manual for the identification of medical bacteria*. 2nd. London Cambridge Univ Press 89-90
8. Birnboim H C, Doly J A 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* 7 : 1513-1523
9. 김봉환 1983. 우리나라 돼지 질병 발생 동향과 대책(상). *대한수의사회지* 18 : 8-20
10. 김봉환 1983. 우리나라 돼지 질병 발생 동향과 대책(하). *대한수의사회지* 19 : 8-20
11. Rutter J M, Luther P D 1984 Cell culture assay for toxigenic *P. multocida* from atrophic rhinitis of pigs. *Vet Rec* 114 : 393-396
12. Runnels L J 1982. Infectious atrophic rhinitis of swine. *Vet Clin N Am* 4 : 301-308
13. Morrison R B, Pijoan C 1985. Microorganism associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can J Comp Med* 49 : 129-137
14. 오강희, 박노찬, 김이준, 박덕상 1990. 돈 폐렴 유래 *Pasteurella multocida* 혈청형 및 약제 감수성. *한가위지* 13 : 69-74
15. 김광재, 안현철, 조현웅등 1994. 강원 동해안 지역 돼지 폐렴에서 분리한 *Pasteurella multocida*에 대한 조사. *한가위지* 17 : 89-94
16. 조길재, 김봉환 1989. 영남지방 돼지의 *Pasteurella multocida* 감염 상태 및 분리균의 생화학적 특성. *대한수의학회지* 29 : 479-485
17. Pijoan C, Lastra A, Ramirez C et al. 1984 Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. *JAVMA* 185 : 522-523

18. Osborne A D, Saunders J R, Sebunya T K 1981. An abattoir survey of the incidence of pneumonia in Saskatchewan swine and an investigation of the microbiology of affected lungs. *Can Vet J* 22 : 82-85
19. Park J M, Kim J Y, Byeon J O et al. 1983. Isolation and serotyping of *Pasteurella multocida* from pigs respiratory disease. *Res Reports of the Office of Rural Development Korea* 25 : 97-104
20. Kielstein P 1986. On the Occurrence of toxin producing *Pasteurella multocida* strains in atrophic rhinitis and pneumonias of swine and cattle. *J Vet Med* 33 : 418-424
21. Pijoan C, Morrison R B, Hliley H D 1983. Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter. *J Clin Microbiol* 17 : 1074-1076