

## 추백리의 혈청학적 진단법에 관한 연구

김정태, 심항섭, 김태종\*, 고태오, 우종태, 유기승, 박유순

경기도축산위생연구소, 건국대학교 수의학과\*

## Studies on serological tests for pullorum disease

Jeong-Tae Kim, Hang-Sub Shim, Tae-Jong Kim\*, Tae-Oh Ko  
Jong-Tae Woo, Ki-Syng Ryu, Yu-Soon Park

*Kyunggi Veterinary Service Laboratory  
Department of Veterinary Medicine, Konkuk University\**

### Abstract

In order to establish a sensitive and specific diagnostic method for detection of antibody to *Salmonella pullorum*, a enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was designed and standardized. The diagnostic efficacy of the established ELISA was compared with that of the serum plate agglutination test and immunodiffusion test for pullorum disease.

1. The chicken hyperimmune sera to *Salmonella pullorum*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium* and *S. typhi* were shown the cross reaction to *S. pullorum* antigen by serum plate agglutination test.

2. When compared the cross reaction titer of microplate agglutination test for chickens hyperimmune sera, it was found that the titer were 64 in *S. pullorum*, 32 in *S. gallinarum*, 4 in *S. typhimurium* and 8 in *S. typhi*, respectively.

3. When compared the specificity of various antigen(HA, EA, PA and SA) by the immunodiffusion test, the most suitable antigen was phenol-treated bacterium.

4. The optimal concentration of *S. pullorum* antigen for ELISA was 1 : 160 dilution of bacterium.

5. The efficacy of the ELISA for detection of *S. pullorum* antibody was compared with serum plate agglutination test and immunodiffusion test in chickens infected with *S. pullorum*. The antibody was first detected at 6 days after infection using three tests examined. The antibody was all detected at 9 days by ELISA, at 12 days by serum plate agglutination test, at 15 days by immunodiffusion test.

---

Key words : *Salmonella pullorum*, ELISA, Immunodiffusion test

## 서 론

추백리는 *Salmonella pullorum*의 감염에 의하여 발생하는 질병으로서 어린 닭에 백색설사와 높은 폐사율을 일으키는 조류에 발생하는 전염병이다<sup>1,2)</sup>.

*S pullorum*은 닭에 감염하여 림프구 등 세포내에 존재하며 감염체는 보균계로 되어 난을 통한 수직전파 및 접촉에 의한 수평감염 등을 일으키는 원인체가 된다<sup>3-5)</sup>. 치료약제로는 sulfamide, nitrofurane계, chloramphenicol 등이 있으나 동물용 약품의 안전사용기준에 따라 일부 사용금지 및 제한이 되어 있고 균의 특성상 약제내성이 쉽게 일어나 치료 및 근절이 어려운 질병으로 알려져 있으며 또한 숙주의 특이성이 높아 *S gallinarum*과 더불어 조류에만 감수성이 있는 질병이다<sup>6,7)</sup>.

본 병은 1899년 최초 보고된<sup>8)</sup> 이래 1900년대 초기에 전 세계적으로 발생하여 양계산업에 막대한 경제적 손실을 주었으며 최근까지도 국내외에서 지속적으로 발생하고 있어 추백리의 근절을 위하여 세계적으로 양성계를 검색, 도태하는 방법을 실시하고 있고<sup>1,9-13)</sup>, 우리나라에서도 법정전염병으로 정하여 방역을 실시하고 있으며 국가 방역계획에 따라 중계를 대상으로 매년 정기적인 검색을 실시, 살처분하는 정책을 취하고 있다<sup>14)</sup>.

추백리는 보균계에서 균 분리가 어렵고 분리율이 낮아 혈청학적 검사로 진단을 실시하고 있으며<sup>12)</sup> 혈청학적 진단법으로는 평판응집반응법<sup>15,16)</sup>, 시험관응집반응법<sup>17-21)</sup>, 면역확산반응법<sup>22)</sup>, 효소면역시험법(ELISA)<sup>11,23)</sup> 등이 보고되어 있으나 우리나라에서는 혈청평판응집반응법만으로 검사를 실시하고 있다<sup>14)</sup>.

평판응집반응법은 술식이 간단하고 다량을 검사할 수 있다는 장점이 있으나 유사 균종들과 비특이반응이 많이 발생한다는 단점 등이 있어 이에 대한 방법의 개선이 필요하다<sup>5,22,24)</sup>.

국내에서 *Salmonella*균의 분리 및 이들의 생화학적 특성 및 유전자 분석 등은 광범위하게 연구되어 있으나<sup>25-30)</sup> Fowltyphoid 등 기타 *Salmonella*균과의 비특이반응 등에 대한 연구는

매우 미진한 실정으로 이에 대한 연구를 필요로 하고 있다<sup>31,32)</sup>. 특히 추백리에 대한 혈청학적 진단방법에 대한 연구는 매우 미진하고<sup>22)</sup>, ELISA를 이용한 추백리 검사법은 국내에서 연구 및 보고가 되어 있지 않아 이에 대한 연구 및 개발을 필요로 하고 있다.

그람음성균의 세포막성분인 lipopolysaccharide(LPS) 및 polysaccharide 등은 체액성 면역 및 식균작용 등에 관여하고 특히 항원성 및 면역원성이 높은 것으로 알려져 있으며<sup>3,33)</sup>, 이들 성분은 phenol, ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), 가열 등에 의해 처리 되었을 때 세포막으로부터 방출되는 것으로 보고되어 있다<sup>23)</sup>. 최근 이들 세포막 구성성분을 통한 병원성 기전 등에 대한 연구가 이루어지고 있으며<sup>34)</sup>, 또한 그람음성균의 이들 성분을 이용한 질병의 진단법들이 개발, 응용되고 있다<sup>35)</sup>. 특히 이들을 이용한 ELISA는 항체의 검출에 특이성 및 감수성이 매우 높을 뿐만 아니라<sup>11,24)</sup>, 술식이 간편하고 대량 검사할 수 있다는 잇점 때문에 최근 여러 감염성 질병검사에 많이 이용되고 있는 진단법이다<sup>36-39)</sup>.

이러한 ELISA를 이용하여 미국 및 유럽에서는 *Salmonella*병의 검색 및 항원 분석에 대한 연구가 지속적으로 수행 되고 있어 국내에서도 이를 이용한 *Salmonella* 감염증 등 여러 질병의 진단법으로 적용하는 연구를 필요로 하고 있다.

본 연구는 닭에서 *S pullorum*의 항체를 검출하는 현행의 혈청평판응집반응법을 보완하고자 ELISA를 이용한 *S pullorum*의 항체검출법을 고안하였으며, 혈청평판응집반응법에서 각종 *Salmonella* 항혈청의 반응성을 조사하고 표준화된 ELISA를 혈청평판응집반응법과 항체 검출효능을 비교 실험하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주 및 균 부유액 제조

경기도축산위생연구소에서 병성감정 가검물로부터 분리하여 보관중인 *S pullorum*, *S gallinarum*, *S typhimurium* 및 *S typhi*의 4개 균주를 tryptic soy agar에 접종 37°C에서 48시간 배양한

후 멸균생리식염수로 채균하여 12,000g에서 20분간 원심세척(3회)한 후 0.5% formalin saline으로 사균시키고, ml당 100mg 농도로 부유시켜 냉장보관 하였다.

#### 면역혈청 제조 및 균 접종시험

*Salmonella* 균종에 대한 닭 면역혈청 제조 : *S pullorum*, *S gallinarum*, *S typhimurium* 및 *S typhi*를 균주별로 항원을 5mg/ml 되게 조정 한 후 닭의 피하와 근육으로 1.5ml씩 5일 간격으로 3회 접종하고 최초 주사 후 5일 간격으로 채혈하여 항체의 생성유무를 확인하였으며 최종 주사 후 7일에 전혈을 채혈하여 혈청분리 및 56°C에서 30분 비동화시켜 4°C에 보관하며 시험에 사용하였다.

균 접종시험 : *S pullorum* 항체가 없는 40일령 닭에 경구로  $2 \times 10^6$ cfu/ml의 *S pullorum* 균액을 2ml 접종하고 3일 간격으로 채혈하여 항체가의 변화를 측정하였다.

#### 혈청평판응집반응법

농림부에서 정한 추백리 검사방법에 따른<sup>14)</sup> 표준법으로 실시하였다. 항원은 평판응집반응용 항원(녹십자)을 사용하여 혈청과 항원을 0.03 ml씩 적하하여 유리봉으로 교반하고 1분내에 응집유무를 확인하였다.

#### Microplate 응집반응법

심 등<sup>34)</sup>의 MAT 방법을 응용하여 수행하였다. 약술하면 항원의 농도는 5mg/ml, 1mg/ml, 0.5 mg/ml 및 0.1mg/ml되게 농도를 조정하여 수행하였으며, 각 혈청은 microplate(U-bottomed 96 well microplate : Corning)에 배수 희석법으로 하여 0.05ml 되게 희석한 다음 동량의 항원을 가하고 습윤상자에 넣고 37°C에서 18시간 반응시킨 후 응집을 나타내는 최종혈청 희석배수의 역수를 응집가로 하였다.

#### 항원 추출시험

가열항원 제조 : 최 등<sup>22)</sup>의 방법에 준하여 추

출하였다. 균 부유액을 12,000g로 원심하여 10% 균 부유액으로 만들어 100°C에서 4시간 가열하여 12,000g에서 20분 냉장원심한 후 상층액을 항원으로 사용하였다.

#### EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)

처리항원 제조 : Nicolet 등<sup>40)</sup>의 방법에 준하여 제조하였다. 균 부유액(100mg/ml)을 침전하여 침전된 균량의 40배의 5mM EDTA로 부유시켜 37°C에서 4시간 교반한 후 12,000g에서 20분 동안 냉장원심하여 0.2µm size 여과기에 여과한 후 -70°C에 보관하며 항원으로 사용하였다.

**Sonication** 항원 제조 : Barrow 등<sup>23)</sup>의 방법에 준하여 제조하였다. 0.01M phosphate buffer saline(pH 7.4)로 균 부유액(2mg/ml)을 만들어 sonicator를 이용하여 3분동안 파쇄한 후 12,000g에 30분 원심하여 상층액을 항원으로 사용하였다.

**Phenol** 처리항원 제조 : Barrow 등<sup>23)</sup>의 방법에 준하여 제조하였다. 균 부유액(DW ml 당 10mg)에 10배량의 -20°C의 아세톤을 넣은 후 -20°C에서 1시간 정지한 다음 상층액을 제거하고 침전물 5배분량의 아세톤으로 washing하여, 건조시킨 후, 유발에 마쇄한 다음 65°C의 DW로 6% (w/v)되게 부유시켜 90% phenol을 동량 첨가하였다(65°C). 이를 5분동안 교반한 후 4°C로 냉각하여 1,000g에서 60분, 원심하고 상층액을 48시간 DW로 투석하여 항원으로 사용하였다.

#### 면역확산반응법

Cullen 등<sup>41)</sup>의 방법을 응용하여 실시하였다. 가열 용해시킨 agar(1% purified agar, 0.016M barbital sodium, 0.03M barbital chloride, 8.5% sodium chloride : pH 7.4)를 87mm×15mm petri dish에 20ml씩 분주 응고시킨 후 gel-puncher를 이용해 직경 3mm 구멍을, 6mm 간격으로 punching하여 micropipette로 항원과 혈청을 0.02ml씩 주입하여 습윤상자에 넣은 후 48~72시간(실온) 반응시켜 침강선 유무를 관찰하였다.

## 효소면역시험법(ELISA)

*S pullorum*의 항체를 검출하기 위한 ELISA는 Voller 등<sup>42)</sup>의 방법에 따라 표준화하였다.

약술하면 항원을 carbonate buffer(pH 9.5)를 이용하여 항원농도를 시험목적에 따라 10~2, 560배로 희석하고 이것을 microplate(96well, Costar)에 50 $\mu$ l씩 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 흡착시켰다. 그리고 0.05% tween 20 PBS로 3회 세척하여 5% bovine serum albumin PBS 200  $\mu$ l을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 blocking한 후 세척액으로 3회 세척하였다. 혈청은 0.05% tween 20 PBS에 400배 희석하여 100 $\mu$ l씩 주입하였다. 또한 시료 1개당 2회 반복 실시하였으며, 혈청을 주입하지 않은 blank well을 두었고 시료는 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 3회 세척하여 100 $\mu$ l의 peroxidase conjugated rabbit antichickens IgG(Sigma) 1,000배액을 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 다시 세척하였다. 그리고 발색지시 substrate로 citrate buffer(OPD 0.4mg/ml, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 $\mu$ l/ml)를 50 $\mu$ l 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 15분 반응시킨 후 2.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 정지시켜 492nm에서 ELISA reader로 OD치를 측정 하였다.

## 결 과

### 혈청평판응집반응법에 의한 닭 면역혈청간의 교차반응 비교

혈청평판응집반응법으로 *Salmonella* 각 균주별 특이성을 시험 하기위해 *S pullorum*, *S gallinarum*, *S typhimurium*, *S typhi*로 면역시킨 닭 혈청에 대해 *S pullorum* 평판응집반응용 항원(녹십자)으로 혈청평판응집반응법을 실시한 바(Photo 1) 혈청평판응집반응 결과는 동종혈청인 *S pullorum*을 비롯한 *S gallinarum*, *S typhimurium* 및 *S typhi*의 면역혈청과 교차응집반응을 나타내 *S pullorum* 평판응집반응용 항원이 본 실험에서 사용한 모든 *Salmonella* 균종과 교차반응이 있는 것을 확인하였다.

### 닭 면역혈청에 대한 microplate 응집반응

Microplate 응집반응에서 항원의 적정농도를 정하고 반응의 특이성을 규명코저 5, 1, 0.5, 0.1 mg/ml 농도의 항원에 대해 닭 면역혈청으로 교차반응을 실시한 결과, 항원농도 5mg/ml에서는 *S pullorum*과 *S gallinarum* 면역혈청에서 역가가 32배, *S typhimurium*이 4배, *S typhi*가 8배로 각각 나타났다(Table 1).

Table 1. Cross agglutination test of chicken hyperimmune serum of various concentration of antigen

Chicken hyperimmune serum	Antigen concentration (mg/ml)			
	5	1	0.5	0.1
<i>S pullorum</i>	32*	64	64	32
<i>S gallinarum</i>	32	32	64	32
<i>S typhimurium</i>	4	4	8	8
<i>S typhi</i>	8	8	16	8
Control	-	-	-	-

\* The number represents the reciprocal of the highest serum dilution showing agglutination

항원농도 1mg/ml에서는 *S pullorum* 면역혈청이 64배, *S gallinarum* 면역혈청이 32배, *S typhimurium* 면역혈청이 4배, *S typhi* 면역혈청이 8배(Photo 2), 항원농도 0.5mg/ml에서는 *S pullorum* 및 *S gallinarum* 면역혈청이 64배, *S typhimurium*이 8배, *S typhi*가 16배이었고, 항원농도 0.1mg/ml에서는 *S pullorum* 및 *S gallinarum* 면역혈청이 32배, *S typhimurium* 및 *S typhi*가 8배로 나타났다.

따라서 반응성이 가장 높고 교차반응이 적으며 판독이 용이하였던 1mg/ml를 microplate 응집반응의 항원농도로 정하였다.

### *S pullorum* 항체 검출을 위한 ELISA의 표준화

제조 항원의 특이성 비교: 본 실험에서 제조한 각 항원(HA, EA, PA 및 SA)에 대한 특

이성을 조사하기 위해 면역확산반응법을 이용하여 각 균주별 면역혈청과 교차반응을 실시한 바(Photo 3), 가열항원은 동종혈청인 *S pullorum*을 비롯하여 *S gallinarum*, *S typhimurium* 등과 교차반응을 보였다.

EDTA 처리항원은 *S gallinarum*, *S typhi*와 교차반응이, sonication항원은 *S gallinarum*, *S typhimurium*, *S typhi*와 교차반응이, 그리고 phenol 처리항원은 *S gallinarum*과 교차반응이 나타나 본 실험에서 제조한 항원중 phenol 처리항원이 타 균종과 비특이 반응이 가장 적은 것으로 나타나 본 실험에서의 ELISA 항원으로 사용하였다.

항원의 적정 희석농도 : 본 실험에서 항원(PA)의 적정 농도를 정하기 위하여 항원을 단계별로 희석하여 *S pullorum* 면역혈청 및 *S pullorum* 음성혈청과의 반응성을 시험한 바 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다.

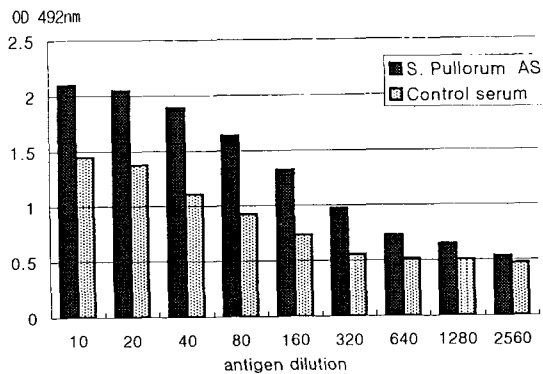


Fig 1. Effect of antigen concentration on the ELISA in comparison with *S pullorum* hyperimmune serum and control serum  
\* AS : antiserum

공시한 항원을 10배에서 2,560배까지 희석하여 사용했을 때 optical density(OD)가 *S pullorum* 면역혈청은 항원의 10배 희석에서 2.10, 20배에서 2.048, 40배에서 1.892, 80배에서 1.638, 160배에서 1.326, 320배에서 0.970, 640배

에서 0.725, 1,280배에서 0.644, 2,560배에서 0.532로 각각 나타났다.

*S pullorum* 음성혈청에서는 항원의 10배희석에서 1.445, 20배에서 1.374, 40배에서 1.107, 80배에서 0.923, 160배에서 0.732, 320배에서 0.552, 640배에서 0.513, 1,280배에서 0.502, 2,560배에서 0.468로 각각 나타나 *S pullorum* 면역혈청과 음성혈청의 OD치의 차이가 가장 높은 160배의 항원농도를 본 실험의 적정항원 농도로 정하였다.

#### ELISA에 의한 Salmonella 균종의 면역혈청 반응비교

본 실험에서 표준화한 ELISA의 특이성을 확인하기 위해 *S pullorum*, *S gallinarum*, *S typhimurium* 및 *S typhi* 각 균주의 면역혈청과 반응시킨 결과는 Fig. 2와 같다.

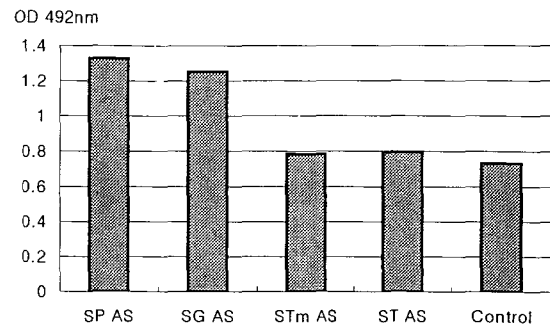


Fig 2. ELISA of various hyperimmune serum for phenol extract antigen on *S pullorum*

\* SP AS : *S pullorum* antiserum, SG AS : *S gallinarum* antiserum  
STm AS : *S typhimurium* antiserum, ST AS : *S typhi* antiserum

*Salmonella* 균종에 대한 각 면역 혈청의 OD치를 비교한 바 *S pullorum*에서는 1.326, *S gallinarum*에서는 1.254로 나타나 이들의 OD치가 높았으며, *S typhimurium*과 *S typhi*에서는 각각 0.785, 0.797, 음성혈청은 0.732이었다.

## ELISA와 혈청평판응집반응법과의 항체 검출능 비교

본 실험에서 표준화한 ELISA의 항체검출 효능을 확인하기 위해 닭 3수에 *S pullorum*을 인공감염시킨 후 3일 간격으로 채혈하여 혈청 평판응집반응법과 ELISA 역가를 비교한 결과는 Table 2와 같다.

혈청평판응집반응법에서는 인공감염후 6일에 3수중 1수에서 검출되기 시작하여 9일에 2수, 12일에 3수에서 양성으로 검출되었고, 면역확산반응법에서는 감염후 6일에 1수, 9일에 1수, 12일에 2수가 양성으로 검출되었고, 15일부터 3수가 양성으로 검출되었으며, ELISA에서는 감염 후 6일에 1수가 양성으로 검출되기 시작하여 9일부터 3수가 양성으로 검출되어 *S pullorum* 항체검출의 민감성이 혈청평판응집반응법 및 면역확산반응법보다 ELISA가 비교적 높은 것으로 나타났다.

## 고 찰

추백리에 감염되면 어린병아리에서 패혈증에 의한 급사 및 백색설사를 일으키며 성계에서는 난소의 퇴행성 변형 및 복막염을 일으키며 특

히 만성의 보균계가 되어 주요한 전염원의 역할을 하게 된다<sup>14)</sup>.

우리나라에서는 본 질병의 방역을 위해 혈청평판응집반응법을 이용하여 종계에 대해 매년 정기검색을 실시하고 있으나 검사시 가양성 반응 등 시술자의 숙련도에 따라 판정 결과가 일정하지 않아 추백리 검사법의 보다 과학적인 방법을 필요로 하고 있다.

박 등<sup>32)</sup>은 *S gallinarum* 감염계로 확인된 닭 5수의 혈청을 추백리 진단액으로 평판응집반응을 실시한 결과 모두 양성반응을 나타내 추백리 검사시 교차반응이 발생하는 것으로 보고한 바 있고, 본 연구에서도 혈청평판응집반응법은 *S gallinarum*, *S typhimurium* 및 *S typhi*의 균종과 교차반응이 나타났으며, micropate 응집반응법을 통한 각 균종의 면역혈청에 대한 교차반응 역가검사를 실시한 바 *S gallinarum*은 32배, *S typhimurium* 4배, *S typhi* 8배로 이들 면역혈청 사이에 교차반응이 나타나 응집반응을 이용한 검사로는 *S pullorum* 감염을 확인하기 어려운 것으로 나타났다.

*S pullorum*의 항원성상에 대한 연구는 여러 학자들에 의해 연구<sup>23,38)</sup>된 바 감염동물의 면역 반응을 일으킬 수 있는 주요 항원 물질로는

Table 2. Comparison of the ELISA reaction and serum plate agglutination test in infected chicken to *S pullorum*

Days after inoculation	No of chicken tested	Serum plate agglutination test	Immuno-diffusion test	ELISA
1	3	0/3*	0/3	0/3
3	3	0/3	0/3	0/3
6	3	1/3	1/3	1/3
9	3	2/3	1/3	3/3
12	3	3/3	2/3	3/3
15	3	3/3	3/3	3/3
18	3	3/3	3/3	3/3
21	3	3/3	3/3	3/3
24	3	3/3	3/3	3/3
27	3	3/3	3/3	3/3
30	3	3/3	3/3	3/3

\* Positive reactor/No of chicken tested

cell envelope 성분인 capsular polysaccharide, lipopolysaccharide(LPS) 그리고 outer membrane protein 등이 있음이 보고 되었으며<sup>5,33)</sup> 이중 polysaccharide, LPS는 항원항체 검출시험에 적합한 항원으로 알려져 있어 이들 성분을 열처리, sonication, EDTA 및 phenol 등으로 추출하였으며, 추출한 항원의 특이성을 확인하기 위해 면역확산반응법으로 면역혈청과의 반응성을 조사한 바, phenol을 이용한 추출항원이 열처리 등을 이용하여 추출한 항원 보다 *S typhi* 및 *S typhimurium*과의 교차반응이 없었고, 모든 제조항원에서 *S gallinarum*과 교차반응이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 *S pullorum*과 *S gallinarum*은 여러학자들에 의해 group D에 속하며 항원구조가 O<sub>1,9,12</sub>로 동일하여 항원의 성상이 유사하며<sup>32, 43)</sup> 혈청학적검사로 이들을 구분하기 어려워 혈청학적검사로 양성으로 나타난 경우 균분리, 생화학적 등의 방법으로 구별해야 한다고 주장한 바 있고<sup>1,30,44-46)</sup>, 이들의 유사한 항원성상으로 세포막 구성성분을 이용한 ELISA 등 혈청학적 검사로는 본 연구에서와 마찬가지로 *S pullorum* 및 *S gallinarum* 두 균종사이에 교차반응을 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Barrow 등<sup>23)</sup>은 LPS를 이용한 ELISA는 *S typhimurium* 등 다른 Smonella serotype과 감별할 수 있다고 하였고, Berchieri 등<sup>11)</sup>은 ELISA가 평판응집반응법보다 특이도가 높고 가양성을 제거할 수 있다고 하였고, 본 실험에서도 LPS의 정제항원을 이용한 ELISA는 *S gallinarum* 이외의 균과는 교차반응을 줄일 수 있다는 것이 확인 되었다.

*S gallinarum*의 감염에 의한 fowl typhoid의 경우 질병 특성상 추백리와 전파양식 및 발병으로 인한 피해가 유사하여 유럽 일부 국가에서는 이들 질병에 대한 진단 및 방역을 동일하게 하는 것으로 알려져 있으며<sup>1)</sup> 국내에서도 fowl typhoid는 법정전염병으로 정하여 추백리에 준하는 방역을 실시하고 있다. 또한 국내에서 돼지 등 가축의 살모넬라 감염증을 유발하는 *S typhimurium*, *S choleraesuis* 및 *S enteritidis*의 항체를 동시에 검출하는 방법이 연구되고 있어<sup>47)</sup> 닭에서

*S pullorum* 및 *S gallinarum*의 항체가 함께 검출되는 것은 닭의 살모넬라 감염증 예방 및 방역에 효과적인 것으로 사료된다.

본 실험에서 *S pullorum* 인공감염계에서 혈청평판응집반응법, 면역확산반응법과 ELISA에 대한 항체검출 효과를 비교한 바, 이들 반응법 중 ELISA와 혈청평판응집반응법이 민감성이 높고 면역확산시험법은 비교적 낮은 것으로 확인되었다.

이상의 본 실험에서 얻어진 일련의 결과를 보면 ELISA가 혈청평판응집반응법이나 면역확산반응법보다 특이성과 민감성이 높은 것으로 나타나 항원의 분석정제 등 보다 많은 시험결과를 추가하고 특히 *S pullorum*과 *S gallinarum*에 대한 특이 항원분석에 대한 지속적인 연구가 요구되며 이러한 시험을 보완하여 ELISA 등의 검사를 실시 할 경우 추백리 감염계를 효과적으로 검출할 것으로 사료된다.

## 결 론

1. *S pullorum* 항원에 의한 혈청평판응집반응 결과 동종혈청인 *S pullorum*의 면역혈청을 비롯해서 *S gallinarum*, *S typhimurium*, *S typhi*의 모든 면역혈청에서 응집반응이 관찰되었다.
2. 각 균종의 면역혈청에 대한 교차반응 역가를 확인하기 위해 microplate 응집반응을 실시한 바 *S pullorum* 면역혈청에서 64배, *S gallinarum* 면역혈청에서 32배, *S typhimurium* 면역혈청에서 4배, *S typhi* 면역혈청에서 8배로 나타났다.
3. 제조한 각 항원(HA, EA, PA 및 SA)의 *S pullorum*에 대한 특이성을 조사하기 위해 면역확산반응법을 이용하여 각 면역 혈청과 교차반응을 실시한 바 phenol 처리항원에서 특이성이 가장 높았다.
4. 추백리의 ELISA에서 항원의 적정농도를 정하기 위해 항원을 10~2,560배로 희석하여 비교 시험한 바 적정항원 희석배수는 160배인 것으로 나타났다.
5. ELISA와 혈청평판응집반응법 및 면역확산 반응법의 항체 검출효능을 비교한 바 모든 반

응법에서 인공감염 후 6일부터 항체가 검출되기 시작 하였으며 ELISA에서는 9일에, 혈청평판 응집반응법에서는 12일에, 면역확산반응법에서는 15일에 3수 모두가 양성으로 검출되었다.

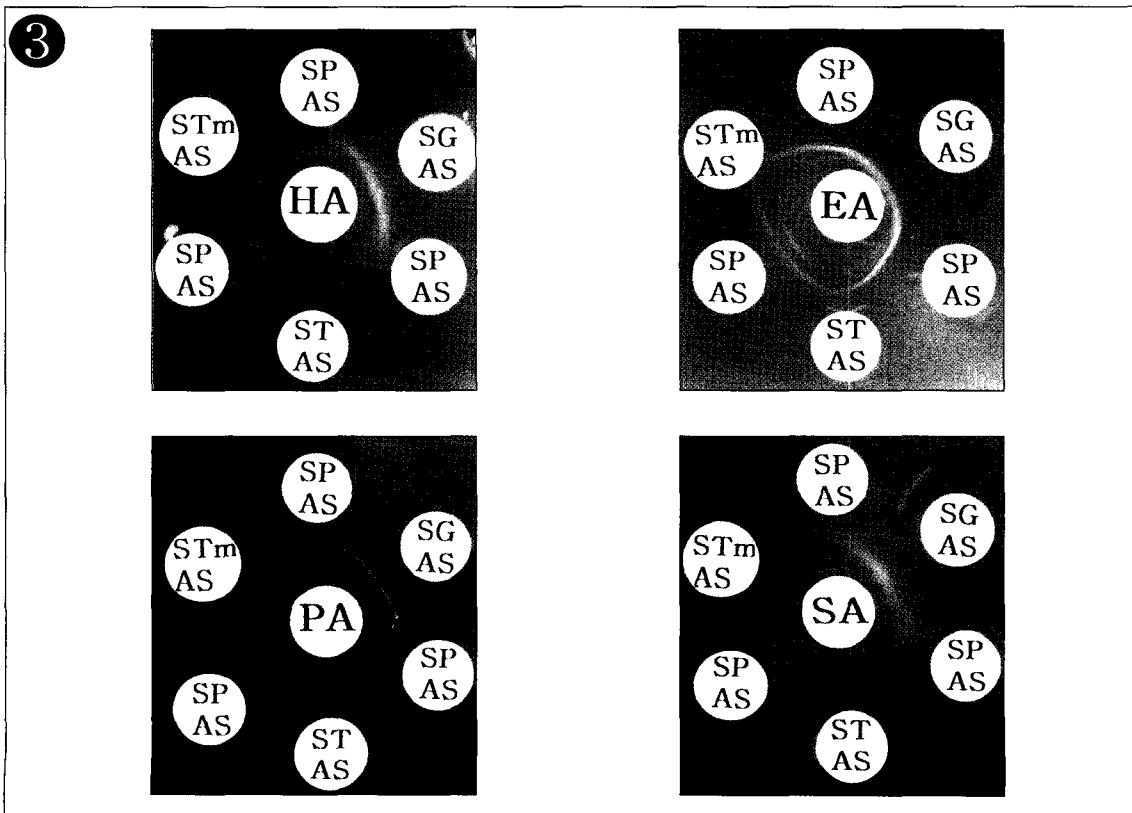
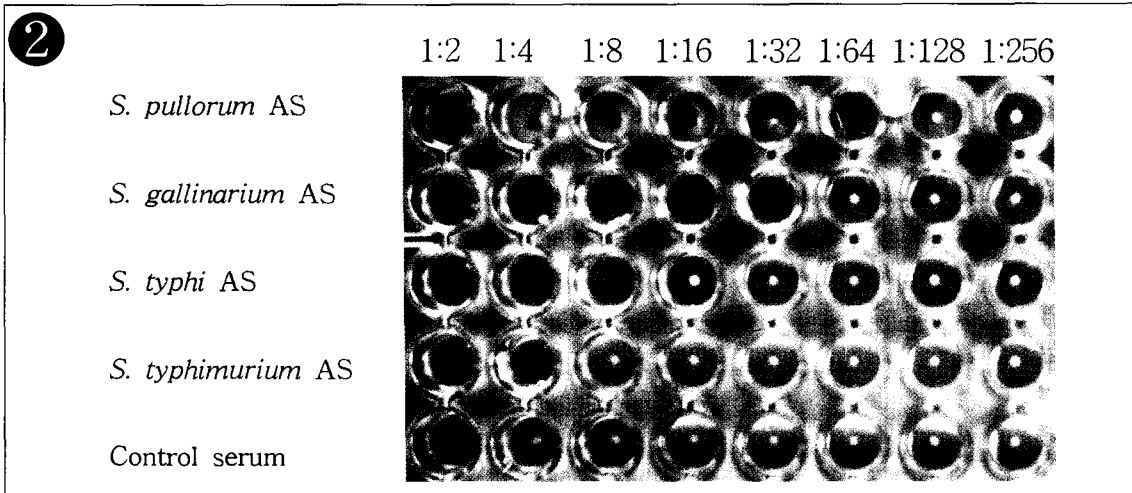
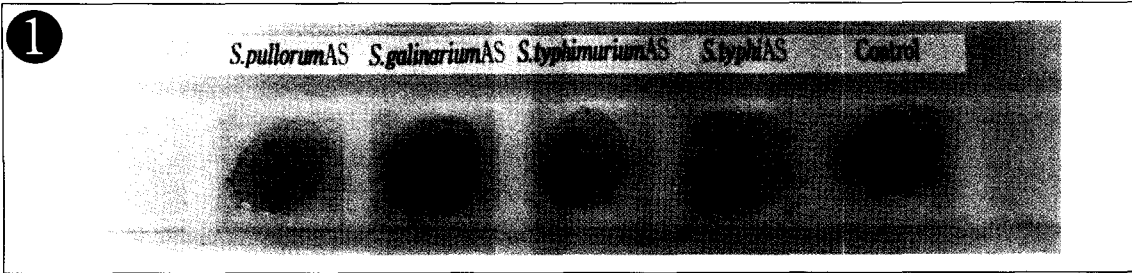
### Legends for Photos

- Photo 1. The reaction of serum plate agglutination test for various hyperimmune serum of *S pullorum* plate agglutination antigen.  
AS : antiserum
- Photo 2. The reaction of microplate agglutination test for various hyperimmune serum.  
AS : antiserum
- Photo 3. The reaction of immunodiffusion test for specificity of various antigen.  
HA : heat treat antigen  
EA : EDTA treat antigen  
PA : phenol extrated antigen  
SA : sonication antigen  
SP AS : *S. pullorum* antiserum  
SG AS : *S. gallinarium* antiserum  
ST AS : *S. typhi* antiserum  
STm AS : *S. typhimurium* antiserum

### 참고문헌

1. Calnek BW, John BH, Beard CW, et al. 1991. *Disease of poultry* 9ed. Iowa State University Press.
2. 농림부. 1992. 질병진단 및 예방약 지침(II).
3. Williams JE, Dillard LH, Hall GO. 1968. The penetration patterns of *Salmonella typhimurium* through the outer structures of chicken eggs. *Avian Dis* 12 : 445~466.
4. Biberstein EL, Zee YC. 1990. *Review of veterinary microbiology*. Blackwell Scientific Publications.
5. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 1988. *Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals* 8ed. Cornell University Press.
6. Francis DW. 1960. Treatment of natural infection of *Salmonella pullorum* in day-old chicks with furazolidone. *Avian Dis* 4 : 63~73.
7. 최원필, 이희석, 여상건 등. 1989. 소, 돼지에서 분리한 *Salmonella* 유래 R plasmid의 유전학적 및 분자생물학적 성상에 관한 연구 II. R plasmid의 비적합성 및 plasmid profile. *대한수의학회지* 29(2) : 59~67.
8. Rettger LF. 1909. Further studies on fatal septicemia in young chickens or "white diarrhea". *J Med Res* 21 : 115~123.
9. Bouzoubaa K, Nagaraga KV, Newman JA, et al. 1987. Use of membrane protein from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chicken *Avian Dis* 31 : 699~704.
10. Sato Y, Sato G. 1997. Status of *Salmonella gallinarum-pullorum* infections in pullo- rum infection in Zambia. *Avian Dis* 41 : 490~495.
11. Berchieri AJ, Iba AM, Barrow PA. 1995. Examination by ELISA of sera obtained from chicken breeder and layer flocks showing evidence of fowl typhoid or pullo- rum disease. *Avian Pathol* 24 : 411~420.
12. 김영환, 김경희, 우용구 등. 1997. 경북 지방유래 추백리 양성계에서의 균분리 및 혈청역가 추이. *한가위지* 20(1) : 19~26.
13. 농림부. 1989~1997. 농수산통계연보.
14. 추백리방역실시요령. 1995. 농림수산부 고시(제95-99호).
15. Schaffer JM, MacDonald AD, Hall W J, et al. 1931. A stained antigen for the rapid whole blood test for pullorum disease. *JA-VMA* 79 : 236~240.
16. Runnells RA, Coon CJ, Farey H, et al. 1927. An application of the rapid method agglutination test to the diagnosis of bacillary





- white diarrhea infection. *JAVMA* 70 : 660~667.
17. Thain JA, Blandford TB. 1981. Alongterm serological study of flock of chickens naturally infected with *Salmonella pullorum*. *Vet Rec* 109 : 136~138.
  18. Anonymous. 1933. Report of conference of official research workers in animal disease of North America on standard methods of pullorum disease in barnyard fowl. *JAVMA* 82 : 487~491.
  19. Pevzner IY, Stone HA, NordskogAW. 1981. Immune for high and disease resistance in chickens : I. Selection for high and low titer to *Salmonella pullorum* antigen. *Poultry Sci* 60 : 920~926.
  20. Jones FS. 1913. The value of the macroscopic agglutination test in detecting fowls that are harboring bacterium pullorum. *J Med Rec* 27 : 481~495.
  21. Thaxton P, Williams JE, Siegel HS. 1970. Microtitration of *Salmonella pullorum* agglutinins. *Avian Dis* 14(4) : 813~816.
  22. 최재윤, 이시영, 이창구. 1970. 닭의 추백리병에 관한 연구 I. 추백리 진단에 있어서 혈청응집과 Agar-gel 침강반응과의 비교시험. *대한수의학회지* 10(2) : 1~6.
  23. Barrow PA, Berchieri AJ, Al-Haddad O. 1992. Serological response of chickens to infection with *Salmonella gallinarum-pullorum* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 36 : 227~236.
  24. Ronald HL, Rosanne PB, Joseph EW. 1981. Detection of *Salmonella* infection by polyvalent Enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 14(3) : 281~287.
  25. 강신명, 최성민, 김은정 등. 1994. 돼지분변에서 분리한 살모넬라 속균의 생물학적특성 및 항균제 감수성. *한국수의공중보건학회지* 18(1) : 15~22.
  26. 윤은선, 박석기, 문현철 등. 1993. 동물원의 야생동물 분변에서 분리한 살모넬라균과 대장균의 생물형, 혈청형 및 약제내성에 관한 연구. *한가위지* 16(1) : 41~50.
  27. 오강희, 최원필. 1994. 초생추 유래 *Salmonella*속 균의 생물학적 특성. *대한수의학회지* 34(3) : 501~510.
  28. 박두희, 김원용, 김철중 등. 1994. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella*속 균의 검출. *대한수의학회지* 34(1) : 115~125.
  29. 박노찬, 최원필, 이희석. 1990. 비둘기와 수생조류에서 분리한 *Salmonella*속 균의 혈청형 및 생물형. *대한수의학회지* 30(2) : 193~201.
  30. 박경윤, 예재길, 박석기. 1994. 가금류에서 분리한 *Salmonella*속 균의 특성. *한국수의공중보건학회지* 18(2) : 107~116.
  31. 이희수, 김순재, 김기석 등. 1997. 국내 분리주 *Salmonella gallinarum*의 닭에 대한 병원성. *대한수의학회지* 37(3) : 569~576.
  32. 박노찬, 도재철, 조광현 등. 1995. 닭 티푸스의 발생상황과 *Salmonella gallinarum*의 항균제 감수성. *한가위지* 18(2) : 113~123.
  33. Kuusi N, Nurminen M, Saxen H, et al. 1981. Immunization with major outer membrane protein preparations in experimental murine Salmonellosis : Effect of lipopoly sacchiride. *Infect Immun* 4 : 328~332.
  34. 심항섭, 우종태, 조중현 등. 1994. 돼지에서 *Actinobacillus plueropneumoniae*의 혈청학적 진단법에 대한 비교연구. *한가위지* 17(2) : 95~113.
  35. 심항섭, 국정희, 정봉수 등. 1998. 효소 면역법을 이용한 *Brucella abortus* 항체 검출에 관한 연구. *한가위지* 21(2) : 107~115.
  36. Carlsson HE, Lindberg AA, Hammarstrom S. 1972. Titration of antibodies to *Salmonella* O antigens by enzymelinked immunosorbent assay. *Infect Immun* 6 : 703~708.
  37. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. 1976. *Enzyme immunoassays in diagnosticmedicine*.

- Bull World Health Organ 53 : 55~65.
38. Rigby CE. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Salmonella* lipopolysaccharide in poultry specimens. *Appl Environ Microbiol* 47(6) : 1327~1330.
  39. Barrow PA, Hassan JO, Mockett AP A, et al. 1989. Detection of *Salmonella* infection by ELISA. *Vet Rec* 125 : 586.
  40. Nicolet J, Paroz P, Krawinkler M, et al. 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Rec* 42(12) : 2139~2142.
  41. Cullen GA, Wyeth PJ. 1975. Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. *Vet Rec* 97 : 315.
  42. Voller A, Bidwell DE, Bertlett A. 1979. *The enzyme-linked immunosorbent assay : A guide with abstracts of microplate applications*. Dynatech Europe Brough House.
  43. Krieg N, Holt JG. 1984. *Bergey's manual of systemic bacteriology*. 9ed. Williams and Wilkin London.
  44. Trabulsi LR, Edwards. 1962. The differentiation of *Salmonella pullrorum-gallinarum* by biochemical methods. *Cornell Vet* 52 : 563~569.
  45. 김기석, 이희수, 모인필. 1993. 국내 닭에서의 Fowl typhoid 발생 및 원인균 분리. *대한수의학회지* 33(4) : 76.
  46. Ewing WH. 1986. *Edwards and Ewing's identification of enterobacteriae*. 4 ed.
  47. 이희수, 임숙경, 우승용 등. 1997. ELISA법을 이용한 주요 살모넬라균 항체검출. *대한수의학회지* 37(3) : 22~23.