

경남지역에서 발생한 가금티푸스의 역학적 특성 및 진단방법에 대한 비교 시험

최유정, 김도경, 김용환*

경상남도축산진흥연구소, 경상대학교 수의과대학*

Epidemiological characteristics on fowl typhoid outbreak in Kyongnam province and comparison of diagnostic methods for identification of *salmonella gallinarum*

You-Jeong Choi, Do-Kyung Kim, Young-Hwan Kim*

*Kyongnam Livestock Development and Research Institute,
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University**

Abstract

An epidemiological survey was conducted to investigate fowl typhoid outbreaks in Kyungnam province of Korea. The causative agent, *salmonella gallinarum* was isolated from 68 chicken samples of tentatively diagnosed fowl typhoid cases occurred during the period from January 1996 to September 1999. Comparative studies were also carried out to evaluate the diagnostic methods for detection of *S gallinarum*. The results obtained were as follows;

1. Of the 68 cases of tentatively diagnosed fowl typhoid, 56 (82%) cases were determined as fowl typhoid by biochemical test and pathological findings. The other 12 (18%) cases were determined as paratyphoid.
2. Fowl typhoid outbreaks occur continuously all seasons in the year, however the incidence was remarkably increased from May to September.
3. The frequency of incidence of fowl typhoid in terms of regional distribution was relatively high in egg-laying hens facilities, and the mode of transmission is likely to be either egg-to-egg or lateral transfer by wild birds or rats.
4. All of 18 isolates from 56 cases were identified as *S gallinarum* by biochemical and serological test.
5. Antimicrobial drug susceptibility test against 18 isolates showed that the isolates were highly susceptible to AM, CZ, CF and GM (above 90%), whereas those strains were 100% resistant to EM, NA and PC.

6. *S. gallinarum* *rfbS* gene was targeted to be amplified by PCR for comparative detection of *S. gallinarum* in the experimentally infected chickens. The amplified 720bp DNA fragment, which is specific in D serogroup strains of *S. enterica* subspecies was confirmed by agarose gel electrophoresis.
7. A comparison made between fecal culture and PCR-method revealed that later-method was relatively higher in detection rate than that of former method for *S. gallinarum*.
8. Comparison of currently applied methods, rapid serum agglutination test (RST) and microplate agglutination test (MAT), with experimentally infected chickens were made to evaluate sensitivity of detection by neutralizing antibody titration. Both methods detected neutralizing antibodies from the challenged chickens of 5 day post infection. However, positive reactions were determined after 7 and 9 days post infection by MAT and RST, respectively.

Key words : *Salmonella gallinarum*, PCR, *rfbS* gene, RST, MAT

서 론

가금티푸스 (fowl typhoid, FT)는 닭 및 칠면조 등의 조류에서 발생하는 급·만성의 전염병으로 모든 일령에 나타나며, 패혈증을 주증으로 하여 높은 폐사율을 나타낸다¹⁾. 본 병의 병원체인 *salmonella gallinarum*은 그람음성, 단간균으로서 살모넬라속군 중 *S. pullorum*과 함께 운동성이 없는 것이 특징이며 혈청학적으로는 두 균종간의 감별이 어렵다^{2,3)}. FT는 일반적으로 어린 병아리에서 추백리와 거의 유사한 증상으로, 중추 및 성계에서는 간, 비장, 신장의 종대 및 충·출혈병변을 나타내며, 만성형의 경우 간은 녹갈색 또는 청동색(bronzed-liver)을 띄고, 미만성의 과사반점이 산재하며 비장의 종대가 현저하다^{4,5)}.

본 질병은 Kelin⁶⁾이 1888년 영국에서 처음으로 발생 보고한 이래 1900년대 초기에 전세계적으로 발생하여 양계산업에 막대한 손실을 주었다. 그후 대부분의 국가에서 추백리와 함께 국가적인 차원에서의 방역을 실시한 결과, 1980년대 이래로 미국에서는 야생조류에서의 일부 보고를 제외하고는 가금에서의 발생은 없으며, 영국에서도 가금에서는 본 병이 근절된 것으로 보고하고 있다. 그러나 멕시코, 중남미,

아프리카지역 및 우리 나라에서는 계절에 상관 없이 가금에서 폭발적으로 발생되고 있는 실정이다⁷⁻⁹⁾. 우리나라에서는 최 등¹⁰⁾이 *S. gallinarum*을 최초로 분리보고 한 이래 채란업계에서는 백색계통의 산란계에서 갈색계통으로 전환하여 사육하기 시작한 1992년 이후부터 본격적으로 FT가 다발한 것으로 추측하고 있다. 최근 들어서 FT에 대한 차단방역과 위생관리의 부실을 틈타 전국적으로 확산되고 있는 실정인어서 국내 채란계 산업 전체를 위협하고 있다¹¹⁾.

FT는 난계대전과를 하며 항균성 약제나 백신만으로 근절하기에는 불가능한 질병이기 때문에 양계선진국에서는 추백리-티푸스의 진단액을 이용하여 양성 보균계를 색출하여 철저히 도태시키는 정책을 꾸준히 추진해오고 있다^{7,8)}. 우리나라에서도 1933년 이래로 추백리-티푸스 진단액의 야외적용을 추진해온 결과 추백리 발생이 크게 감소되는 효과를 얻었지만, 1980년대에 추백리의 국가방역을 1990년대 들어서 농장자율방역으로 전환한 이후부터 추백리와 FT는 발생이 증가 추세에 있다^{10,11)}.

본 병과 추백리 검색을 위한 혈청학적 진단법으로 Jones 등¹²⁾에 의하여 시험관응집반응법 (macroscopic tube agglutination test)이 개발

된 이후, Schaffer 등¹³⁾은 염색항원을 개발함으로써 전혈평판응집법(whole-blood agglutination test)의 결과판독을 더욱 용이하게 하였다. 또한 혈청응집반응법¹⁴⁾, 형광항체법, ELISA 법¹⁵⁾ 및 latex agglutination법¹⁶⁾ 등이 개발되어 검사시간을 단축시키기는 하였으나, 균분리 동정법에 비하여 특이성이 떨어지며, 동일 균종 간에는 물론, 유사한 항원 결정기를 갖는 다른 세균종간에도 비특이 반응을 나타내는 단점들 때문에 보다 신속하고 특이성이 높은 진단법 개발이 절실히 요구되고 있다^{17,18)}.

최근 내열성 세균인 *thermus aquaticus*로부터 내열성 중합효소인 Taq DNA polymerase가 분리되고 또 복잡하던 중합효소연쇄반응(PCR) 술식의 자동화가 가능해지면서 분자생물학 분야에 획기적인 발전을 가져와 항원의 검출이 어려웠던 질병의 진단에 크게 기여해왔다. PCR 기법은 특이 염기서열에 대해서 일부만 알고 있어도 약 백만배 정도까지 표적 DNA를 증폭시킬 수가 있으므로 가검재료에 극미량의 DNA나 소수의 병원체만 존재하는 경우와 병원균이 사멸하여 균분리 방법으로는 검색이 불가능한 경우에도 직접적인 항원의 검색진단이 가능하다는 장점을 갖고 있다^{19,20)}.

본 연구는 국내 양계산업에서 심각한 경제적 피해를 초래하고 있는 가금티푸스의 역학적 발생 특성을 경남지역을 중심으로 조사하고, 야외에서 신속하게 진단할 수 있는 방법을 모색하기 위하여 *S. gallinarum*을 인공 감염시킨 닭으로부터 균분리 배양법, PCR 기법 및 혈청학적 진단법을 실시하여 방법간의 양성율을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

공시재료

1996년 1월부터 1999년 9월까지 경남축산진흥연구소에 병성감정 의뢰 되어 온 살모넬라증으로 의심되는 닭을 대상으로 시험하였다. 대조용 표준균주는 국립수의과학검역원에서 분양 받은 *S. gallinarum* ATCC 9184로서 tryptic

soy agar(TSA, Difco)에 수회 계대 배양하여 사용하였다.

원인균의 분리 및 동정

발병 및 폐사한 닭을 부검하여 간장과 비장을 적출하고 단면을 직접 MacConkey agar(Difco)와 혈액배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 의심되는 집락을 TSI agar(Difco)에 일차 배양하여 methyl red반응, 운동성, urea생성, indol생성, H₂S생성, glucose가스생성 시험과 glucose, lactose, mannitol, sucrose, dulcitol, maltose 분해능 등의 생화학적 성장검사를 실시하였다²¹⁾.

혈청학적 검사

분리균의 혈청학적 분류는 국립수의과학검역원에서 분양 받은 salmonellae O군별 혈청 A, B, C1, C2, D 및 E와 O군제인자혈청 9, 12(Difco)를 사용하여 Ewing의 방법²¹⁾에 따라 평판 및 시험관내 응집반응으로 판별하였다.

약제 감수성 시험

분리 균에 대한 약제 감수성 검사는 ampicillin(AM-10 μ g), cefazolin(CZ-30 μ g), cephalothin(CF-30 μ g), chloramphenicol(CP-30 μ g), ciprofloxacin(CIP-5 μ g), colistin(CL-10 μ g), erythromycin(EM-15 μ g), gentamicin(GM-120 μ g), kanamycin(KM-30 μ g), nalidixic acid(NA-30 μ g), penicillin(PC-10U), streptomycin(SM-10 μ g), trimetop./sulfamethox.(SXT-1.25 μ g/23.75 μ g), tetracycline(TC-30 μ g)등 모두 14종(BBL)의 항생물질을 사용하여 Bauer 등의 디스크 확산법²²⁾에 의하여 시험하였으며, 감수성은 National Committee for Clinical Laboratory Standards의 기준에 의하여 판정하였다.

인공감염시험

인공감염시험은 백색계통의 12주령 SPF Leghon 품종 10수를 사용하였고, 시험계는 외부와 격리된 시험동물사에서 salmonella-free인 사료와 물로 사육하였다. 실험접종용 균주

는 야외농장에서 전형적으로 FT가 발병한 갈색 산란계에서 분리한 *S. gallinarum* WJO-126 균주(국립수의과학검역원에서 분양)를 사용하였다. 병원성을 유지하기 위하여 2주령의 SPF 닭에 접종하여 전형적인 병변을 나타낸 간으로부터 MacConkey agar를 이용하여 재분리하여 사용하였다. 접종용 균주는 brain heart infusion broth(Difco)에 37°C에서 18시간 배양 후 spectrophotometer로 균수를 1.0×10^8 CFU/ml로 조절한 균액을 플라스틱 카테터를 이용하여 10수에 경구로 1 ml씩 접종하였다.

인공감염 닭에서의 진단법 비교

1) 균분리 배양

균 접종후 1, 3, 7 및 14일에 분변 재료 각 1g을 취하여 10ml의 생리식염수에 용해한 현탁액 0.1ml을 tetrathionate brilliant green novobiocin broth(TTBN) 5 ml에 접종하여 37°C에서 24~48시간 증균배양하였다. 배양액을 salmonella-shigella agar(SS agar; Difco)와 MacConkey agar에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 다음, salmonella속 균으로 의심되는 집락을 선별하고 생화학적 및 혈청학적 검사를 실시하여 접종균임을 확인하였다^{23,24)}.

2) PCR 분석

PCR을 위한 genomic DNA추출은 Jonathan의 방법²⁵⁾에 따라 채취한 분변 0.5~1g을 GN broth(Difco) 10ml에 접종하여 37°C에서 6시간 배양하고, 배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심하여 균체를 모은 후, high pure PCR template preparation kit(BM co. USA)를 이용하여 DNA를 분리 정제하여, *rfbS* gene 증폭을 위한 template로 사용하였다.

본 실험에 사용한 primer는 John 등²⁶⁾이 보고한 염기서열을 기초로 한 salmonella gallinarum O antigen 특이 primer인 *rfbS* primer로서 sense primer 5'-TCA CGA CTT ACA TCC TAC-3'와 antisense primer 5'-CTG CTA TAT CAG CAC AAC-3'을 (주)바이오니아에 의뢰하여 합성 정제한 것을 사용하였다.

PCR 조건은 상기의 방법으로 정제한 DNA

template 3 μ l를 시험관에 취하고 여기에 primer를 1 μ l, dNTPs(10mM) 1 μ l, MgCl₂ (25 mM) 3 μ l, 10 \times buffer 5 μ l 및 Taq DNA polymerase(5U/ μ l) 1 μ l를 가한 후 최종량이 50 μ l가 되도록 멸균 증류수를 넣어 DNA thermal cycler(Perkin Elmer)에서 DNA를 증폭하였다. 매 cycle당 94°C에서 1분간 denaturation, 53°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 3분간 extension의 순으로 총 30 cycles로 반응시켰으며, 최초와 최종 cycle은 denaturation을 72°C에서 7분으로 하였다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 720bp의 *rfbS* gene을 확인하였다.

3) 혈청학적 진단

균 접종후 1, 3, 5, 7, 9, 11 및 13일에 혈청을 분리하여 급속혈청응집반응법과 microplate 응집반응법에 의하여 혈중 중화항체를 검사하였다.

항원 제조 : 국립수의과학검역원에서 분양 받은 *S. gallinarum* ATCC 9184 표준균주를 brain heart infusion agar에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 생리식염수로 채균하여 2,000 rpm에서 15분간 원심세척(3회)한 후 MacFaland No 3 탁도에 맞추어 현탁시킨 다음, 포르말린을 0.3%수준으로 첨가하고 4°C에서 4시간 동안 천천히 진탕하여 불활화시켰다. 이 세균현탁액을 spectrophotometer로 620 nm에서 OD가 0.420이 되는 농도로 하여 microplate 응집시험을 위한 항원으로 공시하였다.

급속혈청응집반응법(rapid serum agglutination test; RST) : 농림부에서 규정한 추백리 검사방법에 따른 표준법으로 실시하였다²⁷⁾. 항원은 평판응집반응용 항원(녹십자)을 사용하여 혈청과 항원을 0.03ml씩 적하하고 유리봉으로 섞어서 1분내에 응집유무를 확인하였다.

Microplate 응집반응법(microplate agglutination test; MAT) : Thain 등의 MAT 방법²⁸⁾을 참고로 하여 각 혈청을 microplate(U-bottomed 96 well microplate : corning)에 배수 희석법으로 0.05ml 되게 희석한 다음 동량의

항원을 가하고 습윤상자에 넣어 37°C에서 2시간 반응시킨 후 4°C에서 24시간 후 응집을 나타내는 최종혈청 회석배수의 역대수를 응집가로 하였다.

결 과

가금티푸스의 월별 발생빈도

1996년 1월부터 1999년 9월까지 경남지방에서 발생되었던 살모넬라증으로 의심되는 가검 재료 총 68건중 56건(82%)이 가금티푸스로 확인되었으며, *S. typhimurium*에 의한 paratyphoid는 12건(1.5%)이 발생되었으나 대표적인 살모넬라증인 추백리는 확인되지 않았다. 가금티푸스의 월별 발생 빈도를 보면 매월 발생을 보이고 있으나 5월부터 9월간에 집중적으로 발생하였다(Table 1).

지역별 발생빈도

가금티푸스의 지역별 발생빈도를 보면 96년에는 창녕을 비롯한 11개시군, 97년 진주 외 5개시군, 98년 함안을 포함한 3개 지역에서만, 그리고 99년에는 진주를 비롯한 8개 지역에서 발생하였다. 반면에 창원, 진해, 마산, 남해, 산

청, 의령 등의 6개 지역은 시험기간 중 발생이 없었다(Table 2).

분리균의 생화학적 성상

가금티푸스로 확인된 개체로부터 분리한 *S. gallinarum* 18주의 생화학적 성상검사 결과는 Table 3과 같다. 분리균 18주 모두 methyl red 반응 양성이었으나, 운동성은 없었으며, urea, H₂S 및 indol 산생 시험에서 음성이었다.

당 분해시험에서 dextrose, maltose, mannitol, dulcitol에 양성반응을 보였고, lactose, sucrose에는 음성이었으며, dextrose 함유배지에서 가스생성은 없었다.

약제 감수성

가금티푸스 이환계로부터 분리한 *S. gallinarum* 18주에 대하여 14종의 항생물질을 사용하여 디스크확산법으로 감수성 시험을 실시한 결과는 Table 4와 같다. Ampicillin, cefazolin, cephalothin, trimetoprim/sulfamethoxazol 및 gentamycin에는 분리주의 90%이상이 감수성을, chloramphenicol, ciprofloxacin, streptomycin, 및 tetracyclin에는 50%이상의 분리균이 감수성을 보였으나, erythromycin, nalidixic acid, penicillin에는 100% 내성을 나타내었다.

Table 1. Occurrence of fowl typhoid in the Kyongnam province during the period from January 1996 to September 1999

Year	Months												Sub-total
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
1996					1	2	7	5	1		4	3	23
1997	1		2	1	2	5	1		1	1 (2)	(2)	1	15 (4)
1998	(1)	1					(1)	1	2	1 (1)	1 (1)		6 (4)
1999		1 (2)		(2)	2		3	3	3				12 (4)
Total	1 (1)	2 (2)	2	1 (2)	5	7	11 (1)	9	7	2 (3)	5 (3)	4	56 (12)

() : Paratyphoid infection

Table 2. Geographical occurrence of fowl typhoid in January 1996 to September 1999 at the Kyongnam province

Provinces	Number of cases occurred				Subtotal
	1996	1997	1998	1999	
Changyong	1	-	-	-	1
Chinju	-	1	-	1	2
Hadong	4	-	-	1	5
Haman	1	2	3	2	8
Hamyang	2	1	-	1	4
Hapchon	-	-	1	1	2
Kimhae	3	-	-	-	3
Koje	1	-	-	-	1
Kosung	4	3	-	2	9
Miryang	-	-	-	-	-
Sachon	2	-	-	1	3
Tongyong	2	-	-	-	2
Ulsan	2	2	-	-	4
Yangsan	1	6	2	3	12
Changwon	-	-	-	-	-
Chinhae	-	-	-	-	-
Masan	-	-	-	-	-
Namhae	-	-	-	-	-
Sanchong	-	-	-	-	-
Uiryong	-	-	-	-	-
Total	23	15	6	12	56

Table 3. Biochemical characteristics of 18 isolates from chicken infected with fowl typhoid

Biochemical test	Positive strains	
	Number	%
Methyl Red	18	100.0
Motility	0	0.0
Urea	0	0.0
H ₂ S	0	0.0
Indole	0	0.0
Dextrose	18	100.0
Maltose	18	100.0
Mannitol	18	100.0
Sucrose	0	0.0
Dulcitol	18	100.0
Lactose	0	0.0

Table 4. Antimicrobial drug susceptibility against 18 isolates from chickens infected with fowl typhoid

Drugs	Susceptibility	
	No of strains	%
Ampicillin (AM)	16	90
Cefazolin (CZ)	17	97
Cephalothin (CF)	17	92
Chloramphenicol (CP)	15	84
Ciprofloxacin (CIP)	18	79
Colistin (CL)	8	46
Erythromycin (EM)	0	0
Gentamicin (GM)	17	92
Kanamycin (KM)	6	35
Nalidixic acid (NA)	0	0
Penicillin (PC)	0	0
Streptomycin (SM)	12	68
Tetracyclin (TC)	10	53
Trimetoprim/Sulfamethoxazol (SXT)	17	94

동물유래 *salmonella*속균의 약제내성에 관하여 소와 돼지에서 정과 최²⁹⁾, 최 등³⁰⁾, 닭에서 김 등³¹⁾, 中岡 등³²⁾이 KM, SM, SXT 및 TC에 대하여 높은 내성을 나타낸 것으로 보고하고 있으나, 본 실험에서는 KM을 제외한 SM, SXT, TC에 대하여 50%이상이 감수성을 나타내어 내성도에서 다소간의 차이를 인정할 수 있었다.

인공감염 닭에 대한 진단법 비교

1) PCR 분석

*S. gallinarum*을 1.0×10^8 CFU/ml 수준으로

경구 접종 후 1, 3, 7 및 14일 후 닭의 분변을 GN broth에 6시간 배양하여 분리정제한 DNA를 template로 사용하여 PCR을 실시한 결과, 분변에서 *S. gallinarum* O antigen 특이 *rfbS* gene(720bp)의 PCR 증폭산물을 확인할 수 있었다 (Fig 1).

2) 균분리 배양법과 PCR 분석법의 비교

실험적으로 *S. gallinarum*을 인공감염시킨 닭의 분변을 접종 1일 후부터 채취하여 균분리 배양법과 PCR분석법의 결과를 비교한 바 총 10수의 분변재료 중 PCR법에서 8수(80%)가, 배양법에서는 6수(60%)가 양성으로 판정되어

Table 5. Results of PCR method and culture method for detection of *S. gallinarum* from feces of experimentally infected chickens

Chicken No	Time after infection*	Result		Chicken No	Time after infection	Result	
		Culture	PCR			Culture	PCR
1	1 day	+	+	1	7 day	+	+
2		+	+	2		-	+
3		-	+	3		-	-
4		-	-	4		-	-
5		+	+	5		+	+
6		-	-	6		+	-
7		-	+	7		+	+
8		+	+	8		-	+
9		+	+	9		+	+
10		+	+	10		+	+
Total		6	8	Total		6	7
1	3 day	+	+	1	14 day	-	-
2		+	+	2		-	-
3		-	+	3		+	+
4		-	-	4		+	+
5		-	+	5		-	-
6		-	-	6		-	+
7		+	+	7		-	-
8		+	-	8		-	+
9		-	+	9		-	-
10		-	+	10		+	+
Total		4	7	Total		3	5

* 12-week-old chickens were inoculated orally with 1×10^8 CFU of *S. gallinarum* WJO-126 strain.

Table 5-1. Comparison of PCR with culture method for detection of *S. gallinarum* from feces of experimentally infected chickens

Analyzing method	No true positive	No true negative	No false positive	No false negative	Total	Agreement	
						No	%
Culture	17	11	2	10	40	28	70
PCR	17	11	10	2	40	28	70

PCR법이 배양법에 비하여 민감도가 높은 것으로 인정되었다. 감염 후 3일, 7일 그리고 14일째에서도 PCR 기법의 분리빈도나 민감도가 높은 것으로 나타났다(Table 5). 그러나 40 시료에 대한 검사 결과에서 두 방법간의 일치도는 70%이었다(Table 5-1).

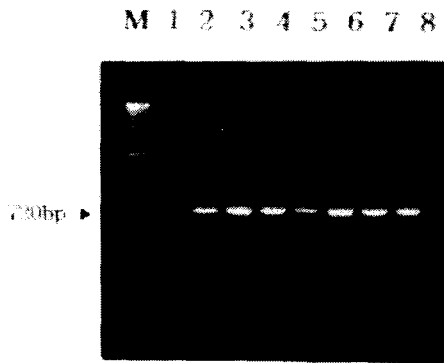


Fig 1. Specific amplification of *rfbS* gene by PCR from pre-incubated(6hrs) fecal sample of chickens inoculated orally with 1×10^8 *S. gallinarum*.

Lane M : 1Kb plus ladder(Gibco-BRL, USA),
 Lane 1,2 : feces of chicken 1 day after inoculation,
 Lane 3,4 : feces of chicken 3 days after inoculation,
 Lane 5,6 : feces of chicken 7 days after inoculation,
 Lane 7,8 : feces of chicken 14 days after inoculation.

3) 혈청학적 진단법 비교

국내에서 널리 사용하고 있는 혈청학적 진단 방법인 RST와 MAT를 이용하여 인공감염시

킨 닭의 *S. gallinarum*에 대한 항체역가를 검사한 결과는 Table 6과 같다.

RST에서는 감염 5일 후부터 10수중 1수에서 항체가 검출되기 시작하여 7일 후에 8수, 9일 후에 10수 모두 양성이었고, 이에 비하여 MAT에서는 감염 후 5일 후에 5수에서 검출되기 시작하여 7일 후에는 10수 모두 양성을 나타내었다. 이 결과로 MAT가 RST보다 민감도가 다소 높은 것으로 나타났다.

Table 6. Comparison of microplate and rapid-agglutination test in chicken infected with *S. gallinarum*

Time after inoculation(day)	No of positive/No of chicken tested	
	MAT	RST
1	0/0	0/0
3	0/0	0/0
5	5/10	1/10
7	10/10	8/10
9	10/10	10/10
11	10/10	10/10
13	10/10	10/10

고 찰

*Salmonella*속 균은 사람 및 동물에서 패혈증, 설사 등을 유발하는 장내 세균으로서 다섯 가지 subgroup으로 크게 구분되며 그중 subgroup I 과 III에 속하는 것이 주로 병원성을 나타낸다²⁹⁾. *Salmonella* 감염증은 사람에는 *S*

typhimurium 및 *S. enteritidis* 등을 비롯하여 여러 종류의 *salmonella*속군에 의하여 나타나며, 동물의 *salmonella* 감염증은 경제적인 피해를 미칠 뿐만 아니라 식육 및 오염환경을 통한 사람의 질병발생에 관련되므로 공중위생상 매우 중요시되고 있다^{8,9,34,35}).

1885년 Salmon과 Smith가 콜레라로 폐사한 돼지에서 *S. choleraesuis*를 최초로 분리 보고한 이래 *salmonella*속 군은 사람과 각종 동물로부터 분리되며, somatic, flagella 및 virulence항원을 기초로 하는 혈청학적 동정법이 확립되므로써 그 항원구조에 따라 현재까지 2,000여종의 균형이 분리 보고되어 있으나, 이 중 분리율이 비교적 높고 병원성이 있는 것은 200여종으로 알려져 있다^{21,36~38}).

본 실험에서 분리한 *S. gallinarum*의 계절적인 분포양상을 살펴보면, 연중 발생하고 있으나 주로 5월에서 9월까지 다발하고 있어 여름철이 주된 감염 계절인 것으로 확인되었다. 또한 11월과 12월에도 다소 높은 발생이 있었으나 이는 여름철에 발생하였던 농장에서 재발한 것으로 볼 수 있으며, 치료 후 완치되지 않고 재감염을 일으키는 살모넬라증의 전형적인 양상을 보였다. 이러한 성적은 가금티푸스의 계절적인 발생동향에 관련하여 보고한 다른 연구자들의 성적과 유사하였다^{28,33~36}).

가금티푸스의 지역별 발생 조사에서는 본 질병이 다발한 지역으로 나타난 창녕, 진주, 하동, 함안, 함양, 함천, 김해, 고성, 밀양, 사천, 통영, 울산 및 양산지역은 사육형태가 단지화 및 집단화되어있는 경향이 있다. 이는 농장에서 최초 발병 위치인 집란 장소 인근 케이지로부터 발병 확산되는 감염농장 유래의 난좌에 의한 전파나 들쥐, 야생조류에 의한 수평감염 등이 주요 전파방법인 것으로 생각된다.

*Salmonella*속군 중 *S. pullorum*과 *S. gallinarum*은 편모를 보유하지 않아 운동성이 없고, 균체항원 구조가 O_{1,9,12}로서 동일하여 추백리-티푸스 진단액에도 동일하게 양성반응을 나타내므로 혈청반응만으로는 구별이 불가능하며 생화학적 반응에 의해서 분별이 가능하다²³). 본 실험에서 분리한 *salmonella*속 군 18주는

비운동성이며, 혈청반응에서 O₉ 및 O₁₂ 균체항원을 보유함과 아울러 glucose 분해에 의한 가스 생성이 없었고, dulcitol 분해능이 양성으로 나타나 모두 *S. gallinarum*으로 동정되었다.

*Salmonella*균의 혈청형을 확인하기 위해서는 여러 종의 *salmonella* 항혈청(O 및 H anti-serum; 156여종)을 갖추어야 하는 관계로 많은 비용이 소요될 뿐만 아니라 균분리 후 생화학적 성상검사와 최종적인 혈청형의 동정을 위해서는 최소한 5일 이상의 시간이 소요된다. 더우기 균이 사멸한 경우에는 균분리 방법만으로 질병진단에 한계가 있다. 이에 반하여 PCR 분석은 병원체의 직접적인 분리동정이 어려운 질병의 진단에 있어서 효과적으로 이용될 수 있는 방법이다^{39,40}).

최근 분변에서 *salmonella*속 균을 직접 검출하기 위하여 단클론항체를 활용한 magnetic particles를 적용한 PCR을 개발한 바 있으나, 준비과정이 복잡하고, 특히 분변물질에 포함된 각종의 혈액성분이나 담즙성분 등과 같은 증폭억제물질과 비특이반응 등을 고려해야 하는 단점이 있으므로 계육 등을 비롯한 축산물에 직접 적용하기 위해서는 비특이반응을 해결하기 위한 대체방법이 필요한 것으로 알려져 있다⁴¹). Jonathan 등²⁵)은 PCR 분석을 위한 DNA 추출시 분변 재료로부터 방해물질을 제거하고 2쌍의 primer를 이용한 multiplex PCR을 수행하여 특이 PCR산물을 확인한 바 있다. 본 실험에서는 감염 닭의 분변 재료를 6시간 증균배양한 후 High pure PCR template preparation kit(BM Co. USA)를 이용하여 빠른 시간내 template DNA를 분리하여 특이적인 PCR product인 *rfbS*(720bp) gene을 확인할 수 있었다. 이는 감염후 24시간내에 FT 실험실 진단시 세균분리 과정 없이 감염 닭의 분변이나 장기로부터 추출한 DNA를 PCR기법으로 증폭하여 신속하고 정확한 진단을 할 수 있음을 시사한다.

인공감염시킨 닭의 분변재료로부터 *S. gallinarum*의 검출을 위한 배양법과 PCR기법간의 검출 빈도율을 비교한 바 PCR기법이 현저하게 높게 나타났으나, 결과의 일치도는 70%수

준이었다. 따라서 가금티푸스 발생시 신속한 진단을 위해서는 PCR 검색과 동시에 균분리 배양법을 병행하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

본 실험의 혈청검사법의 비교시험에서 MAT에서는 7일 후에, RST에서는 9일 후에 100% 양성반응을 나타내어 현재 종계장 자체에서 실시하고 있는 추백리-티푸스 진단액을 이용한 RST의 개선이 필요한 것으로 생각된다. 하지만 현행 양계농가의 실정으로 야외에서 가장 간단히 할 수 있는 *salmonella* 감염의 색출에는 RST가 최선의 방법일 수밖에 없다. 따라서 이 microplate 응집반응은 종계장으로부터 종계를 입하 할 때 전수를 채혈해서 *salmonella* 속균 감염초기의 개체와 *salmonella*속균의 불현성 감염 개체 등을 사전에 색출하는데 이용할 수 있는 효율적인 방법이 될 것으로 사료된다.

결 론

1. 1996년 1월부터 1999년 9월까지 조사기간 중 경남지역에서 발생된 닭의 살모넬라증으로 의심된 68건중 가금티푸스가 56건으로 82%를 차지하였으며, 나머지 12건은 파라티푸스로 확인되었다.
2. 가금티푸스의 계절적인 발생빈도를 보면 연중 발생되고 있으나 주로 5월에서 9월까지 다발 하는 것으로 확인되었다.
3. 지역별 발생 빈도를 보면 주로 산란계를 사육하는 양계농장이 집단적으로 모여 있는 양계단지에서 다발한 것으로 나타났으며, 이는 주로 난계대전염에 의한 수직감염과 야생조류, 쥐 등에 의하여 전파된 것으로 추측된다.
4. 가금티푸스 56건에서 분리한 *salmonella*속균 18주의 생화학적인 성상은 *S gallinarum* 표준 균주와 동일하였다.
5. 분리한 *S gallinarum* 18균주에 대하여 14종의 항생물질을 사용하여 디스크 확산법으로 감수성시험을 실시한 결과 AM, CZ, CF, SXT 및 GM에 대하여는 90%이상의

감수성을, CP, CIP, SM 및 TC에는 50% 이상이 감수성을 보였으나, EM, NA 및 PC에는 100% 내성을 나타내었다.

6. 인공감염시킨 닭의 분변을 GN broth에 6시간 배양하여 DNA를 분리 한 후 *S gallinarum*의 특이적인 primer로 PCR한 결과 720bp크기의 product가 확대되었다.
7. 인공감염시킨 닭 10수로부터 1, 3, 7, 14일 후에 분변을 채취하여 배양법과 PCR법에 의한 양성빈도를 비교한 바 PCR법이 배양법에 비하여 검출률이 현저하게 높은 것으로 인정되었다.
8. Microplate 응집반응법(MAT)과 급속혈청응집반응법(RST)을 이용하여 인공감염시킨 닭의 *S gallinarum*에 대한 항체를 비교한 결과 두 방법 모두 감염 후 5일부터 항체가 검출되기 시작하여, MAT에서는 7일에, RST에서는 9일에 10수 모두가 양성으로 검출되었다.

참고문헌

1. Edward PR, Bruner DW, Dowell ER, et al. 1948. *Salmonella* infections of fowls *Cornell Vet* 38 : 257~262.
2. Bassiouni A, Rifai M, Abbasi K. 1966. The influence of the somatic factor 0-1 on the agglutination reaction for detecting *Salmonella gallinarum-pullorum* infection. *Vet Med J Giza* 12 : 369~376.
3. Blaxlan JD, Sojka WJ, Smither AM. 1956. A study of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* strain isolated from field outbreak of disease. *J Comp Pathol Ther* 66 : 270~277.
4. Smith HW, Tucker JF. 1980. The virulence of *Salmonella* strain for chickens : Their excretion by infected chicken *S J Hyg* 84 : 479~488.
5. Moore VA. 1895. Infectious leukemia in fowls *Bacterial disease frequently mis-*

- taken for fowl cholera. *USDA BAI 12th, 13th Ann Rep* : 185~205.
6. Klein E. 1889. Über ein epidemische Krankheit der Hühner, verursacht einer *Bacillus gallinarum*. *Zentralbl Bacteriol Parasitenkd Abt I Orig* 5 : 689~693.
 7. 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.
 8. Lucio B, Padron M, Mosqueda A. 1984. Fowl typhoid in Mexico. In: Snoeyenbos GH (ed). *Proc Int Symp Salmonella. Am Assoc Avian Pathol* : 382~383.
 9. Silva EM. 1984. The *Salmonella gallinarum* problem in central and south America. In : Snoeyenbos GH(ed). *Proc Int Symp Salmonella. Am Assoc Avian Pathol* : 150~156.
 10. 최재윤, 이시영, 이창우. 1968. 닭의 추백리에 관한 연구. 우리나라에서 분리한 추백리균의 항원형에 관한 연구. *가축위생연구소보* 14(1) : 47~51.
 11. 이희수, 김순재, 김기석 등. 1997. *Salmonella gallinarum* 분리주로부터 추출한 세포외막단백질의 닭에 대한 면역원성. *대한수의학회지* 37(3) : 501~510.
 12. Jones FS 1913. The value of the macroscopic agglutination test in detecting fowls that are harboring *Bacterium pullorum*. *J Med Rec* 27 : 481~495.
 13. Schaffer JM, MacDonald AD, Hall WJ, et al. 1931. A stained antigen for the rapid whole blood test for pullorum disease. *JAVMA* 79 : 236~240.
 14. Runnels RA, Coon CJ, Farley H, et al. 1927. An application of the rapid-method agglutination test to the diagnosis of bacillary white diarrhea infection. *JAVMA* 70 : 660~667.
 15. Barrow PA, Bechieri A Jr, Haddad OA. 1992. Serological response of chickens to infection with *Salmonella gallinarum* - *S pullorum* detected by enzyme linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 36 : 227~236.
 16. Metzler J, Nachamkin I. 1988. Evaluation of a latex agglutination test for the detection of *Salmonella* and *Shigella* spp. by using broth enrichment. *J Clin Microbiol* 30 : 2613~2619.
 17. Khan MI, Nguyen AV. 1995. A *Salmonella* specific DNA probe and its use in southern hybridization for differentiation of *Salmonella enteritidis* *Avian Dis* 39 : 368~374.
 18. Nguyen AV, Khan MI, Lu Z. 1994. Amplification of *Salmonella* chromosomal DNA using the polymerase chain reaction. *Avian Dis* 38 : 119~126.
 19. Kongmuang U, Luk JM, Lindberg AA. 1994. Comparison of three stool processing method for detection of *Salmonella* serogroups B, C2 and D by PCR. *J Clin Microbiol* 32 : 3072~3074.
 20. Lin AW, Usera MA, Barrett TJ, et al. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiates strains of *Salmonella enteritidis* *J Clin Microbiol* 34 : 870~876.
 21. Ewing WH. 1986. Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. Elsevier Science Publishing Co, Amsterdam : 93~248.
 22. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, et al. 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45 : 493~496.
 23. Hoben DA, Ashton DH, Peterson AC, et al. 1973. Some observation on the incorporation of novobiocin into heketon enteric agar for improved *Salmonella* isolation. *Appl Microbiol* 26 : 126~127.
 24. Moats WA. 1978. Comparison of four

- agar plating media with and without added novobiocin for isolation of *Salmonella* from beef and deboned poultry meat. *Appl Environ Microbiol* 30 : 1418~1423.
25. Cheng HC, Jonathan TO. 1996. Rapid Identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence gene, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture. Multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* : 2619~2622.
 26. John MC, Urrat KM, Peter RR, et al. 1993. Selective amplification of abequose and paratose synthase genes(*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). *J Clin Microbiol* : 2118~2123.
 27. 추백리방역실시요령. 1995. 농림수산부 고시(제95-99호).
 28. Thain JA, Blandford TB. 1981. A long term serological study of a flock of chickens naturally infected with *Salmonella pullorum*. *Vet Rec* 109 : 136~138.
 29. 정석찬, 최원필. 1986. 우 유래의 *Salmonella*속 균에 대하여. 대한수의학회지 26 : 79~85.
 30. 최원필, 이희석, 여상건 등. 1988. 우·돈에서 분리한 *Salmonella* 유래 R plasmid의 유전학적 및 분자생물학적 성상에 관한 연구. 1. 유우에서 *Salmonella*속균의 분포상황 및 약제내성. 대한수의학회지 28(2) : 331~337.
 31. 김봉환, 이재진, 김기석 등. 1980. 동물유래 병원세균의 각종 항생물질에 대한 감수성 조사. 대한수의학회지 20(2) : 85~92.
 32. 中岡宇仕, 金鍾培, 馬点述. 1985. 한국에서 분리한 동물유래 *Salmonella*의 약제내성과 plasmid의 검출. 서울대학교 수의대논문집 10(2) : 145~153.
 33. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, et al. 1997. Diseases of poultry. 10th ed, Iowa State University Press, Ames Iowa : 81~129.
 34. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals 8th ed. Cornell University Press, Ithaca and London : 74~88.
 35. Galbraith NS 1964. Studies of human salmonellosis in relation to infection in animals *Vet Res* : 506~528.
 36. Galton MM, Steele MH, Newell KW. 1964. The world problem of salmonellosis Epidemiology of salmonellosis in the United States Junk. The Hague : 421~444.
 37. Bennett IL, Hook ED. 1965. Some aspect of salmonellosis *Ann Rev Med* 10 : 1021~1029.
 38. Edward PR, Galton MM. 1967. Salmonellosis *Adv Vet Sci* 11 : 1~63.
 39. Noah DC, James M, Simpson B, et al. 1996. Comparison of polymerase chain reaction and microbiological culture for detection of salmonellae in equine feces and environmental samples *AJVR* 57 : 780~785.
 40. Stone GG, Onerst RD, Hays MP, et al. 1994. Detecetion of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation PCR procedure. *J Clin Microbiol* 32 : 1742~14749.
 41. Widjojatmodjo M, Fluit AC. 1992. The magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for direct detection of *Salmonellae* in fecal samples *J Clin Microbiol* 30 : 3195~3199.