

국내 사육 닭에서 분리된 *Ornithobacterium rhinotracheale* (OR)균의 약제 감수성 및 항체보유율에 대한 연구

전우진 · 권용국* · 윤여성¹ · 김재홍

국립수의과학검역원 조류질병과 ¹서울대학교 수의과대학

Ornithobacterium rhinotracheale(OR)은 최근에 알려진 그람음성 간균으로서 가금류에서 호흡기감염을 일으킨다. OR균의 항생제 감수성과 OR에 대한 국내 발생현황을 조사하기 위하여 11개 OR 분리주의 8종 항생제에 대한 최소발육억제농도(MIC)와 국내 닭의 OR 항체보유율을 조사하였다. 모든 분리주는 ampicillin, tetracycline 및 doxycycline에 대하여 높은 감수성을 나타내었다. MIC는 각각 0.38~2 µg/ml, 0.094~3 µg/ml, 0.094~3 µg/ml으로 ciprofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin 및 ofloxacin의 MIC는 대부분 3 µg/ml~48 µg/ml로 나타났고 gentamicin에 대하여는 모든 분리주가 저항성을 나타내었다. 시판되는 OR ELISA검사 kit를 사용하여, 국내에서 사육하는 육계 및 육용종계와 산란계 188계군에 대한 항체보유율을 검사한 결과, 육계 5계군(4%), 육용종계 17계군(50%), 산란계 16계군(55.2%)이 OR 항체 양성계군으로 나타났다. 이 결과로 보아 OR은 국내 양계장내 광범위하게 만연되어 있을 것으로 보인다.

Key words □ ELISA, E-test, MIC, *Ornithobacterium rhinotracheale*

Ornithobacterium rhinotracheale(OR) 감염증은 닭과 칠면조 등에서 급성 호흡기 증상과 함께 복기낭에 다수의 작은 기포와 흰색의 요구르트양 삼출물 저류가 특징인 세균성 질병이다(15). OR은 남아프리카에서 1991년도에 성장지연과 호흡기증상을 보이는 28일령의 육계에서 최초로 분리된 이후 Pleomorphic Gram Negative Rod(PGNR), *Pasteurella*-like 또는 *Kingella*-like로 불리다가 1994년에야 비로소 rRNA superfamily V종내에 *Ornithobacterium rhinotracheale*로 명명되었다(13, 15, 16).

OR감염증은 네덜란드(16), 독일(9), 벨기에(5) 등 많은 유럽국가 뿐만 아니라 미국(15), 일본(17) 등 전세계에서 발생하고 있다. 국내에서는 권 등(1)이 2003년도에 호흡기질환이 주증상인 닭에서 OR을 분리함으로써 OR감염증의 존재를 확인하여 보고하였다.

분리된 OR의 항생제에 대한 감수성은 일정하지 않으며, 주로 분리된 지역의 분리주에 따라 감수성이 다르다(15). 이는 분리된 지역에서 사용하고 있는 항생제의 반복사용으로 균이 내성을 획득하였기 때문인 것으로 보고하고 있다(2, 5).

OR균의 항생제 감수성에 대한 보고는 많은 연구가 진행되지 못했으며, 그에 대한 기준도 현재까지 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)규정에 언급되지 않고 있다. 일부 보고(2, 5, 6)에서 야생조류인 당까마귀(Rook)에서 분리된 균주와 가금에서 분리된 균주를 비교하거나 NCCLS규정중 Non-Enterobacteriaceae지침을 적용하여 항생제의 저항성 유무를 확인

하고 있다.

계군의 OR균에 대한 항체보유율 및 OR백신의 효능 등을 평가하기 위하여 최근 여러 가지 혈청학적 검사법이 개발되어 왔다. 그 대표적인 방법이 혈청평판응집반응(3), 한천겔침강반응(14)과 효소표지면역흡착법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)(14)이다. ELISA는 다른 방법보다 민감도가 우수하며, 다량의 시료를 동시에 처리할 수 있는 장점이 있다. OR균은 18개 종의 혈청형(A-R)을 가지고 있고(3) 상업적으로 판매되는 ELISA kit는 다양한 혈청형을 검출할 수 있기 때문에 최근에는 대부분 ELISA kit를 이용하여 혈청검사를 수행하고 있다.

본 연구에서는 국내에서 사육중인 닭에서의 OR균에 대한 항체보유율을 민감도가 높은 ELISA를 이용하여 확인하였고 11주의 OR국내분리주에 대한 최소발육억제농도를 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 공시한 균주는 Table 1과 같이 2001년부터 2002년도에 국립수의과학검역원 조류질병과에 병성감정 의뢰된 가검물 중 OR감염증으로 진단된 예에서 분리된 11주의 분리주와 표준주로서 ATCC 51465 균주를 사용하였다.

항생제에 대한 최소발육억제농도 조사

분리균의 항생제에 대한 최소발육억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)는 E-test(AB Biodisk, Solna, Sweden)로 측정하였다. 제조사의 방법에 따라, Brain Heart Infusion(Difco,

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-467-1805, Fax: 031-467-1803
E-mail: kwonyk@nvrqs.go.kr

Maryland, USA)에 37°C에서 48시간 증균한 후 멸균식염수로 균 농도를 MacFarland No. 1로 조정하고, 5% 면양혈액배지가 첨가된 Muller-Hinton agar (Diameter 150 mm, Difco, Maryland, USA)의 표면에 접종한 후 멸균된 면봉으로 골고루 바른다음, 15분동안 배지표면에 습기가 없도록 방치하고, E-test strip 4-5장을 조심스럽게 올려놓은 후, 5% CO₂, 37°C 조건하에서 48시간 동안 배양하여 MIC를 측정하였다. OR균의 감수성 검사에 대한 해석은 아직 기준이 설정되어 있지 않기 때문에 NCCLS[National Committee for Clinical Laboratory Standards] 규정 중 Non-Enterobacteriaceae지침(*P. aeruginosa* 제외)을 적용하였다(7). MIC₅₀ 측정은 공시한 균주의 50%가 발육억제된 농도로 하였다. 사용된 E-test strip은 ampicillin, gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin, ofloxacin, doxycycline, tetracycline 등 총 8종을 사용하였다.

OR에 대한 항체보유율 조사

국내 사육 계종별(육계, 육용종계, 산란계)로 OR에 대한 감염 상황을 파악하기 위하여 2002년 경기 화성 소재 도계장에서 채혈한 1,107여 점의 육계 혈청과 국립수의과학검역원 조류질병과

에 병성감정으로 의뢰된 육용종계 혈청 207점 및 산란계 혈청 295점을 이용하여 항체가를 조사하였으며, 검사전까지 -20°C에서 보관하였다. ELISA를 검사방법으로 이용하였으며, 검사 kit는 시판되고 있는 OR 항체검사 kit (IDEXX, Buckinghamshire, UK)를 구입하여 사용하였다. 검사술식은 제조회사에서 기술한 방법을 따랐다. 이때 혈청은 1/500으로 희석하였으며, 두 번 반복으로 검사하였다. 그 결과를 650 nm의 흡광계(Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 분석하였다. S/P ratio와 titer는 아래의 공식에 따라서 계산하였으며, titer가 2,000 이상이면 양성으로, 1,000과 2,000 사이를 의양성, 1,000 이하는 음성으로 간주하였다.

*S/P Ratio

S/P=Sample mean-Negative control mean/Positive control mean-Negative control mean

*Titer

Log₁₀Titer=1.09(Log₁₀ S/P)+3.36

결 과

항균물질의 최소발육억제농도 조사

NCCLS 규정(11)에 따라 8종 항균물질의 분리균 11주에 대한 MIC 분포 및 MIC₅₀은 Table 2와 같다. 가장 감수성이 높은 약제는 doxycycline이었으며, MIC₅₀는 0.19 µg/ml였다. 다음으로 감수성이 있는 약제는 tetracycline과 ampicillin으로 MIC₅₀가 각각 0.75 µg/ml와 1.5 µg/ml였다. OR분리주에 대해 가장 저항성을 보이는 약제로는 gentamycin으로 12~512 µg/ml의 넓은 MIC분포와 32 µg/ml의 MIC₅₀를 나타내었다. 다음은 norfloxacin, enrofloxacin, ofloxacin 및 ciprofloxacin순으로 MIC₅₀가 2~16 µg/ml로 나타났다.

OR에 대한 항체보유율 조사

188개 계군에서 수집한 1,609점의 닭 혈청을 대상으로 OR균에 대한 노출여부를 알아보기 위하여 ELISA로 항체검사를 실시한 결과는 Table 3과 같다. 38개 계군에서 항체양성계가 검출되어 20.2%(38/188)의 계군이 OR균에 노출되어 있었음을 알 수

Table 1. Source of 11 *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates

Isolates	Year	Type of chicken	Age (weeks)
OR-161	2002	Broiler	6
OR-1613AS	2002	Broiler	6
OR-240	2002	Broiler	5
OR-2408AS	2002	Broiler	5
OR-295	2002	Broiler	4
OR-2951P	2002	Broiler	4
OR-300	2002	Korean native chicken	5
OR-339	2002	Korean native chicken	5
OR-642	2001	Korean native chicken	14
OR-372	2002	Broiler	6
OR-3723AS	2002	Broiler	6

Table 2. Distribution of 11 *O. rhinotracheale* isolates and 1 reference strain by MIC of antibiotics

Antibiotics	No. of isolates with MIC (µg/ml)											Range	MIC ₅₀	
	≤0.09	0.091-0.99	1-2	3-4	6-8	12-16	24-32	48-64	96-128	192-256	384-768			≥1024
Ampicillin		3	*R+8										0.38-2	1.5
Gentamicin						2	4		2	R+1	2		12-512	32
Ciprofloxacin	R	2	3	5	1								0.016-8	2
Norfloxacin		R			1	4	4	2					0.125-48	16
Enrofloxacin	R		1	2	2	4	2						0.047-32	8
Ofloxacin	R			2	5	3	1						0.047-24	8
Doxycycline	R	7	1	3									0.047-4	0.19
Tetracycline		R+7	2	2									0.094-3	0.75

*R: Reference strain, ATCC 51465

Table 3. Serologic prevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale*(OR) antibody in the domestic chickens

Groups	Age (wk)	No. of flocks tested	No. of samples tested	No. of flocks positive for OR	No. of samples positive for OR
Broiler	5 and older	125	1,107	5 (4%)*	5 (0.5%)
Broiler breeder	20 and older	34	207	17 (50%)	43 (20.8%)
Layer	20 and older	29	295	16 (55.2%)	29 (9.8%)
Total		188	1,609	38 (20.2%)	77 (4.8%)

*Percentage of positive results in parentheses.

있었다. 그 중 산란계가 55.2%(16/29)로 가장 높았으며, 다음으로 산란종계가 50%(17/34), 육계가 4%(5/125)로 가장 낮은 순이었다. 닭 개체별로는 4.8%(77/1,609)의 양성율을 나타내었고, 계종별로는 육용종계가 20.8%(43/207), 산란계가 9.8%(29/295), 육계가 0.5%(5/1,107) 순으로 나타내었다.

고 찰

*O. rhinotracheale*는 칠면조와 닭에서 증체량 감소 및 폐사율 증가와 관련된 새로운 병원체이다(15). 현재까지 본 균의 항생제 감수성에 대한 보고자료는 다른 병원성 세균과 달리 많은 연구가 수행되지 않았다(6, 16, 17). OR은 성장이 매우 느리며 Muller Hinton broth에서는 증식하지 않기 때문에 최소발육억제농도를 산출하는데 있어 기존의 방법인 broth dilution method나 agar dilution method로는 많은 제약이 있다(5, 6). MIC 측정을 위한 E-test 방법은 성장이 느린 특정 세균에 이용함으로써 결과의 해석이 쉽고 간편하여 보편화되어 있는 상태이다. Devriese 등(6)은 이와같은 이유에서 E test를 권장하고 있다.

OR의 항생제 감수성은 분리된 나라에 따라 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(15). 벨기에에서 분리된 OR균주는 enrofloxacin에 감수성이 있다고 보고하였다(5). Devriese 등(5)은 야생조류와 가금류에서 분리된 OR균주를 비교하였을 때, ampicillin, lincomycin, tylosin, doxycycline 및 flumequine의 항생제에 저항성을 획득한 것으로 보고하고 있다. 또한, 터키(2)와 헝가리(17)의 분리주 대다수도 enrofloxacin에 저항성을 보였다. 본 연구에서도 항생제별 MIC 분포를 표준균주와 비교해 본 결과 quinolone계열 항생제에 대한 국내분리주의 내성율이 현저히 높았다. Norfloxacin의 경우, 분리균의 100%가 저항성을 보였으며, MIC 범위가 0.047~32 µg/ml로서 표준균주와 비교해 볼 때 균주간에 매우 높은 항생제 내성을 획득하였음을 알 수 있었다. Devriese 등(4)의 보고와는 달리, tetracycline과 doxycycline은 모든 OR분리주에서 감수성 범위 내에 존재하였으나 표준균주와 비교해 MIC 범위가 높게 나타나 추후 내성획득의 가능성이 있음을 시사하고 있다.

아미노글리코사이드 계열의 항생제에 속한 gentamicin과 neomycin에 대해 대부분의 OR분리주가 저항성을 보인다고 보고되고 있다(2, 16). 본 연구에서도 모든 OR분리주들은 gentamicin에 저항성을 보였다.

페니실린 제제의 경우, 본 연구에서 사용된 ampicillin의 감수

성은 헝가리에서의 성적과 유사한 감수성을 보였다(17). 그러나 van Veen 등(16)은 1996년부터 1999년까지 네델란드에서 분리된 OR분리주를 이용하여 amoxicillin에 대한 감수성을 조사한 결과, 그 감수성이 62%에서 14%로 감소되는 양상을 보였으며 β-lactamase저해제인 clavulanic acid와 amoxicillin을 복합사용하여 MIC를 조사한 결과 감수성이 낮게 나타난 것을 보고하였다. 이는 OR분리주가 β-lactamase를 산생하여 penicillin제제에 내성을 보인다는 점에서 Devriese 등(5)의 보고와 동일하며, 국내에서도 지속적으로 연도별 OR분리주를 대상으로 penicillin제제에 대한 내성연구를 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

현재까지 OR균은 18개 종(A-R)의 혈청형을 가지고 있으며(15), 그중 닭에서 분리된 OR균의 대다수(94%)가 혈청형 A이며, 일부가 혈청형 B, C, E로 보고하고 있다(14). 위와 같은 이유로 각 혈청형에 특이적인 ELISA가 개발되었으나, 혈청형이 부합되지 않을 경우 계군의 OR 항체보유율을 검사하는데 어려움이 있었다. 본 연구에 사용한 ELISA 검사 kit는 18개 혈청형 중 14개(A-M)의 혈청형에 대한 항체를 검사할 수 있는 것이었으므로 이러한 문제는 배제되었다고 할 수 있다(14).

육계 125계군, 육용종계 34계군, 산란계 29계군에서 채취한 1,609개의 혈청으로 OR에 대한 항체형성율을 분석한 결과, 육계 계군에서의 계군별, 개체별 감염율이 각각 4%(5/125) 및 0.5%(5/1,107)로 가장 낮았다. OR 감염증은 야외감염후 항체역가가 1-4주후까지 최고조에 이르며, 그 이후에는 빠르게 소실되므로, 다양한 일령의 계군을 대상으로 혈청검사를 하는 것이 바람직하다고 알려져 있다(5). 본 연구에서 육계계군 및 개체에서 항체형성율이 낮은 것은 사육기간이 짧은 우리나라 육계농가 상황의 특수성 때문인 것으로 사료된다. 또한, 사육기간내 OR 감염이 이루어진다 할지라도 곧 바로 출하됨으로써 감염항체의 형성이 이루어지지 못하기 때문인 것으로 추측되며 앞으로 일령에 따른 항체보유율에 대한 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

산란을 시작하는 20주령의 닭에서는 육계와 달리 50%이상의 국내 사육 계군에서 OR균에 대한 항체를 보유하고 있었다. 산란계 계군에 대한 미국의 OR 항체보유율 조사결과(8)에 의하면, 고연령 계군일수록 항체양성율이 더 높았으며, 여러 일령이 함께 사육하는 농장일수록 OR이 쉽게 전파되어 OR항체가 전 계군에 흔하게 존재하였다. 개체별 OR 항체양성율은 육용종계와 산란계 각각 20.8%와 9.8%로 비교적 낮았다. Sakai 등(11)은 본 연구와 유사한 성적을 보고 하였으며, 추가로 의양성율이 40%정도의 수준으로 나타남을 밝힘으로써 일본내 OR 항체보유율이 높다고

보고하였다. 또한, Turan 등(12)은 OR균에 감염된 계군내의 모든 닭이 혈청학적으로 모두 양성인 아니며, 종종 개체별로 그 항체 역가가 낮게 형성되거나 감염 수주 후에 항체가 소실되는 경우가 있다고 하였다. 본 연구에서 OR균의 계군별, 개체별 항체보유율이 정확히 일치하지 않는 것은 연령별, 농장별 역학적 특성 및 다른 호흡기성 질병과의 관계가 있을 것으로 추측되므로 앞으로 이에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 통하여 우리는 국내에서 분리된 OR균주의 내성획득이 닭의 다른 세균성 질병과 마찬가지로 특정 항생제에 대하여 상당수준 진행되어 있음을 확인하였으며 OR균에 대한 항체를 조사를 통하여 국내 사육농가에서도 장기간 사육되는 산란계 및 육용중계군에 양성계가 50%이상 존재함을 확인함으로써 이 병을 예방하기 위한 철저한 방역관리와 함께 이 병으로 인한 피해와 질병발현 양상 등에 대하여 더 깊은 연구가 수행되어야 할 것으로 보인다.

참고문헌

- 권용국, 전우진, 김재홍. 2003. 닭에서 *Ornithobacterium rhinotracheale* 감염증에 대한 연구. 대한수의학회지 43, 121-127.
- Ak, S, and N. Turan. 2001. Antimicrobial susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chickens in Turkey. *Veterinarski Arhiv*. 71, 121-127.
- Back, A., D. Halvorson., G. Rajashekara, and K.V. Nagaraja. 1998. Development of a serum plate agglutination test to detect antibodies to *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 84-86.
- Chin, R.P., P.C.M. van Empel, and H.M. Hafez. 2003. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection, p.683-690. In Y.M. Saif (ed.), Diseases of Poultry, 11th ed. Ames, Iowa State University Press.
- Devriese, L.A., J. Hommez., P. Vandamme., K. Kerster, and F. Haesebrouck. 1995. In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. *Vet. Rec.* 137, 435-436.
- Devriese, L.A., P. De Herdt, and F. Haesebrouck. 2001. Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens. 2001. *Avian Path.* 30, 197-200.
- Ferrato, M.J., W.A. Craig., M.N. Dudley., G. Eliopoulos., D.W. Hecht., J.F. Hindler., L.B. Reller., A.T. Sheldon., J.M. Swenson., F.C. Tenover., R.T. Testa., M.P. Weinstein, and M.A. Wiler. 2002. MIC Interpretive Standards ($\mu\text{g/ml}$) for *Pseudomonas aeruginosa* and other non-Enterobacteriaceae, p.94-95. Performance standards for Antimicrobial susceptibility testing, M100-S12, 12th supplement. The National Committee for Clinical Laboratory Standards., Wayne, Pennsylvania.
- Heeder, C.J., V.C. Lopes., K.V. Nagaraja., D.P. Shaw, and D.A. Halvorson. 2001. Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial laying hens in the north central region of the united states. *Avian Dis.* 45, 1064-1067.
- Hinz, K.H., C. Blome, and M. Ryll. 1994. Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Vet. Rec.* 135, 233-234.
- Roepke, D.C., A. Back., D.P. Shaw., K.V. Nagaraja., S.J. Sprenger, and D.A. Halvorson. 1998. Isolation and Identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial turkey flocks in the upper midwest. *Avian Dis.* 42, 219-221.
- Sakai, E., Y. Tokuyama., F. Nonaka., S. Ohishi., Y. Ishikawa., M. Tanaka, and A. Taneno. 2000. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: Preliminary investigations. *Vet. Rec.* 146, 502-503.
- Turan, N. and S. Ak. 2002. Investigation of the presence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens in Turkey and determination of the seroprevalance of the infection using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 46, 442-446.
- Vandamme, P., P. Segers., M. Vancaneyt., K. van Hove., R. Mutters., J. Hommez., F. Dewhirst., B. Paster., K. Kersters., E. Falsen., L.A. Devriese, M. Bisgaard., K.H. Hinz, and W. Mannheim. 1994. *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 24-37.
- van Empel, P., H. van den Bosch., P. Loeffen, and P. Storm. 1997. Identification and Serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 418-421.
- van Empel, P.C.M, and H.M. Hafez. 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Path.* 28, 217-227.
- van Veen, L., E. Hartman, and T. Fabri. 2001. In vitro antibiotic sensitivity of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in the Netherlands between 1996 and 1999. *Vet. Rec.* 149, 611-613.
- Varga, J., L. Fodor, and L. Makrai. 2001. Characterisation of some *Ornithobacterium rhinotracheale* strains and examination of their transmission via eggs. *Acta Vet. Hungarica.* 49, 125-130.

(Received July 4, 2003/Accepted September 1, 2003)

ABSTRACT : A Study on Antibacterial Activity and Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* Isolated from the Domestic Chickens

Woo-Jin Jeon, Yong-Kuk Kwon, Yeo-Sung Yoon¹, Jae-Hong Kim (Avian disease division, National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang, 430-824, Korea, ¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Ornithobacterium rhinotracheale (OR) is a recently described gram-negative rod-shaped bacterium associated with respiratory tract infection in poultry. In order to investigate current occurrence of OR infection and to evaluate antibiotic susceptibility, the prevalence of OR antibody in domestic chickens were examined and the minimal inhibitory concentrations(MICs) of 8 antibiotics for 11 OR isolates was determined. All isolates tested were mostly susceptible to three antibiotics, ampicillin (MICs ranging from 0.38 µg/ml to 2 µg/ml), tetracycline (MICs 0.094~3 µg/ml) and doxycycline (MICs 0.047~4 µg/ml) but resistant to genatmicin. Ciprofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin, and ofloxacin gave most isolates inhibition only in case of a higher concentration (MICs ranged in most cases from 3 µg/ml to 48 µg/ml). Out of 188 chicken flocks including broilers, broiler breeders, and layers, sero-positive flock to OR were detected in 5 broilers (4%), 17 broiler breeders (50%), and 16 layers (55.2%), using commercial OR enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kits. It suggested that OR infection was widespread in poultry farms in Korea.