< Original Article >

육용종계 가금티프스 발생에 따른 검사방법 개선 방안

추금숙^{1*} · 김경택² · 윤은정¹ · 김범석²

전라북도축산위생연구소 익산지소¹, 전북대학교 수의과대학²

Suggestions for a better inspection method according to the occurrence of fowl typhoid in broiler breeders

Keum-Suk Chu^{1*}, Kyoung-Taek Kim², Eun-Jeong Yoon¹, Beom-Seok Kim²

¹Iksan-Branch, Jeonbuk Institute of Livestock & Veterinary Research, Iksan 570-390, Korea

²College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received 20 November 2013; revised 6 January 2014; accepted 20 January 2014)

Abstract

Pullorum disease and fowl typhoid are septicemic avian diseases transmitting through egg by trans-ovarian infections. A series of tests has been performing in breeding flocks of chickens and test plans for proper inspection have been modified by government veterinary institute to control of such diseases. To improve inspection plans, different test methods were compared using fowl typhoid positive samples from a poultry farm located in Jeonbuk state in 2012. Based on first inspection, 11 samples among total 200 samples were positive by rapid slide agglutination (RSA) test and 7 samples among RSA positive samples were finally diagnosed as *Salmonella* Gallinarum infection by ELISA, bacterial isolation, PCR, and histopathologic examination. In the second inspection, 20 samples among total 100 samples were positive by RSA test. Among RSA positive ones, 19 samples were positive by ELISA, *S. Gallinarum* were successfully isolated in 3 samples, and 16 samples were positive by PCR in the cecal tonsils where were not successful for bacterial isolation. Based on histopathologic examination, severe inflammation in the 13 cecal tonsils and infiltration of lymphocytes and heterophils in the 11 livers were observed. Therefore, we suggest that bacterial isolation, PCR, and histopathologic examination methods in the third inspection need to be further used in various tissues for correct diagnosis and for final eradication of pullorum disease and fowl typhoid in breeding flocks of chickens.

Key words : *Salmonella* Gallinarum, Rapid slide agglutination, ELISA, PCR

서 론

닭 *Salmonella* 감염증 중 serogroup D1에 속하는 *Salmonella* Pullorum에 의한 추백리, *S. Gallinarum*에 의한 가금티프스는 제2종 법정전염병이며 양계산업에 지속적인 피해를 주는 난계대 질병으로 종계 및 원종계에 대해 종계장·부화장 방역관리요령에 의거 검진이 이루어지고 있다(Park 등, 1994; Kim 등, 1998).

*S. Pullorum*에 의한 추백리는 초생추에서 백색의 설사와 패혈증을 주 증상으로 높은 폐사율을 나타내고, 성계에서는 불현성 감염으로 보균계로서 산란 저하를 나타낸다(Gast와 Shivaprasad, 2003). 전라북도의 발생현황을 보면 2007년 1건, 2009년 2건이 발생하였고, 2010년 이후 전국적으로 4건이 발생하였으나 최근에는 발생보고가 없어 감소하는 추세를 보이고 있다. *S. Gallinarum*에 의한 가금티프스는 간, 비장, 신장의 종대 및 출혈 병변과 함께 패혈증 및 장염 등의 전신증상을 유발하며 만성형은 간에 청동색과 괴사 반점이 산재하고, 비장의 종대와 백색 괴사를 특징으

*Corresponding author: Keum-Suk Chu, Tel. +82-63-290-6512,
Fax. +82-63-290-6538, E-mail. chuks1103@korea.kr

로 한다. 한편 병아리에서는 1개월 미만 특히, 부화 후 10일 이내에 많은 폐사를 일으키며 모계에서 난계대 전염이 되었을 경우 1주령을 전후해서 다발하는 질병이다(Oh와 Choi, 1994; Lee와 Hahn, 2000). 전라북도의 발생은 2007~2009년 107건, 2010년 이후 152건이 발생되어 지속적으로 발생하고 있다.

난계대 질병은 항생제의 사용이나 백신으로만 근절이 어려워 국내에서는 추백리 근절을 위해 1993년부터 종계는 전혈을 통한 농장의 자율검사와 방역기관의 혈청을 이용한 양성 보균계를 색출하여 도태시키는 정책을 추진해 왔다. 2000년대 이후 추백리 발생이 현저하게 감소하였으나 가금티프스는 감소하지 않아 2005년부터 종계장·부화장 방역관리요령을 개정하여 추백리-가금티프스 검사를 1차 혈청 평판응집반응(rapid slide agglutination, RSA)과 2차 효소면역법(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)을 도입하였고, 2차검사시 양성율 10% 이상은 양성계군으로 판정하고 10%이하의 재검사를 실시토록 되어 있다(농림수산부, 2004). 이 요령은 2011년에 개정하여 3차 균분리 검사를 추가하였으며 2차 검사에서 1차 검사 대상 수수의 계사별 양성율 30%미만은 3차 검사를 실시하고 30%이상은 양성계군으로 판정하도록 되어 있다. 또한 3차 검사결과 1수 이상에서 균분리가 되어야 양성계군으로 판정하도록 되어있다(농림수산식품부, 2011).

현재 추백리-가금티프스 검사는 RSA, Microplate agglutination test, ELISA법이 주로 사용되고 있으나 방역기관에서는 RSA, ELISA와 가검물에서의 균분리 및 환축 검사에 PCR법이 적용되고 있다. 또한 항생제의 사용시 세균의 배양이 어려우며, 검출 세균의 생화학적 성상의 변화 등을 고려할 때(Kang 등 2003; Lee 2003) 균분리 동정에 문제점이 있어 적은양의 병원체만 존재하여도 검출이 가능한 PCR을 통한 연구가 이루어지고 있다(Park 등, 2001; Kim 등 2001; Shah 등, 2005). 종계의 검사는 질병의 색출을 위한 계군 검사로 항체 양성계에서 균 분리로만으로도 최종 판정을 하는데 어려움이 있다.

이에 본 연구는 관내 육용종계에서 가금티프스 양성 계군이 발생하여 종계장 방역관리요령에 의거 도태된 종계장의 혈청검사 방법인 RSA 및 ELISA 검사결과 양성계의 부검을 실시하여 육안병변 소견과 균분리 동정 및 PCR법과 조직검사를 실시하였으며 이를 토대로 종계장의 가금티프스 방역관리요령에 대한 개선을 제안하고자 한다.

재료 및 방법

공시 재료

전북 관내 K 종계장은 31주령의 17,000수를 사육하는 3동 무창계사 농장으로 '12년 8월 30일 3동 중 2개동에서 폐사가 발생하여 종계장·부화장 방역관리요령(농림수산식품부고시 제 2011-196호)에 의거 채혈 후 1차 혈청 200수 RSA 검사 후 RSA 양성개체 11수를 ELISA 검사하고 ELISA 양성 7수에 대한 부검을 실시하였고 2차 검사에서 혈청 100수에 대한 RSA 검사 후 RSA 양성 20수에 대한 ELISA 검사를 하고 ELISA 양성 19수를 대상으로 부검을 실시하였다.

혈청검사 및 균분리 동정

추백리-가금티프스 혈청검사를 위한 시료 채취는 개체별 표지를 하여 채혈하였으며 검사는 종계장·부화장 방역관리요령(농림수산식품부고시 제 2011-196호)에 의거 실시하였다. 또한 균분리는 가축질병병성감정실시요령(농림수산검역검사본부고시, 제 2011-2호)에 의거 간 및 비장에서 멸균 면봉으로 채취하여 BHI broth에 증균 후 MacConkey agar, blood agar, SS agar에 배양하여 의심되는 균을 선별하고 Vitek 및 PCR로 확인하였다.

중합효소 연쇄반응(PCR) 및 병리 조직검사

1차 검사 ELISA 양성개체 7수 및 2차 검사 ELISA 양성 19수의 맹장편도, 간, 비장, 신장을 대상으로 PCR 검사는 Kang 등(2011)의 방법에 따라 특이 밴드 증폭 유무를 확인하였으며 병리 조직은 10% 완충포름알린에 맹장편도, 간, 비장, 신장, 심장을 고정하고 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5 µm의 조직절편을 만들어 H&E 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

결 과

혈청검사 및 균분리 동정

가금티프스로 진단된 농장에 대한 RSA은 총 150수

Table 1. Result of *S. Gallinarum* isolated from K breeding farms

Henhouse		Serological test			Culture test		No of positive by PCR
		No of test	No of positive		No of test	No of positive	
			RSA	ELISA			
First inspection	1 groups	50	2	2	2	2	2
	2 groups	50	8	7	5	5	5
	3 groups	100	1	0	0	0	-
Second inspection	3 groups	100	20	19	19	3	3
Total		300	31	28	26	10	10

Fig. 1. Periportal infiltration of heterophils mixed with lymphocytes, Liver ($\times 200$, $\times 400$).

Fig. 2. Severe myocarditis with infiltration of histiocytes and lymphocytes, Heart ($\times 100$, $\times 400$).

검사 결과 1동 50수 중 2수(4.0%), 2동 50수중 8수(16.0%)가 양성이었으나 3동 50수는 모두 음성으로 판정되어 추가 50수 검사를 실시하여 1수(1.0%)가 양성으로 판정되었다. RSA 양성개체에 대한 ELISA검사 결과 1동 2수 중 2수, 2동 8수 중 7수가 양성, 3동 1수는 음성으로 판정되었다. ELISA 양성으로 판정된 개체에 대하여 1동 2수, 2동 5수의 총 7수의 부검 소견은 맹장편도 출혈과 간 및 비장 종대가 관찰되었고, 7수의 간 및 비장에서 분리된 균은 Vitek으로 *S. Gallinarum*을 확인하였다. 그러나 3동의 RSA 양성, ELISA 음성인 1수는 부검소견은 정상이었고 균도 분리되지 않았다. 종계장·부화장 방역관리요령에 의거 1, 2동은 양성계군으로 판정되어 10월 8일 도태되었으나 3동은 음성계군으로 판정되었다. 도태되지 않은 3동에서 34주령에 폐사가 발생되어 검사 결과 *S. Gallinarum*이 분리되어 다시 100수 채혈하여 RSA에서 20수(20.0%) 양성, RSA 양성개체에 대한 ELISA 검사에서 19수가 양성이었고, 양성개체 19수에 대한 균분리 결과 비장에서 3수(15.8%) Vitek으로 *S. Gallinarum*을 확인하였다(Table 1). 균이 분리된 3수의 육안병변은 1수는 간포막염과 간 및 비장 종대의 소견, 2수는 간유약과 간 및 비장종대 소견이 관찰되었다. 균분리가 확인되지 않은 16수 육안병변에서 간경화 1수, 신장종대 3수 및 심낭염 3수가 관찰되었으며

가금티프스로 의심되는 육안 소견은 관찰되지 않았다.

종합효소 연쇄반응(PCR) 및 병리 조직검사

1차 검사 양성 개체 7수의 맹장편도, 간, 비장, 신장 조직에서 추출한 DNA template에서 PCR 검사결과 *S. Gallinarum*이 확인되었으며, 조직검사에서 간, 비장, 신장에서 다발성 괴사소와 위호산구 침윤이 관찰되었다.

2차 검사 양성 판정된 개체 3수의 맹장편도, 간, 비장, 신장에서 PCR 검사결과 *S. Gallinarum*이 확인되었고 조직검사 결과 간에서 다발성 괴사소와 위호산구 침윤과 심장에서는 신근염과 위호산구 침윤이 관찰되었다. 그러나 ELISA에서 양성이었으나 균분리가 되지 않은 16수의 PCR검사에서 맹장편도 16수, 간 1수, 비장 1수, 신장 5수에서 양성밴드를 확인하였으며 조직검사에서 맹장편도 13수에서 염증소견, 간 11수에서 림프구 및 위호산구(Fig. 1), 신장 6수에서 간질성 신염, 심장 4수에서 염증이 관찰되었다(Fig. 2)

고 찰

종계의 난계대 질병인 가금티프스는 육계농장에

이차적인 피해를 발생시키는 질병으로 양계농가의 경제적 피해의 감소와 질병 근절을 위해 제2종 가축 전염병으로 규정하고 있다. 또한 종계에서 산란전 정기 검진과 양성계군은 종란으로 사용을 금지하고 도태를 권고하는 질병이다.

관내 종계장에서 2012년 9월 가금티프스가 발생하여 종계장·부화장 방역관리요령에 의해 혈청검사를 실시하여 RSA에서 1동 4%, 2동 16%로 초기 질병이 발생한 2동이 양성율이 높았으며 3동은 1차 검사에서는 양성계가 검출되지 않았으나 2차 검사에서 양성계가 검출되어 감염 시기와 질병의 진행 상황에 따른 검출율의 차이를 확인할 수 있었다. 종계장·부화장 방역관리요령에 의해 계사별 양성율이 30%이상을 양성계군으로 판정하고 30%이하는 균분리 검사를 하며 양성계가 4수 이상일 때 최소 4수, 4수 미만일 때 해당 개체 모두를 검사하여 양성계군으로 판정하도록 되어있다.

그러나 본 농장의 검사로 보면 가금티프스 감염으로 처음 폐사가 발생하였음에도 RSA 검사 양성율 16%로 계사별 양성율 30%이상일 때 양성계사로 판정하는 규정에 대한 검토가 필요하며 균 분리도 1차 양성계 7수는 전수 균이 분리되었으나 2차 검사에서 19수 중 3수만이 균이 분리되어 감염 진행 정도에 따른 균 분리 검사의 어려움을 확인할 수 있었다.

2011년 전라북도 추백리-가금티프스 혈청검사 결과를 보면 87농장 334계사 29,445수를 검사하여 RSA에서 236수(0.8%) RAS의 양성 236수 ELISA 검사에서 22수(9.3%) 양성이었으나 균분리가 확인된 개체는 없었다. 2012년 검사 중 본 양성 농장을 제외한 82농장 355동 29,630수를 검사하여 RSA에서 256수(0.9%), RAS의 양성 256수 ELISA 검사에서는 2수(0.8%)가 양성이었으나 균은 분리되지 않았다.

*S. Pullorum*과 *S. Gallinarum*은 *Salmonella* D그룹에 속하며 항원의 성상이 유사하여 혈청검사로는 구분이 어려워 균분리 검사로 구별해야 하며 Kim 등(1998)에 의하면 *Salmonella* 동정에 대한 40일령의 닭의 경구 인공감염 실험에서 6일부터 항체가 검출되었으며 ELISA 9일, RSA 12일, 면역확산반응법에서 15일에 감염 3수가 양성으로 검출된 것으로 보고하여 검사방법에 따른 검출 시기와 감도를 비교하였다. Ryu 등(1999)은 산란계의 RSA 양성 개체에서 15.6% *Salmonella*를 분리하였으며 간과 맹장에서 8.9%, 비장에서 7.4% 난소에서 4.4% 분리를 보고하였다. Choi 등(2000)은 인공감염계의 혈청검사 진단법을 비교하

여 RSA는 감염 5일 후부터 10수 중 1수, 7일 후 8수, 9일 후 10수 양성이었고 MAT에서는 감염 후 5일 5수, 7일 10수가 모두 양성으로 조사되었으며 분변에서의 배양법과 PCR을 비교하여 PCR이 배양법에 비해 검출율이 높은 것으로 보고하였다. Proux 등(2002)은 추백리-가금티프스의 검출율 증가를 위해 Rappaport-Vassiliadis broth를 증균배지로 사용하여 1일령 닭보다 10주령의 닭의 인공 감염시 균 분리율이 떨어진다고 보고하였다. Park(2008)은 혈청검사 표본크기에 대한 연구에서 추백리-가금티프스와 같이 유병율이 낮은 질병의 비발생 증명을 위한 검사는 신뢰수준을 높이기 위해 계군당 검사수의 증가를 재기하였다.

종계장의 추백리 및 가금티프스 감염에 대한 검사는 1994년 종계장 위생관리요령, 1999년 추백리 방역 실시요령, 2004년 종계장·부화장 방역관리요령(농림부고시 제 2004-74)호으로 농장 자체검사는 전혈 평판응집반응법이 사용되었고 방역기관의 확인검사는 혈청에서 RSA가 계군 검색 방법으로 활용되어 왔으나 최근에는 ELISA와 양성계에 대한 균분리 검사로 최종 확인검사가 이루어지고 있다. 이렇게 종계장·부화장 방역관리요령은 1994년 이후 개정 과정을 거쳐 효율적인 검색방법을 모색하고 있으나 양계의 산업화 및 종계의 사육형태 변화가 반영되어야 한다. 종계장·부화장 방역관리요령에는 부화 후 120일령 산란 전 검사와 1년내 추가검사를 실시하도록 되어 있으나 양계산업의 계열화로 인해 산란 전 육성농장에서 검사 후 산란농장으로 이동하여 1년 이내에 도태되어 산란 중에 검진 없이 도태가 이루어지고 있는 실정이다. 그러므로 산란 전 검사 후 타 농장으로 이동하여 산란하는 계군은 추가검사 의무화 검토와 시료채취 기준도 계사별 30수 이상을 계사별 사육수수를 감안한 규정의 수정이 필요하다. 또한 종계장의 살모넬라 균분리는 병변이 있는 환축의 검사와 차별화가 필요한 것으로 사료되며 새로운 검사법의 도입과 연구를 통한 개정이 필요하다. 또한 종계장·부화장 방역관리요령에 부화장에 대한 지도·감독이 분기 1회 이상으로 되어있고 부화장의 검사방법에 대한 구체적인 방법이 없으므로 부화장 및 분양 병아리의 검사 규정이 필요하다고 사료된다.

결론

혈청 200수 검사로 RSA에서 1동 50수 중 2수(4.0%),

2동 50수 중 8수(16.0%)가 양성이었으나 3동 100수 중 1수(1.0%)가 양성으로 판정되었다. RSA 양성개체의 ELISA로 7수(1, 2동)가 양성, 3동은 음성이었다. ELISA 양성 7수에서 Vitek으로 균 분리와 PCR 및 조직검사로 *S. Gallinarum*을 확인하였다. 또한 2차 검사에서 혈청 100수 RSA에서 20수(20.0%) 양성, ELISA에서 19수(19.0%)가 양성 판정되었고 3수에서 균이 분리되었다. 그러나 *S. Gallinarum*이 확인되지 않은 16수에서는 PCR에서 양성 및 조직검사에서 다발성 괴사소와 위호산구 침윤이 관찰되었다. 즉 ELISA 양성개체에서 균을 분리하여 도태하는 현 방역관리요령에 대한 연구를 통한 개선이 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 농림수산검역검사본부. 2011. 가축질병병성감정실시요령. 농림수산검역검사본부 고시 제2011-2호.
- 농림수산부. 2004. 종계장 부화장 방역관리요령. 농림부고시 제 2004-74호.
- 농림수산식품부. 2011. 종계장·부화장 방역관리요령. 농림수산식품고시 제2011-196호.
- Choi YJ, Kim DK, Kim YH. 2000. Epidemiological characteristics on fowl typhoid outbreak in Kyungnam province and comparison of diagnostic method for identification of *Salmonella* Gallinarum. Korean J Vet Serv 23: 349-360.
- Gast RK, Shivaprasad HL. 2003. *Salmonella* infections. pp. 567-613. In: Saif YM(Ed). Diseases of poultry. 11th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Kang MS, Kwon YK, Jung BY, Kim A, Lee KM, An BK, Song EA, Kwon JH, Chung GS. 2011. Differential identification of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of *glgC* and *specC* genes. Vet Microbiol 147: 181-185.
- Kang SS, Park JM, Lee JJ, Yuk MJ, Byeon CS, Seo HW, Choi HY. 2003. The study on the characteristics of fowl typhoid and eradication program. Korean J Vet Serv 26: 135-144.
- Kim HH, Park MS, Kang YH, Kim SH, Yu JY, Chung BK, Lee BK. 1998. Epidemiological characteristics of *Salmonella* strains isolated in Korea in 1997. Kor J Vet Publ Hlth 22: 253-260.
- Kim JT, Shim HS, Kim TJ, Ko TO, Woo JT, Ryu KS, Park YS. 1998. Studies on serological tests for pullorum disease. Korean J Vet Serv 21: 313-323.
- Kim YS, Kim SK, Song WC, Hwang EK. 2001. Comparison of polymorphisms of *Salmonella* Pullorum and *Salmonella* Gallinarum using DNA amplified fingerprinting. Korean J Vet Res 41: 357-365.
- Lee DS, Hahn TW. 2000. Virulence, antibiotics susceptibility and plasmid profiles of *Salmonella* Gallinarum isolated from chickens in Korea. Kor J Vet Publ Hlth 24: 49-57.
- Lee YJ, Kim KS, Kim YK, Kwon YK, Tak RB. 2003. Biochemical characteristics and antimicrobials susceptibility of *Salmonella gallinarum* isolated in Korea. J Vet Sci 4: 161-166.
- Oh GH, Choi WP. 1994. Studies on *Salmonella* isolated from chicks. Korean J Vet Res 34: 501-510.
- Park KY, Yeh JG, Park SG. 1994. Characteristics of *Salmonella* species isolated from poultry. Kor J Vet Publ Hlth 18: 107-116.
- Park MK, Choi KS, Kim MC, Chae JS. 2001. Differential diagnosis of *Salmonella* Gallinarum and *S. Pullorum* using PCR-RFLP. J Vet Sci 2: 213-219.
- Pak SI, Park CK. 2008. Determination of sample size to serological surveillance plan for pullorum disease and fowl typhoid. Korean J Vet Res 48: 457-462.
- Proux K, Humbert F, Jouy E, Houdayer C, Lalande F, Oger A, Salvat G. 2002. Improvements required for the detection of *Salmonella* Pullorum and Gallinarum. Can J Vet Res 66: 151-157.
- Ryu JY, Jun MH, Chang KS, Son HS, Kwak HK, Park KJ, Woo YK. 1999. Isolation of *Salmonella* from the layer chickens reacting in pullorum-typhoid agglutination test. Korean J Vet Serv 22: 221-237.
- Shah DH, Park JH, Cho MR, Kim MC, Chae JS. 2005. Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing *Salmonella* Gallinarum from *Salmonella* Pullorum : serotype-sepecific *rfbS* sequence polymorphism. J Microbiol Methods 60: 169-177.