

닭의 *Haemophilus* 感染症에 관한 研究

I. 傳染性 *Coryza*의 感染鷄로부터 *Haemophilus gallinarum*의 分離

南宮 琰 · 安壽煥 · 金基錫 · 毛仁筆 · 李榮玉 · 朴根植 吳 璟 綠

農村振興廳 家畜衛生研究所

千戶孵化場

緒 論

닭의 傳染性 *coryza*는 눈물, 콧물, 세척기 및 結膜 炎 등의 症狀을 나타내며, 症狀의 深度에 따라서 副鼻 腔, 顔面 등에 浮腫을 일으키는 急性 呼吸器 疾病으로서 그 病原體는 *Haemophilus gallinarum* (HG)으로 알려져 왔다.¹⁾

그러나 本病은 他疾病과 復合 感染되는 例가 많으며 特別히 *Mycoplasma*病과 混合 感染時에는 그 症狀가 慢性 的으로 長期間 持續되는 特徵²⁾을 가졌을 뿐만 아니라 發育 遲延과 産卵率의 減少 등으로 養鷄 産業에 많은 經濟 的 損失을 가져 온다.

本病은 歐美等地에서는 이미 1920年代 부터 發生되어 왔으나 DeBlicke³⁾와 Nelson等⁴⁾에 依해서 最初로 報 告되었다.

De Blicke³⁾는 本病의 原因體를 *Bacillus hemoglobinophilus Coryza gallinarum*으로 呼稱하였으나 그 後 Eliot와 Lewis⁵⁾는 다시 HG로 命名하여 오늘에 이르고 있다.

日本에서는 1962년에 加藤 등⁶⁾이 처음으로 發生報告 하였다. 우리 나라에서는 過去 오래前부터 本病과 類似 한 症狀을 나타내는 닭들을 一般 養鷄場에서 흔하게 분 수 있었으나 本病의 原因菌인 HG를 그동안 分離 報告 한 바는 없었다.

著者等은 1979년에 HG를 分離하여 本 學會에 報告한 바 있었으며 그 後에 다시 *coryza* 症狀를 나타내는 可 檢鷄로 부터 數種의 *Haemophilus*屬菌을 分離하고 HG의 公認株를 對照로 하여 性狀을 比較檢討하였으며 그 成績을 報告한다.

材料 및 方法

1. 菌株 : 野分 分離菌株 5株(G1, G2, PS1, PS2, 및 PKS1)와 日本 家畜衛生試驗場으로부터 分讓받은 HG 221 및 美國 USDA, National Animal Disease Cen-

ter,로부터 分讓받은 HG 083을 標準菌株로 供試하였 다.

2. 培地 : 칼로 잘게 片肉한 無脂肪 鷄肉을 2倍의 蒸 溜水에 넣고 一夜 靜置시킨 다음 100°C에서 30分間 加熱 하여 濾過시킨 鷄肉汁液 100ml에 polypeptone(1%)과 食鹽(0.5%)를 넣고 pH 7.4로 調節한 다음 高壓滅菌하 여 增菌培地로 하였으며, 培養時에는 鷄血清(5%)과 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (0.000 25%)를 各各 添加하였다. 寒天培地는 增菌培地에 寒天 2.5%를 넣어서 確認培地로 供試하였으며 血液培地는 tryptose blood agar(Difco)에 緋羊血液(5%)을 添加 하여 分離培地로 供試하였다.

3. 菌分離 : 滅菌된 綿棒으로 可檢鷄의 sinus, 氣管 및 氣囊 등을 各各 無菌的으로 插入하여 分離培地에 塗 布한다음 CO₂ 孵化器에서 15~20時間 培養하여 *Haemophilus*와 비슷한 集落을 골라서 增菌培地에 옮기 쉽다. 增菌培地에서 發育된 菌은 다시 確認培地에 옮겨 심은 다음 *Staphylococcus epidermidis*를 feeder로 다 시 심어 CO₂ 孵化器에 20~30時間 培養하면서 衛生增殖 與否를 觀察하였다.

4. 性狀調查 : Bergey's manual¹⁴⁾에 記載된 HG의 性狀에 따라서 菌形態, catalase作用, indol 및 硫化水 素 등의 産生과 硝酸鹽의 還元 및 營養要求性과 그 밖에 鷄胎兒에 對한 病原性 등을 Kume 등⁷⁾의 方法에 準해서 實施하였다.

5. 抗原 및 免疫血清 : 增菌培地에 37°C에서 20時間 培養한 供試菌液을 遠心分離器로 集菌하고 磷酸緩衝食 鹽水(merthiolate 0.01%添加)에 浮遊시켜 Mac Farland tube No. 2에 濃度を 調節하여 抗原으로 供試하 였으며, 供試菌株中 G₁, G₂ 및 221에 對한 免疫血清은 Page¹⁰⁾의 方法에 準하여 4個月齡鷄에 接種하여 얻은 血清을 凍結保存後 供試하였다. 그 밖에 PS1, PS2 및 PKS1 등의 菌株에 對한 血清은 菌分離 當時에 採取한 血 清을 供試하였다.

6. 血球凝集抑制反應: Iritani와 Hitaka³⁾의 方法에 準하여 micro plate로 4HA單位の 抗原에 1% 鷄血球를 使用하여 血球凝集抑制反應試驗을 實施하였다.

結 果

1979年 서울과 水原近郊에 있는 養鷄場에서 集團的으로 눈물, 콧물 및 呼吸器症狀等 Coryza症狀을 나타내는 可檢鷄로 부터 2株의 HG를 分離하였다.

또한 1981年 千戶 孵化場에서 孵化한 SPF 숫병아리를 分讓받아 12週間 隔離飼育하여 選定된 monitoring farm에 10~20首씩 配分하여 疾病監視鷄로 飼育하였으며, SPF鷄로 부터 數株의 *Haemophilus*屬菌을 分離하였다(Table 1).

分離菌株의 形態는 寒天培地上에서 18時間 培養時의 集落은 아주 작은 이슬방울같은 모양을 나타내었으며, 菌體는 Gram陰性的인 圓形 또는 短小桿菌으로서 運動性이 없고 芽胞를 形成치 않은 反面 莢膜을 가진것이 標準菌株와 同一하였다.

生物學的 性狀은 供試分離菌株 모두 catalase作用에 陰性이고 indol과 硫化水素等을 產生시키지 못한 反面 硝酸鹽을 還元시키므로서 標準菌株와 一致하였다(Table 2).

또한 菌增殖에 있어서 成長要素인 鷄血清과 V factor를 必要로 하였으며 寒天培地上에서 *Staphylococcus epidermidis*의 feeder culture 周圍에 對照菌株와 같이 特異的인 衛星增殖을 確認할 수 있었다(Fig. 1).

鷄胎兒에 對한 病原性은 供試 分離菌株別로 7日齡 鷄胎兒의 亞黃內에 接種時 24時間內에 全鷄胎兒가 甚한 出血病變을 나타내므로서 標準菌株와 같이 강한 病原性을 보였다(Table).

또한 野外分離菌株와 標準菌株間의 交叉 血球凝集抑制反應을 人工免疫血清과 自然感染血清을 使用하여 檢討한 바 同種間에는 HI抗體의 血清力價가 8(log 2)이었으며 異種間에는 4~5(log 2)로서 同種間보다 多少 낮은 抗體價를 나타내었으나 供試菌株間에 顯著한 交叉反應이 成立됨을 알 수 있었다(Table 3).

Table 1. Background Information of *Hemophilus* Strains Isolated from Field

| Strains | Isolation Date | Isolated Area | Chicken Age (weeks) | Isolated from | Signs and Lesions of Infected Chicken |
|---------|----------------|--------------------|---------------------|---------------|---------------------------------------|
| G1 | Feb., 1979 | Seoul | 12 | Sinus | Coryza, airsacculitis |
| G2 | May, 1979 | Suwon, Gyeonggi | 15 | Sinus | Coryza, airsacculitis |
| PS1 | July, 1981 | Anyang, Gyeonggi | 30 | Sinus | Coryza |
| PS2 | July, 1981 | Anyang, Gyeonggi | 30 | Sinus | Coryza |
| PKS1 | Oct., 1981 | Keumsan, Choongnam | 35 | Sinus | Coryza |

Table 2. Biological Properties and Pathogenicities of *Hemophilus* Isolated from Chickens

| Characteristics | Reference Strains | | Field Isolates | | | | |
|------------------------------|-------------------|-----|----------------|----|-----|-----|------|
| | 221 | 083 | G1 | G2 | PS1 | PS2 | PKS1 |
| Catalase Activity | - | - | - | - | - | - | - |
| Indol Production | - | - | - | - | - | - | - |
| H ₂ S Production | - | - | - | - | - | - | - |
| Nitrate Reduction | + | + | + | + | + | + | + |
| Growth on Tryptose agar with | | | | | | | |
| NAD (100µg/ml) | - | - | - | - | - | - | - |
| Chicken Serum (1%) | - | - | - | - | - | - | - |
| NAD+Chicken Serum | + | + | + | + | + | + | + |
| Feeder* | + | + | + | + | + | + | + |
| Pathogenicity for Embryo | + | + | + | + | + | + | + |

* *Staphylococcus epidermidis* was used as feeder culture

Table 3. Cross Hemagglutination Inhibition Test with *Haemophilus* Strains

| Antigen | Serum | | | | | | |
|---------|-------|----|----|-----|-----|------|--------|
| | 221 | G1 | G2 | PS1 | PS2 | PKS1 | Normal |
| 221 | 8* | 6 | 6 | 4 | 4 | 5 | 1 |
| G1 | 6 | 8 | 8 | 5 | 4 | 5 | 1 |
| G2 | 6 | 8 | 8 | 5 | 4 | 5 | 1 |

* Serum titer (\log_2)

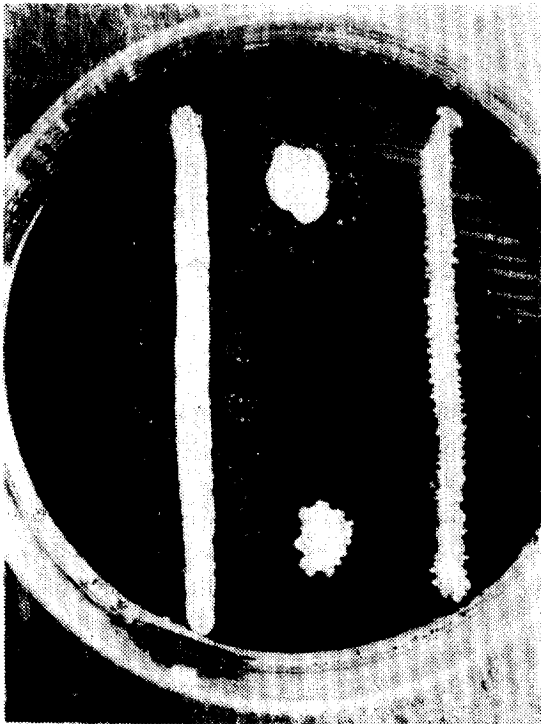


Fig. 1. Satellite colonies of *Haemophilus gallinarum* (G1 strain) on blood agar streaked with *Staphylococcus epidermidis* as feeder

考 察

닭의傳染性 coryza는 原因菌인 HG에 依해서 發病되는 傳染病으로 알려져 왔으나 實際로 우리 나라에서 可檢鷄로부터 HG를 分離 同定한 例는 이번이 처음이다.

우리 나라에서는 過去에 一般 養鷄場에서 臨床적으로 눈물, 콧물 및 顔面浮腫等 coryza 症狀를 나타내는 病鷄를 흔하게 보아 왔으나, 最近에는 이러한 症狀를 나타내는 可檢鷄를 發見하기가 매우 어려운 實情에 있다. 이러한 理由는 여러가지 抗生劑가 市中販賣飼料에 添加되어 있을 뿐만 아니라 最近들어 一般 養鷄場에서 抗生

劑의 濫用 및 誤用이 急激히 增加되기 때문인 것으로 思料된다. 이러한 事實을 뒷받침할 수 있는 實例로서 著者等은 *Haemophilus*를 分離하기 위한 目的으로 抗生劑가 添加되지 않은 配合飼料를 注文하여 實驗鷄에 使用함으로써 쉽게 臨床적으로 coryza 症狀를 나타내는 鷄群을 發見할 수 있었으며 또한 이러한 鷄群으로부터 *Haemophilus*를 分離한 수 있었다.

可檢鷄로부터 菌分離는 發症初期일 수록 容易하였으며 發症이 오래 經過할 수록 他雜菌이 混合增殖됨으로서 分離가 어려웠다.

分離菌은 Gram陰性의 圓形 또는 短小桿菌으로서 運動性이 없고 nutrient agar等 普通培地에서는 發育되지 않으나 血液寒天培地에 CO₂ 孵化器에서는 良好하게 發育됨을 볼 수 있었다.

또한 液體培地上에 菌의 增殖은 NAD와 鷄血清을 添加하므로써 可能하였으며 特히 鷄血清量이 5%以上 되었을때 增殖이 良好하였다.

特히 *Haemophilus*의 增殖에 있어서 V 및 X factor를 必要로 하고 있으며 V factor는 NAD(Co-enzyme)로서 卵黃, 新鮮한 酵母 및 鷄 또는 羊血清等에 含有되어 있다고 알려져 왔다.¹³⁾

生物學的性狀을 檢査한 바 indol 및 硫化水素의 陰性反應, 硝酸鹽의 還元 및 鷄胎兒에 對한 病原性이 認定됨으로 보아 終來報告^{5,7,10,11)}된 結果와 一致하였다.

標準菌株(221)와 野外分離菌株間의 交叉血球凝集抑制反應을 人工免疫血清과 野外感染血清을 使用하여 比較檢討한 바 標準菌株과 野外分離菌株間에 顯著한 血球凝集抑制抗體의 差異가 認定되지 않는 것으로 미루어 野外分離菌株들은 標準菌株과 抗原性이 同一할 것으로 思料된다.

그러나 지금까지 分離된 HG는 3가지 抗原型으로 分類 報告되고 있어서 앞으로 繼續 野外分離菌株들에 對한 抗原型的 究明과 아울러 免疫原性的 調査가 要項된다.

結 論

*Haemophilus gallinarum*에 依해서 發病되는 닭의 傳染性 coryza는 過去 오래前 부터 一般 養鷄場에서 많이 發生되어 經濟的被害를 많이 주어 왔으나 實際로 本病의 原因菌을 分離 同定한 바는 없었다.

그러나 1979年과 1981年에 서울 및 水原近郊의 養鷄場에서 coryza 症狀를 나타내는 可檢鷄로부터 數株의 *Haemophilus*屬菌을 分離하고 그에 對한 形態 및 生物學的性狀檢査와, 病原性 및 血清學的 交叉反應을 實施하여 本分離菌을 *Haemophilus gallinarum*으로 同定하였다.

参 考 文 献

1. De Blicck, L.: A haemoglobinophilic bacterium as the cause of contagious catarrh of the fowl. *Vet. J.* (1932) 88 : 9.
2. Eliot, C.P. and Lewis, M.R.: A hemophilic bacterium as a cause of infectious coryza in the fowl. *J. Am. Vet. Med. Ass.* (1934). 84 : 878.
3. Iritani, Y. and Hitaka, S.: Enhancement of hemagglutinating activity of *Haemophilus gallinarum* by trypsin. *Avian Dis.* (1976) 20 : 614.
4. Kato, K.: Infectious coryza of chickens. V. Influence of *Mycoplasma gallisepticum* infection on chicken infected with *Haemophilus gallinarum*. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* (1965) 5 : 183.
5. Kato, K., Sato, T. and Taubahara, H.: Infectious coryza of chickens. I. Clinical and etiological observations. *Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth.* (1962) 45 : 15.
6. Kato, K. and Tsubahara, H.: Infectious coryza of chickens. II. Identification of isolates. *Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth.* (1962) 45 : 21.
7. Kume, K., Sawata, A. and Nakase, Y.: *Haemophilus* infections in chickens. I. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from chickens affected with Coryza. *Jap. J. Vet. Sci.* (1978) 40 : 65.
8. Kume, K., Sawata, A. and Nakase, Y.: Immunologic relationship between Page's and Sawata's serotype strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Am. J. Vet. Res.* (1980) 41 : 757
9. Nelson, J.B.: Etiology of an uncomplicated coryza in the domestic powl. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1932) 30 : 306.
10. Page, L.A.: *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.* (1962) 23 : 85.
11. Sawata, A., Kume, K. and Nakase, Y.: *Haemophilus* infections in chickens. 2. Types of *Haemophilus paragallinarum* isolates from chickens with infectious coryza, in relation to *Haemophilus gallinarum* strain No. 221. *Vet. Sci.* (1978) 40 : 645.
12. Sawata, A., Kume, K. and Nakase, Y.: Antigenic structure and relationship between serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. *Am. J. Vet. Res.* (1979) 40 : 1450.
13. Yamamoto, R.: Infectious coryza; *in* Disease of poultry, 7th ed., Iowa State University, Press, Iowa. (1978) p. 225.
14. Zinnemann, K. and Biberstein, E.L.: *Haemophilus*; *in* Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore. (1974) p. 364.

Studies on *Haemophilus* Infection in Chickens

1. Isolation of *Haemophilus gallinarum* from Chickens Affected with Infectious Coryza

Sun Namgoong, D.V.M., Ph.D., Soo Hwan An, D.V.M., M. Sc., Ph.D.,
Ki Seuk Kim, D.V.M., M.S., In Pil Mo, D.V.M.,
Young Ok Rhee, D.V.M., M.S., Ph.D. and Keun Sik Park, D.V.M.

Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development

Kyung Rok Oh, D.V.M., M.S.
Chunho Hatchery and Breeding Farms

Abstract

It has long been believed for the presence of infectious coryza affecting serious economic loss in

domestic poultry industry. However, the etiologic agent has not been isolated until quite recently.

From 1979, several strains of *Haemophilus*-like organism were isolated from chickens with symptoms similar to infectious coryza, and their colonial morphology, growth requirement, biochemical properties and pathogenicity were assessed. In addition, serological properties of the isolates by cross hemagglutination inhibition test was also investigated.

The results indicated that all the isolates were identified as *Haemophilus gallinarum* which had similar characteristics to the reference strains.