

病鷄로부터分離한 *Pseudomonas aeruginosa*의 生化學的 性狀과 抗菌性 藥劑耐性

金基錫 · 南宮琰 · 毛仁筆 · 朴根植 吳 璟 祿

農村振興廳 家畜衛生研究所

千戶家禽疾病研究所

緒 論

*Pseudomonas aeruginosa*는 Gram 陰性的 短桿菌으로서 運動性이 있으며 自然界에 널리 分布되어 있고 汚物에 혼한 棲息菌이다. 그 病原성은 높다 할 수 없으나 protease를 含有하고 있는 것으로 알려진 細胞外 粘液인 slime의 產生에 의해 그 毒力이 增加되는 것으로 알려져 있다. 특히 이 菌은 創傷이나 外科手術 後の 感染으로 사람이나 各種 動物에 있어서 黃綠色의 膿 및 膿瘍의 形成과 깊은 관계가 있으며 家畜에 있어서 소의 乳房炎, 成畜의 泌尿生殖器의 感染, 犢牛나 豚의 腸炎에서 原因菌으로 分離된 바 있고 또한 犢牛에서 肝膿瘍, 腹膜炎 및 關節炎, 豚에서의 肺炎, 개, 토끼, 멧돼지, 친치라 및 實驗動物 등에서도 類似한 感染症을 일으킨다고 알려져 왔다.^{2~5,8,13,15,19)}

닭에 있어서 이 菌의 感染症은 1926년에 Kaupp 및 Dearstyne이 처음 報告한 바 있으며¹⁰⁾, Biddle 및 Cover는 1957년에 慢性呼吸器病에 걸린 닭의 呼吸氣道로부터 *Pseudomonas aeruginosa*의 分離를 報告한 바 있다. 그러나 우리나라에서는 아직까지 家禽에서의 本病的 發生 및 原因菌의 分離에 관하여 報告된 바 없다.

따라서 著者들은 1978년부터 1980년까지 病性鑑定 依賴된 可檢病鷄중 特別히 慢性呼吸器病이나 괴저성 피부염 또는 關節炎을 앓고 있는 닭의 病變部로부터 細菌培養을 實施하고 이로부터 이 菌의 特有的 냄새와 綠色의 色素를 띠는 集落을 分離해서 各種 生化學的 性狀을 調査하고 또한 抗菌性藥劑 感受性試驗을 實施하여 얻은 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

可檢材料...1978年 6月부터 1980年 사이에 病性鑑定 依賴된 닭 可檢物중에서 臨床 및 剖檢所見上 細菌性 疾病에 感染된 것으로 疑心되는 病鷄(기낭염, 괴저성 피

부염 및 관절염 등의 감염예)의 氣囊, 肺, 心臟, 關節, 壞死皮膚 등의 病巢로부터 *Pseudomonas aeruginosa*의 分離를 試圖하였다.

菌分離 및 同定: 可檢鷄의 病變部로부터 滅菌된 白金耳나 綿棒으로 內容物을 少量 無菌의으로 採取해서 4~5ml 準備된 Brain heart infusion broth(BHIB)에 接種하였으며 37°C에서 18~24 時間 培養한 후 顯微鏡下에서 Gram陰性的 短桿菌을 確認하고 MacConkey agar에 白金耳로 均등도말하여 다시 37°C에서 18~24時間 培養후 平板上에 增殖된 集落의 形態, 乳糖分解能 및 냄새 등에 의해 原因菌을 分離하였으며 一次 半流動한 斜面배지에 穿刺培養으로 保存하면서 供試하였다.

菌의 同定은 Cowan¹¹⁾과 MacFaddin¹²⁾의 方法에 依據 실시하였다.

藥劑感受性 試驗: Bauer-Kirby의 方法에 準하였다. BHIB에 18~24時間 培養한 菌液을 標準濁度液(0.36N H₂SO₄ 9.5ml + 0.04M BaCl₂ 0.5ml 混合液)과 같은 濃度로 희석한 후 희석된 菌液을 滅菌綿棒에 沈積시켜 Muller-hinton medium 平板上에 가법케 附着시켰으며 이후 37°C에서 18~24時間 培養후 디스크周圍에 形成된 發育阻止環의 直徑을 測定하여 感受性 有無를 判定하였다. 試驗에 使用된 디스크는 ampicillin (AM) 등 14種으로써 그 種類와 藥劑含有濃度는 Table 1에서와 같다.

結 果

複合性 慢性呼吸器病, 壞疽性 皮膚炎 및 關節炎을 앓고 있는 病鷄로부터 *Pseudomonas aeruginosa* 40菌株을 分離하여 이들 菌에 대한 各種 生物化學的 性狀을 調査했던 바 그 成績은 Table 2에서와 같다. catalase, oxidase, citrate utilization, gelatin hydrolysis, casein hydrolysis, tween 80 hydrolysis는 全株에서 陽性反應으로 나타났으며, 色素產生을 위한 King,

Ward & Raney, medium A 및 B(Media A-for pyocyanin; pepton 20g, glycerol 10g, K₂SO₄, anhyd. 10g, MgCl₂, anhyd. 1.4g, water 1000ml, Media B-for fluorescin; proteose pepton 20g, glycerol 10g, K₂HPO₄ 1.5g, MgSO₄ · 7H₂O 1.5g, water 1000ml)에서 全株 共히 陽性을 나타내었고 자외선 조사(Black-Ray, 366NM)시 형광을 發했다. 또한 이들 菌은 BHI 한천 平板培養에서 42°C에서는 發育하였으나 5°C에서는 發育이 抑制되었으며 KCN broth 및 MacConkey 한천에서는 모두 發育하였다. Urease는 SSR液體培地에서는 陰性反應이 있으나 Christensen의 斜面한천에서는 大部分의 分離菌株가 培養후 수시간 以內에 陽性反應을 나타냈으며 적어도 24時間 以內에는 全株에서 陽性이었다. indol, methyl red, Voges-Proskauer 試驗에서는 모두 陰性으로 나타났다. 이들 分離株는 大部分(92.5%)이 運動性을 가졌으나 3株에서는 運動性이 없었다. 그리고 이들 分離菌株에 대한 糖分解能을 보면 glucose 및 xylose는 모두 分解하였으며 mannitol은 35株(87.5%)가 分解하였으나 反應時間이 매우 遲延되어 陽性反應 菌株의 大多數가 試驗 8日 이후에서 分解하였다. 그러나 lactose, maltose, salicin 및 sucrose는 모두 分解되지 않았다(Table 3).

이들 分解菌의 藥劑感受性을 試驗한 成績은 Table 4에서와 같다. gentamicin (GM), colistin (CL) 및 amikacin (AK)에는 全株가 感受性이 있었다. 그러나

Table 1. Antimicrobial Disks Used for Susceptibility Test

Antimicrobials	Disc potency
Amikacin (AK)	10mcg
Ampicillin (AM)	10mcg
Carbenicillin (CB)	50mcg
Chloramphenicol (CM)	30mcg
Colistin (CL)	10mcg
Gentamicin (GM)	10mcg
Kanamycin (KM)	30mcg
Methicillin (ME)	5mcg
Neomycin (NE)	30mcg
Nitrofurantoin (FM)	300mcg
Streptomycin (SM)	10mcg
Sulfonamides (SSS)	250mcg
Tetracycline (TC)	30mcg
Trimethoprim+	1.25mcg+
Sulfamethoxazole (SXT)	23.75mcg

Table 2. Biochemical and Physiological Properties of 40 *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

Tests or substrates	No. of positive strains	% of positive strains
Motility	37	92.5
Catalase	40	100
Oxidase	40	100
Fluorescent pigment	40	100
Pyocyanine pigment	40	100
Fluorescence in U. V. light	40	100
Growth at 5°C	0	0
Growth at 42°C	40	100
Growth on MacConkey	40	100
Growth in KCN	40	100
Utilization of citrate as C source	40	100
Gelatin hydrolysis	40	100
Casein hydrolysis	40	100
Urease (SSR medium)	0	0
Urease (Christensen's medium)	40	100
Tween 80 hydrolysis	40	100
Indol	0	0
Methyl red	0	0
Voges-Proskauer	0	0

carbenicillin (CB)에는 65% sulfonamides (SSS)에 32.5%, neomycin(NE)에 15%, streptomycin(SM) 및 tetracycline(TC)에는 各各 12.5% 및 7.5%의 感受性을 보였다. 또한 chloramphenicol(CM)에는 2.5%의 感受性을 나타냄으로써 이들 藥劑에 對한 分離菌의 感受性은 比較的 낮은 것으로 나타났다. nitrofurantoin(FM), AM, methicillin(ME), kanamycin(KM) 및 trimethoprim+sulfamethoxazole(SXT)에는 全株가 耐性을 가지고 있었다.

이들 藥劑耐性菌의 耐性樣相을 보면 全株가 6藥劑 以上에 耐性을 가진 多劑耐性菌으로써 이중 FM, SXT, AM, ME, KM, CM, TC, SM, NE 및 SSS에 耐性을 가진 10劑 耐性菌이 35%로 가장 많았으며 CB를 포함한 11劑 耐性菌이 20%였고, SSS를 除外한 9劑 耐性菌이 17.5%로써 이들 3種의 耐性型이 70% 以上을 차지했다(Table 5).

考 察

各種 動物에 있어서 *Pseudomonas aeruginosa*의 感染 症에 關한 報告는 많으며^{2,5,8,13,15,19}, 特히 鴨에서도 Kaupp 및 Dearstyn¹⁰이 처음 報告한 以來 상당히 많은 報告^{1,14,17}가 있었으나 우리나라에서는 아직까지 本 病에 關해서 報告된 바 없었다.

Rajasekhar 및 Keshavamurthy¹²는 競馬에 있어서 *Pseudomonas aeruginosa*에 起因한 急性 膀胱炎의 發生을 報告한 바 있으며 또한 乳牛에 있어서도 *Pseudomonas aeruginosa*에 因한 乳房炎의 發生을 Malmo 등¹³

Table 3. Fermentation Reaction of 40 *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

Substrates	No. of positive strains	No. % of positive strains
Glucose	40	100
Lactose	0	0
Maltose	0	0
Mannitol	35	87.5
Salicin	0	0
Sucrose	0	0
Xylose	40	100

Table 4. In Vitro Susceptibility of 40 *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antimicrobial Drugs

Antimicrobials	No. of susceptible strains	% of susceptible strains
Gentamicin	40	100
Colistin	40	100
Amikacin	40	100
Carbenicillin	26	65
Sulfonamides	13	32.5
Neomycin	6	15
Streptomycin	5	12.5
Tetracycline	3	7.5
Chloranphenicol	1	2.5
Nitrofurantoin	0	0
Ampicillin	0	0
Methicillin	0	0
Kanamycin	0	0
Trimethoprim+ Sulfamethoxazole	0	0

Table 5. Distribution of Resistance Patterns of 40 *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

Resistance pattern	No. of resistant strains	% of resistant strains
FM SXT AM ME KM CM TC SM NE SSS CB	8	20
FM SXT AM ME KM CM TC SM NE SSS	14	35
FM SXT AM ME KM CM TC SM NE CB	2	5
FM SXT AM ME KM CM TC NE SSS CB	2	5
FM SXT AM ME KM TC SM NE SSS CB	1	2.5
FM SXT AM ME KM CM TC SM SSS CB	1	2.5
FM SXT AM ME KM CM TC SM NE	7	17.5
FM SXT AM ME KM CM TC SM SSS	1	2.5
FM SXT AM ME KM CM TC SM	1	2.5
FM SXT AM ME KM CM	3	7.5
Total	40	100.0

이 報告하였다.

Biddle 및 Cover¹¹는 CRD 感染病鷄로부터 Mycoplasma를 비롯한 11種의 各各 다른 種類의 細菌을 分離 하였으며 이중 眼窩下洞, 氣管枝 및 氣囊에서 *Pseudomonas aeruginosa*가 分離되었음을 報告한 바 있다. 本 試驗에 供試된 菌株 역시 大部分이 이들 氣管部位에서 分離率에 높았으며 單一感染보다는 大腸菌, 포도상 구균 및 Proteus菌 등과의 混合感染된 例가 많았다. 이 로 미루어 鴨에서의 *Pseudomonas* 感染症을 原發性的 他 疾病에 따른 二次的인 感染이 많은 것으로 생각된다.

이들 分離菌의 生化學的 性狀은 分離株 間에 거의 差 異가 없었으며 Cowan⁶과 MacFaddin¹²의 分類基準에 一致하였다.

各種 抗菌劑에 對한 이들 *Pseudomonas* 分離菌의 感 受性은 GM, CL 및 AK에서는 매우 높은 感受性을 보 였으나 NE, SM, TC, FM, SXT, CM, AM, MZ 및 KM 등에는 高度의 耐性을 가짐으로써, AK, CL 및 GM 등에 感受성이 높고 CM, KM, FM, TC 및 AM 등 에 大部分의 菌株가 耐性을 가진것으로 報告된 Cox 및 Luther⁷의 成績과 거의 一致하였다.

그러나 Sadasivan 등¹³은 分離된 家禽由來 *Pseudo monas*菌이 GM에 27.8%, CM에 40.9%, NE에 23.1%,

SM에 49.5% 및 CB에 16.6%의感受性이 各各 있는 것으로 報告하였으며 이는 本成績과 상당한 差異가 있었다. KM 및 TC 등의 例에는 높은 耐性을 가져 本成績과 비슷하였다. 大前憲一 등²⁰⁾은 CL 및 GM에 分離菌의 100%가 感受性이 있었으나 KM, CM 및 FM 등에는 매우 높은 耐性을 가진 것으로 報告하여 本成績과 一致하였다. 그러나 SM 및 TC 등에 있어서는 分離菌의 80% 以上이 感受性이 있는 것으로 報告하였다. Markaryan¹⁴⁾ 역시 SM 및 KM 등에 대한 높은 感受性을 報告하였으며, Srinivasan 등¹⁸⁾도 SM, KM 및 CM 등에 대해 分離菌의 90% 以上이 感受性이 있는 것으로 報告하였다.

이와 같이 報告者에 따른 各種 抗菌劑에 對한 *Pseudomonas aeruginosa*의 感受性에 있어서는 多樣한 差異는 이 菌의 分離 地域 및 畜種에 따른 治療 및 飼料 添加劑 등으로써의 常用 抗菌性 藥劑의 選擇의 差異에 起因한 것으로 思料된다.

Roe 등¹⁶⁾과 Lowbury 등¹¹⁾은 *Pseudomonas aeruginosa*가 腸內細菌에서와 같이 同種 및 異種간에 R plasmid에 의한 藥劑耐性的의 傳達이 이루어지는 것으로 報告하였으며 이는 特히 *Pseudomonas aeruginosa*가 大部分의 다른 一般細菌들 보다 多數의 藥劑에 耐性을 가진 多劑 耐性菌이며 또한 이 菌의 人獸共通 感染의 可能性을 생각할 때 野外에서의 家畜의 治療 및 豫防을 爲한 抗菌劑의 使用에 보다 細心한 注意가 必要하다 하겠다.

結 論

1978年 6月부터 1980年 사이에 病性鑑定 依頼된 可檢 病鷄 등 複合性 慢性呼吸器病, 괴저성 괴부염 및 關節炎 등 細菌性 疾病의 感染이 疑心되는 病鷄로부터 *Pseudomonas*菌을 分離하여 生物化學的 性狀檢査에 따라서 *Pseudomonas aeruginosa*로 同定하였으며, 이들 分離菌에 對한 抗菌劑 感受性 試驗結果 分離菌의 全株가 gentamicin, colistin 및 amikacin 등에 感受性이 있었으나 nitrofurantoin, trimethoprim+sulfamethoxazole, ampicillin, methicillin 및 kanamycin 등에서는 耐性을 가지고 있었다. carbenicillin, sulfonamides, neomycin, streptomycin, tetracycline 및 chloramphenicol 등에는 菌株에 따른 感受性的의 差異를 나타냈다. 이들 分離菌의 全株가 6種 以上の 藥劑에 耐性을 가진 多劑耐性菌으로써 이들 耐性菌의 耐性樣相은 10種이 관찰되었으며 이중 FM, SXT, AM, ME, KM, CM, TC, SM, NE 및 SSS에 耐性을 가진 10劑 耐性菌이 35% 로써 가장 빈번했다.

參 考 文 獻

1. Biddle, E.S. and Cover, M.S.: The bacterial flora of the respiratory tract of chickens affected with chronic respiratory disease. Am. J. Vet. Res. (1957) 18: 405.
2. Blue, J.L., Wooley, R.E. and Eagon, R.G.: Treatment of experimentally induced *Pseudomonas aeruginosa* otitis externa in the dog by lavage with EDTA-tromethamine-lysozyme. Am. J. Vet. Res. (1974) 35: 1221.
3. Bruner, D.W. and Gillespie, J.H.: Hagan's infectious diseases of domestic animals. 6th ed., Comstock Pub. Ass., Ithaca and London (1973) p. 115.
4. Buxton, A. and Fraser, G.: Animal microbiology (vol.1). Blackwell. Sci Pub., Oxford, London, Edingburgh and Melbourne (1977) p. 241.
5. Cooper, J.E. and Needham, J.R.: Observations on a post-operative septicaemia in experimental dogs with particular reference to *Pseudomonas aeruginosa*. J. Comp. Path. (1975) 85: 445.
6. Cowan, S.T.: Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge(1974).
7. Cox, H.U. and Luther, D.G.: Determination of antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by disk diffusion and microdilution methods. Am. J. Vet. Res. (1980) 41: 906.
8. Harada, S., Ishibashi, T., Kitahara, Y., Harada, Y., Takamoto, M. and Sugiyama, K.: Experimental *Pseudomonas* infection in mice; Effect of single cyclophosphamide administration on *Pseudomonas* infection. Japan. J. Exp. Med. (1979) 49: 43.
9. Hofstad, M.S., Calnek, B.W., Helmboldt, C.F., Reid, W.M. and Yoder, Jr.H.W.: Diseases of poultry. 7th ed., Iowa State Univ. Press, Iowa (1978) p. 335.
10. Kaupp, B.F. and Dearstyne, R.S.: Poultry pathological studies. J. Am. Vet. Med. Ass. (1926) 65: 484.
11. Lowbury, E.J.L., Kidson, A., Lilly, H.A.

- and Ayliffe, G.A.J.: Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics; Emergence of strains highly resistant to carbenicillin. *Lancet* (1969) 2 : 448.
12. MacFaddin, J.F.: Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilins Comap., Baltinnore (1976).
13. Malmo, J., Robinson, B. and Morris, R.S.: An outbreak of mastitis due to *Pseudomonas aeruginosa* in a dairy herd. *Australian Vet. J.* (1972) 48 : 137.
14. Markaryan, M.: *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of infections in fowls. *Vet. Bull.* (1976) : 339.
15. Raja sekhar, M. and Keshavamurthy, E.S.: Acute cystitis due to *Pseudomonas aeruginosa* in a race-horse. *Vet. Rec.* (1976) 99 : 214.
16. Roe, E., Jones, R.J. and Lowbury, E.J.L.: Transfer of antibiotic resistance between *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and other gram negative bacilli in burns. *Lancet* (1971) 1 : 149.
17. Sadasivan, P.R., Srinivasan, V.A., Venugopalan, A.T. and Balaprakasam, R.A.: Aeruginocine typing and antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* of poultry origin. *Avian Dis.* (1977) 21 : 136.
18. Srinivasan, V.A., Koteeswaran, A., Venugopalan, A.T., Nachimuthu, K. and Balaprakasam, R.A.: Biochemical studies, antibiotic sensitivity and aeruginocine typing of *Pseudomonas aeruginosa* of poultry origin. *Vet. Bull.* (1976)
19. Wooley, R.E., Blue, J.L., Scott, T.A. and Belcher, M.K.: Attempt to induce *Pseudomonas pyoderma* in the dog. *Am. J. Vet. Res.* (1974) 35 : 807.
20. 大前憲一, 寺門誠致, 小山敬之, 小枝鐵雄, 田圭地速見, 清水健: 動物由来 緑膿菌の 薬剤感受性と血清型について. *日獣會誌* (1973) 27 : 386.

Biochemical and Drug Susceptibility Test of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Diseased Chicken

Ki-Seuk Kim, D.V.M., M.S., Sun Namgoong, D.V.M., Ph.D.

In-Pil Mo, D.V.M., Keun-Sik Park, D.V.M.

Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development

Kyoung-Rok Oh, D.V.M., M.S.

Chunho Poultry Disease Laboratory

Abstract

Biochemical and antimicrobial susceptibility tests were conducted on 40 strains of *Pseudomonas aeruginosa* originated from diseased chicken submitted for diagnosis to this Institute during 1978-80.

An extensive study of the biochemical properties revealed that the tested strains can be identified with *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiogram showed that all the strains were susceptible to gentamicin, colistin and amikacin but resistant to nitrofurantoin, trimethoprim+sulfamethoxazole, ampicillin, methicillin and kanamycin, and had varying degrees of resistance to other antimicrobials including carbenicillin, sulfonamides, neomycin, streptomycin, tetracycline and chloramphenicol.

Three of the most frequent resistance patterns observed were FM SXT AM ME KM CM TC SM NE SSS Pattern, FM SXT AM ME KM CM TC SM NE SSS CB Pattern and FM SXT AM M EKM CM TC SM Pattern, and these resistance patterns contained 72.5% of the tested strains.