

닭의 추백리병에 관한 연구

I. 추백리 진단에 있어서 혈청응집과 Agar-gel 침강반응과의 비교 시험

가축위생연구소 최재윤·이시영·이창구

Studies on Diagnosis for Pullorum Disease

Comparative Experiments for the Diagnosis of Pullorum Disease by Tube Agglutination and Agar-gel Precipitin Tests with Chicken Sera

J. Y. Choi, S. Y. Lee & C. K. Lee

Veterinary Research Laboratory, Anyang, Korea

ABSTRACT

In these studies the efficacy of plate, tube agglutination and agar-gel precipitin test were compared for the detection of pullorum infected chickens. From all the chickens showing positive reaction in agar-gel precipitin test, *Salmonella pullorum* organisms were isolated.

서 언

추백리 야외검색시 문제되었던 추백리의 양성 반응계의 무모한 도태를 방지하기 위하여 한천내 침강 반응법을 응용하며 이의 효능도를 측정코저 전혈급속평판 응집

반응법, 시험관내 응집반응법 및 한천내 침강반응법과 균분리 시험을 비교 검토 하였던 바 한천내 침강 반응법과 균분리 성적과는 일치되는 성적을 얻었다.

연 구 사

한천내 침강반응의 혈청학적 응용은 1946년 Oudin¹²⁾의 항원 항체 반응의 착상과 1948년 Ouchterlong¹³⁾는 항원과 항혈청이 한천내에서 주위로 확산하여 양쪽 중간 지점에 반응대를 형성하나 이때 항원과 항혈청의 농도 구(溝)와의 거리 등이 깊이 관계된다고 하였으며 1951년 Pope¹⁴⁾의 방법 및 1955년 Grabar⁹⁾의 Immuno-electrophoresis에 의한 혈청 분류로서 본격적으로 사용하게 되었다. 이러한 선구자들이 처음으로 이 방법을 착상한 것은 혈청의 분획을 구분하는데 사용되어 왔으나 점차 발달하여 여러 질병의 혈청학적 진단과 항원 항체 분석에 사용되게 되었다. 그 예를 들면 1956년 Wilson¹⁵⁾ 등은 소의 혈청 albumin의 분석에 Ouchterlong의 방법을 썼고 1961년 Nazareth Gergozian¹¹⁾ 등은 가금류의 혈청분석에 1961년 Yoshida¹⁹⁾ 등은 *Staphylococcus*의 항원 분석에 사용하여 7개의 항원 구성인자로 되어있다고 하였다. 1954년

Gispén⁷⁾은 Pox virus의 항원분석. 1961년 Whiteside¹⁸⁾는 *Sal. typhosa*, *Sal. havrlem* 등 *Sal. monella*의 항원분석에 사용하였다. Freeman(1950)⁶⁾, King(1952)⁹⁾ 등은 항독소의 특성을 측정하는데 이 방법을 사용하였다.

1949년 Mitchison 및 Spicer¹⁰⁾는 streptomycin의 정량에 이 방법을 사용하는 등 많은 연구가 진행되었으며 독소의 진단과 정량 혈청, 항원 분석 및 세균 병독의 동정에 많이 사용되고 있다. 그러나 이용 방법도 여러가지 있을 뿐만 아니라 이 반응에는 한천의 농도, 반응의 시간, 온도 및 구(溝)간의 거리 등이 크게 영향을 미치고 특히 사용되는 항원의 처리가 가장 문제시 된다. 항원의 처리에 대해서는 Boivin⁸⁾이 Gram-negative의 세균을 탄수화물, 지방, 단백질의 물질로 분리하는데 성공하였고, 또한 *Salmonella*의 O 항원을 분석하는데도 성공하였다. Freeman, Challinor 및 Wilson⁵⁾는 *Sal. typhim-*

urium과 Sal. typhosa를 Boivin type antigen으로 만들었고, Edger Rihl⁴⁾ 등은 Boivin type antigen을 만드는데 ether로서 추출하여 Endotoxin을 분리하였다. 현재 Boivin type antigen을 만든다는 항원의 처리는 물리적으로 균체를 파괴하는 방법 또는 화학적으로 균체를 파괴하여 내용물을 추출하는 방법 등이 이용되고 있다. 1966년

Staenescu¹⁶⁾ 등은 Sal. pullorum 항원에 의한 양성반응을 나타내는 비특이 반응의 문제로서 Sal. enteritidis 및 Mycobacterium avium 등의 항원적 자극에 의하여 일어난다고 하였으며, 1963년 Aoki¹⁾ 등은 추백리 검색시 문제시 되었던 비특이 반응이 한천내 침강반응법을 응용함으로써 제거시킬 수 있다고 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

- 가. 공시동물
- 토끼, 추백리 양성, 의양성 및 음성계
- 나. 공시균주

Salmonella pullorum No. 4(중간형) No. 11(표준형) 및 No. 296(변이형)

다. 사용약품

Bacto-agar, Noble-agar, Ion-agar, merthiolate amito-Black-10B, acetic acid, methyl alcohol

2. 방법

- 가. 한천 침강용 평판 제조

Wilson 및 Pringle¹⁷⁾의 방법을 응용하여 순도가 높은 최종 1.5%의 한천용액을 만들었다. 이의 방부제로 0.01%의 merthiolate와 삼투압을 높이기 위하여 5.0%의 식염을 혼합한 다음 pH를 7.8로 수정하였다. 초자판(15cm × 8cm × 0.2cm)을 수평평판상에 올려 놓고 그 위에다 한천용액(이때의 온도 70~80°C)을 15~20ml 분주하여 굳혔으며 이때 한천의 두께는 4mm 되도록 하였다. 직경 5mm의 관(管)을 이용하여 한천평판 위에 간격이 2mm 되겠끔 구(溝)를 만들어서 사용하였다. (그림 참조)

나. 항원제조 : Aoki, Kashiwazak, Sato Watase 및 Sakamoto¹⁾의 방법을 참작하여 Salmonella pullorum Straine No. 11을 Mac Farland Nephelometer Scale No. 1의 100배로 하여 100°C에서 4시간 가열한 다음 3,000 r.p.m.에서 60분간 원심분리하여 그 상청액으로 항원으로 한다.

다. 감각 반응법

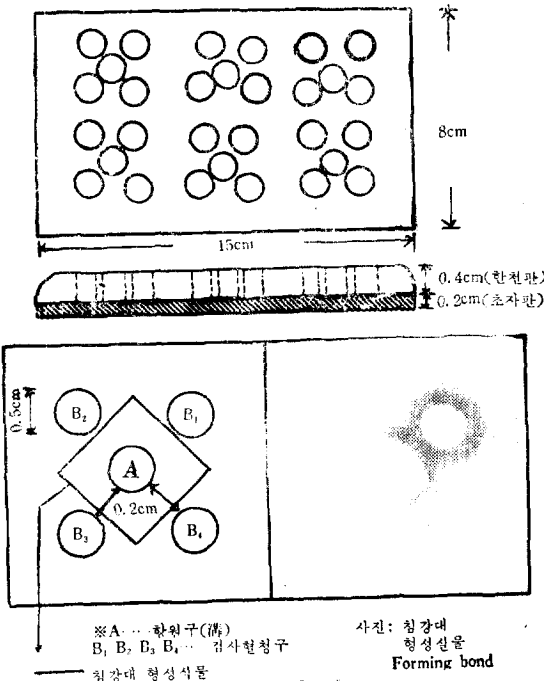
항원 및 가검혈청을 한천 침강구(溝)에다 각기 0.06ml씩 분주하고 이의 건조를 방지하기 위하여 밀폐용기에다 적당히 수분을 가한 다음 37°C 부란기에 넣어 72시간후 반응을 관찰하였다.

라. 반응 감각후 한천 침강관 건조법

반응된 한천 침강관을 생리적 식염수에다 48시간 침전 하면서 수시로 식염수를 갈아 주었다. 이때 식염의 일부와 반응하지 않은 부분의 항원 항체는 제거된다. 그 후 증류수에다 48~72시간 재침전 세척하여 여과지를 한천 침강판에다 부착시켜 37°C 부란기에서 24시간 건조시켰다.

마. 염색 및 탈색방법

6 Gm의 Amido-black-10B를 methyl alcohol 45ml, acetic acid 10ml, Distilled water 45ml의 비로 용해한 것을 염색액으로 사용하였고 염색반응 시간은 3~5분간으로 하였으며 5% acetic acid solution으로 약 10~20분간 탈색 하면서 관찰하였다.



시험 결과

1. 추백리 양성 반응계에 있어서 혈청학적 비교 시험.

3개 종계장에서 평판응집 반응으로 양성반응을 보였던

닭 71수를 수집하여 시험관내 응집반응과 한천내 침강반응을 비교 조사하였던 바 그 성적은 다음과 같다.

표 1. 평관 응집반응에서 양성반응의 닭 혈청으로 시험관내 응집반응과 한천내 침강반응과의 비교시험.
Table 1. Results of tube agglutination test and agar-gel precipitin test for chicken serum which showed positive reaction in rapid serum agglutination test.

계 Group No.	군	평관 반응으로 양성 닭 수 No. of chickens showing positive reaction	시험관내 반응에서 40배 이상 닭 수 Tube agglutination test	한천내침강대 형성 닭 수 Agar-gel precipitin test	균분리 닭수 Isolation of Sal. pullorum
A		30	25/30	26/30	26/30
B		28	25/28	20/28	20/28
C		13	10/13	11/13	?/13*
균분리를 기준으로한 양성반응지수(%) Ratio of positive reaction by the Isolation of Sal. pullorum (%)		124.56%	105.26%	100%	100%

* 사고에 의해 균분리를 못하였음.

위 표에서 한천내 침강반응 양성계수와 균분리 계수가 일치하는 것을 기준으로 보았을 때 응집반응 40배 이상의 양성 계수가 105.26%이었으며 전혈 급속평관반응 양성계수는 124.56%였다.

3개 종계장에서 평관응집반응으로 의양성 반응을 보였던 닭 47수를 검색 수집하여 시험관내 응집반응과 한천내 침강반응을 비교 조사하였던 바 그 성적은 다음과 같다.

2. 추백리의 양성반응계에 있어서 혈청학적 비교시험.

표 2. 평관 응집반응에서 의양성 반응을 닭 혈청으로 시험관내 응집반응과 한천내 침강반응과의 비교시험
Table 2. Results of tube agglutination test and agar-gel precipitin test for chicken serum which showed suspect reaction in rapid serum agglutination test.

계 Group No.	군	평관 반응으로 양성 닭 수 No. of Chickens showing positive reaction	시험관내 반응에서 40배 이상 닭 수 Tube agglutination test	한천내침강대 형성 닭 수 Agar-gel precipitin test	균분리 닭수 Isolation of Sal. pullorum
A		23	8/23	2/23	2/23
B		14	2/14	1/14	1/14
C		10	0/10	0/10	0/10
계 Total		47	10/47	3/47	3/47
의양성계에서 양진율(%) Ratio of positive reaction from chicken of showing suspect. (%)			21.27%	6.38%	6.38%

위 성적에서 전혈 급속응집반응에서 47수의 의양성 반응을 보였던 것이 시험관내 응집반응 40배 이상 의양성 계수가 47수중 10수(21.27%)였고 한천내 침강반응과 균분리에서 다 같이 47수중 3수(6.38%)가 양성이었다.

3. 추백리 음성반응계에 있어서 혈청학적 비교시험.
3개 종계장에서 평관응집반응으로 음성 반응을 나타냈던 닭 48수를 시험관내 응집반응과 한천내 침강반응을 비교조사 하였던 바 그 성적은 다음과 같다.

표 3. 평관 응집반응에서 음성반응이 닭 혈청으로 시험관내 응집반응과 한천내 침강반응과의 비교시험.
Table 3. Results of tube agglutination test and agar-gel precipitin test for chicken serum showed negative reaction in rapid serum agglutination test.

계 Group No.	군	음성반응 닭 수 No. of chickens showing negative reaction	시험관내에서 양성반응 닭 수 Tube agglutination test	한천내에서 침강대형성 닭 수 agar-gel precipitin test	균분리 닭수 Isolation of Sal. pullorum
A		26	0/26	0/26	0/26
B		12	0/12	0/12	0/12
C		10	0/10	0/12	0/10
Total		48	0/48	0/48	0/48

평관응집 반응에서 음성반응을 보였던 닭 48수를 시험관내 응집반응, 한천내 침강반응 및 균분리에서 모두 음

성이었다.

고 찰

추백리병의 검색사업은 끊임없는 노력으로 매년 그 발생율을 저하하고 있으나 아직까지 2~3%의 양성발생율을 보이고 있는 현실이다. 이러한 현상을 관찰해 볼 때 첫째 닭 체내에 있어서의 혈중 항체 소장과의 관계, 둘째 진단액의 효능도, 셋째 항원 항체 반응에 있어서의 비특이 반응의 존재 등을 들 수 있다. 특히 그중 항원 항체 반응에 있어서의 비특이 반응의 존재는 세계 각국에서 연구의 대상이 되고 있으며 문제점 해결을 위하여 여러 각도에서 추궁되고 있다. 1963년 Aoki, Kashiwazak 등은 전혈 급속 평판응집 반응법으로는 비특이 반응을 진단할 수 없으므로 추백리 방역에 문제점이 되고 있다고 하였으며 이를 해결하기 위하여서는 추백리 진단 방법중 가장 정확하고 간단한 방법 즉 한천내 침강반응법을 추천하였다.

따라서 현재 일본에서는 본 한천내 침강 반응법을 추백리병 진단에 응용하고 있다. 본 시험 표 1에서 지적된 바와 같이 한천내 침강반응 양성과 균분리 양성과는 일치된 결과로 미루어 볼 때 한천내 침강반응과 시험관내 응집반응과의 평판 급속 응집반응과의 비특이적인 반응을 보인 차는 19.3%였다.

또한 표 2에서 평판응집 반응에서 의양성 반응을 보였던 닭을 한천내 침강반응에서 양성율이 6.38%였고 또한 균분리율도 같은 6.38%였고 표 3에서 평판응집 반응에서 음성이던 닭이 한천내 침강반응에서도 같은 음성, 균분리에서도 역시 음성으로 된 것을 미루어 고찰할 때 한천내 침강반응은 비특이 반응을 제거할 뿐만 아니라 추백리병 진단에 정확성을 높인 것이라 생각된다.

적 요

추백리병의 혈청학적 진단시 문제시 되었던 비특이 반응 문제를 해결하기 위하여 한천내 침강 반응법을 응용하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 평판 응집 반응에서 추백리 양성 반응이던 닭군이 한천내 침강반응과 균분리에 있어서 일치된 결과로 미루어 한천내 침강반응과 시험관내 응집반응과의 차는 5.26%였고 시험관내 응집반응과 평판응집반응과의 차는 19.3%

%였다.

2. 평판 응집 반응에서 추백리 의양성 반응을 보였던 닭군이 한천내 침강반응과 균분리율이 다 같이 6.38%였다.

3. 평판 응집반응에서 추백리 음성반응을 나타냈던 닭군은 한천내 침강반응에서나 균분리 시험에 있어서 다같이 음성이었다.

SUMMARY

In these studies three diagnostic methods for detecting pullorum positive chickens, namely plate, tube agglutination and agar-gel precipitin test were compared and obtained the following results.

1. A total of 60 chickens and 57 chickens out of 71 pullorum positive reactors plate by test showed positive reactions in tube agglutination and agar-gel precipitin test, respectively. Pullorum organisms

were isolated from all the chickens which showed positive reaction in agar-gel precipitin test.

2. Three chickens out of 47 suspects by plate test showed positive reaction in agar-gel precipitin test and pullorum organisms were isolated.

3. The group which showed negative reaction in plate agglutination test showed negative reaction both in agar-gel precipitin test and in isolation of organism.

인 용 문 헌

1. Aoki, S., Kashiwazaki, M., Sato, S., Watase, H. and Sakamoto, C. 1963. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 3(4): 175~184.
2. Boivin, A. and Mesrobianu, L. 1933. Comp. Rend. Soc. Biol. 113:490.
3. _____ and Mesrobianu, L. 1935. Rev. D. Immuno., 1:553.
4. Edger Rihi et al. 1959. J. Immuno.. 84:132.
5. Freeman, G.G. Challinor, S.W. and Wilson, J. 1940. Biochem. J. 34:307.

6. Freeman, V.J.. 1950. Pub. Hlth. Rep. 65:875.
7. Gispén, R. 1954. J. Immuno. 94:134.
8. Grabar, P. and Willians, C.A. 1955. Bioche. Biophyo. Acta. 17:67.
9. King, E.O. et al. 1950. Am. J. Pub. Hlth. 40:704.
10. Mitchson, D.A. and Spicer, C.C. 1949. J. Gen. Microbiol. 3:184~203.
11. Nazareth, G. et al. 1961. J. Immuno. 88:389.
12. Oudin, J. 1946. Compt. Rend. Acad. Sci. 222: 115:116.
13. Ouchterlong, Ö. 1948. Acta. path. Microbiol. Scand., 25:186~191.
14. Pope, C. G. et al. 1951. Brit. J. Exptl. Path. 32:246.
15. Staenscu, V., Vior, C. and Sandulescu, St. 1966. Arch. Vet. Romania. 1:81~94.
16. Wilson, M.W. and Pringle, B.H. 1954. J. Immuno. 73:232:243.
17. Wilson, M.W. Pringle, B.H. 1956. J. Immuno. 77:324.
18. Whiteside, R.E. and Baker, E.E. 1961. J. Immuno 88:650.
19. Yoshida, A. and Heden, C.G. 1961. J. Immuna 88:389.