

닭의 *Haemophilus* 感染症에 관한 研究

Ⅲ. 野外에서 分離한 *Haemophilus gallinarum*의 特性

南宮璇 · 金基錫 · 毛仁筆 · 朴根植

農村振興廳 家畜衛生研究所

緒 論

傳染性 coryza는 *Haemophilus gallinarum*(HG)菌의 感染에 依해서 發病되는 닭의 急性 呼吸器疾病으로서 鼻汁, 眼疾, 眼面浮腫, 食欲感退 및 下痢 등의 症狀을 나타내며 때로는 氣管炎과 氣囊炎 등을 同伴한다.^{2,19,20}

本病은 모든 닭의 日齡에 感受성이 있으며 發育遲延과 産卵中止 등으로 養鷄產業에 莫大한 經濟的 損失을 招來하게 된다. 特히 mycoplasma病, 傳染性 氣管支炎, 傳染性 喉頭氣管炎 및 포도상구균症 등과 混合感染時에는 症狀이 甚化될 뿐만 아니라 長期間 持續된다.^{4,10,11,19}

우리나라에서는 처음으로 南宮 등^{23,24}이 甚한 coryza 症狀을 나타내는 可檢鷄로부터 HG를 分離 同定하고 地域別로 抗體保有率을 調査하였다.

지금까지 HG에 對한 生物學的의 性狀, 病原性 및 血清學의 特性 등이 여러사람들에 依해서 報告^{6,10,16}되었으 며 特히 抗原성에 따라 2種 또는 3種의 血清型으로 分類하였다. 또한 免疫原성에 따라서 2種 또는 3種의 免疫型으로 分類報告^{7,9,14,15}되어 왔다.

本 試驗에서는 國內에서 分離한 HG에 對하여 生物學的 및 血清學의 性狀 등을 標準菌株과 比較檢討함과 아울러 適合한 國內 백신株를 選拔하고자 하였다.

材料 및 方法

菌株: Coryza症狀을 나타내는 可檢鷄로부터 分離한 *Haemophilus* 野外分離菌株과 日本 家畜衛生試驗場으로부터 分讓받은 HG 221 및 美國 農務省 National Animal Disease Center로부터 分讓받은 HG Modesto 등을 標準菌株로 供試하였다.

培地: 前報에서 發表²²한 鷄肉汁培地와 Kato's medium에 鷄血清(5%)과 nicotinamide adenine dinucleotide(0.00025%)를 各各 添加하였다.

抗原 및 抗血清: 抗原은 前報와 同一한 方法²³으로

만들었으며, 抗血清은 Page¹⁰의 方法에 準해서 20週齡의 닭과 토끼에 各各 抗原을 接種하여 얻었다.

性狀調査: Kume⁶의 方法에 準하여 各 菌株別로 酵素作用, 菌增殖에 對한 營養要求性 및 糖分解能 등을 調査하였다.

病原性調査: 供試菌株의 18時間 增菌液을 0.1ml씩 7日齡의 SPF 鷄胎兒의 卵黃에 接種하고 또한 SPF 15 週齡鷄의 鼻腔內에 0.2ml씩 各各 接種한 다음 鷄胎兒에 對한 病變 및 弊死狀態와 接種鷄에 對한 臨床症狀 등을 觀察하였다.

吸收試驗: 供試菌株의 抗血清에 10倍 濃度の 抗原을 섞어서 37°C에서 3日間, 4°C에서 12時間 作用시킨 다음, 遠心分離하여 上層液을 吸收血清으로 供試하였다.

血清反應: 血清平板凝集反應 및 血球凝集抑制反應試驗은 Kato⁶의 方法에 準하여 實施하였다.

백신接種과 攻擊: Kume⁷의 方法에 準하여 만든 백신으로 20週齡鷄의 筋肉內에 1ml씩 接種하고 3週後에 攻擊菌液(菌數 約 10¹¹ CFU/ml)을 0.3ml씩 鼻腔內에 接種한 다음 2週間 臨床觀察와 菌回收率을 調査하였다.

結 果

野外分離菌株의 生物學的 性狀: 野外에서 coryza 症狀을 나타내는 可檢鷄로부터 分離한 15株의 *Haemophilus*를 對象으로 生物學的 性狀과 病原性 등을 標準菌株과 比較한 結果는 Table 1과 같다.

供試菌株에 對한 生物學的 性狀은 野外分離菌株과 標準菌株가 모두 同一하게 catalase作用, indol 및 H₂S 產生 등에 陰性反應을 나타내었으며 硝酸鹽의 還元에는 陽性反應을 各各 나타내었다.

HG菌의 增殖에 必要한 成長要素의 要求性은 野外分離菌株과 標準菌株 모두가 NAD(V factor), hemin (X factor) 및 鷄血清 등의 單獨添加나 NAD와 hemin, hemin과 鷄血清 등과의 復合添加란으로는 增殖이 不可

Table 1. Biological Characteristics of Field Isolates of *Haemophilus gallinarum*

| Characteristics | Isolates | Reference strains | |
|-----------------------------|----------|-------------------|---------|
| | | 221 | Modesto |
| Biochemical activity | | | |
| Catalase activity | 0/15* | - | - |
| Indol production | 0/15 | - | - |
| H ₂ S production | 0/15 | - | - |
| Nitrate reduction | 15/15 | + | + |
| Growth requirement | | | |
| NAD (100μ) | 0/15 | - | - |
| Hemin(50μ) | 0/15 | - | - |
| Chicken serum (1%) | 0/15 | - | - |
| NAD+Hemin | 0/15 | - | - |
| NAD+Chicken serum | 15/15 | + | + |
| Hemin+Chicken serum | 0/15 | - | - |
| Fermentation | | | |
| Glucose | 15/15 | + | + |
| Maltose | 15/15 | + | + |
| Mannose | 15/15 | + | + |
| Trehalose | 15/15 | + | + |
| Sorbitol | 0/15 | - | - |
| Mannitol | 9/15 | - | - |
| Pathogenicity | | | |
| Embryos | 15/15 | + | + |
| Chickens | 15/15 | + | + |

* : No. of positive isolates/No. of isolates tested

能하였으나 NAD와 鷄血清(1%)을 添加하였을 경우에는 增殖이 可能하였다. 또한 糖分解能은 供試 野外分離菌株와 標準菌株 모두가 glucose, maltose, mannose 및 trehalose 등에 陽性反應을 나타낸 반면 sorbitol에서는 陰性反應을 나타내었다. 그러나 mannitol에서는 野外分離菌株의 15株中 9株가 陽性反應을 나타내었으나 標準菌株에서는 모두 陰性反應을 나타내었다.

供試菌株에 對한 病原성은 野外分離菌株와 標準菌株 共히 鷄胎兒에서 接種 20時間內에 甚한 出血症狀을 나타내고 斃死하였으며, 成鷄에서는 鼻汁, 眼疾 및 眼面浮腫 등의 臨床症狀을 나타내었다.

野外分離菌株의 血清學의 特性: 供試 野外分離菌株에 對한 抗原성을 標準菌株와 比較하기 위하여 野外分離菌株의 抗原과 標準菌株의 抗血清과의 平板凝集反應을 實施하였던 바 野外分離菌株中 PKA1을 除外한 全菌株가 標準菌株 221 免疫血清과 凝集反應을 나타내었으

Table 2. Antigenic Characteristic of Field Isolates of *Haemophilus gallinarum*

| Antigens | Antisera* | |
|----------|-----------|---------|
| | 221 | Modesto |
| G1 | ++ | - |
| G2 | + | - |
| PA1 | + | - |
| PS1 | + | - |
| PT1 | + | - |
| PS2 | + | - |
| PT2 | + | - |
| PS4 | + | - |
| PT4 | + | - |
| PKA1 | - | + |
| PKS1 | + | - |
| PKS2 | + | - |
| PKT2 | + | - |
| WS5 | + | - |
| WS6 | + | - |

*: Ten-fold diluted chicken antisera

**: Plate agglutination within two minutes

나, 標準菌株 Modesto 免疫血清과는 전혀 凝集反應을 나타내지 않았다. 그러나 PKA1株는 다만 Modesto 免疫血清과 凝集反應을 나타내었다(Table 2).

또한 供試 野外分離菌株에 對한 確實한 抗原성을 究明함과 동시에 適合한 國內 백신株의 選拔을 위해서 標準菌株와 凝集성이 같은 供試 野外分離菌株中에서 4株를 任意로 選拔하여 標準菌株와 交叉凝集 및 吸着反應을 實施하였던 바 選拔菌株中에서 G1, PS4 및 WS5 등은 標準菌株 221과 相互 交叉反應을 나타내었고, 選拔菌株 PKA1은 標準菌株 Modesto와 相互 交叉反應을 나타내므로서 國內分離菌株를 두가지 血清型으로 區分할 수 있었다(Table 3).

選拔菌株에 對한 免疫原性 比較: 供試 野外分離菌株에 對한 免疫原성을 標準菌株와 比較하기 위하여 選拔菌株로 免疫시킨 鷄群에 標準菌株 221과 Modesto로 各 群을 달리하여 攻擊한 다음 免疫效果를 調査한 結果는 Table 4와 같다.

標準菌株 221로 攻擊한 選拔菌株에 對한 防禦率は G1, PS4 및 WS5群에서 50% 내지 70%의 防禦率을 各 各 나타내었으나 PKA1群과 對照群에서는 전혀 防禦能 이 없었다. 또한 標準菌株 Modesto로 攻擊한 選拔菌株에 對한 防禦率は PKA1群에서만 70%의 防禦率을 나타

Table 3. Cross Agglutination Reaction between Selected Isolates and Reference Strains of *Haemophilus gallinarum*

| Antisera | Agglutination titer | | | Antisera absorbed with homologous antigen | Agglutination titer | | |
|----------|---------------------|-----|---------|---|---------------------|-----|---------|
| | Homologous antigen | 221 | Modesto | | Homologous antigen | 221 | Modesto |
| G1 | 320 | 160 | 20 | G1 | 0 | 0 | 10 |
| PS4 | 320 | 160 | 10 | PS4 | 0 | 0 | 10 |
| WS5 | 320 | 320 | 10 | WS5 | 0 | 0 | 10 |
| PKA1 | 320 | 10 | 160 | PKA1 | 0 | 0 | 0 |
| 221 | — | 320 | 10 | 221 | — | 0 | 10 |
| Modesto | — | 10 | 320 | Modesto | — | 10 | 0 |

Table 4. Effects of Challenge Exposure of Chickens Immunized with Selected Isolates of *Haemophilus gallinarum*

| Immunized with | GMT(HI) | Strains challenged | Response to challenge | | |
|----------------|---------|--------------------|-----------------------|--|--------------------|
| | | | Coryza sign | Reisolation of <i>Haemophilus</i> spp. | Protection rate(%) |
| G1 | 16.5 | | 4/10* | 5/10 | 50 |
| PS4 | 25.2 | | 2/10 | 3/10 | 70 |
| WS5 | 28.5 | 221 | 2/10 | 3/10 | 70 |
| PKA1 | 4 | | 10/10 | 10/10 | 0 |
| Control | 4 | | 5/5 | 5/5 | 0 |
| G1 | 4 | | 10/10 | 10/10 | 0 |
| PS4 | 4 | | 10/10 | 10/10 | 0 |
| WS5 | 4 | Modesto | 10/10 | 10/10 | 0 |
| PKA1 | 4 | | 2/10 | 3/10 | 70 |
| Control | 4 | | 5/5 | 5/5 | 0 |

*: No. of chickens with sign/No. of chickens tested

내었을 뿐 他群들과 對照群에서는 전혀 防禦能을 나타내지 않았다.

考 察

傳染性 coryza의 感染을 일으키는 原因體가 HG라고 報告한 以後 HG에 對한 生物學的의 性狀, 病原性 및 血清學的의 特性 등이 여러 사람에게 依해서 報告되어 왔다. 3,6,10)

지금까지 닭으로 부터 分離된 HG의 生物學的의 性狀中에서 Page¹⁰⁾가 分離 報告한 一部の HG를 除外하고 모두가 catalase作用에 陰性反應을 나타내는 菌株로 報告되었다. 3,6)

우리나라에서 分離된 供試 野外分離菌株도 全菌株가 catalase作用에 陰性反應을 나타내었으며 그밖에 indol 產生에 陰性反應, 硝酸鹽의 還元作用 등 이미 報告^{3,6,10)}

된 生物學的의 性狀의 成績과 一致하였다.

Schalm과 Beach¹⁸⁾는 coryza 症狀을 나타내는 感染 鷄로부터 分離된 *Haemophilus*菌은 增殖에 必要한 成長 要素로서 X因子와 V因子를 必要로 한다고 報告하였으나 最近에는 鷄由來 *Haemophilus*의 成長要素로서 V因子만이 關與한다고 報告되었다.^{10,13,18)}

國內에서 分離된 供試 野外分離菌株의 增殖에 있어서도 V因子(NAD)만이 關與하고 X因子(hemin)는 전혀 關與치 않았다. Zinnemenn과 Biberstein²¹⁾은 *Haemophilus*의 種分類에 있어서 V因子만을 必要로 하는 菌株은 *H. paragallinarum*, V因子와 X因子를 모두 必要로 하는 菌株을 *H. gallinarum*으로 提議하고, Bergy's manual에 記載하여 왔었다. 따라서 最近에는 이를 根據로 *Haemophilus*菌이 增殖에 V因子만 必要로 하는 *Haemophilus*는 *H. paragallinarum*으로 改稱하여 報

告되는 예를 볼 수 있다.

供試 菌株에 對한 糖分解能은 野外分離菌株의 全例가 glucose, maltose 및 trehalose 등을 分解하고 sorbitol은 非分解하였으며 mannitol은 供試菌株 15例中 9例만이 分解하였다.

病原性은 野外分離菌株의 全例가 鷄胎兒에 對해서 接種 20時間內에 甚한 出血病變과 斃死를 나타내었으며, 接種鷄에서는 鼻汁, 眼淚 및 眼面浮腫 등의 臨床症狀을 나타내고 있어서 先人들의 報告^{3,6,10}와 一致하였다.

HG에 對한 抗原型의 分類에 있어서는 Page^{10,12}는 serotype A, B, C, Kato와 Tsubahara³는 serotype I, II, III 등으로 各各 分類하여 왔으나 最近에 Sawata 등¹⁶은 그들이 野外에서 分離한 菌株에 對하여 抗原構成과 防禦作用 등을 調査하여 serotype 1, 2로 分類하였으며, 그 分類된 血清型間에는 서로 다른 特性이 있음을 確認^{8,17}하였다.

供試 野外分離菌에 對한 抗原性은 PKA1株를 除外한 全例가 標準菌株 221과 相互 凝集反應을 나타낸 반면 PKA1株는 다만 標準菌株 Modesto와 凝集反應을 나타내었다. 또한 供試 選拔菌株에 對한 交叉凝集 및 吸着反應에서도 標準菌株인 221과 Modesto에 各各 交叉反應을 나타내고 있어서 國內의 野外分離菌株도 두가지 血清型이 있음을 確認할 수 있었다.

HG에 對한 免疫原性은 여러가지로 報告되어 왔으나 最近에 Kume 등¹⁶은 Page와 Sawata 등이 分類한 serotype中에 相互 免疫原性에 對한 相關性을 調査하였던 바 Page의 serotype A는 Swata의 serotype 1과 Kato 菌株인 221과 비슷하며 Page의 serotype C(Modesto)는 Swata의 serotype 2 (H-18)와 비슷하다고 報告하였으며 또한 이들 血清型들에 對한 相互 免疫作用은 同種型끼리만 關與하고 異種型끼리는 전혀 關與치 않는다고 報告하였다.⁸

供試 國內의 野外分離菌株에 對한 免疫原性을 標準菌株와 比較時에 選拔菌株 G1, PS4 및 SW5는 標準菌株 221과 같은 免疫作用을 나타내었으며 또한 選拔菌株 PKA1은 標準菌株 Modesto와 같은 免疫作用을 나타내었다. 따라서 國內 分離菌株에 對한 適合한 백신株의 選拔이 可能하여 故로 앞으로 適合한 國內 백신株를 選拔하여 國內 防疫에 必要한 效果의 백신開發이 望된다.

結 論

닭에 急性 呼吸器症狀과 産卵中止 및 發育遲延 등으로 養殖産業에 많은 被害를 주고 있는 傳染性 coryza의 原因菌인 HG를 coryza症狀을 나타내는 可檢鷄로부

터 15株를 分離하고 그 野外分離菌株에 對한 生物學的 性狀, 病原性 및 血清學的 特性 등을 標準菌株와 比較 檢討하였으며 血清學的으로 抗原性이 서로 다른 두가지 血清型으로 分類하였고 또한 標準菌株와 同一한 두가지 免疫原性을 나타내는 3株의 백신株를 選拔하였다.

參 考 文 獻

1. Eliot, C.P. and Lewis, M.R.: A haemophilic bacterium as a cause of infectious coryza in the fowl. J. Amer. Vet. Med. Ass. (1934) 84: 878.
2. Kato, K. and Tsubahara, H.: Infectious coryza of chickens. I. Clinical and etiological observations. Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. (1962) 45: 15.
3. Kato, K. and Tsubahara, H.: Infectious coryza of chickens. II. Identification of isolates. Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. (1962) 45: 21.
4. Kato, K.: Infectious coryza of chickens. V. Influence of *Mycoplasma gallisepticum* infection on chicken infected with *Haemophilus gallinarum*. Nat. Inst. Anim. Hlth. (1965) 5: 183.
5. Kato, K.: Nature of hemagglutination-inhibition antibody response and its relationship to protection in infectious coryza. Jpn. J. Vet. Sci. (1970) 32(suppl): 263. (in Japanese)
6. Kume, K., Sawata, A. and Nakase, Y.: Haemophilus infections in chickens. I. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolated from chickens affected with coryza. Jpn. J. Vet. Sci. (1978) 40: 65.
7. Kume, K., Sawata, A. and Nakase, Y.: Immunologic relationship between Page's and Sawada's serotype strains of *Haemophilus paragallinarum*. Am. J. Vet. Res. (1980) 41: 757.
8. Kume, K., Sawata, A. and Nakase, Y.: Relationship between protective activity and antigen structure of *Haemophilus paragallinarum* serotypes 1 and 2. Am. J. Vet. Res. (1980) 41: 97.
9. Matsumoto, M. and Yamamoto, R.: Protective quality of aluminumhydroxide-absorbed broth bacterin against infectious coryza. Am. J. Vet. Res. (1975) 36: 579.
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. Page, L. A. : *Haemophilus* infections in chickens. III. Factors in intraflock transmission of infectious coryza and its chemical and antibiotic therapeutics. Avian Dis. (1962) 6 : 211.
 12. Page, L. A., Rosenwald, A.S. and Price, F. C. : *Haemophilus* infections in chickens. IV. Results of laboratory and field trials of formalinized bacterins for the prevention of disease caused by *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis. (1963) 19 : 318.
 13. Pickett, M.J. and Stewart, R.M. : Identification of *Haemophilus* bacilli by means of the satellite phenomenon. Amer. J. Clin. Pathol., (1953) 23, 713.
 14. Rimler, R.B., Davis, R.B. and Page, R.K. : Infectious coryza: Cross-protection studies, using seven strains of *Haemophilus gallinarum*. Am. J. Vet. Res. (1977) 38 : 1587.
 15. Rimler, R.B. and Davis, R.B. : Infectious coryza: In vivo growth of *Haemophilus gallinarum* as a determinant for cross protection. Am. J. Vet. Res. (1977) 38 : 1591.
 16. Sawata, A., Kume, K. and Nakase, Y. : *Haemophilus* infections in chickens. II. Types of *Haemophilus paragallinarum* isolates from chickens with infectious coryza, in relation to *Haemophilus gallinarum* strain No. 221. Jpn. J. Vet. Sci. (1978) 40 : 645.
 17. 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.
 18. Schalm, O.W. and Beach, J.R. : Cultural requirements of the fowl coryza bacillus. J. Bacteriol. (1936) 31 : 161.
 19. Yamamoto, R. : Infectious Coryza: in Diseases of Poultry, 7th ed., Iowa State University press, Iowa. (1978) p. 225.
 20. Yamamoto, R. : Infectious Coryza: in Isolation and Identification of Avian Pathogens, 2nd ed., The Am. Ass. of Avian Path. Creative Printing Company, New York. (1980) p. 16.
 21. Zinnemann, K. and Biberstein, E.L. : *Haemophilus*. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., editors, Williams and Wilkins, Baltimore, (1974) p. 364.
 22. 南宮璇, 安壽煥, 金基錫, 毛仁筆, 李榮玉, 朴根植, 吳璟祿 : 닭의 *Haemophilus* 감염증에 관한 연구. I. 傳染性 Coryza의 感染鷄로부터 *Haemophilus gallinarum*의 分離. 大韓獸醫學會誌(1981) 21 : 93.
 23. 南宮璇, 金基錫, 毛仁筆, 朴根植 : 닭의 *Haemophilus* 감염증에 관한 연구. II. 傳染性 Coryza의 國內感染狀況. 農試報告(1982) 24 : 119.

Studies on *Haemophilus* Infection in Chickens

III. Biological and Serological Characteristics of *Haemophilus gallinarum* Isolated from Chickens Affected with Coryza

Sun-Namgoong, D.V.M., Ph.D., Ki-Seuk Kim, D.V.M., M.S.,
In-Pil Mo, D.V.M. and Keun-Sik Park, D.V.M., Ph.D.

Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development

Abstract

Infectious coryza is one of the important acute respiratory diseases causing a significant egg drop and retarded growth in chicken. An attempt for the isolation of etiologic agent was made by utilizing SPF sentinel birds housed in commercial farms and the results obtained are as follows.

Fifteen isolates of *Haemophilus gallinarum* were tested for their biological and serological characteristics with reference strains, 221 and Modesto and subsequently classified into two serotypes. Of them, isolates immunologically identical to the standard strains were also selected as vaccine strains for future studies.