

한방사료 첨가제의 항균성 및 재래닭에서의 *Campylobacter jejuni* 방제효과

김근섭 · 정태성 · 신기욱 · 한대용 · 차혜진 · 김용환¹

경상대학교 수의과대학/생명과학 연구소

(게재승인 : 2006년 1월 25일)

Antimicrobial Activity and Preventive Effect of Oriental Herbal Medicine Feed Additives for *Campylobacter jejuni* in Korean Native Chickens.

Gon-sup Kim, Tae-sung Jung, Gee-wook Shin, Dae-young Han, Hye-jin Cha and Yong-hwan Kim¹

Research institute of life science, College of Veterinary Medicine, Geongsang National University

Abstract : In this study, antimicrobial activity of oriental herbal medicine extract (OHME) was tested for some organisms and the preventive effects of OHME for the colonization of *Campylobacter jejuni* on epithelium of small intestine were examined in Korean native broiler chickens fed a forage added 1.0% OHME. The isolated *Campylobacter* spp were biotyped, serotyped and the susceptibility of isolates to antimicrobial agent were examined. The growth of *Staphylococcus aureus* was inhibited in 0.25% OHME. *C. jejuni* and *C. coli* were inhibited in 0.1% OHME, and *Salmonella* spp, *Lactobacillus acidophilus* and *Escheichia coli* 0157 were inhibited in 2.0% OHME. For the application of forage added 1.0% OHME in broiler chicken farm, the frequency of *Campylobacter* spp from feces, liver and spleen sample of chickens were examined during 2 weeks interval. The frequency of *Campylobacter* spp in feces from chickens fed assorted forage (control group) was increased from 25% in first week to 75% in seventh week. But the frequency of *Campylobacter* spp in feces sample from chickens fed forage added OHME was slightly reduced from 25% in first week to 15% in seventh week. The frequency of *Campylobacter* spp in liver, and spleen was 13.7% and 10% respectively after seventh week in control group, but the *Campylobacter* spp was not isolated after fifth week in live and spleen from chickens fed forage added OHME. Isolated 56 strains of thermophilic *Campylobacter* from Korean native chickens was classified as *C. jejuni* (76.7%), *C. coli* (21.4%) and *C. laridis* (1.6%). The majority of 43 isolates of *C. jejuni* was classified on biotype I (60.4%), II (30.2%). Most of 12 isolates of *C. coli* were biotype I (83.3%). Isolated 31 strains *C. jejuni* of showed 11 different serotype, and serotype 36 (18.6%), 17 (13.9%) were most frequent. Isolated 10 strains of *C. coli* showed 5 different serotypes and serotype 31 (33.3%) and 21 (25%) were relatively common. Isolated *Campylobacter* spp were highly susceptible to nalidixic acid, amikacin, gentamicin, colistin and chloramphenicol.

Key words : oriental herval medicine extract (OHME), antimicrobial activity, *campylobacter jejuni*.

서 론

Campylobacter 속균 중에서 *C. jejuni*, *C. coli* 및 *C. laridis*의 3종은 미호기성 배양 조건으로 42°C에서 잘 증식하는 특성이 있으므로 thermophilic *Campylobacter*라고 불리워지고 있다(1,13). 이들 중 *C. jejuni*와 *C. coli*는 근년 사람의 급성 세균성장염의 원인균으로 알려졌으며, 이들 세균에 기인된 장염 및 집단 식중독의 발생에는 *Salmonella* 및 *Shigella*에 의한 것보다 많다고 한다(3,6). *C. jejuni*는 사람 이외에 소, 면양, 산양, 개, 고양이 및 원숭이 등 포유동물의 장관 내에서 증식하며 이들 동물에서 장염 및 식중

독을 일으키는 원인이 된다. 특히 이 균은 닭, 거위 및 메추라기 등의 가금류에 널리 분포하고 있으며, 감염 경로는 보균 동물과의 접촉 또는 오염된 음식을 섭취함으로써 전파된다(1,2). 동물에서 *C. jejuni*의 분리 빈도를 보면 닭의 분변에서 10~100%, 칠면조 33~93%, 오리 35~88%, 돼지 1~98%, 면양 9~73%, 소 2~55%, 토끼 11.3%의 분포를 하고 있음을 보고하였다(5,13,14,24).

근년 양계 사육 형태가 대형화됨에 따라 대량 밀집 사육으로 인한 *Campylobacter* 속균 등의 세균성 감염증이 증가되고 있고, 주 감염원이 오염된 사료와 물 및 집적 접촉이라는 점을 고려할 때 닭에서의 감염 및 오염을 방지하는 것은 대단히 어려운 일이다(7,21). 또한 항균제 사용은 감염증 방지를 일시적으로 나타낼 뿐, 투약 중지로 재감염이 문제시되

¹Corresponding author.

E-mail : yho157@nongae.gsnu.ac.kr

며, 무분별한 오남용으로 인한 내성균의 출현 증가 뿐만 아니라 계육 및 계란에서 약재 잔류로 사람의 건강을 위협하고 있다(2,4). *Campylobacter* 속균과 *Salmonella* 속균의 닭에 서의 감소 대책으로 fracto-oligosaccharide, dried yeast, mannose 및 formic acid 또는 propanoic acid 등을 급여하여 장관 정착을 감소시켰다는 보고(9,17)가 있으나 효율적인 방법이 되지 못하고 있으며, 또 산란계에 특정 항원을 면역하여 생산된 계란의 난황으로부터 면역 글로불린을 추출하는 방법이 개발된 바 있으나, 역시 효율적인 방법이 되지 못하고 있다(2,16,22). 한약재의 유효한 성분은 생체 내에서 상승 효과를 나타내어 생체 내의 면역 시스템 중 보체계의 활성화, 여러 가지 cytokine의 활성화와 일상의 식품 성분과의 상승 작용으로 신체 항상성을 유지하도록 도와주는 역할을 해 왔다(25,26). 이러한 한약재 내의 유효성분을 동정하고 특성을 연구 개발하면 대체 식품 첨가물이나 의약품의 개발이 가능하다.

삼백초는 향균성분인 decanoyl acetaldehyde, methyl-nonyl-ketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde 등이 함유되어 있어 향균작용 및 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높인다고 하였다. 뿐만 아니라 이노작용, 혈압작용 등이 있어 민간요법의 치료로 널리 사용되고 있다(23,25). 홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기부터는 미국, 인도, 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원 작물이기도하다. 홍화의 약용부위는 꽃이며, 약용성분은 carthamin ($C_{12}H_{22}O_{11}$)인데 한방의 처방 예로는 홍화탕, 활혈통경탕 등이 있으며, 꽃은 혈소판 응고를 억제하고, 출혈시간을 지연시키는 작용이 있을 뿐만 아니라 혈장 콜레스테롤과 중성지방의 저하 기능도 있어 여성들의 통경약이나 어혈을 푸는 약재로 한방에서 널리 사용해 왔다. 홍화씨에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히 linoleic acid 등의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 하였다(25,26).

본 연구에서는 닭에서 *Campylobacter*의 감염을 예방할 수 있는 한방사료 첨가제를 개발할 목적으로 저자 등이 개발한 사료 첨가제의 *Campylobacter* 속균과 주요경합 세균에 대한 항균성, 장관 정착 억제 효과 및 분리균의 혈청형과 항생제 감수성을 검사하였다.

재료 및 방법

한방사료 첨가제에 대한 항균 시험

공시 균주 및 배양. 항균 시험에 사용한 균주는 국립보건 환경연구원에서 분양 받은 *C. jejuni* ATCC#3356 및 *C. coli* ATCC#2758, 수의과학 검역원에서 분양 받은 *S. enteritidis* ATCC#13076, *S. pullorum* ATCC#9120, 경상대 낙농학과에서 분양 받은 *L. acidophilus* LACH5, 국내 분리 균 *E. coli* O157:H7의 6주를 사용하였다.

Campylobacter 속균은 소의 혈액을 5% 첨가한 10 ml의 VTP brucella-FBP broth (VTP: vancomycin 0.002%,

trimethoprim lactate 0.001% 및 polymixin B 5,000 IU/L complex, FBP: ferrous sulfate 0.025%, sodium metabisulfate 0.025% 및 sodium pyruvate 0.025% complex)에 접종하고, CampyGen (Oxoid, England)을 이용하여 CO₂ 10%, O₂ 5% 분압에서 42°C에서 48시간 배양하였다. *Salmonella* Spp.과 대장균은 10 ml의 tryptic soy broth (TSB, Gibco, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하였으며, *Lactobacillus* 균은 Deman, Rogosa, Sharpe (MRS, Difco, USA) 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 각 균의 배양액을 3,000 g에서 10분간 원심 침전하여 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH7.0)로 2회 원심 세척한 후 균수를 MacFarland 표준 탁도 0.5로 맞추어 사용하였다.

최소 발육 억제 농도 측정

첨가제의 조성. 삼백초의 향균성분(Methyl-n-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등이 포함된 한방첨가제 20 g을 100 ml 증류수에 가하고 80°C의 수용성 상에서 30분간 중탕하여 얻은 여액을 4°C에 보관하면서 사용하였다.

최소 발육 억제농도 측정. 공시 균주에 대한 한방첨가제의 최소 발육 억제 농도(Minimal inhibitory concentration; MIC)는 National Committee Clinical Laboratory Standard (NCCLS) 기준(15)에 따라 한천 평판 희석법으로 측정하였다. 즉, 한방추출 용액을 PBS로 2배 계단 희석하여 농도별로 함유하는 Muller Hilton medium (MHM, Difco, USA)에, 10⁵ CFU/ml로 조정된 균액을 multiple inoculator로 접종하였다. *Campylobacter* 속균은 gas pack을 사용하여 10% CO₂, 5% O₂ 분압으로 42°C에서, 그 외의 균은 37°C 배양기에서 24~48시간 배양하여 가장 낮은 농도의 한방추출액을 함유한 배지에서 균의 발육이 억제된 농도를 MIC로 나타내었다.

*Campylobacter jejuni*의 장관 정착 억제 효과 측정

실험동물. 실험동물은 2주령의 유주 50수를 실험에 사용하였다. 실험구는 *C. jejuni* 분리 시험에서 음성을 나타내는 개체를 선발하여 시험구와 대조구로 나누어 5수씩 케이지 사육하였다. 시험구는 시판 육계 전기 사료(Dodam Tec. Korea)에 OHME를 1% 함유되게 첨가하였고, 대조구는 그대로 사용하였다.

***C. jejuni* 감염시험.** 소혈액을 5% 첨가한 VTP-brucella-FBP broth에 균을 접종하여 10% CO₂, 5% O₂의 미호기 조건으로 42°C에서 24시간 배양하였다. 배양 균액을 2,000 rpm에서 15분간 원심 침전하고 PBS(pH 7.2)로 10배 계단 희석하여 2.3×10⁸ CFU/ml로 조정된 다음, 경구 주입관(sonde)을 사용하여 0.5 ml 경구접종 하였다. 균 접종 계군의 감염 유무를 조사하기 위하여 균 접종 후 1일, 접종 후 7, 14 및 21일에 직장 분변을 채취하였다. 분변 재료는 VTP-brucella-FBP broth에 접종하여 10% CO₂, 5% O₂의 미호기 조건으로 42°C에서 24시간 증균 배양하였다. 증균 배양액 0.03 ml을 Campy-BAP에 도말하여 미호기 조건으로 48~72

시간 배양하여 감염 유무를 판정하였다.

장관의 주사 전자 현미경적 관찰. *C. jejuni* 균의 장관 정착 상태를 확인하기 위하여 균 접종전 1일 접종후 7, 14 및 21일에 공장을 적출하여 냉각된 PBS로 가볍게 세척한 다음 2%, pH 7.4 glutaraldehyde(Sorensen, USA)-용액(pH 7.4)에 침적하여 4°C에서 고정하였다.

다음 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.2)로 1시간 간격으로 3회 수세하고, 70, 80, 90, 95% absolute ethanol에서 탈수과정을 거쳐 임계 건조기에서 건조시켰다. 건조된 조직편을 양면 테이프를 이용하여 블록에 얹고 ion sputtering coater 내에서 순금으로 100 Å 두께로 표면 처리하여 주사 전자 현미경(JSM 6400, Oxford, USA)로 관찰하였다.

한방 사료 첨가제의 야외 적용 시험

실험동물. 야외 적용 시험은 2005. 1월부터 2005. 6월 까지 경기도 용인소재 양계장에서 실시 하였다. 공시동물은 부화 4~5일령의 재래닭 유추 3원교배종(유색육봉종 \times 2원 교배종 \times 우)으로 OHME 첨가군(250수)과 대조군(250수)으로 나누어 사육하면서 2주 간격으로 각 20마리에서 가검 재료를 채취하였다.

한방사료 첨가제의 구성. 홍화, 삼백초 등을 일정비율로 분쇄농축 한 후 고형분을 과립화하여 사료에 1% 되게 첨가하여 사용하였다.

시료 채취. 사료급여 1주후부터 2주 간격으로 5회에 걸쳐 대조구 및 OHMFA 첨가사료 급여구 각 20마리에서 분변, 비장 및 간으로부터 시료를 채취하였다. 분변재료는 직장분변을 멸균된 면봉을 이용하여 채취하였으며, 비장 및 간의 시료는 1회용 poly glove를 사용하여 무균적으로 채취한 다음 약 1g을 마쇄한 후 각각의 시료를 소의 혈액을 5% 첨가한 VTP brucella FBP broth에 접종하였다

Campylobacter 속균의 분리 및 동정

직장분변, 비장, 및 간 시료를 5% 소혈액을 첨가한 VTP Brucella-FBP broth 10 ml에 접종한 것을 실험실로 옮겨 단 시간에 균분리를 실시하였다. *Campylobacter* 속균의 분리는 시료가 접종된 평판배지를 Campy pack 2 (BBL, USA)와 혐기성 jar (Difco, USA)를 이용하여 10% CO₂, 5% O₂, 및 85% N₂의 미호기 상태에서 42°C에서 18~24시간 증균 배양하였다. 증균배양액 0.03 ml를 취하여 Campy-BAP에 접종하고 증균배양과 동일한 미호기 조건으로 42°C에서 48~72시간 배양한 다음 각각의 평판배지에서 *Campylobacter* spp.으로 의심되는작은(폭 0.2~0.8 μm) 집락 3개씩을 선택하여 G(-)로서 만곡 또는 S자형의 corkscrew-like motility 나타내는 균을 선발하였다. 선발된 세균은 Modeiros와 Hofmann(9)의 방법에 따라 catalase 생성, oxidase 생성, 43°C 및 25°C에서의 발육성, nalidixic acid (30 μg, disc)에 대한 감수성, cephalothin(30 μg, disc)에 대한 저항성, H₂S 생성, nitrate 환원, 1% glycine 및 3.5% NaCl 첨가배지에서

발육성 등에 관한 생화학적 성장검사를 실시하였다.

분리균의 biotyping. *Campylobacter*로 동정한 균의 biotyping은 Lior(10)의 방법에 준하여 rapid H₂S 생성시험, hipurate 및 DNA 가수분해 시험의 그 결과에 따라 분류하였다

분리균의 serotyping. 분리균의 혈청학적 분류는 Lior 등(11)의 방법에 따라 36종 표준혈청을 사용하여 평판응집 반응의 결과에 따라 분류하였다. 표준 면역혈청은 Gifco (USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 항원은 각 *Campylobacter*의 단일 집락을 Campy-BAP에 접종하여 미호기 조건으로 42°C에서 48시간 배양한 것을 집균하여 DNase를 0.5% 첨가한 0.01 M phosphate buffer에 고농도로 부유시킨 균액을 항원으로 사용하였다. 분리균의 항원형 검사는 면역혈청 5종을 혼합한 다가 혈청으로 먼저 screening test를 한 다음 다가 혈청과 응집반응을 일으킨 항원에 대하여 50 μl의 항원과 1:6으로 희석한 단가 혈청을 혼합하여 30~60초 내에 응집반응이 일어나면 2혈청형으로 판정하였다. 단가 혈청에 교차 면역반응을 일으킨 항원에 대해서는 흡착면역 혈청을 사용하여 같은 방법으로 최종형별하였다.

Campylobacter 분리주의 항생물질에 대한 감수성

항균성 물질에 대한 감수성시험. 분리동정한 *C. jejuni*의 항균성물질에 대한 감수성 시험은 Lior 등(12) 등의 방법에 따라 한천 평판 희석법으로 실시하였다. 배지는 면양혈구 5%를 첨가한 Muller Hinton agar (MHA) 배지를 사용하였고, 항균성 물질은 ampicillin (Ap), cephalothin (Cep), chloramphenicol (Cp), erythromycin (Em), gentamicin (Gm) kanamycin (Km), rifampin (te), nalidixic acid (NA), streptomycin (Sm), tetracyclin (Tc)의 10종류를 사용하였다. 먼저 각종 항균물질을 MHA agar 배지에 가하여 최종 농도 400, 200, 100, 50; 25, 12.5, 3.13, 1.15, 0.78, 0.39, 및 0.2 μg/ml가 되는 한천 평판 배지를 만들었다. 시험 균액을 10⁵ CFU/ml로 맞추어 multiple inoculator로 MHA평판 배지상에 접종한 다음 CampyGEN (Oxoid, England)을 이용하여 5% O₂, 10% CO₂, 및 85% N₂의 미호기 조건으로 37°C에서 24~48시간 배양하였다. MIC는 접종균의 발육여부로서 판정하였고, 판정기준은 통상의 방법에 따라 Cp, Tc 및 Sm은 12.5 μg/ml, NA와 Cep는 30 μg/ml, 그 외의 약제는 25 μg/ml의 농도에 발육하는 것을 내성균으로 하였다.

결 과

한방사료 첨가제의 항균효과

Campylobacter 속균 및 주요 경합세균에 대한 OHME의 최소발육 억제농도를 조사한 결과는 Table 1에서와 같이 *C. jejuni*, *C. coli*는 1% 이상의 농도에서 *S. enteritidis*, *S. pullorum*, *L. acidophilus* 및 *E. coli* O157은 2%에서 *St. aureus*는 0.25%에서 항균효과를 나타내었다(Table 2).

Table 1. Biotyping scheme for thermophilic *Campylobacter*

Test	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>		<i>C. lariidis</i>	
	I	II	III	IV	I	II	I	II
Hipurate hydrolysis	+	+	+	+	-	-	-	-
Rapid H ₂ S production	-	-	+	+	-	-	+	+
DNA hydrolysis	-	+	-	+	-	+	-	+

***Campylobacter jejuni*의 장관 정착 억제 효과**

감염 계군의 분변에서 *C. jejuni*의 분리. 한방 사료첨가제 (OHME) 급여에 의한 *C. jejuni*의 장관 정착 억제 효과를 조사하기 위하여 4~5일경의 육추에 2.3×10^8 cell/ml의 균액 0.5 ml을 경구접종하고 접종전 1일, 접종 후 7, 14 및 21일에 직장 분변을 취하여 *C. jejuni*를 분리한 성적은 Table 3과 같다.

접종 1일경에는 대조군 및 1% OHME첨가 사료 급여군 (시험군) 모두 직장 분변에서 *C. jejuni*가 검출되었다. 대조군에서는 17일 경과 후부터 21일까지 5마리의 실험군 중 4마리에서 *C. jejuni*가 검출되었다. 그러나 1%OHME 급여군에서는 7일 후 5마리의 실험군 중에서 3마리, 14일 후 2마리, 21일 후에는 1마리에서만 직장 분변에서 *C. jejuni*가 검출되었다.

장관의 주사 전자 현미경적 관찰. 한방사료첨가제 급여가

Table 2. Minimum inhibitory concentration of OHME on *Campylobacter* and other competitive bacteria

Microorganisms	MIC (%)				
	2.0	1.0	0.5	0.25	0.13
<i>C. jejuni</i>	-	-	+	+	+
<i>C. coli</i>	-	-	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>	-	+	+	+	+
<i>S. pullorum</i>	-	+	+	+	+
<i>L. acidophilus</i>	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O157	-	+	+	+	+
<i>Sta. aureus</i>	-	-	-	-	+

Table 3. Isolation of organism from feces of chickens infected with *C. jejuni*

Treatment groups	During of times after inoculation	No. of positive/ No of tested
Control fed	1 day	5/5
	7 days	4/5
	14 days	4/5
	21 days	4/5
1% OHME added	1 day	5/5
	7 days	3/5
	14 days	2/5
	21 days	1/5

*C. jejuni*의 장관 정착에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 2주령의 재래닭에 *C. jejuni*를 2.3×10^8 CFU/ml 수준으로 경구 접종한 후 대조군에는 일반 사료를, 실험군에는 한방사료 첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합하여 급여한 후 소장(공장)에서의 정착 상태를 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과, 대조군에서는 감염 후 7, 14, 및 21일에 균이 소장 점막 표면 부위에 다수 부착하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 감염 후 14일에 가장 많은 정착을 나타내었다(Fig 1). 한방첨가제를 급여한 군에서는 시간이 지남에 따라 *C. jejuni* 균이 거의 관찰되지 않았다(Fig 2).

한방사료첨가제의 thermophilic *Campylobacter* 속균에 대한 방제효과

입식후 1주부터 2주간격으로 5회에 걸쳐 OHME 첨가군과 대조군 각 20두의 직장 분변, 간 및 비장재료로부터 시간의 경과에 따른 *Campylobacter* spp.의 분리빈도는 Fig 4와 같다. 직장 분변재료에서 대조군은 입식후 20수 중 5수(25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으며 그 후 분리율이 점차 증가하였으며 7주 후에서 20수 중 16수(80%)에서 균이 분리되었다. OHME 첨가군의 경우 입식 일주일 후 20수 중 5수(25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으나 그 후 분리율이 다소 감소하여 7주 후에는 20수 중 3수(15%)에서 분리되었다. 간 및 비장에서 대조군은 입식 일주일 후에 각 10%에서 *Campylobacter* 속균이 분리되었으며 7주 후에도 간에서 20%, 비장에서 15%가 분리되었다. OHME 첨가군의 경우 입식 1주 후에 간 및 비장에서 각각 5%가 분리되었으나, 7주 후에는 두 장기에서 균이 분리되지 않았다. 균이 분리된 간은 염증 소견이 관찰되었으며 비장은 다소 종대되어 있었다.

Thermophilic *Campylobacter*의 동정. 재래닭 1~7주령의 육추에서 분리한 56주의 thermophilic *Campylobacter*의 균종을 분류한 결과 *C. jejuni*가 43주(76.7%)로 가장 높은 분포를 보였으며, *C. coli* 12주(21.4%) 및 *C. lariidis* 1주 순으로 분류되었다(Table 5).

분리균의 biotype. 균종별 biotype의 분포는 분리한 *C. jejuni* 43주는 biotype I이 26주(60.4%)로 가장 높았으며, II는 13주(30.2%), IV 3주 (6.8%) 및 III 2주(4.6%) 순이었다. 분리한 12주의 *C. coli*는 biotype I이 10주로 대부분 (83.3%)이었으며, II도 2주(16.6%) 분리되었다. 분리균 중에

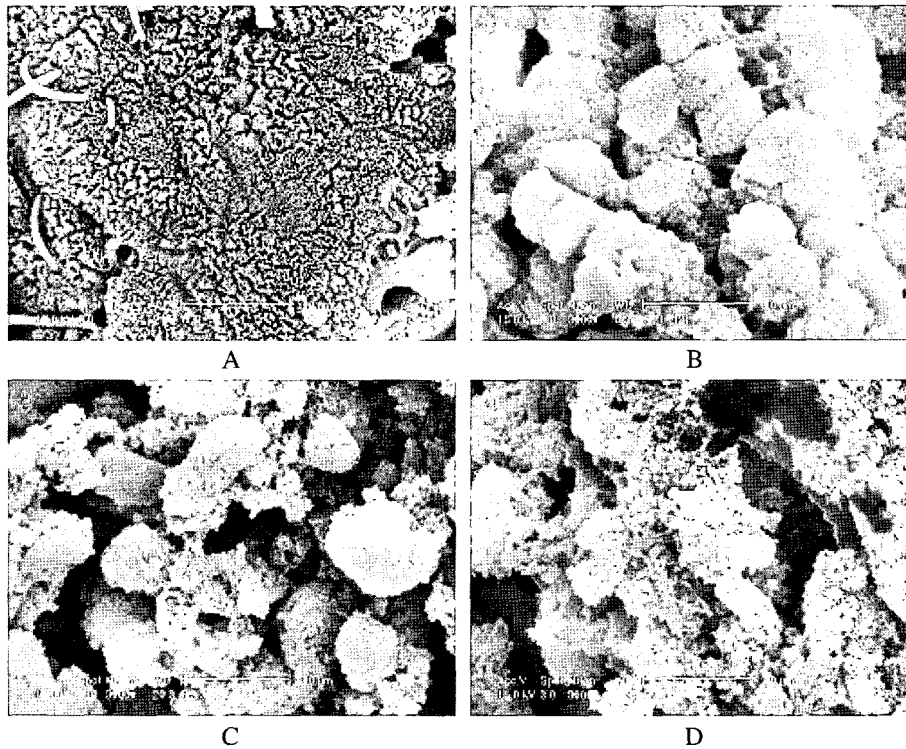


Fig 1. Scanning electron micrograph on jejunum(1000×) from Korean native chickens fed a assorted forage(control group). (A) Vilus epitherium on jejunum before infection. There are observed a few bacillary form of bacteria. (B,C,D) Vilus epitherium on jejunum at 7,14 and 21days after infection with *C. jejuni*. There were observed many bundles of fine viroid form of bacillus.

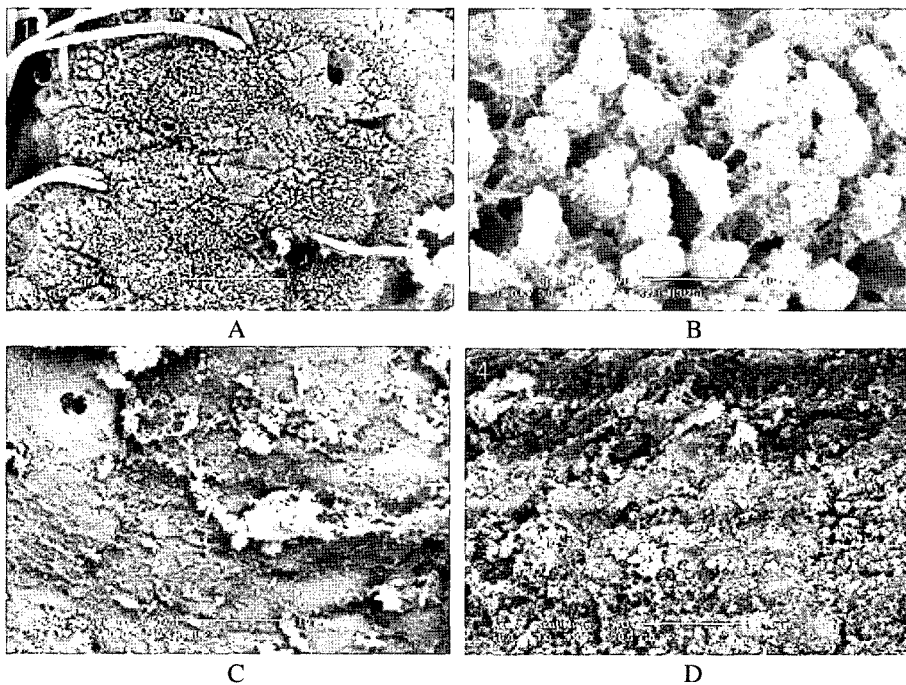


Fig 2. Scanning electron micrograph(1000×) on jejunum from korean native chickens fed a forage added OHME(tested group). (A) Vilus epitherium before infection. There are observed a few bacillary forms of bacteria. (B)vilus epitherium at 7days after infection with *C. jejuni*. There are observed many bundles of fine viroid form of bacillus. (C) Vilus epitherium at 14days after infection with *C. jejuni*. Bacteria observed occasionary. (D) Vilus epitherium after 21days after infection with jeju.Bacteria was observed occasionary.

서 *C. laridis*도 1주가 분리되었으며 biotype I으로 분류 되었다(Table 6).

분리균의 serotype. 분리균의 serotype은 Lior등(11)의 혈정학적 분류방법에 따라 36종의 표준 항혈청으로 조사 하였으며, 결과는 Table 7 및 8과 같다. *C. jejuni* 43주중 41주가 serogrouping이 가능하여 11종류의 serotype으로 분류되었다. Serotype별 형별분포는 뚜렷한 차이가 없었으나 이들 중 type 36(18.3%)과 17(13.6%)이 비교적 많았다. *C. coli*의 serotype은 12주 중 10주가 serogrouping 가능하여 5종류의 serotype으로 분류되었으며 type 31(33.3%)과 20(25%)이 많은 편이었다.

사료 첨가제 투여계군 및 시험대조군에 대한 감염증 발생 및 병리해부 소견. 간 및 비장 재료에서 대조구에서는 80두 중 각 11(13.7%)두 및 8(10%)두에서 균이 분리되었으나 OHMFA 첨가 균에서는 간 및 비장재료 각 2(2.5%)두에서 균이 분리되었다. 균이 분리된 간은 염증 소견이 관찰되었으며 비장은 다소 증대되어 있었다.

항생제 감수성 시험

분리한 *Campylobacter* 55주에 대하여 항생물질에 대한 감수성시험을 실시한 결과는 Table 10에서 보는 바와 같다. *C. jejuni*(43주) 및 *C. coli*(12주)는 NA, Am, Gm, Cl 및 Cp에 대하여 90% 이상의 균주가 높은 감수성을 보였으며,

Table 4. Recovery of thermophilic *Campylobacter* in liver, spleen and rectal swabs sample from broiler chickens of Korean native

Week interval	Group	No. of chickens examined	No. of sample Positive (%)		
			Liver	Spleen	Rectalswabs
First week	Control	20	2(10)	2(10)	5(25)
	Treated	20	1(5)	1(5)	5(25)
Third week	Control	20	2(10)	1(5)	8(40)
	Treated	20	1(5)	1(5)	4(20)
Fifth week	Control	20	3(15)	2(10)	10(50)
	Treated	20	.	.	3(15)
Seventh week	Control	20	4(20)	3(15)	16(80)
	Treated	20	.	.	3(15)
Total	Control	80	11(13.7)	8(10)	40(50)
	Treated	80	2(2.5)	2(2.5)	15(18.7)

Table 5. Species of thermophilic *Campylobacter* isolated from chickens

No. of sample testes	Total No. of isolate (%)	No. of isolates (%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. laridis</i>
160	54(34.3)	43(26.9)	12(7.5)	1(0.6)

Table 6. Biotype of *Campylobacter* isolated from chickens

No. of isolates	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>			<i>C. laridis</i>		
	I	II	III	IV	No. of isolates	I	II	No. of isolates	I	II
43(100)	26(60.4)	13(30.2)	2(4.6)	3(6.9)	12(100)	10(83.3)	2(16.6)	1(100)	1(100)	.

Table 7. Serotype of *C. jejuni* isolated from chickens

Serotype	4	5	9	10	17	18	22	26	27	30	36	Untypabal	Total
No. of serotype (%)	4 (9.3)	4 (9.3)	4 (9.3)	1 (2.3)	6 (13.6)	2 (4.6)	2 (4.6)	4 (9.3)	4 (9.3)	2 (4.6)	8 (18.3)	2 (4.6)	43 (100)

Table 8. Serotype of *C. coli* isolates from chickens

Serotype	8	20	20	25	31	Untypabal	Total
No. of serotype (%)	1 (8.3)	3 (25.0)	1 (8.3)	1 (8.3)	4 (33.3)	2 (16.6)	12 (100)

Table 9. Antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* isolated from Korean native chickens

Drugs	concentration (µg/ml)	No. of susceptible strains	
		<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)
Nalidixic acid (NA)	30.0	42(97.6)	12(100)
Amikacin (Am)	25.0	42(97.6)	11(91.6)
Gentamycin (Gm)	25.0	41(95.3)	11(91.6)
Colistin (Cl)	12.5	40(93.0)	11(91.6)
Chloramphenicol (Cp)	25.0	39(90.6)	11(91.6)
Kanamycin (Km)	25.0	36(83.7)	10(83.3)
Erythromycin (Em)	25.0	34(79.0)	8(66.6)
Ampicillin (Ap)	25.0	27(62.7)	7(58.3)
Tetracyclin (Tc)	12.5	25(58.1)	7(58.3)
Streptomycin (Sm)	12.5	23(53.4)	5(41.6)
Cephalotin (Cep)	25.0	0(0)	0(0)

No. of tested strains were 43 of *C. jejuni* and 12 of *C. coli*

Km, Em, Ap 및 Tc에 대하여 50% 이상의 균주가 감수성이었으나, Cep에 대해서는 분리균 모두 감수성이 없었다. *C. jejuni*와 *C. coli*는 항생물질에 대한 감수성 차이가 뚜렷하지 않았다.

고 찰

*C. jejuni*와 *C. coli*는 사람의 위장염의 원인균으로 밝혀진 이래 근년 본균에 의한 장염 및 식중독이 미국, 영국, 캐나다, 호주, 벨기에 및 아프리카 등지에서 집단적으로 발생하는 예가 많아짐에 따라 공중보건상 중요한 병원체로 인식되고있다(3.6.19). 특히 닭은 *C. jejuni*의 자연숙주로서 지역 또는 환경에 따라서 거의 100%의 높은 분리율을 나타내는 것으로 보고되고 있어서 닭에서는 본균의 감염증을 예방하는 것은 공중보건학 상 매우 중요하다(7,21). 본 연구에서는 닭에서 *Campylobacter*속균 등의 세균방제를 위한 한방사료 첨가제를 개발할 목적으로 삼백초, 홍화등의 한약제를 혼합한 추출물을 사용하여 *Campylobacter*속균과 주요 경합세균에 대하여 최소발육저지 농도를 측정할 결과 *Staphylococcus aureus*는 0.25% 농도에서, *C. jejuni*와 *C. coli*는 1.0% 이상 농도에서 *S. enteritidis*, *S. pullorum*, *L. acidophilus*는 2% 이상에서 증식이 억제되었다. 강 등(23)은 몇종의 세균에 대한 한방첨가제의 항균시험을 실시하여 *Salmonella*속균과 *E. coli*는 2.0% 이상에서, *Staphylococcus aureus* 등은 0.25%에서 증식이 억제되었다고 하였으며 이러한 결과는 본 실험의 성적과 유사하였다.

*C. jejuni*를 2주령의 재래닭에 경구접종하여 한방첨가제 급여에 의한 장관 정착 억제 효과를 조사한 결과, 3주 후 대조군에서는 대부분 닭의 직장분변에서 *C. jejuni*가 검출되었으나, 첨가제 급여군에서는 대부분의 개체에서 균이 분리되

지 않았다. 강 등(23)은 broiler 유추에서 *S. enteritidis*를 경구 접종하여 사료 첨가제의 장관 정착 억제효과를 조사한 결과 첨가군에서는 14일 후에는 균이 거의 분리되지 않았다고 하였으며 본 실험의 결과와 유사한 유형이었다. 이상의 성적으로 재래닭에 대한 한방사료 첨가제의 급여가 *C. jejuni* 및 장내 병원성 세균을 사멸시켜 장관 정착을 억제하는 것으로 생각된다.

재래닭 4-5일령 유추에 *C. jejuni*를 경구 접종하여 공장 에서 균의 정착상태를 주사전자 현미경으로 관찰한 소견에서 대조군의 경우 감염 14일 및 21일 후에도 점막상피에 다수의 균이 부착되어 다발(bundle)을 형성하고 있었으나 첨가 사료 급여군에서는 적은수의 균이 관찰되었다. 이러한 결과는 직장분변에서 균 분리 개체수의 감소와 일치되었다.

농장적용시험에서 입식 후 시간의 경과에 따른 *Campylobacter*속균의 분리빈도를 조사한 결과 대조구는 직장분변 재료에서 입식 일주일 후 25%에서 균이 분리되었으나 점차 분리율이 증가하여 7주 후에는 75%의 재래닭에서 균이 분리되었다. 첨가사료 급여군에서는 입식 일주일 후 직장 분변재료중 25%에서 균이 분리되었으나 점차 분리율이 감소하여 7주후에는 15%에서만 균이 분리되어 한방 첨가 사료의 *Campylobacter* 속균 방제효과가 입증되었다. 간 및 비장에서 대조군의 경우 7주일 후에는 분리 개체수가 증가하였으나 첨가군의 경우 5주일 후에는 균이 분리되지 않았다. 이러한 성적은 한방 첨가제의 항균성 및 개체의 저항성 증가에 따른 결과로 생각된다. 이상의 결과를 통해서 재래닭의 1-7주령 유추에 1.0%의 한방사료 첨가제의 투여는 *Campylobacter*속균 및 장내 병원성 세균의 수를 감소시키고 장관정착을 억제함으로써 질병의 발생을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

농장실험에서는 입식 후 1주부터 2주 간격으로 5회에 걸쳐 사료첨가제 첨가군과 대조군 각 20수의 직장 분변, 간 및 비장재료로부터 시간의 경과에 따른 *Campylobacter* 속균의 분리빈도를 조사한 결과 직장 분변재료에서 대조구는 입식후 20수 중 5수 (25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으며 그 후 분리율이 점차 증가하였으며 7주 후에서 20수 중 16수(80%)에서 균이 분리되었다. 직장 분변 재료에서 OHME 사료첨가 급여군의 경우 입식 일주일 후 20수 중 5수(25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으나 그 후 분리율이 다소 감소하여 7주 후에는 20수 중 3수(15%)에서 분리되어 OHME 첨가 사료의 thermophilic *Campylobacter*의 방제효과가 입증되었다. 간 및 비장 재료에서 대조군에서는 80수 중 각 11수(13.7%) 및 8수(10%)에서 균이 분리되었으나 사료첨가제 군에서는 간 및 비장재료 각 2(2.5%)수에서 균이 분리되었다. 균이 분리된 간은 염증 소견이 관찰되었으며 비장은 다소 종대되어 있었다. 간, 비장의 병변은 *Campylobacter* 속균 감염에 의한 염증 소견으로 생각된다. 이러한 성적은 강 등(23)이 *S. enteritidis*를 broiler 4-5일령 유추에 경구 접종하여 대조군과 한방사료 첨가군으로 나누어 4주간 사육한 후 분변 중 *Salmonella* 속균

을 분리한 성적과 실험방법은 달랐지만 최종결과는 유사한 유형이었다.

본 실험에서 분리한 thermophilic *Campylobacter* 56주는 *C. jejuni*가 76.7%, *C. coli* 21.4% *C. laridis* 1주로 분류되었으며 균종별 biotype의 분포를 조사한 성적에서 분리한 *C. jejuni* 43주는 biotype I이 60.4%로 가장 높았으며, biotype II는 30.2%, biotype IV 및 biotype III 순이었다. *C. coli* 12주는 biotype I이 75%로 대부분이었으며 II도 2주(16.6%)가 분리되었다. *C. laridis*의 1주가 분리되었으며 biotype I으로 분류되었다. Lior 등(18)은 사람과 동물에서 유래한 *C. jejuni*와 biotype I 및 II는 57.3% 및 36.0%라고 보고하였으며, 본 실험의 성적과 유사하였다. *C. coli*의 biotype 분포는 I 및 II가 75% 및 16.6%로 Lior 등(10)의 닭 유래균에서 biotype II가 오히려 많았다는 보고와는 상이한 결과로 이에 대하여는 더 조사하여야 할 것으로 생각된다.

분리균의 혈청형별 분류는 *C. jejuni* 43주중 41주가 serogrouping이 가능하여 11종류의 serotype으로 분류되었다. Serotype별 형별분포는 뚜렷한 차이가 없었으나 이들중 type36(18.6%)과 17(13.9%)이 비교적 많았다. *C. coli*의 serotype은 12주중 10주가 serogrouping 가능하여 5종류의 serotype으로 분류되었으며 type 31(33.3%)과 20(25%)이 많은 편이었다. *C. jejuni* 혈청형별 분포는 뚜렷한 차이가 없었으나 type 36(18.6%)과 17(13.9%)이 비교적 많아 닭 유래균은 type 36이 비교적 많았다는 김과마(24)의 성적과 유사하였다. Pattom 등(18)에 의하면 환자에서 흔히 분리되는 균이 혈청형은 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 16 및 17이라고 보고하였으며 본 실험의 결과에서도 비슷한 분포를 나타내고 있는 것으로 보아 닭에서 유래한 균이 사람에서 *Campylobacter* 장염의 주요 감염원이 될 것으로 생각된다. 분리한 *Campylobacter* 56주에 대하여 항생물질에 대한 감수성시험을 실시한 결과 *C. jejuni*(43주) 및 *C. coli*(12주)는 NA, Am, Gm, Cl 및 Cp에 대하여 90% 이상의 균주가 높은 감수성을 보였으며, Km, Em, Ap 및 Tc에 대하여 50% 이상의 균주가 감수성이었으나 Cpe에 대해서는 분리균이 모두 감수성 균이 없었다. *C. jejuni* 및 *C. coli*는 항생물질에 대한 감수성 차이가 뚜렷하지 않았다. *C. jejuni* 약제감수성에 관한 많은 연구에서 일반적으로 Gm, Km, Em, Tc, Cp, Va, Ap, rifampicin, ceftriaxone, spectinomycin, josamycin 및 clindamycin 등에 감수성이 높은 것으로 보고하였다(3,6,8,12,24) 그러나 Butzler(1)가 EM에 대한 내성을 보고한 이래 많은 연구자들이 *C. jejuni*의 EM에 대한 내성율은 1~28% 범위라고 하였다. Karmorli 등(18)에 의하면 EM에 대한 내성균은 그 세균의 B-lactamase 생성에 기인한다고 하였다. 본 실험에서 EM에 대한 내성율은 31%로 김과마(24)가 보고한 22.1%보다 높았으며, Luber 등(12)의 29.4%와 유사한 수준이었다. Tc에 대한 내성율은 41.9%로 Luber 등(12)의 45%보다 낮았으며, 김과마(24)의 35.2%보다 약간 높았다.

이와 같이 EM, Tc에 대하여 *Campylobacter* 속균의 대부분이 감수성이 높았다는 종전의 보고(8,14,24)와는 달리 내성균이 많이 출현하고 있음을 알 수 있었다. 그러므로 *Campylobacter* 속균에 의한 사람과 가축의 질병치료 및 예방목적으로 EM 및 Tc를 사용할 경우에는 내성균의 문제를 고려해야 할 것으로 생각된다. 장내 세균에 속하는 *Salmonella*, *E. coli*, *Proteus* 등의 세균은 일반적으로 각종 항생제에 대한 내성율은 높으나, *C. jejuni*와 *C. coli*는 이들 세균과는 달리 감수성이 다소 높다는 것을 알 수 있었다. Cep에 대한 내성율은 100%로 여러 연구자(3,6,8)들의 성적과 거의 같은 수준이었다. Cephalosporin계 항생제에는 감수성균이 거의 없는 것이 특이한 점이라 할 수 있다.

결론

본 연구에서는 닭에서 *Campylobacter* 속균의 감염증을 예방할 수 있는 한방사료첨가제를 개발할 목적으로 한약제를 이용하여 *Campylobacter* 속균과 주요 경합세균에 대한 항균성과 *C. jejuni*의 장관정착억제효과를 검사하였다. 개발한 한방사료 첨가제를 육계 농장에 직접 적용하여 *Campylobacter* 속균의 억제효과, 분리균의 혈청형 및 항생제 감수성 시험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Campylobacter 속균 및 주요 경합세균에 대한 한약제 추출액(OHME)의 최소 발육 억제 농도는 *St. aureus*는 0.25%, *C. jejuni*와 *C. coli*는 1%, *S. enteritidis*, *S. pullorum*, *L. acidophilus* 및 *E. coli* 0157은 2%로 나타났다.

각 주별 5수를 배치한 시험구에서 *C. jejuni*를 10^5 CFU/ml 수준으로 접종한 재래닭 육추에서 OHME를 1.0% 급여한 결과 7일 이후 분리 개체수가 감소하기 시작하여 21일 후에는 1마리에서만 직장 분변에서 *C. jejuni*가 검출되었다. 그러나 대조구에서는 5수 중 4수에서 균이 검출되었다.

야외 적용시험에서 입식 후 2주 간격으로 첨가구와 대조구의 직장분변, 간, 비장 재료에서 *C. jejuni*의 분리 빈도를 조사한 결과 직장 분변 재료에서 대조구는 입식 1주 후 25% (5/20)에서 균이 분리 되었으며 점차 증가하여 7주 후에는 75%(5/20)에서 균이 분리되었다.

그러나 OHME급여구는 입식 1주일 후 25%(5/20)에서 균이 분리되었으며 7주 후 15%(3/20)에서만 분리되어 경시적으로 현저한 차이를 나타내었다. 간 및 비장재료에서 대조구는 입식 7주 후에 간에서 20%, 비장에서 15%의 분리율을 나타내었으나 OHME 급여구에서는 두 장기에서 균이 분리되지 않았다.

한국 재래닭에서 분리한 thermophilic *Campylobacter* 56주의 균종별 분포율은 *C. jejuni*가 76.7%(43/56), *C. coli* 21.4%(12/56) 및 *C. laridis* 1.6%(1/56)순이었다. 분리한 *C. jejuni* 43주는 대부분이 biotype I(60.4%)과 II(30.2%)로 분류되었고, *C. coli* 10주는 5종의 혈청형으로 분류되었으며 serotype 31(33.3%)과 21(25%)이 비교적 많았다.

분리한 *C. jejuni*(43주)와 *C. coli*(12주)는 NA, AM, Gm

및 Cp에 대하여 90%이상의 균주가 감수성을 보였으며, Km, Em, Ap 및 Tc에 대하여 50% 이상의 균주가 감수성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 농림기술 개발 연구사업의 지원으로 수행되었음(ARPC-100052-2).

참고 문헌

1. Butzler JP. *Campylobacter* infection in man and animal. Boca raton, florida: CRC press Inc. 1984: 1-246.
2. Cox NA, Hofacre CL, Bailey JS, Buhr RJ, Wilson JL, Hiatt KL, Richardson LJ, Musgrove MT, Cosby DE, Tankson JD, Vizzier YL, Cray PF, Vaughn LE, Holt PS, Bourassaa DV. Presence of *Campylobacter jejuni* in various organs one hour, one day, and one week following oral or intracloacal inoculations of broiler chicks. *Avian Dis* 2005; 49(1): 155-8.
3. Desmonts MH, Gesbert FD, Avrain L, Kempt I. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolates from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. *J antimicrob chemother* 2004: 1025-1030.
4. Evans SJ and Sayers AR. A logitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain, *Preventive Vet* 2000; 46: 209-223.
5. Garcia MM, Lior H, Stewart RB, Rckerfauer GM, Trudel JRR, Skilijarevski A. Isolation, charaterization and serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from slaughter cattle. *Appl Environ* 1985; 49: 667-672.
6. Ishihara K, Kira T, Ogaikubo K, Morioca A, Tanaka MK, Takahashi T, Tanura Y, Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolated from food producing animal on farms (199-2001):Results from the Japans Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *International J Antimicrob Agent* 2004; 24: 261-267.
7. Jacobs-Reitsma WF. Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in Poultry. *The Veterinary Quarterly* 1997; 19: 113-117.
8. Karmali MA, De grandis S, Fleming PC. antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter jejuni* with special reference to resistance patterns of Canadian isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 10: 593-597.
9. Line JE, Bailey JS, Cox NA, stern NJ, Tompkins T. Effect of yeast-supplement feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poultry Science* 1998; 77: 405-410.
10. Lior H. New extended biotyping schemes for *Campylobacter jejuni*, coli and *Campylobacter laridis*. *J clin Microbiol* 1984; 30(4): 636-640.
11. Lior H. Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ Gill P. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 761-768.
12. Luber P, Bartelt E, Genshow E, Wagner J, Hahn H. Comparison of angar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbial* 2003; 41: 1062-1068.
13. Modeiros D, Hofman L. Isolation of thermophilic *Campylobacter* from food MFLP-46. *Health Canada* 2002: 1-11.
14. Munroe DL, Prescott JF, Penner JL, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* serotype solated grom chickens, cattle and pigs. *J Clin Microbial* 1983; 18: 887-881.
15. National committe for clinical labatory standard. Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 4th ed 1997: 93-180.
16. Noor SM, Husband AJ and Widdes PR. Inovo oral vaccination with *Campylobacter jejuni* estabilishes early development immunity in chickens, *British Poultry Science* 1995; 36: 563-573.
17. Oyofa BA, De Loach JR, Corrie DE, Norman JD, zigurin RL, Mollenhauer HH. Eeffect of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. *Avian Dis* 1989; 33: 531-534.
18. Patton CM, Barrett TJ, Moriis GK. Comparison of Penner and Lior methods for serotyping *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 558-556.
19. Rosef O, Kapperud G. Isolation of *Campylobacter fetus subsp jejun* from feces of Norwegian poultry. *Acta Vet* 1982; 23: 128-134.
20. Eiden JJ, Dalton HP. An animal reserrior for *Campylobacter fetus subsp jejuni*. Presented at 20th interscience conference. *Antimicrob Agents Chemother*, Am Soc Microbiol New Oreans abt 1980: 691.
21. White PL, Bakers AR, James WO. Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* in raw Poultry products, *Revue Scientifique et Technique(International Office of Epizootics)* 1997; 16: 525-541.
22. Widdes PR, Perry R, Muir WI, Husband AJ and Long KA. Immunisation of chickens to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*, *British Poultry Science* 1995; 37: 765-778.
23. 강호조, 김용환, 이후장, 김종수, 김종섭, 김도경, 김은희, 박미림, 김근섭. 한방 사료첨가제를 이용한 육계의 *Salmonella* 방제효과 - 항균성 및 장관정착억제 -. *대한수의학회지* 2003; 43: 41-47.
24. 김용환, 마점술. 동물에서 thermophilic *Campylobacter*의 분포 및 분리세균의 약제내성진달에 관한연구. I. 동물에서 thermophilic *Campylobacter*의 분포 및 분리세균의 약제에 대한 내성. *대한수의학회지* 1989; 29: 291-301.
25. 이진만, 이상한, 권상호, 김준한, 이동성, 문철호, 김종국. 기능성 건강식품 제조/실험. 도서출판 동국. 2000: 311-338.
26. 신동원, 김남일, 여인석, 한권으로 읽는 동의보감. 도서출판 들녘. 1999: 956-975.