

## 종모우 정액중 *Brucella*균 신속 검출을 위한 PCR기법 개발

정석찬 · 정병열 · 우승룡 · 조동희 · 김종엽 · 김우택\* · 이정미\*\* · 박용호\*\* · 백병걸\*\*\*

수의과학연구소 · 제주도 축산진흥원\*  
서울대학교 수의과대학\*\* · 전북대학교 수의과대학\*\*\*  
(1998년 3월 17일 접수)

### Development of PCR assay for the detection of *Brucella* spp in bovine semen

Suck-chan Jung, Byeong-yeal Jung, Seong-ryong Woo, Dong-hee Cho, Jong-yeom Kim,  
Woo-taek Kim\*, Jung-mi Lee\*\*, Yong-ho Park\*\*, Byeong-kirl Baek\*\*\*

Department of Bacteriology and Immunology, National Veterinary Research Institute  
Department of Animal Health, Cheju Livestock Promotion Institute\*  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University\*\*  
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University\*\*\*  
(Received Mar 17, 1998)

**Abstract** : The diagnosis of brucellosis is currently based on serological and microbiological tests. However, the microbiological isolation and identification have several disadvantages such as time-consuming and laborious, and the serological methods have been reported to cross-react with antigens other than those from *Brucella* spp. To develop a sensitive and rapid diagnostic method for detection of *Brucella* species, the genus-specific primers were designed and synthesized from the sequence of gene encoding a 31kDa cell surface protein(BCSP) and a 36kDa outer membrane protein(OMP) of *B abortus*. The amplified 711bp and 982bp DNA fragments were only visible in each species of *Brucella* by PCR method using the BCSP and OMP primers, respectively. However, PCR product was not obtained with DNA from other Gram-negative bacteria. As little as 1pg of the *B abortus* genomic DNA could be detected by this PCR method. Using the PCR technique, semen samples from 185 bulls of *Brucella*-seronegative herds in Cheju island were examined for comparison of this PCR method with conventional methods in 1995. The semen samples from 5 bulls were positive by culture method and PCR, and one was positive and 5 were suspect by semen plasma agglutination test. However, the semen samples obtained from 177 bulls were negative by semen plasma agglutination, culture and PCR methods in 1996. The results of comparison tests suggested that PCR was a better test than agglutination test against semen of bulls. This study indicated that the PCR

technique was a valuable for the diagnosis of bovine brucellosis, particularly in bull semens.

**Key words :** *Brucella abortus*, PCR, bull semen.

## 서 론

소 *Brucella* 병은 잠복기가 긴 만성 전염병으로서 전세계적으로 발생하고 있으며, *B abortus* 가 주요 원인균이고 간혹 *B melitensis*, *B suis* 등이 감염하는 것으로 알려져 있다. 임신하지 않은 암소에서는 무중상을 나타내지만 임신한 소에서 유산, 불임 등의 번식장애와 유량감소 등을 야기하고 숫소에서는 고환염, 부고환염 등을 일으켜 농가의 피해가 크며, 사람에서 파상열, 관절염 등을 일으키는 주요 인수공통전염병의 하나로서 이 병의 방제는 공중위생학적으로 매우 중요시 되고 있다<sup>1-3</sup>.

*Brucella* 병의 진단을 위한 균리동정법은 시간이 10일 이상 소요되고 만성 감염의 경우에 균분리율이 낮아 조기진단법으로 적용하기는 어렵기 때문에 혈청학적인 방법을 흔히 사용하고 있다. 혈청학적 진단법은 응집반응, 보체결합반응, 효소면역반응 등 많은 방법들이 개발되어 사용되고 있으나 아직 단일진단법으로 완벽한 방법이 없어 국가마다 2종 이상의 진단법을 병행하여 사용하고 있다<sup>4,5</sup>. 혈청학적 진단법은 비특이적인 반응이 많고, 잠복기중에 있거나 만성형인 경우에 검출하지 못하는 단점이 있으며<sup>6,7</sup> 특히 숫소의 경우에는 고환이나 부고환에 국소감염을 일으키므로 혈중 항체수준이 매우 낮아 혈청 대신 정장액을 이용한 응집반응법으로 *Brucella* 항체를 검사하고 있다<sup>1,4,5</sup>.

이러한 단점을 극복하기 위하여 최근에는 민감도와 특이성이 높은 분자 유전학적 방법 즉, 병원체에 대한 특이유전자를 증폭시켜 임상 가검물내의 극히 미량까지도 검출할 수 있는 PCR 기법 등의 조기진단법 개발연구가 활발히 수행되고 있다. PCR 법을 이용하여 *Brucella* 균의 검출을 위해 사용되는 유전자로서 IS711, omp(2a, 2b), 16S rRNA, 31kDa 및 43kDa 항원 등을 encoding 하는 여러가지 유전자가 보고되고 있다<sup>8-12</sup>.

한편 국내에서 *Brucella* 병의 발생은 1956년 처음 보고

된 이후 산발적으로 발생하고 있으며 특히 제주도에서는 1984년 이후 매년 100두 이상 검출되고 있어 제주도내 사육되고 있는 소 전두수를 대상으로 검진하는 방역사업을 1991년부터 실시하고 있음에도 불구하고 근절되지 않고 있다<sup>13,14</sup>. 또한 PCR 기법을 이용하여 소 정액중 *Leptospira* 균을 검출하기 위한 연구는 보고되어 있으나<sup>15</sup> *Brucella* 균을 검출하기 위한 연구는 아직 없는 실정이다.

따라서 이 연구에서는 소 *Brucella* 병의 신속정확한 진단과 조기근절을 위하여 PCR 진단법을 개발하고, 제주도에서 사육하고 있는 종모우를 대상으로 정액을 이용한 *Brucella* 항체검출과 균분리 및 PCR 검출법을 비교 조사하였다.

## 재료 및 방법

**사용균주 :** 이 실험에 사용한 *Brucella* 표준균주는 미국 NADC(National Animal Disease Center)로부터 분양받은 *B abortus*, *B suis*, *B melitensis*, *B canis* 및 *B neotomae* 등 5종과 국내 *Brucella* 병에 감염된 소의 유방상 임프절 및 우유로부터 분리한 *B abortus* 19개 균주를 사용하였고, *Escherichia coli* O157:H7은 미국 Pennsylvania State University의 대장균 표준센터로부터 분양받았으며, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* 등의 균주는 덴마크 Statens Serum Institute의 International *Escherichia* 및 *Klebsiella* Centre에서 분양받아 사용하였다.

**시험 및 가검재료 :** *Brucella* 평판응집반응(standard plate agglutination test; SPT), 로즈벵갈응집반응(Rose Bengal plate agglutination test; RBPT) 및 시험관 응집반응(standard tube agglutination test; STT) 진단액은 USDA 방법<sup>5</sup>에 따라 수의 과학연구소에서 제조하여 사용하였으며, *Brucella* monospecific A, M, R 항혈청은 NADC로부터 분양받아 사용하였다. 소 정액은 제주도에서 사육하고 있는 종모우를 대상으로 1995년에 185두, 1996년에 177두에 대해 전기사

정법으로 채취한 다음 무균시료병에 넣어 실험실로 냉장수송하여 시험에 사용하였다.

Genomic DNA 분리 : *Brucella* 균의 genomic DNA 분리는 각 균주를 serum dextrose agar 배지에서 3일간 배양후 배지의 집락을 멸균생리식염수로 집균하여 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)로 1회 세척한 다음 CTAB-DNA precipitation 방법에 의해 실시하였으며<sup>16</sup>, *Brucella* 균 부유액 600 $\mu$ l를 phenol과 동량 혼합처리하여 15,000rpm에서 원심분리한 다음, 5M NaCl 125 $\mu$ l 및 CTAB(10% cetyl-trymethyl ammonium bromide in 0.7M NaCl) 80 $\mu$ l를 가하여 68 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. Chloroform 및 Phenol을 가하여 단백질을 제거한 후 isopropanol을 동량 가하여 15,000rpm에서 원심 침전시키고, 70% ethanol로 세척한 다음 건조시켰다. TE buffer(pH 7.5)로 DNA를 부유시킨 후 흡광도 A<sub>260</sub> 및 A<sub>280</sub>에서 DNA 농도를 측정하여 사용하였다.

정액중 *Brucella* 균의 genomic DNA 분리는 정액 1ml을 1,500rpm에서 1분간 원심분리한 다음 상청액을 13,000rpm에서 5분간 재원심하였다. 침전된 Pellet을 TE buffer(pH 8.0) 1ml에 재부유하여 2회 원심세척한 다음, CTAB-DNA precipitation 방법<sup>16</sup>에 의해 genomic DNA를 분리하여 PCR용 template DNA로 사용하였다.

Primer 제조 : *Brucella* 균을 특이적으로 검출하기 위하여 BCSP31(*Brucella* 31-Kd cell surface protein) 및 omp 2b(*Brucella* 36Kd outer membrane protein) 유전자의 염기서열과 GeneBank의 sequence database에 기초하여 2 set (BCSP 및 OMPB)의 primer를 design 하고 DNA 인공합성기(Applied Biosystems, model 391)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 제조하였다(Table 1).

PCR assay : PCR 기법은 50mM KCl, 10mM Tris, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, Primers(forward 및 reverse) 각 100nM, deoxynucleotide triphosphates 200 $\mu$ M, Taq DNA polymerase 2.5 units 및 template

DNA 약 10ng이 함유된 reaction mixture 10 $\mu$ l내에서 수행하였다. PCR은 GeneAmp PCR system(Perkin Elmer Co.)내에서 실시하였고, Taq DNA polymerase 2.5 unit를 가하기 전에 먼저 5분간 boiling한 다음 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, primer annealing은 55 $^{\circ}$ C에서 1분, DNA extension은 72 $^{\circ}$ C에서 1분간을 30회 반복하였으며, 최종 DNA extension은 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하였다. PCR이 끝난후 각 sample의 10 $\mu$ l를 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel에 10 $\mu$ l를 loading하여 100V, 1시간동안 전기영동을 실시한 후 자외선 조사하에서 DNA band를 확인 및 사진촬영을 실시하였다.

PCR 법의 특이성 조사는 *B abortus* 등 *Brucella* 균 5종, 대장균 등 Gram 음성세균 5종의 genomic DNA 10ng을 사용하여 실시하였으며, 민감성은 *B abortus*의 genomic DNA 10ng부터 100ag까지 회석하여 수행하였다.

*Brucella* 균 분리동정 : 전기사정법으로 종모우에서 채취한 정액 50 $\mu$ l씩을 Bacitracin 25 $\mu$ g/ml, Polymyxin B 5 $\mu$ g/ml, Nalidixic acid 5 $\mu$ g/ml, Vancomycin 20 $\mu$ g/ml 및 Cycloheximide 100 $\mu$ g/ml을 함유한 Serum dextrose agar 2매에 각각 도말하여 CO<sub>2</sub> 10% 조건하에 37 $^{\circ}$ C에서 3~5일간 배양하였다. *Brucella* 균으로 의심되는 투명하고 smooth한 원형의 집락(직경 약 2~4mm)에 대해 Gram 염색을 실시하여 Gram 음성의 간구균을 확인하고 urease, CO<sub>2</sub> 요구성, H<sub>2</sub>S 산생, 용혈성, MacConkey agar에서의 성장능 등의 생화학적 성상시험으로 *Brucella* spp임을 확인하고, *Brucella* 균 monospecific 항혈청 A, M, R을 이용한 응집반응을 실시하여 균종을 동정하였다<sup>4</sup>.

응집반응 : 개체별 혈청을 이용한 SPT, RBPT 및 정장액을 이용한 시험관 응집반응(semen plasma tube agglutination test)은 USDA 방법<sup>5</sup>을 사용하였으며, 정장액 시험관 응집반응은 정액을 2,000rpm에서 5~10분간 원심분리한 후 상청액을 채취하여 정장액으로 하였으며, 정장액 0.

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence(5' to 3')	Size of products(bp)
BCSP1(F)	GTA TCG TTC TTG AAG CCT AC	711
BCSP3(R)	GTG CAT TTC AAT AGG CTA GAG	
OMP(B)(F)	ACT GGA GGT CAG AAA TGA AC	982
OMP(B)(R)	GAT TAG AAC GAA CGC TGG AA	

0.08ml, 0.04ml, 0.02ml, 0.01ml 및 0.005ml씩을 각각 시험관에 분주하고 1:100으로 희석한 시험관용 진단액 2ml씩을 혼합하여 37℃에서 48시간동안 작용시킨 후 판정하였다. 희석배수 1:25 이하에서 응집시에는 음성으로 판정하고, 1:50에서 응집시에는 의양성, 1:100 이상에서 응집시에는 양성으로 판정하였다.

## 결 과

*Brucella* 병을 조기에 검출할 수 있는 PCR 진단기법을 확립하기 위하여 BCSP(*Brucella* 31kDa cell surface pro-

tein) 및 OPMB(*Brucella* 36kDa outer membrane protein) primer를 제작하였으며(Table 1), 먼저 PCR 기법의 최적 조건을 시험한 결과 이들 primers의 annealing 온도는 55℃였고, Mg<sup>++</sup>은 1.5mM 농도였다.

PCR 기법에 의한 BCSP 및 OMPB primers의 *Brucella* 균에 대한 특이성을 확인하고자 *B abortus* 등 5종의 *Brucella* 균과 대장균 등 5종의 Gram 음성 세균으로부터 추출한 각각 genomic DNA 10ng을 사용하여 PCR을 수행하였다. *Brucella* 균 5종에만 특이적으로 각각 711bp 및 982bp 크기의 증폭 DNA를 검출할 수 있었으며 다른 세균에서는 검출되지 않았다(Fig 1). 또한 이 PCR 기법은

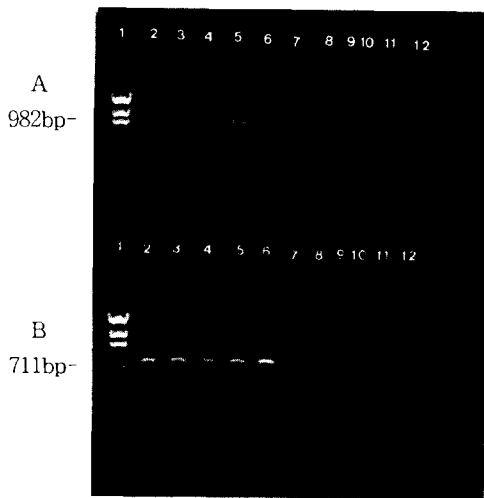


Fig 1. Specificity of the PCR assay for detection of *Brucella* species using OMPB(A) and BCSP(B) primers.

Lane, 1; DNA size marker(1Kb ladder, BRL), 2; *B abortus*, 3; *B melitensis*, 4; *B suis*, 5; *B canis*, 6; *B neotomae*, 7; *Eshcherichia coli* O157:H7, 8; *Yersinia enterocolitica*, 9; *Citrobacter freundii*, 10; *Salmonella enteritidis*, 11; *Klebsiella pneumoniae*, 12; negative control(No template DNA).

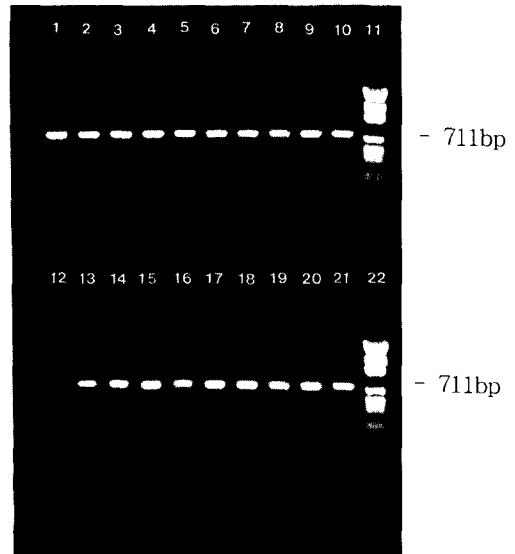


Fig 2. Amplification of the DNA from field isolates of *Brucella abortus* by PCR assay using BCSP primers.

Lane 1 to 10 and 13 to 21; *B abortus* strains isolated from supramammary glands and milks of cattle, 11 and 22; DNA size marker(1Kb ladder, BRL), 12; negative control(No template DNA).

Table 2. Comparison of the agglutination test, culture and PCR methods with semen samples from bulls in *Brucella* -seronegative herds

Year	No. of semen samples tested	No. of positive samples(suspect)		
		Semen plasma agglutination test	Culture	PCR
1995	185	1(5)	5	5
1996	177	0	0	0
Total	362	1(5)	5	5

국내 *Brucella* 병에 감염된 소의 유방상임프절 및 우유에서 분리한 *B. abortus*의 19개 균주 모두에서도 특이적으로 PCR product를 확인할 수 있었다(Fig 2).

PCR 기법의 민감성을 알아보기 위하여 *B. abortus*의 genomic DNA를 10ng에서부터 100ag으로 10단계 희석하여 template DNA로 사용하고 BCSP primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 1pg까지 검출할 수 있었다(Fig 3).



Fig 3. Sensitivity of the PCR assay for detecting the DNA from *Brucella abortus* using BCSP primers.

Lane 1; DNA size marker(1Kb ladder, BRL), 2~10; genomic DNA (serial 10-fold dilution: 10ng to 100ag), 11; negative control(No template DNA).

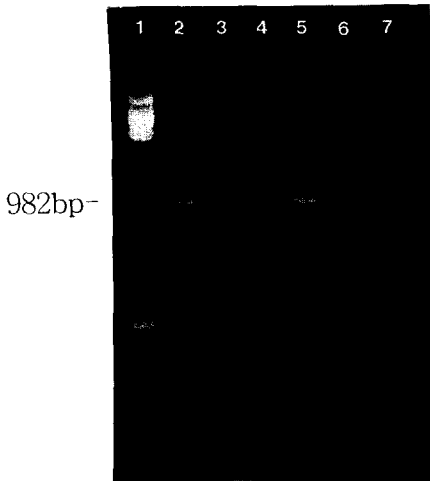


Fig 4. Application for detection of *Brucella abortus* in semen samples by the PCR method.

Lane 1; DNA size marker(123bp ladder, BRL), 2; positive control(*B. abortus* genomic DNA 10ng), 3; Negative control (No template DNA), 4 to 7; Semen samples collected from bulls in Cheju island.

제주도 지역에서 사육하고 있는 종모우를 대상으로 1995년에 185두, 1996년에 177두로부터 개체별 혈액 및 정액을 채취하여 *Brucella* 혈중항체조사와 정장액을 이용한 시험관 응집반응, 정액중 *Brucella*균 분리동정 및 PCR 기법을 비교조사한 결과는 Table 2와 같다. 1995년에 종모우 185두의 개체별 혈청으로 SPT 및 RBPT를 실시한 결과 모두 음성이었으나 정장액을 이용하여 시험관 응집반응에서는 양성 1두, 의양성 5두였으며, 균 분리 시험에서는 정액 5두에서는 *B. abortus*가 분리동정되었고, 185두의 정액을 이용하여 직접 PCR 기법을 적용한 시험에서도 균 분리시험에서 확인되었던 5두에서 *Brucella*에 특이적인 982bp 크기의 DNA 증폭산물을 검출할 수 있었다(Fig 4). 이들 *Brucella* 양성 5두를 살처분한 후 1996년에 종모우 177두에 대해 재검사한 결과 *Brucella* 항체검사와 정액중 균 분리 및 PCR 기법에서 *Brucella* 음성으로 나타났다.

## 고 찰

*Brucella* 병의 진단은 원인균 분리동정, 혈중항체검사 및 유전학적 검사법 등이 알려져 있으며, 가검재료중 균을 분리 및 동정하는 것은 가장 정확한 진단법이기는 하지만 많은 시간이 소요되고, 가검물에서 직접 균체를 증명하는 면역형광항체법이나 DNA probe 법은 민감성이 낮은 단점이 있으므로 대부분의 국가에서 혈청학적 방법을 흔히 사용하고 있다<sup>1,3,8</sup>.

우리나라에서는 *Brucella* 병 검진을 위하여 집합우유를 이용한 우유윤환반응(milk ring test), 개체별 혈청을 이용한 SPT, RBPT, STT, 보체결합반응(complement fixation test) 등이 사용되고 있으나 이들 혈청학적 진단법은 비특이반응이 높고, 만성 감염을 검출하지 못하는 경우가 많아 최근에는 민감성과 특이성이 높은 것으로 알려져 있는 PCR 진단법이 여러질병의 진단에 응용되고 있다<sup>17,18</sup>.

*B. abortus*의 주요 항원으로는 cell surface protein으로 31 kilodaltons(kDa), outer membrane protein(OMP)으로는 88~94kDa, 35~40kDa, 25~30kDa, 16.5kDa 등 크기의 단백질이 알려져 있으며<sup>19,20</sup>, 이들 항원을 야외 자연감염에서의 항체형성능이 명확히 규명되지 않아 진단용 항원으로는 세포벽에 존재하는 smooth lipopolysaccharide 항원을 이용한 진단법을 사용하고 있다<sup>1,21</sup>. Ficht *et al*<sup>22</sup>은 *B*

*abortus*의 36kDa OMP 항원을 encoding 하는 유전자인 omp 2a 및 omp 2b에 대한 염기서열을 보고하였고, Mayfield *et al*<sup>23</sup>은 31kDa 항원을 encoding 하는 BCSP31 유전자의 염기서열을 보고한 바 있다.

Romero *et al*<sup>11</sup>은 *B abortus*의 16S rRNA 유전자에 기초한 Primer를 작성하여 PCR 법으로 *Brucella* 균을 특이적으로 검출할 수 있었고, 검출한계는 genomic DNA 80fg 까지 검출할 수 있다고 보고하였다. Baily *et al*<sup>10</sup>은 *B abortus*의 31kDa 항원 유전자에 기초한 primer로 PCR를 수행한 결과 *B abortus* 및 *B melitensis*에서 약 223bp 크기의 특이적인 증폭산물을 검출할 수 있었으며, genomic DNA 약 60fg(20 cells)까지 검출할 수 있었다. 또한 Fekete *et al*<sup>12</sup>은 43Kd 항원 유전자를 이용한 PCR 기법으로 약 635bp 크기의 증폭산물을 100fg까지 검출할 수 있음을 보고한 바 있다.

이 연구에서 *Brucella* 균을 특이적으로 검출하기 위하여 BCSP31 및 omp 2b 유전자에 대해 제작한 2 set의 primers(BCSP 및 OMPB)를 이용하여 PCR 기법의 특이성을 검사한 결과 *Brucella* 속균에서 각각 711bp 및 982bp 크기의 DNA를 검출할 수 있었으며, 다른 Gram 음성세균에서는 검출되지 않았으며 이 PCR 기법의 검출한계는 genomic DNA 1pg까지 검출할 수 있었다. 따라서 이들 primer를 이용한 PCR 기법은 *Brucella* 균을 검출하는데 매우 민감하고 특이적인 방법으로 생각되었다. 하지만 이 실험에서 *Brucella* 균에만 특이적으로 증폭된 711bp 및 982bp 크기의 유전자가 BCSP31 및 omp 유전자 인지의 확실성을 증명하기 위해서는 앞으로 제한효소를 이용한 분석이나 염기서열분석이 필요한 것으로 생각된다.

한편 Romero *et al*<sup>24</sup>은 PCR 기법을 *Brucella* 병 진단에 적용하기 위해 우유중 ELISA 기법에 의한 항체검사와 PCR 기법과의 비교조사한 결과 이들 진단법의 특이성은 각각 100% 였으나 민감성은 ELISA 법이 98.2%, PCR 법은 87.5%에 나타났으며, 두 진단법의 일치율은 91% 였다. 이들 두가지 진단법을 동시에 사용할 때 민감성은 100%로 나타나 소에서의 *Brucella* 병 검진시 어느 1종 방법을 사용하는 것 보다는 두가지 방법을 동시에 사용하는 것이 바람직한 것으로 주장하였다. Leal-Klevezas *et al*<sup>25</sup>은 PCR 기법을 사용하여 198bp 크기의 omp-2 유전자를 *Brucella* 균에서 특이적으로 검출할 수 있었고, 이 기법을 *Brucella* 병 감염환자 및 염소를 대상으로 혈

청화적인 방법 등과 비교시험한 결과 감염환자 3명과 인공감염시킨 염소 3두는 PCR 법이나 혈청화적인 방법 및 균 분리법 모두에서 확인할 수 있었으며, 야의 염소 22두에 대한 비교시험에서는 RBPT 검사에서 14두가 양성이고 혈액중에서 단지 1두에서만 *Brucella* 균이 분리되었으나 PCR 기법으로 혈액중 19두, 우유 17예중 11예에서 양성으로 나타나 PCR 기법이 매우 민감성이 높은 방법임을 제시하였다.

제주도에서는 1984년 이후 *Brucella* 병이 지속 발생하고 있어 1991년부터 5개년 방역사업을 추진하여 *Brucella* 병 근절을 위하여 노력하고 있으나 근절되지 않고 지속 발생되고 있는 실정이다. 제주도는 여러농가의 소가 봄부터 가을까지 공동방목장에서 혼합사육됨으로써 양성농가의 동거축에 의한 접촉이나 종모우에 의한 자연교미가 *Brucella* 병의 주요 전염원인으로 추정되어 왔다. 종모우에서 혈중항체검사로는 *Brucella* 병이 검출되는 예가 매우 낮아 근절의 장애요인으로 생각되어 제주도내에서 사육되고 있는 종모우를 대상으로 정액중 *Brucella* 균 검출을 시도하였다. 1995년에 종모우 185두에 대해 개체별 *Brucella* 병 혈중항체검사에서는 모두 음성이었으나 정액액을 이용한 시험관 응집반응에서는 양성 1두, 의양성 5두였으며, 정액중의 균분리 동정 및 PCR 기법으로는 5두에서 *B abortus*가 검출되었다. *Brucella* 병 양성으로 판정된 이들 5두를 살처분하고 1996년에 재검사한 결과 종모우 177두 모두는 *Brucella* 음성으로 나타났다. 따라서 종모우의 *Brucella* 병 검진은 혈중항체 검사보다는 정액을 이용한 검사가 *Brucella* 병 근절을 위해 필요한 것으로 생각된다.

이상의 결과를 볼 때 PCR 기법을 이용한 진단법은 *Brucella* 균을 확인하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라 항체수준이 낮은 예에서도 *Brucella* 균을 신속히 검출할 수 있으므로 앞으로 혈청화적인 방법과 병행하여 정액, 우유, 임파절 등의 재료로부터 직접 *Brucella* 균을 검출하는데 개발된 PCR 기법이 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

*Brucella* 병의 조기근절에 기여하고자 신속정확하게 검색할 수 있는 PCR 진단기법을 확립하고, 1995년 및 1996년에 제주도 지역의 종모우에 대한 *Brucella* 항체

조사와 정액중 *Brucella* 균 분리 및 PCR 기법을 비교조사하였다.

*Brucella* 균을 특이적으로 검출하기 위하여 BCSP (*Brucella* 31kDa cell surface protein) 및 OMPB(*Brucella* 36kDa outer membrane protein) primer 2 set를 제작하였으며, 이들 primer를 이용한 PCR 기법은 *Brucella* 균에서 각각 711bp 및 982bp 크기의 DNA를 특이적으로 검출할 수 있었고 다른 Gram 음성 세균에서는 검출되지 않았다. 이 PCR 기법은 *B abortus*의 genomic DNA 1pg까지 검출이 가능하였다.

1995년에 제주도내 종모우 185두를 대상으로 개체별 *Brucella* 병 혈중항체검사는 모두 음성이었으나 정장액을 이용한 시험관 응집반응에서는 양성 1두, 위양성 5두였으며, 정액중의 균 분리 동정 및 PCR 기법으로는 5두에서 *B abortus*가 검출되었다. 이들 양성 5두를 살처분하고 1996년에 재검사한 결과 종모우 177두 모두는 음성으로 나타났다. PCR 기법은 정액중 항체수준이 낮은 경우에도 *Brucella* 균을 신속히 검출할 수 있어서 *Brucella* 병 검진에 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Adams LG. Advances in brucellosis research. Texas A and M University Press, Texas, 1-501, 1990.
2. Beran GW. Handbook of zoonoses. 2nd ed, CRC press, London, 9-39, 1994.
3. OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 2nd ed, OIE, Paris, 260-276, 1992.
4. Alton GG, Jones LM. Laboratory techniques in brucellosis, World Health Organization, Geneva, 1-163, 1975.
5. USDA. Brucellosis eradication ; Uniform methods and rules. Animal and Plant Health Inspection Service, Iowa, 1985.
6. Perry MB, Bundle DR. Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* 0157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. *Infect Immun*, 58: 1391-1395, 1990.
7. Mittal KR, Tizard IR. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella a-*

- abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res Vet Sci*, 28:311-314, 1980.
8. Hopper BR, Sanborn MR, Bantle JA. Detection of *Brucella abortus* in mammalian tissue, using biotinylated, whole genomic DNA as a molecular probe. *Am J Vet Res*, 50:2064-2068, 1989.
9. Bricke BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol*, 32:2660-2666, 1994.
10. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*, 95:271-275, 1992.
11. Romero C, Gamazo C, Pardo M, et al. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol*, 33:615-617, 1995.
12. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, et al. Rapid, sensitive detection of *Brucella abortus* by polymerase chain reaction without extraction of DNA. *Biotechn Techniques*, 4:31-34, 1990.
13. 농림부. 농림수산통계연보, 1996.
14. 문진산, 박용호, 정석찬 등. 소 브루셀라 감염우의 혈청학적 진단법 비교와 세포성 면역반응에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지, 20:185-194, 1996.
15. Masri SA, Nguyen PT, Gale SP, et al. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Can J Vet Res*, 61:15-20. 1997.
16. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res*, 8: 4321-4325, 1980.
17. Wang RF, Cao WW, Johnson MG. 16S rRNA based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl Environ Microbiol*, 58:2827-2831, 1992.
18. Vary PH, Andersen PR, Green E, et al. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol*, 28:933-937, 1990.
19. Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, et al. 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic

- DNA. *Infect Immun* , 56:2036-2046, 1988.
20. Tibor A, Weynants V, Denoel P, Lichtfouse B, *et al* . Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to lipoproteins. *Infect Immun* , 62:3633-3639, 1994.
  21. Gomez-Miguel MJ, Moriyon I, Alonso-Urmeneta B, *et al* . Serological response to the outer membrane lipoprotein in animal brucellosis. *Infect Immun* , 56:716-718, 1988.
  22. Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus* . *Infect Immun* , 57:3281-3291, 1989.
  23. Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, *et al* . The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene*, 63:1-9, 1988.
  24. Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Evaluation of PCR and indirect enzyme linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J Clin Microbiol* , 33:3198-3200, 1995.
  25. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, *et al* . Single-step PCR for detection of *Brucella* spp from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* , 33:3087-3090, 1995.
-