

부루세라 RB51 백신의 임신소에 대한 안전성

김종만 · 우승룡 · 이지연 · 정석찬 · 진영화 · 김재훈 · 권창희 · 윤용덕 · 유한상^{1*}

국립수의과학검역원
¹서울대학교 수의과대학
(게재승인: 2003년 11월 28일)

The Safety of *Brucella abortus* strain RB51 in pregnant cattle

Jong-man Kim, Sung-ryong Woo, Ji-young Lee, Suk-chan Jung, Young-hwa Jean,
Jae-hoon Kim, Chang-hee Kweon, Young-dhuk Yoon, and Han-sang Yoo^{1*}

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-016, Korea

¹College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Accepted: November 28, 2003)

Abstract : The safety of *Brucella abortus* strain RB51(SRB51) was investigated in dairy cows and Korean native cattle of 4~7th month of gestation. From experimentally inoculated cattle, 18 of 25 (72.0%) dairy cows, and 3 of 10 (30.0%) Korean native cattle were aborted or delivered premature fetus. There were no significant differences in the incidence of abortion depending on the inoculation route (intramuscular and subcutaneous) and dosages (1×10^9 , 2.8×10^9 , and 4.0×10^9 CFU). The antibodies to the SRB51 were measured by a dot blot enzyme-linked immunosorbent assay. The highest titers to SRB51 were detected between 5~7 weeks after inoculation and the specific antibody could be detected up to 28 weeks after inoculation. The SRB51 was isolated from amnio-allantoic fluid, bronchial lymph node, mammary gland, and supramammary lymph node in 5 of 25 dairy cows during 4 weeks after either abortion or delivery. Although SRB51 was isolated from 4 of 24 aborted fetus or normally delivered calves at parturition time, it was not isolated during 4 weeks afterward. Eleven of twentyfive dairy cows showed the endometritis and/or necrosis until 6 weeks after delivery, no lesions were seen at 8 weeks after delivery and uterus from control dairy cows. The results of present study revealed that SRB51 might induce the clinical signs of brucellosis in the pregnant cattle at 4~7th month of gestation.

Key words : *Brucella abortus*, SRB51, safety, pregnant cattle, Dot-ELISA

서 론

소 부루세라병 방역대책의 기본은 발생율이 높은 경우, 백신접종과 검진/살처분을 병행하며, 발생율이 낮아지면 검진/살처분 정책만을 적용하여 근절을 추진하는 것이다. 이러한 목적으로 미국에서는 1940년 S19 약독화 생균백신을 개발하여 발생감소 및 근절대책 추진에 사용하여 왔다 [12]. 그러나 S19 백신은 높은 예방효과는 있으나 몇가지 제한점 즉, 사람에게 병원성, 임신소에서 일부 유산발생, 야외 감염 소와 구별이 안되는 응집항체 생성 등이다 [6, 7, 21]. 이러한 단점을 보완하기 위

하여 최근에 개발한 것이 LPS O-sidechain이 결핍된 R type 변이주로 만든 RB51 약독화 생균백신이다 [3]. Stevens 등 [20]은 RB51 백신은 S19 백신보다 병원성이 낮고, 12주 이내에 체내에서 자연 소실되고, 감염항체와 백신항체의 감별이 가능하다는 등의 장점이 있는 것으로 보고하였다. 우리나라도 점차 발생이 증가하고 있는 소 부루세라병 방역대책의 일환으로 1998년에 한우와 젖소에 RB51 백신을 최초로 적용하였으나 임신소에서 많은 유, 조산이 발생하여 양축농가에 커다란 피해를 초래한 바 있다. 본 연구에서는 백신접종 임신소에서 유, 조산 발생과 부루세라 RB51 백신 접종과의 상관관계를 규

*Corresponding author: Han-sang Yoo

College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: 82-2-880-1263, Fax: 82-2-874-2738, E-mail: yoohs@snu.ac.kr]

명하기 위하여 임신 젖소와 한우에 국내 2개 제조사 및 미국에서 생산한 부루세라 RB51 백신을 접종하고, 유, 조산 발생상황, 항체분포, 어미소와 송아지의 각종 장기로부터 백신균주 분리 등을 시험하였다.

재료 및 방법

공시백신

국내 A사 및 B사에서 생산한 백신과 미국의 백신 제조사(Professional Biological Company)에서 생산한 RB51 생균동결건조백신(Lot No. 1136)을 시험에 공시하였다.

임신 젖소 및 한우

젖소는 부루세라 SRB51 항체음성인 초임의 임신 4-6개월령 홀스타인 젖소 29두를 구입하여 국립수의과학검역원 당하리계류장에서 사육하면서 시험하였고, 한우는 농촌진흥청 축산기술연구소 남원지소의 부루세라 RB51 백신을 접종하지 않은 임신 4.5-7개월령 소 14두를 공시하였다.

백신접종

공시 백신은 접종시험 전에 미리 균수를 측정한 후 젖소에는 1두분당 1.0×10^9 , 2.8×10^9 , 4.0×10^9 의 균이 함유되도록 희석한 다음 한 군당 3-4두씩 피하 또는 근육으로 접종하였고, 한우에는 국내 A, B사의 백신을 동봉한 희석액으로 희석하여 용법에 따라 1 ml 씩 피하로 각 5두씩에 접종하였다(A사 백신; 2.8×10^9 /ml, B사 백신; 6.0×10^9 /ml). 백신 비접종 대조군으로 젖소와 한우 각 4두씩을 백신접종군과 동일한 조건으로 사육하면서 시험을 실시하였다.

채혈 및 우유채취

혈중 항체 측정을 위하여 젖소의 경우, 백신 접종전과 접종후 3, 5, 7, 9, 12, 16, 20, 24, 28주에, 한우는 백신 접종전과 접종 후 4, 8, 12, 16, 20, 24주에 채혈하고 혈청을 분리하여 56°C에서 30분간 비동화한 후에 항체 검사에 사용하였다. 우유는 백신접종 젖소에서 분만일 그리고 분만후 3, 5, 7, 14, 21일에 수집하여 SRB51 분리와 항체검사를 시험하였다.

유, 조산 발생조사

백신을 접종한 젖소 및 한우는 백신을 접종하지 않은 대조군 소와 같이 사육하면서 유산, 조산, 정상분만 상황을 조사하였다. 임신기간을 280일로하여 분만일보다 15일 이전에 기립 또는 수유불능 등의 증상을 보이는 허

약자를 분만한 것은 조산으로, 조산보다 조기에 미숙상태의 태아가 배출된 것은 유산으로 하였으며 조산기간 이후에 분만한 소는 정상분만으로 판정하였다.

혈중 및 유중 항체조사

SRB51 항체조사는 Olsen 등 [11]의 방법을 다소 변형하여 Dot blot assay법으로 시험하였다. 즉, RB51 배양균을 acetone으로 살균하여 균 농도를 spectrophotometer로 600 nm에서 20% transmission되게 농도를 조절하였다. 96-well microfiltration unit (Bio-Rad Laboratories)에 0.45 μ m pore size의 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell Inc.)을 고착시키고, 100 μ l의 RB51 항원액을 각 well에 가하고 실온에서 20분간 incubation하였다. 이 membrane을 진공펌프를 이용하여 10분간 여액을 제거, 건조하고 각 well에 0.02 M Tris와 0.25% fish gelatin (Norland Laboratory, Tris-FG)이 들어 있는 0.5 M NaCl buffer (Tris-NaCl, pH 7.5)를 100 μ l 가하여 blocking하였다. 30분 작용시킨 후 membrane은 0.3% Tween 20이 들어있는 Tris-NaCl (Tris-NaCl-Tween) 100 μ l를 가하여 1회 세척 후 여과, 건조하고 다시 blocking buffer를 가하여 5분간 작용시킨 후에 Tris-NaCl로 2회 세척하였다. 가검혈청 또는 유청은 1:10으로 희석한 후 2진 희석하였다. 100 μ l의 희석 가검물을 microfiltration unit의 각 well에 가하고 30분간 실온에서 반응시킨 후에 nitrocellulose는 여과, 건조 후에 well당 100 μ l의 Tris-NaCl-Tween으로 5회 세척하였다. 1:800으로 희석한 rabbit anti-bovine IgG conjugate 100 μ l를 각 well에 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 각 well을 100 μ l의 Tris-NaCl-Tween으로 5회 세척 후에 여과하여 30초간 건조하였다. 이 nitrocellulose membrane을 microfiltration unit에서 제거하고 0.15% H₂O₂와 0.5 mg의 4-chloro-1-naphthol/ml가 들어있는 Tris-NaCl에서 20분간 발색시킨 후에 어두운 실내에서 12시간 건조하고 결과를 판독하였다. 결과판독은 음성대조군보다 육안적으로 반응이 명확히 나타난 혈청의 최고희석 배수로 하였다.

균 분리 및 동정

주기적으로 채취한 백신접종 젖소의 우유 및 질점액과 유, 조산 또는 분만 후 8주간 경과일별로 도태한 소 및 송아지의 각종 장기로부터 가검재료를 tryptose agar plate에 접종하고 3-5일간 배양 후 형성된 집락중 부루세라균 유사집락을 순수분리하여 그람염색, acriflavin 응집성 및 oxidase, catalase, urease, lactose, glucose, indol 등의 생화학적시험 등으로 부루세라균을 확인하고, AMOS-PCR(abortus, melitensis, ovis, suis-polymerase chain reaction)법 [1]으로 SRB51을 최종동정하였다.

백신접종소 자궁 및 태반의 병리조직학적 변화조사

정기적으로 도태한 젖소의 자궁 또는 태반을 수집하여 10% formalin으로 고정하고 파라핀으로 포매하여 절편을 만들어 hematoxylin & eosin으로 염색하여 광학현미경으로 조직소견을 관찰하였다.

결 과**백신접종 임신소에서 유, 조산 발생상황**

임신 4-6개월령 젖소 29두와 4.5-7개월령 한우 14두를

대상으로 RB51백신을 제조사별, 접종부위별, 균 함량별로 구역을 나누어 접종하고 유, 조산 발생상황을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 백신을 접종한 젖소 25두중 18두(72.0%), 한우 10두중 3두(30.0%)에서 유, 조산이 발생하였으며 백신을 접종하지 않은 대조군에서는 유, 조산이 발생하지 않았다. 접종부위별로는 국내 A사 백신(2.8×10^9)을 근육과 피하로 접종한 젖소 각 3두중 2두씩(66.6%)에서 유, 조산이 발생하였다. 또한 국내 A,B사 백신을 균함량을 1두당 1.0×10^9 , 2.8×10^9 , 4.0×10^9 으로 달리하여 젖소에 피하로 접종한 결과, 유, 조산 발생을

Table 1. Abortion and premature delivery in dairy cow and Korean native cattle inoculated with *Brucella abortus* SRB51

Cattle	Groups	Inoculation			No. of cattle tested	Delivery status			
		Vaccine*	Route**	Inoculum (cfu/head)		Abortion	Premature	Total (%)	
Dairy cow	Inoculated	A	IM	2.8×10^9	3	0	2	2(66.6)	
			SC	4.0 "	3	1	1	2(66.6)	
			SC	2.8 "	3	1	1	2(66.6)	
			SC	1.0 "	3	1	0	1(33.3)	
		B	SC	4.0 "	3	1	1	2(66.6)	
			SC	2.8 "	3	0	2	2(66.6)	
			SC	1.0 "	4	2	2	4(100)	
		C	SC	1.0 "	3	2	1	3(100)	
		Control	-	-	-	4	0	0	0
		Korean native cattle	Inoculated	A	SC	2.8 "	5	1	0
B	SC			0.6 "	5	2	0	2(40.0)	
Control	-		-	-	4	0	0	0	

* A and B vaccine; produced in Korea, C vaccine; produced in USA.

**IM; intramuscular, SC; subcutaneous.

Table 2. Frequency of the abortion or premature delivery in dairy cow depending on inoculation time and months of gestation

Months of gestation at inoculation (No. of head)	Abortion (A) or premature delivery (PD)	Incidence time of Abortion or premature delivery following SRB51 inoculation (months)					Months of gestation at the moment of abortion or premature delivery				
		<2	2	3	4	>5	5	6	7	>8	Total(%)
4 (11)	A	1	1	1	1		1	1	1	1	4(36.4)
	PD			1	2				1	2	3(27.3)
5 (7)	A	1						1			1(14.3)
	PD	1		1	3			1		4	5(71.4)
6 (7)	A	3						2	1		3(42.8)
	PD	1	1						1	1	2(28.6)
Sub-total	A	5	1	1	1		1	4	2	1	8(44.4)
	PD	2	1	2	5			1	2	7	10(55.6)
Total(%)		7(39)	2(11)	3(17)	6(33)	0	1(5.5)	5(28)	4(22)	8(44)	18(100)

이 각 71.4%(7두 중 5두), 66.7%(6두 중 4두), 66.7%(6두 중 4두)로 뚜렷한 차이가 없었으며, 백신별로는 국내 A사, B사 및 미국제 조 백신을 접종한 젖소의 유, 조산

발생율이 각 58.3%(12두 중 7두), 80%(10두 중 8두), 100%(3두 중 3두)이었다.

백신접종에 따른 임신 월령별 유, 조산 발생시기를 조

Table 3. Antibody titers of serum and milk in cattle inoculated with *Brucella abortus* SRB51 at 4-7 months of gestation

Cattle breed	Vaccination			No. of cattle	RB51 antibody titers by dot-blot ELISA (weeks after inoculation)													
	Vaccine**	Route	Dose (10 ⁹ cfu/head)		Serum ^(a)								Milk ^(b)					
					0	3	5	7	9	12	16	20	24	28	0	7	14	
Dairy cow	A	IM	2.8	3	0	20	160	80	80	40	20	20	20	D***	80	<10	<10	
					0	160	1280	1280	160	160	160	160	160	160	160	160	320	40
						0	80	640	160	80	40	20	10	D	80	<10	<10	
						0	20	20	40	10	<10	<10	<10	D	80	<10	<10	
		SC	2.8	3	0	80	20	20	20	<10	<10	<10	D	80	<10	<10		
					0	20	40	20	10	<10	<10	D	80	<10	<10			
		SC	4.0	3	0	160	1280	320	160	160	160	D	160	80	80			
					0	160	1280	1280	160	40	D	320	80	80				
					0	160	1280	160	160	40	40	D	320	80	NT			
		SC	1.0	3	0	20	160	160	20	10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	
					0	20	160	160	160	80	80	80	D	320	80	40		
					0	20	20	10	10	10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	
Dairy cow	B	SC	4.0	3	0	20	20	80	160	160	160	160	D	640	80	80		
					0	20	20	20	160	160	D	640	80	80				
						0	20	160	160	160	80	80	80	80	80	NT	NT	NT
			SC	2.8	3	0	10	20	<10	<10	<10	<10	<10	D	<10	<10	<10	
					0	20	20	20	20	<10	<10	<10	<10	D	20	<10	<10	
					0	20	20	80	80	40	20	20	20	20	80	40	20	
		SC	1.0	4	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT*	D	160	<10	<10		
					0	20	80	160	80	80	20	<10	<10	D	40	<10	<10	
					0	20	D	NT	NT	NT	NT	NT	D	NT	NT	NT		
					0	80	160	80	160	160	40	20	<10	<10	80	<10	<10	
	Control	-	-	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					80	160	160	160	160	160	80	D	160	160	NT			
10					10	<10	<10	D	10	10	<10							
Native cattle	A	SC	2.8	5	0	10	20	10	<10	<10	<10	NT						
					0	80	160	160	160	160	160	NT						
					0	40	20	<10	<10	<10	NT	NT						
					0	80	80	80	80	80	<10	NT	NT		NT			
					0	40	20	10	<10	<10	<10	NT						
	B	SC	0.6	5	0	80	40	40	40	40	40	40	NT					
					0	40	80	160	160	160	160	NT						
					0	80	160	160	160	160	160	NT	NT					
					0	40	10	<10	<10	<10	<10	NT	NT		NT			
					0	80	80	160	160	160	160	160	NT					
	Control	-	-	4	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT				

*NT; not tested, **A, B; Vaccines produced by 2 companies in Korea, C; vaccine produced in USA. ***D; slaughtered for bacteriological and histopathological examination. ^(a); Serum samples were taken every 2-3 week. ^(b); Milk samples were taken every 7 days after delivery.

사한 결과는 Table 2와 같다. 임신 4개월령 11두, 5개월령 7두, 6개월령 7두에 백신을 접종한 결과 유, 조산 발생은 각 7두(63.7%), 6두(85.7%), 5두(71.4%)로서 임신 5개월령에 접종한 소의 유, 조산 발생율이 가장 높았으며, 유, 조산한 18두 중 유산이 8두(44.4%), 조산이 10두(55.6%)였다. 백신접종 후 유, 조산발생은 2개월 이내에 7두(39%), 4개월 6두(33%) 순이었으며, 2개월 이내에서는 유산이, 4개월후에는 조산이 많았다. 임신월령별로는 8개월이 8두(44%)로 가장 많았고 6개월이 5두(28%), 7개월이 4두(22%), 5개월이 1두(5.5%) 순이었다.

혈중 및 유중 항체가

젖소 및 한우에 백신을 제조사별, 접종부위별, 균량별로 접종하고 주기별로 혈중 및 유중 항체가를 Dot-blot법으로 조사한 결과는 Table 3과 같다. 가장 높은 혈중 항체가는 백신접종 5-7주 후에 볼 수 있었으며, 개체에 따라 최고 항체가가 1:20-1:1,280, 지속기간이 5주-28주 이상으로 매우 다양하게 나타났다. 유중 항체가는 초유에서 가장 높아 1:10-1:640 이었으며, 항체수준이나 지속기간은 혈중 항체에서와 같이 개체별로 매우 다양하였다. 축종별 혈중 항체가에서 한우가 젖소보다 다소 높은 항체반응을 보였고, 접종부위별 비교에서 근육접종이 피하접종보다 항체가도 높고 오래 지속되는 양상을 보였으며, 접종균량에서는 4.0×10^9 균을 접종한 젖소의 항체가가 1.0×10^9 또는 2.8×10^9 균을 접종한 젖소균보다 다소 높은 항체반응을 나타내었다.

소 및 송아지로 부터 백신주 분리

백신접종 후 유, 조산 또는 정상분만한 젖소로부터 주기적으로 우유 및 질점액을 수집하고, 시험계획에 따라 주기적으로 도태한 젖소 및 송아지(유산태아 포함)의 각종 장기로부터 부루세라균을 분리하여 PCR로 SRB51을 확인한 결과는 Table 4와 같다. 우유와 질점액중의 SRB51 분리는 출산후부터 28일까지 주기적인 검사에서 모두 음성이었다. 장기로부터 SRB51 분리시험에서 백신접종한 어미소 25두중 5두(20.0%)의 가검물(양노막강액, 폐문 임파절, 유선 및 상유방 임파절)에서 SRB51이 분리되었다. 백신접종한 젖소로부터 유, 조산 또는 정상분만한 송아지 24두중 4두(16.7%)의 출산 당시가검물(폐문임파절, 장간막임파절, 위내용물, 비장, 간장, 복강액)에서 SRB51이 분리되었고 이 후 1, 2, 4주 검사에서는 분리되지 않았다. 소 및 송아지에서 분리한 SRB51의 AMOS-PCR 결과는 Fig. 1과 같이 표준균주와 동일한 유전자 양상을 나타내었다.

Table 4. Isolation of SRB51 from dairy cows and delivered calves

Isolation time after abortion or delivery	Dairy cows			Calves***
	Tissues	Milk	Viginal swabs	
0	2/4**	0/23	-	4/12
1 week	1/9	0/19	0/12	0/6
2 weeks	1/3	0/18	0/10	0/3
4 weeks	1/5	0/11	0/7	0/3
6 weeks	0/4	NT	NT*	NT
7-8weeks	0/4	NT	NT	NT
Total	5/25 (20.0%)	0/71	0/51	4/24 (16.7%)

*Not tested

**No. of isolated sample/No. of tested sample

***Bronchial lymph node, abomasal contents, spleen, liver, abdominal cavity fluid were used for SRB51 from calves.

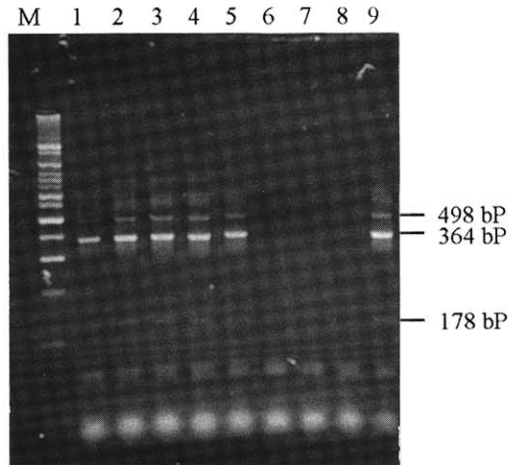


Fig. 1. DNA patterns for *B. abortus* strains by AMOS-PCR. Primers for *B. abortus* SRB51, eri-gene and IS711 were used for amplification.

M; 1Kb DNA ladder(Gibco-BRL, USA), lane 1; SRB51 from amnio-allantoic fluid of aborted dairy cow inoculated with C vaccine, lane 2-3; SRB51 from placenta of aborted dairy cow inoculated with B vaccine, lane 4-5; SRB51 from spleen and lymph node of dairy cow inoculated with B vaccine, lane 6-8; sample from negative control, lane 9; standard RB51.

백신접종 소의 자궁 및 태반조직의 병리학적 소견
유, 조산 또는 분만후 주기적으로 도태한 젖소 자궁

Table 5. Histopathological examination of uterus and placenta in dairy cow following inoculation with *Brucella abortus* SRB51

Groups	No. of cow tested	Inflammation or necrosis of uterus and placenta in dairy cow after delivery or abortion (%)					Total
		<1	2	4	6	8 week	
Vaccinated	25	2/7(28.6)	6/7(85.7)	2/5(40.0)	1/3(33.3)	0/3	11/25(44.0)
Control	4	0/1	0/1	0/2	-	-	0/4

**Fig. 2.** Photomicrograph of a section of placentome from a dairy cow after abortion. Note extensive inflammatory infiltration and necrosis. H & E stain ($\times 400$).

및 태반조직의 병리조직학적 검사결과는 Table 5 및 Fig. 2와 같다. 출산 직후부터 8주까지 주기별 자궁과 태반의 조직검사결과 백신접종군 25두중 11두(44.0%)에서 6주까지 염증이나 괴사소견이 관찰되었으나 8주에 도태한 3두의 소에서는 이상병변이 관찰되지 않았으며, 백신을 접종하지 않은 대조군 젖소 4두에서도 분만일과 분만후 4주까지의 검사에서 염증 및 괴사소견 등이 관찰되지 않았다.

고 찰

야외에서 부루세라 RB51 백신접종 후 발생한 소의 유, 조산이 백신접종과 연관성이 있는지를 시험하기 위하여 백신별, 접종부위별, 접종균량별로 임신 4-7개월령의 젖소와 한우에 2종의 국내산 및 1종의 미국산 RB51 백신을 접종한 결과 젖소 25두중 18두(72.0%)와 한우 10두중 3두(30.0%)에서 유, 조산이 발생하였다. 이는 Samartino와 Enright [15]가 SRB51이 소 태반에 colonization하는 것이 확인되었다는 보고, Palmer 등 [14]이 RB51 백신을 bison에 피하로 접종한 결과 유산이 발

생하였다는 보고, Van Metre 등 [4]이 임신소에 송아지 백신 접종용량의 SRB51을 접종한 결과 백신에 의한 부루세라증이 발생하였으며 병변도 야외감염 부루세라 병변과 동일하였다고 한 보고와 같이 연구조건이나 방법은 조금씩 다르더라도 SRB51이 임신소의 자궁과 태반에 감염하여 본 연구결과와 같이 염증과 유산을 유발할 가능성이 있음을 제시하고 있다. 이 결과는 또한 Olsen 등 [9]이 부루세라 생균백신의 생물학적 안전성 기준으로 제시한 백신접종 후 백신에 의한 임상증상이 나타나지 않아야 한다는 조건을 만족시키지 못하는 결과이다. 다만, RB51 백신개발 또는 평가에 관련한 Olsen 등 [10]이 임신우 200두에 SRB51 1.0×10^9 을 피하로 접종시 유산이나 태반감염이 없었다는 보고와 Palmer 등 [13]의 임신 6개월령 Hereford heifer 각 5두에 SRB51 9.4×10^8 , 3.0×10^8 을 피하 접종한 결과 유산은 물론 태반에 병변이 발생하지 않았다는 성적과는 차이가 있으며, 이는 부루세라병 감수성에 영향을 주는 소의 품종, 나이, 임신 상태, 접종균수, 접종방법 등의 차이에 기인하는 결과라고 사료된다. 소 품종별 유, 조산 발생에서 젖소가 72%, 한우가 30%로 비교적 큰 차이를 나타내었는 바, 이는 Bruner와 Gillespie [2]의 부루세라병에 대한 감수성은 품종별, 개체별로 매우 다르다고 한 것과 Palmer 등 [12]과 Olsen 등 [10]이 보고한 SRB51에 대한 Hereford heifers와 bison간에 유조산 발생의 차이에서와 같이 소 품종간의 감수성 차이에 기인된 결과라 여겨진다.

근육과 피하로 접종부위를 달리하여 각 3두의 임신젖소에 동일한 균량의 백신을 접종한 결과 각 2두(66.6%)에서 동일하게 유, 조산이 발생하였다. 이는 유, 조산 원인을 규명하기 위하여 구성된 특별대책반 모니터링 조사 결과의 115개 목장, 2,417두 중 피하접종한 1,886두 중 909두(48.2%), 근육접종한 426두 중 217두(50.9%) 그리고 접종부위가 미확인된 105두 중 60두(57.1%)에서 유산이 발생하였다는 야외조사결과와 유사한 결과이다.

국내 A, B사에서 제조한 백신을 1두당 1.0×10^9 , 2.8×10^9 , 4.0×10^9 으로 조절하여 젖소에 피하접종한 결과 유, 조산 발생율이 각 7두 중 5두(71.4%), 6두 중 4두

(66.6%), 6두 중 4두(66.6%)로서 백신접종 균량과 유, 조산 발생간에는 큰 차이가 인정되지 않았다. 그러나 Palmer 등 [14]은 RB51 백신 접종에 따른 감염은 접종 부위와 용량이 커다란 영향을 미친다고 하였고, Olsen 등 [9]은 SRB51을 송아지 백신접종량인 100-340억을 임신중기의 소에 접종시 태아조직에서 높은 수의 SRB51이 분리되었다고 하였던 바, 금후 접종균수와 유, 조산과의 상관관계를 규명하기 위해서는 본 연구에서 시험한 것보다 다양한 균수를 공시하여 접종에 따른 영향을 추가로 조사하여야 할 것이다. 백신접종시의 임신월령에 따른 유, 조산 발생율은 임신 4, 5, 6개월령에 접종시 유, 조산율이 각 63.7%, 85.7%, 71.4%로 임신월령에 따라 다소 유, 조산 발생에 차이가 있었다. 이는 Smith 등 [17]이 보고한 임신기에 따른 태반조직내에 부루세라균 증식인자인 *i-erythritol*의 량과 생리적인 조건의 차이 등에 따른 감수성의 차이 때문인 것으로 사료된다. 백신접종 후 유, 조산 발생이 접종 후 2개월 이내가 7두 (39.0%), 4개월에 6두(33.3%)로 다수를 차지하였으며, 유, 조산이 발생한 임신월령은 8개월령 이상이 8두(44.0%)로 가장 많았고, 5개월령이 1두(5.5%)로 가장 적었다. Palmer 등 [14]은 임신 6개월령 bison에 SRB51을 1.0×10^9 접종시 대부분이 68일과 107일 후에 유산하였다고 보고한 바와 같이 SRB51 접종 2-3개월 후, 임신 8-9개월령에 유, 조산이 많이 발생하는 것으로 여겨진다. 그러나 Smith 등 [16]이 S544균을 임신 5-6개월령 소에 접종시 3-4주 후에 유산이 발생하였다는 보고나 Mingle 등 [15]이 S19 백신을 정맥주사시 16-42일 후 유산이 발생하였다는 보고에서와 같이 병원성이 강한 균주나 백신을 정맥으로 접종시에는 이보다 유, 조산이 초기에 발생하는 것으로 보여진다.

백신을 젖소와 한우에 접종하고 Dot-blot 법으로 혈중 항체가를 조사한 결과 항체 peak는 접종 5-7주 후에 도달하였으며, 그때의 항체가는 1:20-1:1,280, 지속기간은 5-28주로 개체에 따라 매우 큰 차이를 보였다. Stevens 등 [18]은 소에 SRB51을 접종한 결과 4주 후에 항체가 최고로 나타났고 10주 후 크게 감소하였다는 결과와는 항체지속기간이 다소 차이가 있으나 이는 송아지에 대한 시험이었든 관계로 균이 접종 수주후에 소실되었기 때문으로 생각되며, 본 연구의 한우 및 젖소에서 24-28주까지 항체가 지속된 이유는 임신소에서 균이 잔재하면서 지속적으로 항체생성을 자극하였기 때문으로 사료된다.

SRB51의 소 및 송아지 체내에 잔류, 보균성을 조사하기 위하여 유, 조산 또는 분만 후 주기별로 젖소 및 송아지를 도태하여 각종 장기로부터 SRB51 분리를 시험한 결과 어미소에서는 상유방입과절, 유선, 기관지림

프절 그리고 분만시 태액으로부터 25두 중 5두(20.0%)에서 SRB51이 분리되었고, 유산태아 또는 분만송아지 24두 중 4두(16.7%)의 기관지림프절, 장간막림프절, 위내용물, 비장, 간, 복수에서 분만 당일에 SRB51이 분리되었으나, 이후 1-4주까지의 시험에서는 분리되지 않았다. 이 결과는 백신접종한 일부 임신소에서는 SRB51이 소실되지 않고 임신기간 동안 잔류하고 있으면서 유산 및 조산을 유발할 수 있다는 것을 의미한다. 이는 Palmer 등 [12]이 임신 6개월령 소에 SRB51을 정맥접종한 후 14주까지 감염이 지속하였다는 보고와 Olsen 등 [8]이 송아지에 백신을 접종하여 성우기까지 사육하고 임신을 시킨후 분만 1주 전에 부검하여 조사한 결과 일부 임신소와 태아에서 SRB51을 분리하므로써 송아지에 접종한 SRB51이 일부 소에서는 성우기까지 지속된다는 결론을 내린 것과 유사한 결과이나 Cheville 등 [3]의 SRB51을 heifer에 피하접종시 6주 만에 완전 소실하였다는 결과와는 차이가 있다. 이러한 차이는 접종경로, 접종량, 나이, 임신 등 시험조건의 차이에 기인한 것으로 유추할 수 있을 것이다.

유, 조산 및 분만 소의 자궁 또는 태반조직에 대한 병리조직학적 검사 결과 젖소 25두 중 11두(44.0%)에서 자궁내막염 또는 괴사소견이 대부분 4주 이내에서 관찰되었으나 일부는 분만 후 6주까지도 회복기 병변을 관찰할 수가 있었다. 이는 Palmer 등 [14]의 임신 bison에 SRB51을 1.0×10^9 피하접종시 태반염이 발생하였다는 보고, Palmer 등 [12]의 임신 6개월의 Hereford heifer에 SRB51을 정맥접종시 많은 태반염이 발생하였다는 보고와 유사한 결과로서 정맥접종 또는 감수성이 있는 임신소에 SRB51을 피하로 접종하면 생식기에 병변을 일으킨다는 것을 확인할 수 있었으며, Olsen 등 [9]이 제시한 부루세라생균백신의 생물학적 안전성 기준의 하나인 접종소의 태반조직에 염증 또는 퇴행성 변화가 없어야 한다는 조건을 충족시키지 못하는 결과이다. 이는 또한 Stevens 등 [19]이 미국에서는 현재 SRB51이 성우나 임신소에 사용이 허가되어 있지 않으며, 이들에 대한 안전성과 효능이 연구중에 있음을 보고한 것에서 현재까지는 임신소에서 SRB51이 안전하지 않을 수 있음을 추정할 수 있다.

결 론

부루세라 RB51 백신이 국내 임신소의 유, 조산 발생과 상관성을 조사하기 위하여 임신 4-6개월의 젖소 29두와 임신 4.5-7개월령의 한우 14두를 공시하여 백신 제조사별로 접종균양, 접종부위를 달리하여 접종하고 유, 조산 발생상황, 혈중 항체가, 유중 항체가 및 균분리, 소

및 송아지의 SRB51 보균성 그리고 자궁조직의 병리조직학적 병변 등을 시험하였다.

백신접종 젖소 25두 중 18두(72.0%), 한우 10두 중 3두(30.0%)에서 유, 조산이 발생하였으며, 유, 조산 발생과 접종부위(근육과 피하), 접종량(1.0×10^9 , 2.8×10^9 , 4.0×10^9 /두)간에는 뚜렷한 상관관계를 볼 수 없었다. 백신접종 5-7주 후에 가장 높은 혈중 항체를 나타내었으며, 이 때의 항체는 1:20-1:1,280 이었고, 항체지속기간은 5-28주로 개체에 따라서 매우 다양하였다. 유중 항체는 초유에서 가장 높아 1:10-1:160 이었으며 점차 감소하였으나 혈중 항체와 같이 개체에 따라 오래 지속하기도 하였다. 소 및 송아지의 RB51 보균성 조사에서 출산한 젖소 25두 중 5두(20.0%)에서 SRB51이 분리되었으며, 유, 조산 태아 또는 분만송아지 24두 중 4두(16.7%)에서 출산 당일에 SRB51이 분리되었으나 그 이후에는 분리되지 않았다. 출산한 소 25두 중 11두(44.0%)의 자궁 또는 태반조직에서 염증 또는 괴사소견이 관찰되었다.

이 연구결과 부루세라 RB51 백신을 임신 4-7개월령의 소에 접종할 경우 유, 조산 등의 임상증상이 발생하여 안전성에 문제가 있을 수 있을 것으로 나타났다.

참고문헌

1. **Bricker, B. J. and Halling, S. M.** Enhancement of the brucella AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, **33**, 1640-1642.
2. **Bruner, D. W. and Gillespie, J. H.** Hagan's infectious diseases of domestic animals. pp. 196-218. Cornell University Press, sixth edition. 1973.
3. **Cheville, N. F., Jensen, A. E., Halling, S. M., Tatum, F. M., Morfitt, D. C., Hennager, S. G., Fverichs, W. M. and Schurig, E.** Bacterial survival, lymph node changes and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 1992, **53**, 1881-1888.
4. **David, C., Van Metre and George, A.** Brucellosis induced by RB51 vaccine in a pregnant heifer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1999, **215**, 1491-1449.
5. **Mingle, C. K., Manthei, C. A. and Jasmin, A. M.** The stability of reduced virulence exhibited by *Brucella abortus* strain 19. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1941, **99**, 203-204.
6. **Nicoletti, P.** Vaccination. In *Animal Brucellosis*, ed. Nielsen K and Duncan JR, pp. 238-300, CRC Press, Boca Raton, FL. 1990.
7. **Nicoletti, P. L.** A preliminary report on the efficacy of adult cattle vaccination using strain 19 in selected dairy herds in Florida. *Proc 80th Annu. Meet. US Anim. Health Assoc.* 1997, 91-100.
8. **Olsen, S. C., Bricker, B., Palmer, M. V., Jensen, A. E. and Cheville, N. F.** Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51. serology, clearance and efficacy. *Res. Vet. Sci.* 1999, **66**, 101-105.
9. **Olsen, S. C., Cheville, N. F. and Bricker, B.** Technical report on vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. Technical Committee for Vaccine Evaluation, USDA/ARS/NADC. 1997, 1-11.
10. **Olsen, S. C., Cheville, N. F. and Bricker, B.** Technical report on vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. pp. 1-11, Technical Committee for Vaccine Evaluation, USDA/ARS/NADC. 1996.
11. **Olsen, S. C., Stevens, M. G., Cheville and N. F. Schurig, G.** Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997, **9**, 363-367.
12. **Palmer, M. V., Cheville, N. F. and Jensen, A. E.** Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriology, and serologic findings. *Vet. Pathol.* 1996, **33**, 682-691.
13. **Palmer, M. V., Olsen, S. C. and Cheville, N. F.** Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1997, **58**, 472-477.
14. **Palmer, M. V., Olsen, S. C., Gilsdorf, M. J., Philo, L. M., Clarlce, P. R. and Cheville, N. F.** Abortion and placentitis in pregnant bison induced by the vaccine candidate, *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.* 1996, **57**, 1604-1607.
15. **Samartino, L. E. and Enright, F. E.** Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 1992, **53**, 359-363.
16. **Smith, H., Williams, A. E. and Pearce, I. H.** Foetal erythritol : A cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. *Nature.* 1962, **193**, 47-49.
17. **Smith, H., Williams, A. E. and Pearce, I. H.** Foetal erythritol. A cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. *Nature.* 1962,

- 193, 47-49.
18. **Stevens, M. G., Olsen, S. C. and Cheville, N. F.** Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995, **44**, 223-235.
 19. **Stevens, M. G., Olsen, S. C. and Palmer, M. V.** *Brucella abortus* strain RB51. a new brucellosis vaccine for cattle. *Compend Contin. Educ. Pract. Vet.* 1997, **19**, 766-775.
 20. **Stevens, M. G., Olsen, S. C., Pugh, G. W. and Palmer, M. V.** Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Infect Immun.* 1994, **62**, 3206-3212.
 21. **Taylor, A. W. and McDiarmid, A.** The stability of the avirulent characters of *Brucella abortus*, strain 19 and strain 45/20 in lactating and pregnant cows. *Vet. Rec.* 1949, **61**, 317-318.