

Brucella 감염농장에서 감염경로의 역학적 연구

윤여백, 김영진, 김추철, 노영선, 권미순, 김철민, 임채웅^{1,*}

전라북도축산진흥연구소 정읍지소, 전북대학교 수의과대학¹
(접수 2004. 4. 18, 게재승인 2004. 5. 23)

Epidemiological study for infection route of brucellosis in a infected dairy farms

Yea-Back Yoon, Young-Jin Kim, Choo-Cheol Kim, Young-Sun Rho,
Mee-Soon Kwon, Chul-Min Kim, Chae-Woong Lim^{1,*}

Jeongeup-branch, Jeonbuk Livestock Development & Research Institute, Jeongeup, 580-814, Korea
^{1,*}College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756, Korea
(Received 18 April 2004, accepted in revised from 23 May 2004)

Abstract

A dairy farm that has been suffered continuously (more than 2 years) from brucellosis in Korea in spite of repeated legal test-and-slaughter was investigated the main source of infection in the farm. All cattle (22 milking cows, 44 heifers, 60 calves, 8 bull), dogs (3 mixed breed), feces from wild birds (3 samples), drinking water (3 sites), and soil in the paddocks (14 sites) inside the farm were examined with serological and/or bacteriological methods including specific DNA detection with PCR method. *Brucella* spp in the milk and blood were detected in 12/22 and 5/22 milking cows, respectively, although all of them were negative with conventional tube agglutination test. The number of serologically positive heifer was 15 (15/44), but the isolation of *Brucella* spp was succeeded in the only 11 (11/15) of them. *Brucella* were detected in vaginal (1/11) and nasal (3/12) excretion in serologically positive heifers. All the three dogs were serologically positive, and *Brucella* spp were isolated from their blood. However, *Brucella* spp were not detected in the drinking water, soil in the paddocks, nor the feces of wild birds. The results suggest that milking cow secrete *Brucella* spp through milk, genital tract and nasal cavity, which are the major source of infection in this farm, The main infection route of *Brucella* spp is contact to contact with *Brucella* spp excreting animals

¹Corresponding author

Phone : +82-63-270-3788, Fax : +82-63-270-3780

E-mail : lcv@chonbuk.ac.kr

rather than environmental contamination. The animals, living together with infected cow such as dogs, are the readily susceptible and are required to be examined for *Brucella* spp.

Key words : *Brucella*, Dairy cattle, Epidemiological study, PCR

서 론

부루셀라병은 전세계적으로 가축과 야생동물 뿐만 아니라 사람도 감염되는 전염성이 강한 세균성 질병이다. 대표적인 임상증상은 유산이며, 불임과 양량감소 등도 보고 되고 있다¹⁾.

소 부루셀라 균의 감염경로는 감염된 소의 유산태자, 태반, 뇨 및 질 분비물과의 접촉을 통한 섭취로 감염이 일어난다. *Brucella abortus*는 우유를 통하여 배출되나 물, 흙에서도 4개월까지 생존할 수 있다. 전파는 서로 다른 종 사이에서도 가능하며 소에서 다른 가축²⁾으로 또는 야생동물^{3,4)}로의 전파감염이 보고 되었으며, 가축 감염실험에서도 이 사실이 입증되었다⁵⁾. 또한, 가축에서 사람으로의 감염도 보고된 바 있다⁵⁾.

부루셀라 균은 숙주세포내에 기생하기 때문에 항생제 치료에 의해 빠른 효과를 볼 수 없다. 따라서 국내에서는 이 질병의 근절을 위하여 살처분 정책을 실시하고 있으며, 그에 따라 부루셀라 근절을 위하여 무엇보다도 중요한 것은 질병발생초기에 신속히 검출하는 기술이다. 살처분을 위하여 양성우를 색출하고 있으나 체내에 균이 감염 되어 있음에도 불구하고 항체생성이 매우 미약하여 혈청학적 방법으로 검출이 되지 않을 수 있다. 이러한 경우 임신 혹은 분만과 같은 심한 스트레스 상황에서는 혈청학적으로 양성반응을 보일 수 있다. 그러므로 혈청학적으로 음성이라고 해서 양성우 모두를 검출 할 수는 없다. 근래에 혈청학적, 세균학적 기술을 통하여 부루셀라를 검사하고 있으나 혈청학적 검사는 항원적으로 교차반응을 보일 수 있는 세균이 있는 것이 단점이며, 세균학적 검사는 사람에 감염 우려가 있다⁷⁾. 최근에는 분리된 세균 혹은 오염된 야외 시료에서 중합효소연쇄반응

(PCR)을 통하여 신속, 정확하게 항원을 검출해 내고 있다^{8,9)}. 또한 probe를 사용하여 야외에서 검출된 부루셀라균의 종을 분석하는 기술도 개발되었다^{10~12)}.

본 연구는 부루셀라병이 발생하여 혈청학적으로 양성인 소를 살처분하여도 지속적으로 양성우가 발생한 전라북도 정읍시에 소재한 한 젓소 사육농장에서 혈청학적 검사와 함께 세균학적, 분자생물학적 기법을 활용하여 부루셀라병 발생 농장내 사육되고 있는 소, 개, 음수, 흙 그리고 새의 분변 등을 조사하여 이 문제에 대한 원인을 파악코자 하였다.

재료 및 방법

농장과 환경

전라북도 축산진흥연구소 정읍지소 관내의 한 농장을 집중적으로 조사하였다. 최초 부루셀라병 발생시에는 젓소 134두(착유소 22두, 비육소 44두, 송아지 60두, 수소 8두), 개 3마리가 사육되고 있었으며, 환경조사를 위하여 야생조류 분변 3건, 음수 3곳, 농장 흙 14곳에서 시료를 채취하였다. 혈액은 각 개체별로 채취하였으며 우유는 착유중인 소에서 채취하였다. 임상적으로 건강한 소 11두의 질내 분비물, 37두의 비강분비물, 살처분되는 6마리 소 그리고 3마리의 태자로부터 시료를 채취하였다.

혈청학적 검사

Rose Bengal test(RBT)와 standard tube agglutination test(STAT)를 통하여 *Brucella* spp에 대한 항체를 검사하였다. 1차 시험은 30 μ l의 혈청과 RBT 진단액 30 μ l를 혼합하여 4분 동안 방치한 후 응집이 일어나면 양성으로 하였고, RBT에서 양성인 혈청은 다시 STAT 진

단액 2ml에 25배, 50배, 100배, 200배로 희석하여 37°C에서 48시간 배양하여 100배 이상 응집된 것을 양성으로 하였다.

미생물학적 분석

항응고제 EDTA로 처리된 혈액 200 μ l를 800 μ l의 Trypticase™ soy broth에 접종하여 5% CO₂배양기에서 배양하였다. 배양 4일 후에 100 μ l의 배양액을 표준 Brucella agar에 분주하고 3주간 배양하였다. 비강 및 질내 분비물은 항생제가 포함된 Trypticase™ soy broth에서 4일간 배양하였다. 이후 항생제가 포함된 Brucella agar에서 10일간 5% CO₂배양기에서 배양하였다¹³⁾.

채취된 물과 분변시료는 10배 희석하여 세균 분리를 시도하였다. 각 희석액의 100 μ l를 항생제가 포함된 Brucella agar에 15일 동안 배양하였으며 의심되는 집락은 PCR을 이용하여 동정하였다.

혈액 및 분비물에서 DNA 추출

혈액 및 분리된 세균집락에서 DNA추출은 시판되는 DNA extract kit(QIAGEN)를 사용하였다. 추출된 DNA는 PCR법으로 검사할 때까지 20°C에 보관하였다¹⁴⁾.

PCR

Master Mix(QIAGEN)를 사용하여 일반적인 방법에 의해서 PCR을 실시하였다. 반응혼합액 6 μ l를 1x TAE를 포함한 1.5% agarose gel에 분획시키고 ethidium bromide로 염색하여 UV로 관찰하였다¹⁴⁾.

Ziehl-Neelsen 염색

Brucella 균주를 현미경으로 관찰하고자 슬라이드에 도말하고 고정 후 Carbol Fuchsin Silla(1:10)로 10분 동안 염색하였다. 증류수

Table 1. Detection of *Brucella* spp infection in cattle by different methods

Category	Sample	Number of sample	Sample procesing	Number of positive	Positve rate(%)
Heifers	Serum	44	RBT-STAT	15	36
	Blood	44	Culture/PCR	9	21
	Nasal swab	24	Culture/PCR	4	17
	Vaginal swab	11	Culture/PCR	1	9
Calves	Serum	60	RBT-STAT	-	-
	Blood	60	Culture/PCR	-	-
	Nasal swab	7	Culture/PCR	-	-
Milking cows	Serum	22	RBT-STAT	-	-
	Blood	22	Culture/PCR	5	23
	Milk	22	Culture/PCR	12	55
	Nasal swab	7	Culture/PCR	-	-
Bull	Serum	8	RBT-STAT	-	-
	Blood	8	Culture/PCR	-	-
Neonate	Serum	3	RBT-STAT	-	-
	Blood	3	Culture/PCR	-	-

-: Negative

로 세척하고 0.5% acetic acid에서 30초 동안 반응시킨 후 현미경 하에서 빨간색의 작은 구균을 확인하였다.

결 과

조사농장에 사육하고 있는 젖소 134두를 검사한 결과, RBT-STAT에는 처너우 44마리 중 15두(34%)에서 양성 반응을 보였고, 착유소나 송아지, 수소에서는 모두 음성으로 판정되었다. 전혈을 배양한 결과, 처너우에서 9두, 착유소 22두 중 5두에서 균이 검출되었다. 혈청학적으로 양성반응을 보였던 시료 대부분이 혈액배양에서도 양성을 보였으나, PCR 검사에서는 부루셀라의 특이 유전자를 증폭하지 못하였다. 22마리의 착유소의 우유를 채취하여 PCR 검사를 시행한 결과 12개 우유에서 양성반응을 보였다. 처너우에서 24개, 송아지에서 6개, 착유소의 7개 비강, 처너우의 11개 질에서 균이 배출되는지를 확인하기 위하여 PCR 및 세균배양을 실시한 바, 원인균은 질에서 1건, 비강에서는 4건이 동정되었다. 태자 3두에서는 RBT와 PCR 검사에서 모두 음성반응을 보였다(Table 1).

부루셀라 발생농장에서 키우고 있는 3마리의 개는 RBT에서 모두 양성이었으며, 혈액배양 및 Ziehl-Neelsen염색에서 부루셀라균을 관찰하였다(Table 2).

또한 14건의 소 분변, 4건의 야생동물 분변, 3건의 음수를 각각 채취한 후 10배 희석하여 *Brucella* 균 검출을 시도하였다. 각 희석액은 항생제가 포함된 *Brucella* agar 또는 broth에서 배양하였으며, 동시에 PCR을 실시하였다. 검사한 모든 분변 채취물과 음수는 세균학적으로 음성반응을 보였다(Table 3).

고 찰

부루셀라병은 인수공통 전염병으로서 가축에서 발생될 경우 질병근절을 위하여 살처분 정책을 실시하고 있다. 이를 위해서는 질병발생 초기에 빠르고 정확한 진단이 이루어져야 한다. 본 연구는 이러한 전통적인 방법의 효과를 혈청학적, 미생물학적 방법과 PCR법을 이용하여 조사하고자 하였다. 예상한 것처럼 부루셀라는 성우의 질환¹⁾이기 때문에 연령이 어린 집단보다는 임신한 소에서 혈청학적으로 높은 양

Table 2. Detection of pathogenic *Brucella* spp in the dogs

Class	ID No	RBT	Blood culture	Stain proceeding
Dog	1	+3 ^a	+	+
Dog	2	+3	+	+
Dog	3	+3	+	+

^a : Positive

Table 3. Examination of other samples for *Brucella* spp

Class	No	No of positive	
		Culture	PCR
Bird feces	3	0	0
Soil with feces	14	0	0
Waste	2	0	0
Drinking waters	3	0	0
Total	22	0	0

성률을 보였다. 혈청학적으로 양성반응을 보였던 개체들은 대부분 혈액배양에서도 부루셀라 균주가 검출되었고, 이 중 한마리는 질분비물에서 균체가 검출되었다.

착유소에서는 혈청학적으로 음성을 보였으나, 혈액검사를 통해서 세균이 동정되었고 PCR을 통해서 우유에서 부루셀라균이 검출되었다. 이는 RBT에서 지속적으로 음성을 보였지만 실제로는 만성적인 감염상태인 것으로 판단된다¹⁵⁾.

이 실험에서 분변, 물 등 환경으로부터 얻은 시료에서는 부루셀라 균체를 검출할 수 없었으나 감염된 소로부터 다른 가축이나 사람에게 감염시킬 수 있는 환경적 요인들을 예로 들 수 있다¹⁶⁾.

이 농장에서 사육된 개들은 모두 부루셀라에 감염이 되었으며 혈청학적으로 또는 혈액배양을 통해서 균주가 검출되었다. 이러한 경우는 Prior²⁾ 의해서 보고된 바 있으며 실험적으로는 *B abortus*가 개에 감염된다는 것이 보고된 바 있다¹⁷⁾.

감염된 농장에는 여러가지 위험요소가 발견되었는데 특히 감염동물과 감수성동물간의 접촉이 매우 중요한 요소로 보고되고 있다¹⁸⁾. 일반적으로 농장에 가축의 수가 많을수록 감염될 확률은 높아진다. 농장의 면적당 두수가 많고 관리가 잘 되지 않는다면 감염의 속도나 수가 늘어난다¹⁹⁾.

따라서 이 농장의 주요 감염요인은 착유소의 우유, 질과 비강을 통한 배출물들이 의심되며, 주요 감염경로는 환경보다는 부루셀라에 감염된 동물에서 유래하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 감염우와 함께 사는 개와 같은 동물도 쉽게 감염됨을 알 수 있었다.

결 론

혈청학적 검사와 함께 세균학적, 분자생물학적 기법을 활용하여 부루셀라병 발생 농장내 사육되고 있는 소, 개, 음수, 흙 그리고 새의 분변등을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈청학적으로 양성의 정도가 높은 균은

입신우였다. 혈청학적으로 양성반응을 보였던 소에서는 대부분 혈액에서 부루셀라 균체가 검출되었으며 1마리에서 질내용물에서도 균체가 검출되었다.

2. 우유와 혈액에서 각각 PCR과 배양법을 사용한 결과 만성적으로 감염된 소에서는 혈청학적으로 음성을 보이더라도 부루셀라에 감염되어 있는 경우가 있다.
3. 부루셀라는 동종간, 이종간 감염이 분명하게 나타났으며 이는 감염된 동물로부터 환경에 있는 감수성 동물에서도 오염될 수 있음을 시사한다.

참고문헌

1. Queen PJ, Carter ME, Markey BK, et al. 1994. *Clinical veterinary microbiology*. Wolfe Publishing: 261.
2. Prior MG. 1976. Isolation of *Brucella abortus* from two dogs in contact with bovine brucellosis. *Can J Comp Med* 40(1): 117~118.
3. Flagg DE. 1983. A case history of a brucellosis outbreak in brucellosis free state which originated in bison. United States Animal Health Association Proceedings 87 : 171~172.
4. Forbes LB, Tessaro SV. 1993. Transmission of brucellosis from reindeer to cattle. *JAVMA* 15; 203(2): 289~294.
5. Forbes LB, Tessaro SV. 1996. Infection of cattle with *Brucella abortus* biovar 1 isolated from a bison in Wood Buffalo National Park. *Can Vet J* 37(7): 415~419.
6. Repina LP, Nikulina AI, Kosilov IA. 1993. A case of human infection with brucellosis from a cat. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 4: 66~68.
7. Lopez-Merino A. 1991. *Brucellosis. Advance in perspectives*. Publication Tcnica del INDRE-SSA 6: 1~54.

8. Leal-Klevezas DS, Martnez-Vzquez IO, Lpez-Merino A, et al. 1995. Single step PCR for the detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 33: 3087~3090.
9. Leal-Klevezas DS, Barbabosa-Pliego R, Flores-Trujillo M, et al.. 1999. Epidemiological molecular de un foco primario de brucelosis en el Estado de Maxico. *Biotechnol Apl* 16: 149~153.
10. Fekete A, Bantle JA, Halling SM. 1992. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J Vet Diagn Invest* 4: 79~83.
11. Fekete A, Bantle JA, Halling SM,, et al.. 1990. Preliminary development of a diagnostic tests for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 69: 216~227.
12. Herman L, Ridder HD. 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *App Env Microbiol* 58: 2099~2101.
13. Leal-Klevezas DS, Martnez-Vzquez IO, Garca-Cant J, et al.. 2000. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *J Vet Microbiol* 75: 91~97.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Manuatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
15. Geong M, Robertson ID. 2000. Response of Bali cattle(*Ros jevanicus*) to vaccination with *Brucella abortus* strain 19 in West Timor. *J Prevent Vet Med* 47: 177~186.
16. Young EJ, Nicoletti P. 1997. Brucellosis in humans. In: Thorne ET, Boyce MS, Nicoletti P, Kreeger TJ. *Brucellosis, bison, elk and cattle in the Creater Yellowctone Aria: defining the problem, exploring solutions*. Available from the Wyoming and Fish Department, 5400 Bishop Blvd., Cheyenne, WY 82006: 147~153
17. Palmer MV, Cheville NF. 1997. Effect of oral or intravenous inoculation with *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in beagles. *Am J Vet Res* 58 (8): 851~856.
18. Crawford RP, Huber JD, Adams BS. 1990. Epidemiology and surveillance. In: Nielsen K, Dunkan JR.(Eds.), *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, P: 131~151.
19. Salman MD, Meyer ME, Peralta JrG. 1984. Epidemiology of bovine brucellosis in Mexicali Valley, Mexico: use of the path analysis to refine the existing control program. *Int J Zoonoses* 11: 216~222.