

브루셀라병 혈청검사 양성 수소와 12개월령 이하 소에서의 균 분리 및 동정

류재윤*, 변정운, 이희영, 이용창, 이종진, 송영각¹, 남향미²

충청북도 축산위생연구소 제천지소¹, 국립 수의과학검역원²
(접수 2007. 8. 22, 게재승인 2007. 9. 24.)

Isolation of *Brucella* spp from sero-positive native bulls and calves below twelve months old

Jae-Yun Ryu¹, Jung-Hyun Bun, Hee-Young Lee, Yong-Chang Lee,
Jong-Jin Lee, Young-Gak Song¹, Hyang-Mi Nam²,

¹Jechun branch, Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute. Jechun, 390-090, Korea. ²National Veterinary Research Quarantine Service, Anyang 430-824, KoreaJ
(Received 22 August 2007, accepted in revised from 24 September, 2007)

Abstract

This study was conducted to investigate the characteristics of brucellosis in Korean native cattle in a farm where bovine brucellosis was confirmed 3 times from September 2006 to March 2007. Of 74 bulls serum samples examined, 21 (28.4%) were positive by Rose-Bengal test (RBT) and Standard tube agglutination test (STAT). In the isolation test from seropositive bulls, *B abortus* was isolated and identified from 2 specimens (testis, intestinal lymph node) among 6 kinds of specimens including blood, urine, feces and soil. Isolation rate of intestinal lymph node and testis was 25% (3/12 cases) and 16.7% (2/12), respectively. *B abortus* was also isolated from calves below 12 months old, i.e., 1 isolate (25.0%) was confirmed from testis, 4 (40.0%) from supra-mammary lymph nodes and 1 (25.0%) from intestinal lymph node. All isolates had *Brucella* specific 16s r-RNA with 905-bp band detected by PCR assay. For the more effective control of bovine brucellosis in Korea, this paper would like to suggest that all of bulls and calves should be included in the screening tests.

Key words : *Brucella abortus*, PCR

*Corresponding author

Phone: +82-43-220-5640, Fax: +82-43-220-5640,

E-mail : kis7076@hanmail.net

서 론

브루셀라병은 *Brucella*속균에 의한 소, 돼지, 산양, 면양, 개 및 기타 동물에 감염하여 생식기관 및 태막의 염증과 유산, 불임증 등이 주 특징이고, 제2종 가축전염병으로 이 병은 동물 뿐 만 아니라 사람에게 감염하여 파상열을 일으키는 인수공통전염병으로서 공중위생상 매우 중요시 되고 있으며, 원인균인 *Brucella* 속균은 그람음성의 작은 간균이며, *B abortus*, *B melitensis*, *B suis*, *B ovis*, *B canis*, *B neotomae*의 6균종이 있으며, 편성세포내 기생균으로 macrophage내에서도 증식하며, 분리에는 5-10% CO₂ 가 요구되며, 균의 저항성은 비교적 약하며, 우유의 저온 살균으로 쉽게 살균되고, 균의 생존성은 태반중에서 수개월, 흙에서 37일간, 물에서 57일간, 직사광선에서 5시간 생존하는 것으로 알려졌으며, 브루셀라균종에 따라 감수성의 차이가 있고, *B melitensis*는 면양, 산양 및 사람에게, *B abortus*는 소, *B suis*는 돼지, *B ovis*는 면양, *B neotomae*는 다람쥐, *B canis*는 개에 감수성이 높지만, 다른 가축 및 동물에도 서로 교차감염 할 수 있다. 유산태아, 태막, 후산 등에 균이 농후하게 들어 있으며, 유산후 질루에 일시 배설되고 우유를 통해 배설되어 감염원이 되며 보균하고 있는 소, 돼지 등이 전염원이 된다. 오염된 사료, 물 등에 의한 경구감염이 가장 중요한 자연감염이고, 이밖에 창상 감염, 결막 감염, 유방을 통한 감염, 교미나 인공수정을 통한 생식기 감염, 태반 감염 등이 가능하다¹⁻¹⁰⁾. 사람에서의 브루셀라 병원성은 *B melitensis*, *B suis*, *B abortus*, *B canis* 순이며, 잠복기는 2-4주이며 때로는 수개월이 가는 경우도 있다. 또한 사람에게 대한 전염은 분만우의 후산물, 유산송아지와 접촉 및 섭취, 살균하지 않은 우유 및 유제품의 섭취에 주로 기인하며, 식육에 의한 감염가능성은 희박하다. 또한 직업병으로 수의사·축주·식육취급자·인공수정사·

실험실 종사자들이 주로 감염되며, 임상증상으로 파상열·피로·오한·두통·근육통·식욕감소·관절염·림프절염·척수염·수막뇌염·골수염·심내막염·신장염 등을 일으킬 수 있으며 사람과 사람과의 전파는 되지 않는 것으로 알려져 있고, 감염된 사람에 대한 치료는 항생제로 치료가 가능하며 재발 방지 위해 임상증상이 사라져도 6주 이상 반드시 투여하여야 하며, 치료하지 않아 만성 경과시는 입원치료가 필요한 질병이다⁶⁻¹⁰⁾. 브루셀라균은 숙주세포 내에 기생하기 때문에 항생제 치료에 의해 빠른 효과를 볼 수 없으며, 우리나라는 적발도태법의 정책을 실시하고 있으며, 이 질병의 근절을 위해 여러가지 방법의 혈청검사로 항체의 유무를 검사하여 양성우를 색출하는 있으나, 체내에 감염세균을 보유하고 있음에도 불구하고 항체 형성이 매우 미약하여 혈청학적인 방법으로 검출이 안 될 수도 있다. 또한 심한 스트레스나, 분만 혹은 임신 등의 원인과 혈구의 파괴 등으로 혈청학적 양성을 보일 수 있다. 또한 혈청학적 음성이라고 해서 항체형성기 등을 고려해서 반드시 음성이라고 할 수 없는 맹점을 가지고 있기 때문에 브루셀라균의 분리 동정이 중요시 되고 있는 상황이다⁸⁻¹⁴⁾. 정부에서는 소 브루셀라병 방역강화에서 2013년 근절 목표로 감염농장 색출을 위한 검사 확대와 농가의 예방 노력 확립 등 다각적인 방역대책 추진함에서 모든 거래 암소, 10두 이상 농장은 연 2회 실시하고, 수집상·증개상은 연 4회, 사육소 및 다발지역 일제검사를 실시하고 있으며, 살처분 보상금을 가축시세의 100%→80%→60%로 조정하였으며, 2007년에는 감염농장 색출을 조속히 마무리하고 근절기반 조성을 위해 '소 브루셀라병 방역 강화대책' 마련하여 1세 이상 모든 한우·육우 및 유우에 대한 정기검사, 평균 감염률 30%초과하는 다발지역은 연 2회 검사 실시를 계획하고 있고, 발생농장의 인근 500m 이내 사육소에 대한 의무검사를 계획하고 있다^{5,10)}. 본 연구의 목적은 수소의 경우에는 단지 교환이나 부교환의

국소감염만을 일으키므로 눈에 띄는 증상이 없으므로, 임상증상으로 판단하기 지난하므로 반드시 혈청검사를 수행하여야만 감염여부를 판정할 수 있기 때문에 수소에 대한 혈청검사 실시가 꼭 필요한 사항임을 인식하고, 우리나라에서 금년까지 검사하지 않았던 수소에 대한 브루셀라병 검사를 실시하고, 또한 12개월령 이하에서의 감염우에 대한 조사를 수행함으로써 수소 및 12개월령 이하 감염우에 대한 브루셀라병 감염실태, 브루셀라병 감염경로에 따른 역학조사 및 브루셀라병 확산 방지를 위한 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시 농장 및 재료

충청북도 축산위생연구소 제천지소 관내의 수소를 비육하는 전형적인 축산농가로서 브루셀라병이 세 차례(2006년 9월 2007년 3월) 연속적으로 발생한 농장을 공시농장으로 취하여 이 농장의 브루셀라병 혈청검사 양성우를 중심으로 시료를 채취하였다. 최초 브루셀라병 발생시에는 한우 51두를 사육하고 있었으며, 최초 브루셀라 발생은 15두였고, 두 번째 11두, 세 번째는 2두가 발생하였다. 공시 재료로는 두 번째, 세 번째 발생한 개체 12두에서 채취한 고환, 뇨, 분변, 장간막림프절, 혈액, 농장주변 토양, 음수 등 63건을 채취하여 시료로 공시 하였으며, 12개월령 이하 감염우에 대한 시료의 공시는 수소 4두와 암소 10두 총 14두에서 고환·장간막림프절·상유방림프절·혈액 등 32건에 대하여 공시하였다.

혈청학적 검사

Rose Bengal test(RBT)와 Standard Tube Agglutination test (STAT)를 통하여 *Brucella* spp에 대한 항체 검사를 하였다. 1차 시험은 실온에서 1시간정도 방치한 30 μ l의 혈청과 RBT 진단액(*Brucella abortus*

1119-3균을 Rose Bengal dye 로 염색)을 30 μ l 혼합하여 4분 동안 잘 흔들어서 반응시킨 후 즉시 응집정도에 관계없이 응집이 일어나면 양성, 응집이 일어나지 않을 경우 음성으로 판정하였으며, RBT에서 양성인 혈청은 다시 STAT 진단액(*Brucella abortus* 1119-3균에 페놀 식염수를 가한 부유액) 2ml에 25배, 50배, 100배, 200배로 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하여 100배 이상 응집된 것을 양성으로 하였다. 또한 표준양성혈청 및 음성혈청을 매 검사 시 대조군으로 사용하였다¹⁵⁻²⁰. 또한 브루셀라병 항체 진단키트(Dip-stick, 에니젠)를 이용하여 RBT와 STAT의 결과와 비교하였다.

미생물학적 검사

항응고제 EDTA로 처리된 혈액 1ml를 9ml의 TrypticaseTM Soy broth, *Brucella* broth에 접종하여 5% CO₂배양기에서 배양하였다. Bacitracin 25,000 unit/10ml을 1 l 의 증류수에 용해하여 기초배지에 첨가하였다. 배양 4일 후에 100 μ l의 배양액을 표준 *Brucella* agar에 분주하고 3주간 배양하였다. 또한 고환 및 장간막림프절은 항생제가(Bacitracin 25,000 unit / 10ml)포함된 TrypticaseTM soy broth에서 3-4일간 배양하였다. 이후 항생제가 포함된 *Brucella* agar에서 10일간 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다¹³. 채취된 음수, 뇨 및 분변시료는 10배 희석하여 세균 분리를 시도하였다. 각 희석액의 100 μ l를 항생제가 포함된 *Brucella* agar에 15일 동안 배양하였으며 배양 후 4일째 직경 1-2mm의 원형, 투명한 담황색, 위에서 내려다 보면 볼록한 형태의 유백색이며, 염색조건은 그람음성, 구균, 비운동성을 가지며 아포 및 편모나 섬모가 없으며, 미호기성으로 느린 증식성의 세균학적인 특징을 가진 것으로 의심되는 집락을 생화학적인 검사 및 PCR을 이용하여 분리 동정하였다¹⁸⁻²⁷.

PCR

혈액 및 분리된 세균집락에서 DNA 추출은 시판되는 DNA extract kit(QIAGEN)를 사용하였다. 추출된 DNA는 PCR로 검사할 때까지 20°C에 보관해서 사용하였고¹⁴⁾, Master Mix(QIAGEN)를 일반적 방법에 의해서 PCR을 실시하였다. primer는 16S rRNA(905bp)를 사용하였고, F4 5'-TCG AGC GCC CGC AAG GGG-3', R2 5'-AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA-3'을 사용하였다. PCR 조건은 predenaturation 95°C/5min, denatu-

ration, 95°C/30sec, annealing 54°C/90sec, 30 cycle, extension 72°C/ 90sec로 하고, 최종 extension은 72°C/6min으로 반응시켰다. PCR이 완료되면 반응혼합액 10 μ l를 1X TAE buffer를 포함한 1.5% agarose gel(ethidium bromide 1 μ l/ml, Bioneer)에 분획시키어 전기영동을 실시하였다^{13,20-27)}. 전기영동이 끝난 gel을 UV illuminator에서 905 bp DNA band 증폭 산물의 유무를 확인하였다²⁵⁻²⁶⁾(Fig 1).



Fig 1. Amplification patterns of 16S rRNA gene of *B abortus* isolates by PCR using 16S rRNA primers

M	ladder marker,	lane 1	Standard strain, <i>B abortus</i> (biotype1)
lane 2	A farm(Testis),	lane 3	A farm(Supramammary lymph nodes)
lane 4	A farm(Intestinal lymph node)	lane 5	B farm(Testis),
lane 6	B farm(Supramammary lymph nodes)		

결 과

브루셀라 양성우에 대한 혈청검사의 결과(로즈벵갈테스트, 시험관 응집반응)에서 브루셀라병 양성 발생농장은 6개월 동안 세 번 연속 양성 반응을 보였다. 첫 번째 발생에서 15두, 두 번째 11두, 마지막에서 2두의 양성을 보였으며, Table 1과 같이 발생의 순서에 따라 수소에 대한 감염률은 23.7%, 37.0%, 22.2%의 감염률을 보였고, 암소에 대한 감염률은 66.7%, 20.0%, 0%의 결과를 나타내었다. 전체적인 농장의 감염률은 29.2%를 나타내었고, 수소 28.4%, 암소는 38.9%의 감염률을 나타내었다(Table 1).

브루셀라 양성우의 양성 항체가별, 각 양성 항체가 장기별균 분리를 한 결과 Table 2와 같

다. 혈청검사 양성우에 대한 역가는 200배와 400배에서 각각 5두씩 나타났으며, 100배에서는 2두가 확인 되었다. 또한 간이진단키트(Dip-stick)에서는 11두의 양성우(91.7%) 성적을 나타냈다. 브루셀라균 분리 및 PCR 검사에서는 400배 역가에서 3두, 200배에서 2두의 균 분리를 할 수 있었다. 또한 역가에 따른 장기별 세균분리 결과는 총 5건의 세균 분리를 하였는데 고환에서 2건, 장간막림프절에서 3건의 세균을 분리하였다(Table 2). 장기별 브루셀라균 동정율은 Table 3과 같이 고환에서 12건중 2건(16.7%)이 분리가 되었고, 장간막림프절에서 3건(25.0%), 혈액·뇨와 분변 음용수·토양 등에서는 분리가 되지 않았다.

총 63건의 장기 시료 중에서 5건(7.94%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 장간막림프절에서는 24건중 5건(20.8%)의 균 분리를 나타내었다.

Table 1. Detection of reactors in a farm by serum tests

No of tests (frequency)	Heads	Sex (A)			No of positive RBT-STAT*(B)		Positive rate A/B × 100(%)	
		Male	Female	Calves	Male	Female	Male	Female
First	51	38	9	4	9	6	23.7	66.7
Second	32	27	5		10	1	37.0	20.0
Third	13	9	4		2		22.2	
Total	96	74	18	4	21	7	28.4	38.9

* RBT : Rose Bengal test, STAT : Standard Tube Agglutination test

Table 2. Isolation rate of *Brucella* organisms by antibody titers in 12 bull reactors

Agglutination titer	No of positive bull	No of positive Dip-stick	No of positive culture & PCR(B)	Specimens			Total
				Testis	Intestinal Lymph node	Blood	
Below 100	2	1					
200	5	5	2	1	1	0	2
Above 400	5	5	3	1	2	0	3
Total	12	11	5	2	3		5

Table 3. Isolation rate of *Brucella* organisms from various specimens in sero-positive native bulls

	Specimens						Total
	Testis	Intestinal lymph node	Urine	Blood	Feces	Water, soil	
No of test (A)	12	12	10	12	12	5	63
No of positive culture & PCR (B)	2	3	0	0	0	0	5
A/B × 100 (%)	16.7	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.94

Table 4. Isolation rate of *Brucella* organisms from various specimens in sero-positive indigenous calves below twelve months

	Specimens				Total
	Testis	Supra-mammary lymph node	Intestinal lymph node	Blood	
No of test (A)	4	10	4	14	32
No of positive culture & PCR (B)	1	4	1	0	6
A/B × 100 (%)	25	40	25	0	18.8

(Table 3). 12개월령 이하에서 브루셀라병 혈청검사 결과 양성축에 대한 장기별 브루셀라균 동정율은 Table 4와 같다. 고환에서 4건 중 1건(25%)이 분리가 되었고, 상유방립프절에서 4건(40%), 장간막립프절에서 1건(25%)이 분리되었으며, 뇨와 혈액에서는 분리되지 않았다. 총 32건의 시료장기 중에서 6건(18.8%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 상유방립프절 및 장간막립프절에서는 18건 중 6건(33.3%)의 균 분리를 나타내었다(Table 4).

고 찰

브루셀라병은 인수공통 전염병으로서 비교적 폭넓은 숙주범위를 가지는 병원균으로 소, 돼지, 면양, 강아지 등에 일차적으로 감염된 후 전염 매개체인 생물학적 요소인 소, 말, 돼지, 사슴과 기계적 매개체인 쥐, 고양이, 야생조수, 흡혈곤충인 진드기, 모기, 파리와 차량 및 기구, 수레, 장축, 착유기 등을 들 수 있으며, 이들과 접촉이 빈번한 직업인 축주, 인공수정사, 수의사의 감염이 될 수 있으므로 가축에서는 발생될 경우 질병근절을 위하여 살처분 정책을 실시하고 있다. 이를 위해서는 질병발생 초기에 빠르고 정확한 진단이 이루어져야 한다. 또한 우리나라에서는 12개월령 이상의 암소에 대한 혈청검사를 위주로 브루셀라균 검색 정책을 펼치고 있으므로 수소 및 12개월령 이하에 대한 혈청검사나 브루셀라균 동정에 대한 기초 자료가 부족한 것 같아 본 연구를 수행하였다. 또한 본 연구의 목적은 수소의 경우에는 단지 고환이나 부고환의 국소 감염만을 일으키므로 눈에 띄는 증상이 없으므로, 임상증상으로 판단하기 지난하므로 반드시 혈청검사를 수행하여야만 감염여부를 판정할 수 있기 때문에 수소에 대한 혈청검사가 꼭 필요한 사항임을 인식하고, 우리나라에서 검사하지 않았던 수소에 대한 브루셀라병 검사를 실시하고, 또한 12개월령 이하에서의 감염우에 대한 조사를 수행함으로써 수소 및 12개월령 이하 감염우에 대한

브루셀라병 감염실태, 브루셀라병 감염경로에 따른 역학조사 및 본병의 확산 방지를 위한 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

또한 브루셀라병의 진단은 세균을 직접 분리 동정하는 것이 가장 확실한 진단법이지만 시간이 많이 걸리고, 잠복감염에서 세균의 분리율이 낮은 점이 단점이며, 혈청학적진단법은 가장 간단하면서 빠른 시간 안에 판정할 수 있으나, 비특이성 반응이 많이 나타나고, 만성 감염증이나 감염초기에는 검출하지 못하는 경우가 많아 최근에는 민감성과 특이성이 높은 직접증합효소연쇄반응(Direct PCR)이 진단에 응용되고 있는 상황이다. 이와 같이 PCR기법을 이용한 진단법은 브루셀라균을 확인하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라 항체수준이 낮은 예에서도 브루셀라균을 신속히 검출할 수 있으므로 혈청학적 방법과 병행하여 혈액·립프절·우유·정액 및 질분비물 등의 재료로부터 직접 브루셀라균을 검출하는데 많이 사용되리라 생각되며, 질병진단기관에서 진단을 위한 모든 장비의 구입 및 인력보강을 하여 정확한 브루셀라 살처분 정책에 활용 될 수 있으리라 생각된다.

브루셀라병 양성 발생농장은 6개월 동안 3회 연속 혈청검사 양성 반응을 보였다. 처음 본병이 발병 했을 때의 총 사육두수 51두 중 15두가 감염되어 29.4%의 감염률을 보였고, 두 번째 발병에서는 32두 중 11두가 발병하여 34.4%, 세번째는 13두 중 2두로 15.4%의 감염률을 나타내었다. 또한 수소의 감염률은 23.7%, 37.0%, 22.2%이었고, 암소의 감염률은 66.7%, 20.0%, 0%의 결과를 나타내었다. 전체적인 농장의 감염률은 29.2%를 나타내었고, 수소는 28.4%, 암소는 38.9%의 결과를 나타내었다.

3회 연속 재발생한 농가로 심 등¹⁰⁾은 양성 동거우를 재검사 한 결과 1개월 이내에 발생이 50.2%, 1개월 6개월은 26.6%의 브루셀라병의 재발생을 확인 할 수 있었다. 또한 본 질병의 발생률의 조사는 심 등¹⁰⁾의 연구에서 12개월 이상 암소에서만의 발생률과 재발생

를 나타내었으나 본 조사에서는 수소에 대한 재발생을 확인 할 수 있었으며, 암소와 비슷한 결과를 얻을 수 있었다.

브루셀라병 양성우의 양성 항체가 별로 균 분리를 실시하여 각 양성 항체가에서 장기별 균 분리를 한 결과 혈청검사 양성우에 대한 역가는 200배와 400배에서 각각 5두씩 나타났으며, 100배에서는 2두의 혈청역가를 나타내었다. 또한 간이 진단키트(Dip-stick)에서는 12두 중 11두의 양성우를 나타내어 91.7%의 일치율을 나타내었다.

브루셀라균 분리 및 PCR 검사에서는 총 12두의 양성우중 5두(41.7%)에서 세균을 분리하였는데 역가별로 세분해 보면 400배에서 3두, 200배에서 2두의 균 분리를 할 수 있었다. 혈청역가가 높을수록 균 분리율은 다소 높은 것으로 나타났다.

장기별 브루셀라균 동정율은 고환에서 12건 중 2건(16.7%)과 장간막림프절에서 3건(25.0%)이 분리가 되었고, 혈액과 뇨·분변·음용수·토양 등에서도 분리가 되지 않았다.

총 63건의 시료장기 중에서 5건(7.94%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 장간막림프절에서 24건중 5건(20.8%)의 균 분리를 나타내었다.

김 등⁵⁾의 연구에 의하면 림프절에서 800건 중 219건(27.4%), 근육에서 0.79%, 전혈 3.64%, 정소 51건중 3건(5.9%), 난소 14.2% 등의 분리율이며, 정 등⁸⁾은 비강 분비물 4건과 질 분비물 1건의 균 분리와 수소에서는 혈청과 전혈에서 세균 분리가 안된 것을 볼 수 있었다. 또한 응집반응에서 양성우로 판정된 개체에서 실질 장기별 브루셀라균의 분리율은 Yanupsky¹⁴⁾는 상유방림프절에서 80%로 가장 높고, 유방 59%, 우유 45%, 자궁 42%, 비강 37%의 순으로 보고하였고, 정 등⁸⁾은 상유방림프절 55.6%, 유즙 40.7%로 보고 하였다. Park 등¹¹⁾은 브루셀라균 분리주중 상유방림프절에서 79.5%가 분리되었음을 보고한 바 있다. 본 실험에서는 수소의 고환 및 장간막림프절에 대한 균 분리 수행으로 고환에서 58%, 장간막림프절에서 50%의 분리율을 나타낸 것

은 김 등⁵⁾의 연구보다 균 분리율이 다소 높게 나타났다. 기타 다른 연구자들은 주로 암소에 대한 세균 분리를 수행하였으나, 본 연구는 수소에서의 세균분리를 수행하였으므로 다소 차이가 나는 것 같다.

본 연구에서는 정 등⁸⁾의 연구와 같이 혈액 36건중 한건도 원인균이 분리 되지 않았으나, 김 등⁵⁾은 907건 중 33건(3.64%)의 세균분리를 보고하여, 시료가 적을 경우의 낮은 분리율로 인한 사례라 판단된다. 브루셀라균은 AUSVETPLAN(Australian veterinary emergency plan. version 3.0, 2005년)에 의하면 감염 초기에만 세균을 분리할 수 있다는 보고가 있으며, 혈액 내 박테리아가 지속되는 균혈증 기간 중에는 임상증세가 없으며, 수주 내지 몇 개월이 지속되기도 한다. 그 후 균이 임신자궁, 젖소의 유방, 거세하지 않은 수소의 고환, 부생식선 등에 국소화하여 존재한다고 한다.

또한 본 실험에서 분변, 뇨, 물, 토양 등 환경으로부터 얻은 시료에서는 브루셀라균을 검출할 수 없었으나, 감염된 소로부터 다른 가축이나 사람에게 감염시킬 수 있는 환경적 요인들을 배제 할 수는 없는 것 같다¹⁸⁾.

12개월령 이하에서 브루셀라병 혈청검사 결과 양성축의 장기별 브루셀라균 분리율은 고환에서 4건 중 1건(25%), 상유방림프절 4건(40%), 장간막림프절 1건(25.0%)이 분리되었으며, 혈액, 뇨 및 분변에서는 분리 되지 않았다. 총 32건의 시료장기 중에서 6건(18.8%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 상유방림프절, 장간막림프절에서는 24건 중 6건(25%)의 균 분리를 나타내었다. 정 등⁸⁾에 의하면 양성우 동거축의 송아지(암·수) 68두에서 혈액에서 균 분리를 할 수 없었다고 보고하였다.

12개월 이상의 개체에 대한 균 분리 및 혈청검사 결과 보고는 상당히 많이 보고되었지만, 성숙축이 되지 않은 12개월령 이하 소에 대한 혈청검사 및 세균분리 보고 자료는 찾을 수 없었다. AUSVETPLAN에 의하면 ‘감염은 모든 연령의 소에서 일어날 수 있으

나 대부분의 경우 성성숙한 동물에서 지속된다. 감염된 젖을 먹은 송아지는 수 주 동안 분변을 통해 병원성 브루셀라균을 배출한다'라고 되어있으며, 또한 선천적으로 감염된 송아지는 초유항체로 인해 양성 혈청반응을 나타내고, 그 후에 음성혈청반응을 나타내며 세균이 배출되는 때, 즉 임신이나 유산 시까지 발현하지 않는다²⁸⁾라고 되어있으며, 또한 *B abortus*는 오염된 먹이나 물의 섭취 또는 유산되거나 분만 직후 감염된 동물의 태반, 태아 또는 생식기를 활아서 전파된다. 흡입이나 직접접촉 특히 상처 난 피부나 점막 등이 요인이 된다²⁹⁾. 이런 방식으로 감염된 처녀우는 혈청학적 검사로는 찾아내지 못하고, 성숙기 이후 감염의 근원이 된다. 청정 우군으로의 질병전파는 주로 잠복 감염된 젖소나 처녀우의 유입에 의한다 라고 되어있다.

이상과 같은 연구를 수행함으로써 수소 및 12개월령 이하 소에 대한 브루셀라균 분리나 혈청학적 진단의 미비점을 보완하고 브루셀라병 근절 정책에 있어서 수소 및 7 12개월령 이하 소에 대한 브루셀라병 검사의 필요성을 인식하여, 브루셀라병 방역 및 근절 정책에 기초적 자료가 되었으면 하는 바램에서 본 연구를 수행하였다.

결 론

브루셀라병 감염 수소와 12개월령 이하의 감염우에서 혈청학적 검사와 함께 세균학적, 분자생물학적 기법을 활용하여 브루셀라균을 분리 동정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 수소에 대한 브루셀라병 혈청검사결과 74건 중 21건(28.4%)이 로즈벡검방법과 시험관응집반응에서 양성을 나타내었다.
2. PCR 검사에서는 분리된 모든 브루셀라균은 16s r-RNA 프라이머에서 905-bp 밴드가 형성되었다.
3. 장기별 세균 분리 결과는 고환에서 12건 중 2건(16.7%), 장간막림프절에서 3건(25%) 등 총 5건이 분리되었으나, 혈액·뇨·분변·음용

수·토양 등에서는 분리되지 않았다.

4. 총 63건의 시료장기 중에서 5건(7.94%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 장간막림프절에서는 24건 중 5건(20.8%)의 균분리를 나타내었다.
5. 12개월령 이하에서 브루셀라병 혈청검사 결과 양성축에 대한 장기별 브루셀라균 동정율은 고환에서 4건 중 1건(25%), 상유방림프절 4건(40%), 장간막림프절 1건(25%)이 분리되었으며, 혈액과 뇨·분변에서는 분리되지 않았다.
6. 총 32건의 시료장기 중에서 6건(18.8%)의 균동정이 이루어졌으며, 고환과 상유방림프절 및 장간막림프절에서는 18건 중 6건(33.3%)의 균 분리를 나타내었다.

참고문헌

1. Forbes LB, Tessaro SV. 1993. Transmission of brucellosis from reindeer to cattle. *JAVMA* 203(2):289-294.
2. 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.
3. Repina LP, Nikulina AI, Kosilov LA. 1993. A case of human infection with brucellosis from a cat. *AH Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 4:66-68.
4. Lopez-Merino A. 1991. *Brucellosis. Advance in perspectives*. Publication Tcnica del INDRE-SSA 6:1-54.
5. Kim ST, Yoon KB, Kang TK, et al. 2005. Brucellosis outbreak of Korean indigenous cattle at Yeongwol and Pyeongchang country Korea. *Korean J Vet Serv* 28 (4):387-392.
6. Rijpens NP, Jannes G, Asbroeck MV, et al. 1996. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S RNA spacer

- probes. *J Clin Microbiol* 62 : 683-1688.
7. Leal-Klevezas DS, Martinex-Vazquez IO, Lopez-Marino A, et al. 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 33 : 3087-3090.
 8. Jung SC, Jung BY, Woo SR, et al. 1998. Development of PCR assay for the detection of *Brucella* spp in bovine serum. *J Vet Med Assoc* 38(2) : 345- 352.
 9. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ. 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173^{AL}. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Ed: Krieg NL, Holt JG. Vol 1. Williams & Wilkins, Baltimore and London : 377-388.
 10. 심향섭, 고태오, 유성종 등. 1996. 경기도에서 발생하는 유우 브루셀라병에 관한 연구. *한가위지* 19(3) : 189- 198.
 11. 박노찬, 김상윤, 조광현 등. 1998. 경북지방의 브루셀라병에 관한 연구. *한가위지* 21(4) : 451- 465.
 12. Timoney JF, Gillespie JH, Scott EW, et al. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and infectious disease of domestic animals*. 8 eds. Comstock Publishing Associate, Ithaca and London : 127-138.
 13. Bae J. 1999. *Generation of baculovirus-Brucella abortus heat shock protein recombinants; Mouse immune responses against the recombinants, and B. abortus superoxide dismutase and L7/L12 recombinant proteins*. Ph.D. thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
 14. Yagupsky P. 1999. Detection of *Brucella* in blood cultures. *J Clin Microbiol* 37 : 3437-3442.
 15. Perry MB, Bundle DR. 1990. 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.
 16. Mittal KR, Tizard IR. 1980. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res Vet Sci* 28 : 311-314.
 17. Alton GG. 1975. Jones LM. *Laboratory techniques in brucellosis*. World Health Organization, Geneva : 1-163.
 18. USDA. 1985. *Brucellosis Eradication: Uniform methods and rules*. Animal and Plant Health Inspection Service, Iowa
 19. Diaz-Aparicio E, Marin C, Alonso-Urmeneta B, et al. 1994. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J Clin Microbiol* 32 : 1159-1165.
 20. 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 Cin Microbiol* 33 : 3087-3090.
 21. 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. *Bio-tecnol Apl* 16 : 149-153.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Herman L, Ridder HD. 1992. Identification of *Brucella* spp. by Using the polymerase chain reaction. *App Env*

- Microbiol* 58: 2099-2101.
25. 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.
 26. Bricke BJ, Halling SM. 1994. 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.
 27. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, et al. 1990. Rapid, sensitive detection of *Brucella abortus* by polymerase chain reaction without extraction of DNA. *Biotech Tech* 4: 31-34.
 28. Lapraik RD, Brown DD, Mann H, et al. 1975. *Brucellosis*: a study of five calves from reactor dams. *Vet Rec* 97: 52-54.
 29. Nicoletti P 1980. The epidemiology of bovine *Brucellosis*. *Adv Vet Sci Comp Med* 24: 69-98.