

<원 저>

국내 경북지역 소에서 분리된 브루셀라 분리주의 생물학적 특성

김정화¹ · 임정주² · 김동혁² · 이진주² · 김대근² · 전무형³ · 김상훈³
장홍희⁴ · 이후장² · 민원기² · 김 석^{24,*}

¹경상북도 기축위생시험소 북부지소, ²경상대학교 수의과대학,
³충남대학교 수의과대학, ⁴경상대학교 농업생명과학연구원
(게재승인: 2010년 2월 25일)

Biological characterization of *Brucella* spp. isolated from cattle in Gyeongbuk, Korea

Jeong-Hwa Kim¹, Jeong Ju Lim², Dong Hyeok Kim², Jin Ju Lee², Dae Geun Kim², Moo-Hyung Jun³,
Sang Hun Kim³, Hong Hee Chang⁴, Hu Jang Lee², Won-Gi Min², Suk Kim^{2,4,*}

¹Northern Branch, Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Andong 760-803, Korea
²College of Veterinary Medicine, and ⁴Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 600-701, Korea
³College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
(Accepted: February 25, 2010)

Abstract : Members of the genus *Brucella* are facultative intracellular bacteria and cause brucellosis, a chronic disease in humans and abortion in animals. In this study, we tested sera for brucellosis of 15 Hanwoo farms in the western part of Gyeongbuk province, resulting 5 farms were brucellosis positive in 2008. We collected blood from 277 heads in the brucellosis positive 5 farms, and performed serological diagnosis, *brucella* positive cattle which had shown higher than 200 antibody titer in tube agglutination test were slaughtered, supramammary lymph nodes were collected, and *Brucella* spp. wild type isolation and identification were performed. From these results, 15 of *Brucella* spp. wild type strains were isolated and all strains were identified as *B. abortus* biotype 1 by biological and molecular analysis. In the antimicrobial susceptibility test, all 15 strains had a similar susceptibility and resistance pattern. This study may be useful for bacteriological and epidemiological understanding of cattle brucellosis in Korea.

Keywords : *Brucella abortus*, Brucellosis, cattle, isolation, PCR

서 론

브루셀라균 속은 많은 종류의 동물과 사람에게 감염할 수 있는 α -Proteobacteria강 Brucellaceae과에 속하는 그람 음성, 통성 세포내 기생 세균이다 [14]. 이들은 숙주 특이성과 선호도에 따라 *Brucella(B.) melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae* 및 *B. canis* 등으로 분류한다 [16].

소의 브루셀라병은 *B. abortus*에 의해 주로 발병되지만

드물게 *B. melitensis*와 *B. suis*에 의한 감염이 일어나기도 한다. 소를 양 또는 염소와 함께 가두어 놓는 남유럽과 서아시아의 일부 국가에서는 *B. melitensis*에 의해 야기될 수 있다 [21]. *B. abortus*는 일반적으로 소와 들소, 물소 등 야생 반추류에 숙주특이성을 가지며, 이외에 말, 낙타, 양, 사슴, 개, 사람 및 기타 동물에도 감염된다. *B. abortus*는 감염된 숙주의 림프계나 유선 조직으로부터 분리되고, 적어도 9개의 생물형(biotype or biovar)이 다수의 변이주를 포함하여 알려져 있으며 [28],

*Corresponding author: Suk Kim
College of Veterinary Medicine Gyeongsang National University, Jinju 600-701, Korea
[Tel: +82-55-751-6631, Fax: +82-55-751-5903, E-mail: kimsuk@gsnu.ac.kr]

그 중 1형이 세계적으로 가장 흔히 분리되는 생물형이다 [21]. 미국의 경우 감염된 소의 약 85%가 1형에 의해 발생되었다고 알려져 있고, 2형은 1986년에 캐나다에서 발생 한 소 브루셀라병으로부터 분리 되었으며, 미국에서는 1, 2, 3 및 4형이 발견 되었다 [27]. 국내에서는 브루셀라병 감염우에서 분리된 *B. abortus* 균 모두 1형이었다고 보고된 바 있다 [6]. Biotype 3과 6은 아프리카와 일부 아시아 지역에서 흔히 분리되고, biotype 2와 4는 미국에서 biotype 1과 함께 흔히 분리된다. Biotype 5와 9는 혼하지는 않지만 영국, 독일 등과 같은 나라에서 중요하며, 남부 아프리카에서는 분리균주의 90%가 biotype 1이며, 10%는 biotype 2인 것으로 알려져 있다 [28]. 현재 브루셀라균 아종과 biotype의 결정은 serotyping, phage typing, dye sensitivity, CO₂ requirement, H₂S production 및 metabolic properties에 의한 phenotypic characterization에 기초하여 구별하고 있으며, *B. abortus*는 biotype 1-6과 9, *B. suis*는 biotype 1-5, 그리고 *B. melitensis*는 biotype 1-3의 biotype으로 구분된다 [6, 21, 28].

브루셀라병의 명확한 진단은 성공적인 브루셀라병 방역사업의 결정적 요소이다. 브루셀라병에 대해 두 가지 진단적 접근방식이 현재 사용되고 있는데, 첫 번째는 혈청학적 진단을 통한 감염된 숙주의 검색이고, 두 번째는 감염된 숙주로부터 병원체의 분리와 동정이다 [24]. 브루셀라병 진단에 사용되는 혈청학적 진단법은 plate agglutination test, tube agglutination test(TAT), latex agglutination test, rose bengal plate test, fluorescence polarization assay, complement fixation test, enzyme-linked immunosorbent assay, agar gel immunodiffusion test, milk ring test, Coombs test, card test 등 다양한 방법이 사용되고 있다 [25, 27]. 브루셀라 균은 실험적으로 감염시킨 소의 자궁경관 점액, 자궁 및 유방 분비물에서 유산 후 36일까지 생존하는 것으로 알려져 있다 [28]. 현재 야외에서 분리된 세균을 브루셀라균으로 동정 할 수 있는 단일 검사법은 없기 때문에 배양시의 성장특성, 혈청학적, 세균학적 또는 분자생물학적 방법 등 복합적인 진단법이 필요하다 [21]. 브루셀라병에 대한 혈청학적 진단법은 다른 세균과 항원적으로 교차반응이 일어나 민감성과 특이성에 문제가 있기 때문에 최근에는 민감도와 특이성이 높은 분자유전학적 방법으로 해당 병원체에 대한 특이 유전자를 증폭시켜 임상가검물 내의 극히 미량까지도 검출할 수 있는 polymerase chain reaction(PCR) 기법에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다 [11]. 브루셀라병의 PCR 기법에 사용되는 유전자는 *B. abortus*의 43 kDa outer membrane protein 유전자, BCSP31, IS711 (IS6501), *omp25*, *omp(2a, 2b)* 및 16S rRNA 등 여러 가지가 보고되어 있다 [11, 13, 15, 20, 26]. 최근에 *B.*

abortus, *B. melitensis*, *B. ovis* 및 *B. suis* 각각의 특이 primers를 한 시험관에 모두 넣어 균형을 동정할 수 있는 Abortus, Melitensis, Ovis 및 Suis(AMOS) PCR법이 개발되어 유용하게 활용되고 있다 [10]. 본 연구에서는 경북지역 내 브루셀라병 혈청검사 결과 양성우로 판정된 한우를 살처분하는 과정에 채취된 유방상립프절로부터 브루셀라균을 분리하고, 분리된 균에 대한 생화학적 검사를 통하여 균형과 혈청형을 동정하였으며, 항생제 감수성 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

혈청검사

혈청검사는 2008년도 경상북도 서부 지역 내 15호의 한우농장을 대상으로 브루셀라병 혈청검사를 수행하여 브루셀라병 감염이 확인된 한우 사육농장 5호를 선정하였고, 12개월령 이상 소 277두를 채혈하여 본 실험에 공하였다. 채혈한 혈액은 채혈 즉시 항응고제가 첨가되지 않은 플라스틱 재질의 진공 시험관에 옮겨 담고 가능한 한 시험관을 수평으로 일정시간 유지시켜 응고시킨 후 냉장상태로 실험실에 운반하였다. 운반된 혈액을 3,000 RPM에서 10분간 원심하여 혈청을 분리하였고 분리된 혈청은 56°C에서 30분간 비동화하여 혈청검사에 사용하였다. 혈청검사는 결핵병 및 브루셀라병 방역실 시요령 [3]에 의거 수행하였으며, 로즈벵갈 응집반응법(RBT)과 시험관 응집반응법(TAT)을 이용하였다.

브루셀라균 분리

브루셀라균 이외의 균의 성장을 억제하기 위한 선택 배지는 앞서 보고한 논문을 참고하여 제조하였다 [7]. 브루셀라균의 일반적 배양에 사용되는 tryptic soy agar (TSA; Difco, USA)배지를 증류수에 넣고 가열하여 녹인 다음 121°C에서 15분간 멸균한 후 50°C로 온도를 낮추고, 56°C에서 30분 동안 비동화 한 5% horse serum (Sigma, USA)을 무균적으로 첨가하여 사용하였고, 선택 배지로서 polymyxin B 5 mg, bacitracin 25 mg, cycloheximide 100 mg, nalidixic acid 5 mg, nystatin 100 mg, 그리고 vancomycin 20 mg을 syringe filter(0.45 µm; Corning, USA)로 여과하여 serum dextrose agar(SDA)에 첨가하여 사용하였다.

브루셀라병 방역실시요령 [3]에 따라 TAT에 의해 양성우로 판정된 한우 사육농가 5호의 23두를 살처분하는 과정 중 유방상립프절을 채취한 후 냉장상태에서 실험실로 운반하여 림프절 주위의 지방조직을 손질하고 95% 에탄올에 담근 후 꺼내어 화염 멸균 한 후 균질화 하여 SDA 선택배지에 도말 하였으며, 37°C, 10% CO₂ 조건

하에서 3-5일간 배양하였다. 브루셀라균으로 의심되는 투명하고 smooth한 원형집락(직경 약 2-4 mm)을 SDA 선택배지에 순수 배양한 후 시험에 사용하였다. 시험에 사용한 표준주는 국립수의과학 검역원으로부터 분양 받은 *B. abortus* 544를 이용하였다.

분리균의 동정 및 biotype 규명

분리균의 염색은 Modified Hucker's Gram 염색법 [18]에 따라 분리균을 염색하여 형태와 염색 상태를 관찰하였으며, 분리균의 집락 형태는 TSA에서 4일간 배양한 것을 crystal violet 염색을 통해 집락형태를 관찰하였다 [16]. 그 외의 acriflavine 시험과 유당 및 포도당 발효시험, 용혈성 검사, 운동성 시험, oxidase 시험, catalase 시험 및 urease 시험을 수행하여 아외주를 동정하였다 [7].

브루셀라균으로 동정된 아외주는 CO₂ 요구성, H₂S 생산능, thionin 및 basic fuchsin 함유 배지에서의 성장능력 및 2종의 혈청, 즉 A monospecific antiserum 과 M monospecific antiserum과의 응집반응을 토대로 biotype을 규명하였다 [4, 8].

분리균의 항균제 감수성 검사

항균제 감수성 검사는 분리균 15주와 표준균주 *Brucella abortus* 544를 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI, 2007)에 따라 디스크 확산 법으로 수행하였으며, 공시한 항균제는 BD(USA) 제품인 amikacin(30 µg), amoxicillin/clavulanic acid(20/10 µg), ampicillin(10 µg), bacitracin(10 U), cefaclor(30 µg), cefepime(30 µg), cephalothin(30 µg), ciprofloxacin(5 µg), colistin(10 µg), erythromycin(15 µg), gentamycin(10 µg), kanamycin(30 µg), nalidixic acid(30 µg), neomycin(30 µg), norfloxacin (10 µg), penicillin(10 U), polymyxin B(300 U), rifampin(5

µg), streptomycin(10 µg), tetracycline(30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole(1.25/23.75 µg) 및 vancomycin(30 µg) 등 22종에 대하여 검사하였다. 판정은 CLSI(2007)의 Enterobacteriaceae 균에 대한 판정기준에 준하여 실시하였다.

PCR

분리된 아외주의 브루셀라균 동정과 subtype을 규명하기 위하여 PCR을 수행하였다. 브루셀라균 동정을 위해 브루셀라 균의 특이적인 유전자부위인 BCSP, BCSP31, 16S rRNA를 작제하였고, 브루셀라 균 subtype을 규명하기위해 IS711 element(AMOS)에 기초하여 primer를 설계한 다음 제조회사(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 제조하였다 [9, 10, 29] (Table 1).

TSA에 배양된 균주의 Genomic DNA 추출은 bacterial genomic DNA kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 추출하였으며, PCR을 위한 template DNA로 사용하였다. PCR은 PCR premix kit(Bioneer, Korea)을 이용하여 25 pg template DNA와 유전자 특이 primer를 각각 10 pM를 첨가하여 수행하였으며, PCR 반응조건은 Table 1과 같다. PCR이 끝난 후 증폭된 유전자 부위의 확인을 위해 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose 에서 확인하였다.

결 과

한우 사육농가 15호 중 5개의 농가에서 브루셀라병 양성반응을 보였고, 이들 양성 농가 5호의 한우 277두에 대한 검사결과 RBT에서 54두(19%), TAT에서 40두(14%)가 양성으로 판정되었고, TAT에서 양성으로 판정된 40두 중 23두로부터 유방상립프질을 채취하여 균 분

Table 1. Oligonucleotide primers and PCR condition used in this study

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Size of products (bp)	PCR conditions
BCSP31	F (B4): TGC-CTC-GGT-TGC-CAA-TAT-CAA	223	35 cycle (90°C 60 sec, 60°C 30 sec, 72°C 60 sec)
	R (B5): CGC-GCT-TGC-CTT-TCA-GGT-CTG		
16S rRNA	F (F4): TCG-AGC-GCC-CGC-AAG-GGG	905	30 cycle (95°C 30 sec, 54°C 90 sec, 72°C 90 sec)
	R (R2): AAC-CAT-AGT-GTC-TCC-ACT-AA		
BCSP	F: GTA-TCG-TTC-TTG-AAG-CCT-AC	711	40 cycle (94°C 15 sec, 55°C 20 sec, 72°C 60 sec)
	R: GTG-CAT-TTC-AAT-AGG-CTA-GAG		
AMOS	<i>abortus</i> : GAC-GAA-CGG-AAT-TTT-TCC-AAT-CCC	498	40 cycle (95°C 15 sec, 52°C 30 sec, 72°C 90 sec)
	<i>melitensis</i> : AAA-TCG-CGT-CCT-TGC-TGG-TCT-GA	731	
	<i>ovis</i> : CGG-GTT-CTG-GCA-CCA-TCG-TCG	976	
	<i>suis</i> : GCG-CGG-TTT-TCT-GAA-GGT-TCA-GG	285	
	IS711: TGC-CGA-TCA-CTT-AAG-GGC-CTT-CAT	-	

Table 2. Basic biochemical and metabolic profiles of isolates from *Brucella* (*B.*) sero-positive cattle

Tests	<i>B. abortus</i> 544	15 isolates
Colony morphology	smooth	smooth
Acriflavine test	-	-
Crystal violet test	-	-
Gram stain	G(-) rod	G(-) rod
Lactose fermenting on MacConkey agar	-	-
Hemolysis on Blood agar	-	-
Produces acid on agar containing glucose	-	-
Motility at 25°C and 37°C	-	-
Oxidase test	+	+
Catalase test	+	+
Urease test	+	+
CO ₂ requirement	+	+
H ₂ S production	+	+
Growth on dyes thionin (1 : 25,000; 1 : 50,000; 1 : 100,000)	-	-
basic fuchsin (1 : 50,000; 1 : 100,000)	+	+
Agglutination by antiserum of A	+	+
M	-	-
Final identification of isolated strain		<i>B. abortus</i> biotype 1

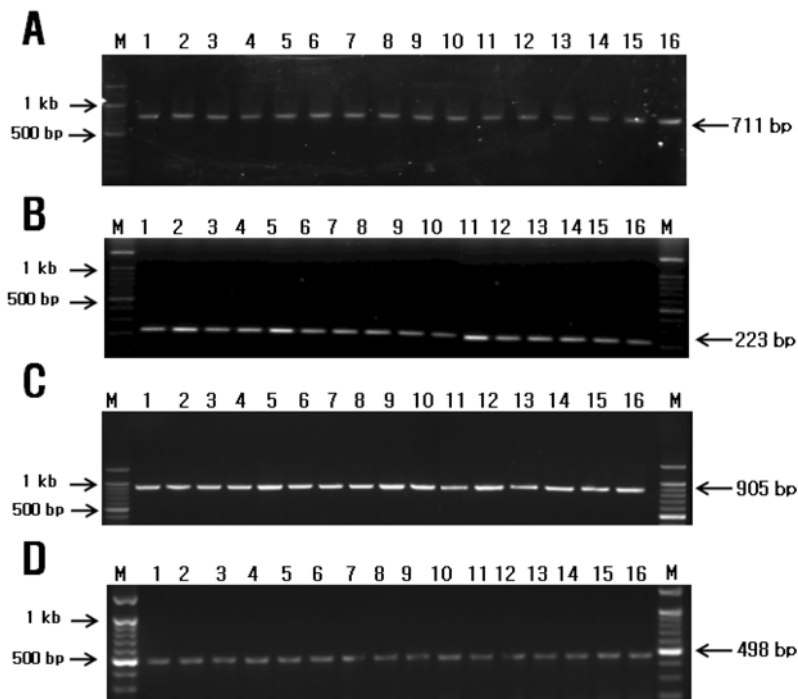


Fig. 1. Amplified patterns of the genes of *Brucella* spp. by PCR using various primer sets. BCSP (A), BCSP31 (B), 16S rRNA (C) and AMOS primer sets (D) were used to analysis for *Brucella* specific gene amplification (A, B and C) and *Brucella* subtype identification (D), resulting that 15 wild type strains showed 711, 223 and 905 bp amplified products for *Brucella* specific genes and 498 bp amplified products for *B. abortus* specific pattern, respectively. M: 1 kb DNA ladder marker, Lane 1-15: *B. abortus* wild type strains, Lane 16: *B. abortus* 544.

리 시도하여 15주에서 브루셀라균이 분리되어 균 분리율은 65%(15/23)로 나타났다. 균이 분리된 15주의 혈청 항체가는 모두 TAT에서 200 이상의 높은 항체가를 보였다.

야외분리균 15주의 성장 시험결과는 Table 2와 같다. 즉, SDA배지에 나타난 집락은 모두 그람음성 간균이었고, 형태적으로 smooth형 집락이었으며, 0.1% acriflavine test 및 10% crystal violet test에서 음성으로 판정되었다. 야외분리균을 MacConkey agar에 접종 배양할 때 무색 유당 비분해 집락을 형성하였고, blood agar에서는 용혈성을 나타내지 않았으며, glucose를 분해하지 않았다. 모든 분리균은 25°C와 37°C 모두에서 운동성이 없었으며, oxidase test, catalase test, H₂S 생성 및 urease 생성실험에서는 모두 양성이었다. 또한 초대 배양시 10% CO₂ 상태에서 집락 형성이 잘 되었다. Thionin과 basic fuchsin이 첨가된 색소배지에서의 성장 능력을 조사한 바, thionin이 함유된 배지에서 전혀 발육하지 않았으며, basic fuchsin이 함유된 배지에서는 발육하였으며, 2종의 항혈청으로 응집반응을 조사한 결과 분리된 균주 모두 A monospecific antiserum에 대하여 응집하였으나 M monospecific antiserum에는 응집하지 않아 분리된 균주

15주를 *B. abortus* biotype 1임이 확인되었다(Table 2).

분리된 야외주의 동정하기 위하여 분리된 야외주의 분자유전학적 기법을 수행하고자 확립된 BCSP, 및 BCSP31, 16S rRNA primer sets를 이용하여 표준균주인 *B. abortus* 544와 야외 분리균 15주를 공시하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 공시된 primers 모두 BCSP는 711 bp, 16S rRNA는 905 bp, 그리고 BCSP31은 223 bp에서 증폭된 브루셀라균 특이 유전자 fragments가 각각 관찰되어 브루셀라 균임을 확인 할 수 있었으며(Figs. 1A-C), 브루셀라 균형 선별용 AMOS primer sets를 이용한 PCR에서는 498 bp에서 증폭된 *B. abortus* 특이 DNA fragments가 관찰되어 분리된 15주 모두 *B. abortus*임이 확인되었으며, 생물학적 성장시험과 같은 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 1D).

분리균주와 표준균주 544에 대한 항생제 감수성검사 결과는 표준균주인 *B. abortus* 544주와 야외 분리균주 15주가 동일한 항생제 내성 패턴을 보이는 것으로 나타났다으며, 항생제에 대한 감수성 결과는 amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, cefaclor, cefepime, ciprofloxacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, polymyxin B, streptomycin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole 등 12

Table 3. Antibiotic sensitivity of *Brucella abortus* isolates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	544
Amikacin	S*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Amoxicillin/clavulanic acid	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicillin	R*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Bacitracin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefaclor	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefepime	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cephalothin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Colistin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Erythromycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kanamycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nalidixic Acid	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Neomycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Norfloxacin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Penicillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Polymyxin B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Streptomycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tetracycline	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Trimethoprim/sulfamethoxazole	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

*S: susceptibility, R: resistance.

중에 감수성이 있었으며, ampicillin, bacitracin, cephalothin, colistin, erythromycin, nalidixic acid, norfloxacin, penicillin, rifampin, vancomycin 등 10종에는 감수성이 없었다(Table 3).

고 찰

브루셀라병은 근래 국내 소에서 폭발적으로 발생하였고, 최근에는 낮은 비율이지만 여전히 꾸준히 발생하고 있는 중요한 인수공통전염병 중 하나이다. 국내에서 실시하고 있는 소의 브루셀라병 공인 진단법은 한육우의 경우 브루셀라병 검사 의뢰된 혈액을 RBT로 바로 검사 한 후, 1차 검사에서 양성 및 의양성 반응을 나타내는 개체를 다시 TAT로 양성우를 확진하여 감염소로 판정되는 경우 살처분하는 과정을 거친다 [3]. 브루셀라균에 감염된 동물은 종종 유산과 유량의 감소가 일어나며, 감염된 동물의 80%가 유방상립프절과 유선에 브루셀라균이 만성적으로 자리 잡고 있어 체액이나 유즙을 통하여 계속적으로 배출되기 때문에, 유방상립프절은 브루셀라 균의 분리에 가장 적합한 장기로 알려져 있다 [23]. 또한 심 등 [6]은 항체 역가와 균 분리 서로 상관관계가 있다고 보고 하였으며, 200배 이상의 항체를 갖는 감염체에서 균 분리가 가능한 것으로 보고 하였다. 본 실험에서는 앞선 연구결과를 토대로 야외 브루셀라균 분리를 위해 매몰처리 전 시험관응집반응법에서 200배 이상을 나타낸 개체 23두를 대상으로 유방상립프절에서 균 분리를 수행 하여, 15주의 야외주를 분리하였으며, 65%(15/23)의 높은 분리율을 확인 할 수 있었다. 정 등 [5]은 경북지역의 젖소 20두 유래 유방상립프절, 유즙, 자궁에서 브루셀라균을 분리하여 모두 *B. abortus* biotype 1인 것으로 보고하였고, 김 등 [2]은 제주도 젖소로부터 브루셀라균 8주를 분리하여 이 중 5주는 *B. abortus* biotype 1이고 3주는 *B. suis* biotype 1으로 보고하였으며, 김 등 [1]은 제주도 브루셀라병 양성 반응우로부터 10주를 분리하여 모두 *B. abortus* biotype 1인 것으로 보고하였고, 심 등 [6]은 경기지역의 젖소 유래 유방상립프절, 유즙, 비장에서 38주를 분리하여 모두 *B. abortus* biotype 1이었다고 보고한 바 있다. 본 실험 결과에서도 경북지역 한우로부터 분리된 15주의 분리주에서 biotype을 분석해본 결과 모두 *B. abortus* biotype 1로 확인되어, 국내에서 브루셀라병을 유발하는 병원체는 거의 대부분 *B. abortus* biotype 1에 의해 발생되는 것으로 조사되었다.

분리균주와 표준균주에 대한 항생제 감수성검사 결과 모든 균주가 amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, cefaclor, cefepime, ciprofloxacin, gentamicin, kanamycin,

neomycin, polymyxin B, streptomycin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole 등 12종의 항생제에 감수성이 있었으며, ampicillin, bacitracin, cephalothin, colistin, erythromycin, nalidixic acid, norfloxacin, penicillin, rifampin, vancomycin 등 10종의 항생제에는 감수성이 없었다. García-Rodríguez 등 [19]은 ciprofloxacin 등 6종의 quinolone계 항균제의 *B. melitensis*와 *B. abortus*에 대한 MIC를 실험한 결과 *B. abortus*에 대해서 quinolone계 항균제의 살균작용이 효과적이지 않다고 보고하였으나, 본 실험에서는 디스크 확산시험결과 표준주와 야외주 모두에서 quinolone계 항균제인 ciprofloxacin에 대해 높은 감수성은 아니지만 미약한 감수성이 있는 것으로 나타나 시험방법에 따라 약간의 민감도 차이가 나타날 수 있는 것으로 판단하였다.

PCR기법을 이용한 병원체의 검출법은 적절하게 표준화 되었을 때 가검물에 존재하는 균체 DNA를 특이하게 증폭시켜 검출할 수 있으며, 브루셀라병의 PCR법에 의한 진단으로는 *B. abortus*의 43 kDa outer membrane protein 유전자, BCSP31, IS711(IS6501), *omp25*, *omp(2a, 2b)*, *omp1*, *omp2*, *cdsA*, *lpxD*, *fabZ* 및 16S rRNA 등 여러 가지가 보고되어 있다 [10, 13, 15, 19, 25].

본 실험에서 분리된 *B. abortus* 야외 분리주를 대상으로 PCR를 실시한 결과, BCSP, 16S rRNA 및 BCSP31 primer를 사용했을 때 모두 특정부위의 증폭 산물이 관찰되어 브루셀라균으로 밝혀졌으며, 분리균주의 균종을 파악하기 위하여 확립된 PCR법인 AMOS PCR을 실시한 결과 *B. abortus* 544주와 동일한 유전자 증폭 산물이 관찰되어 *B. abortus*로 확인되었다. 이는 AMOS PCR 방법의 활용이 국내 야외분리주에 대한 균종을 규명하는데 있어 유용하게 사용 될 뿐만 아니라, 생물학적 특성과 분자유전학적 특성을 동시에 활용함으로써 야외분리 브루셀라균의 균형을 규명하는데 있어 유용한 방법임을 확인 할 수 있었으며, 국내 경북지역에서 발생되고 있는 브루셀라병의 원인체가 *B. abortus* biotype 1에 의한 감염임을 확인 할 수 있었다.

결 론

농장에 많은 피해를 주고 있는 브루셀라병을 근절하기 위해서는 브루셀라 야외주의 생물학적 특징을 알고 정확한 진단을 하는 것이 꼭 필요하다. 이번 실험에서는 브루셀라병 혈청검사를 실시하여 시험관응집반응법에 200배 이상의 혈청항체 역가를 보인 소를 대상으로 채취한 유방상립프절에서 브루셀라균을 분리하고 분리균의 생물학적, 분자유전학적 성상을 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 브루셀라병 혈청검사 결과 TAT에서

200배 이상의 혈청항체 역가를 보인 5개 한우농가의 23 두 중 15두로부터 브루셀라균을 분리하여 65%의 균 분리 보였고 이는 모두 *B. abortus* biotype 1로 동정되었다. 분리 동정된 균들은, ampicillin, bacitracin, cephalothin, colistin, erythromycin, nalidixic acid, norfloxacin, penicillin, rifampin, vancomycin에는 감수성이 없었음이 확인되었다. 확립된 BCSP, 16S rRNA, BCSP31 primers를 이용하여 아외주 모두 브루셀라 균임을 확인하고 AMOS PCR을 통하여 분리된 균 모두 *B. abortus*로 확인되었다. 이로서 경북지역에 만연해 있는 브루셀라병의 원인체를 규명 할 수 있었고, 본 결과는 국내 소 브루셀라병의 원인체에 대한 미생물학적 기초 자료로서 활용 될 뿐만 아니라 본 질병에 대한 역학적 접근에 있어서 유용한 자료로 사용 될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단과제 “총체적 단백질분석을 통한 국내분리 *Brucella abortus* 균의 항원성 규명과 고민감도 혈청학적 진단기법 개발(과제번호 331-2007-1-E00263)”의 일부임

참고문헌

1. 김우택, 이완수, 김공식. 제주도내 축우 부루셀라병 발생상황 조사. 한국가축위생학회지 1991, **14**, 104-109.
2. 김종만, 정석찬, 박정문. 부루셀라 양성우에서 분리한 균의 성장과 혈청학적 진단법 비교. 농사시험논문집 1988, **30**, 1-6.
3. 농림수산식품부. 결핵병 및 브루셀라병 방역 실시 요령. 농림수산식품부 고시 제2009-147호. 농림수산식품부, 과천, 2009.
4. 우종태, 서익수. 홀스타인 유우로부터 *Brucella abortus*의 분리와 분리균의 성장에 관한 연구. 서울대학교수의대 논문집 1986, **11**, 103-118.
5. 정중식, 조용준, 박청규. 경북지방 젓소로부터 *Brucella abortus*의 분리 및 균형별. 대한수의학회지 1988, **28**, 339-343.
6. 심항섭, 고태오, 유성중, 우종태, 박병옥, 김성렬, 박유순. 경기도에서 발생하는 유우부루셀라병에 관한 연구. I. 감염우의 역학조사 및 분리균의 특성에 관하여. 한국가축위생학회지 1996, **19**, 189-198.
7. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Berger JM. Techniques for the Brucellosis Laboratory. pp. 1-156, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.
8. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory Techniques in Brucellosis. 2nd ed. pp. 1-163, World

- Health Organization, Geneva, 1975.
9. Alton GG, Maw J, Rogerson BA, McPherson GG. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal tests. Aust Vet J 1975, **51**, 57-63.
10. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J Trop Med Hyg 1992, **95**, 271-275.
11. Bricker 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 1994, **32**, 2660-2666.
12. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. J Clin Microbiol 1995, **33**, 1640-1642.
13. Cloeckart A, Verger JM, Grayon M, Grépinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. Microbiology 1995, **141**, 2111-2121.
14. Cloeckart A, Grayon M, Grépinet O, Boumedine KS. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. Microbes Infect 2003, **5**, 593-602.
15. Corbel MJ, Gill KPW, Redwood DW. Diagnostic Procedures for Non-Smooth *Brucella* Strains. pp. 74-92, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, 1979.
16. Corbel MJ, Gill KPW, Thomas EL. Methods for the Identification of *Brucella*. pp. 4-35, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, 1978.
17. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol 1990, **69**, 216-227.
18. Finegold SM, Martin WJ, Scott EG. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 5th ed. pp. 146-187, C. V. Mosby, St. Louis, 1978.
19. García-Rodríguez JA, García Sánchez JE, Trujillano I, García Sánchez E, García García MI, Fresnadillo MJ. Susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to clinafloxacin and four other new fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 1995, **39**, 1194-1195.
20. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella*

- spp. by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 1992, **58**, 2099-2101.
21. **International Office of Epizootics**. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees. 6th ed. pp. 624-659, OIE, Paris, 2008.
 22. **Kim S, Watarai M, Suzuki H, Makino S, Kodama T, Shirahata T**. Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. Microb Pathog 2004, **37**, 11-19.
 23. **Leal-klevezas DS, Martínez-vázquez IO, López-merino A, Martínez-Soriano JP**. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. J Clin Microbiol 1995, **33**, 3087-3090.
 24. **López-Goñi I, Moriyón I**. *Brucella*: Molecular and Cellular Biology. pp. 1-428, Horizon Bioscience, Norfolk, 2004.
 25. **Lord VR, Rolo MR, Cherwonogrodzky JW**. Evaluation of humoral immunity to *Brucella* sp in cattle by use of an agar-gel immunodiffusion test containing a polysaccharide antigen. Am J Vet Res 1989, **50**, 1813-1816.
 26. **Morata P, Queipo-ortuño MI, De Dios Colmenero J**. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 1998, **36**, 2443-2446.
 27. **Nielsen K, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR, Bundle DR**. Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. Am J Vet Res 1989, **50**, 5-9.
 28. **Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD**. Veterinary Medicine. 10th ed. pp. 963-984, Saunders, Philadelphia, 2007.
 29. **Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I**. Specific detection of *brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol 1995, **33**, 615-617.