

# Canine brucellosis 검출을 위한 ELISA 진단법 확립

허진 · 백병길\*

전북대학교 수의과대학

(접수 2011. 5. 12, 게재승인 2011. 6. 1)

## Development of ELISA for detection of canine brucellosis

Jin Hur, Byeong-Kirl Baek\*

Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received 12 May 2011, accepted in revised from 1 June 2011)

### Abstract

This study was carried out to develop enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of canine brucellosis in dogs experimentally inoculated with *Brucella abortus* 1119-3 and *B. canis* RM666. Groups A, B and C of dogs (each group consisting of three dogs) were orally inoculated with approximately  $5 \times 10^9$  colony-forming units of *B. abortus* and *B. canis*, and with sterile pyrogen-free PBS, respectively. The animals were monitored at regular intervals up to the 12th week post inoculation (PI) by standard tube agglutination test (STAT), plate agglutination test (PAT), Rose Bengal test (RBT), 2-mercaptoethanol rapid slide agglutination test (2ME-RSAT) and ELISA. The induced antibody titers in group A dogs were detected from the first week PI to the eighth week PI in STAT, PAT and RBT using the inactivated whole cells of *B. abortus* 1119-3 as antigens, while no sera in groups B and C dogs reacted with the antigens. In 2ME-RSAT using whole cells of *B. canis* M-strain as antigens, the induced antibody titers in group B dogs were observed at the second week PI and persisted for the 12th week PI, while sera of groups A and C dogs did not react with the whole cells. In ELISA using cytoplasmic fractions antigen of *B. abortus* 1119-3, the mean optical density of antibodies in groups A and B was detected from the first and second weeks PI, respectively, and persisted for 12th week PI, while sera of group C did not cross-react with the fractions antigen. However, in ELISA using the hot saline extracts of *B. canis* M- as an antigen, the induced antibody titers in only group B dogs were detected from second week PI and persisted for until the end of this study. These results indicate that the ELISA using *B. abortus* 1119-3 cytoplasmic fractions as antigens can be a good candidate for detection of brucellosis by *B. abortus* as well as *B. canis* in dogs.

**Key words** : *Brucella canis*, *Brucella abortus*, ELISA, Cytoplasmic fractions, Dogs

### 서론

개에서 브루셀라병은 주로 *Brucella (B.) canis*에 감염되어 발생하며 드물게 *B. abortus*, *B. suis* 또는 *B. melitensis*의 감염에 의해 발생하는 것으로 보고되고 있다 (Kormendy와 Nagy, 1982; Barr 등, 1986; Forbes와 Pante-koek, 1988; Forbes, 1990; Thanappa 등, 1990; Palmer와

Chevill, 1997). 더불어 이들 균주는 개에서 다른 개로, 소나 돼지에서 개로 다시 이들 균에 감염된 개에서 소나 돼지로 심지어는 개에서 사람에게 전염될 수 있는 것으로 보고되고 있다(Bicknell, 1976; Kormendy와 Nagy, 1982; Barr 등, 1986; Davis 등, 1988; Forbes, 1990; Palmer와 Cheville, 1997; Lucero 등, 2005). 특히 개는 오랫동안 사람과 소 사이에서 가장 밀접하게 접근하여 생활해 오고 있는 애완동물로서 개에서의 브루셀라병 감염은 사람과 소에 재감염시킬 기회가 많다(Blankenship

\*Corresponding author: Byeong-Kirl Baek, Tel. +82-63-270-2559, Fax. +82-63-270-3780, E-mail. baekbk@chonbuk.ac.kr

과 Sanford, 1975; Palmer와 Cheville, 1997). 즉, *B. abortus*에 감염된 소로부터의 개의 감염 예(Taylor 등, 1975; Bicknell, 1976; Bicknell과 Bell, 1979; Forbes, 1990)와 이와 같은 감염경로를 통한 인공 감염 보고 예(Pidgeon 등, 1987; Scanlan 등, 1989)를 접할 수 있다. 개에서 이들 균주의 감염에 의한 임상 증상은 드물지만, 유산과 부고환염 그리고 관절염 등이 보고되고 있다(Clegg, 1968; Carmichael, 1990). 특히 이들 균에 감염된 개는 전형적으로 잠행성 상태이며 많은 감염 개들은 준임상 상태를 보이기 때문에 사람이 임상 상태를 보이지 않는 감염된 개에게 먹이를 주거나 관리할 때 우연한 접촉을 통해 사람에게 감염될 수 있어 공중보건학적으로 매우 중요한 질병 중 하나이다(Pikerill과 Carmichael, 1972; Alton 등, 1975; Zoha와 Carmichael, 1982; Carmichael, 1990; Forbes, 1990; Thanappa 등, 1990).

연구자들은 국내에서 브루셀라병을 근절 시키기 위한 연구의 하나로 *B. canis*를 개에게 인공 감염시킨 후 형성된 항체를 여러 종류의 진단 방법으로 상호 비교하여 인공감염의 성립과정을 관찰한데(백 등, 2000) 이어 국내 젓소에서 분리한 *B. abortus* biotype 1을 불활성화시킨 항원으로 개에게 인공 면역시킨 후 소에서의 브루셀라병 표준 진단법인 standard tube agglutination test (STAT), plate agglutination test (PAT) 그리고 rose bengal test (RBT)와 개에서 사용되는 2-mercaptoethanol rapid slide agglutination test (2ME-RSAT) 등의 방법(허 등, 2001)으로 항체의 형성과 소실을 관찰한 데 이어서 국내 토종견에 *B. abortus*와 *B. canis*를 경구 감염시킨 후 유도된 항체 역가를 동시에 진단할 수 있는 진단법을 개발하기 위해 *B. abortus* 1119-3을 항원으로 하여 소 등에서 브루셀라병 진단법으로 사용되고 있는 STAT, PAT, RBT와 개에서 *B. canis*에 의한 브루셀라병 검출시 사용되고 있는 진단법인 2ME-RSAT를 *B. canis* M-균주의 hot saline 추출물과 *B. abortus* 1119-3의 세포질성 단백질을 항원으로 한 ELISA와 비교 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

국립수의과학검역원에서 *B. canis* RM666과 *B. canis* M- 균주 그리고 *B. abortus* 1119-3을 분양받아 *B. abortus*

1119-3은 potato infusion agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에, *B. canis* RM666과 *B. canis* M- 균주는 Brucella agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 접종하여 37°C에서 24~72시간 배양하여 실험에 사용하였다.

### 실험 동물

전라북도 전주에 있는 한 개 사육농가에서 구매한 토종견 중 2ME-RSAT와 RBT를 실시하여 음성인 평균 생후 1년생 9두를 구매하여 3개 군으로 구분하여 실험에 사용하였다.

### *B. abortus* 1119-3와 *B. canis* RM666 인공감염

*B. abortus* 1119-3을 potato infusion agar에, *B. canis* RM666을 Brucella agar에 각각 접종하여 phosphate buffered saline (PBS)로 부유시켜 회수한 후 50 ml PBS에 약  $5.0 \times 10^9$  CFU가 되도록 균수를 조정하여 하룻밤 절식시킨 체중 10~13 kg 3두씩의 개에게 각각 경구 감염시켰으며, 대조군 개 3두에도 같은 방법으로 같은 양의 PBS를 경구 투여하였다.

### 채혈

*B. abortus* 1119-3과 *B. canis* RM666을 감염 2일 전 그리고 감염 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12주 후에 요골쪽 피부정맥에서 채혈, 혈청을 분리하여 -70°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 열정학적 진단

*B. abortus* 1119-3과 *B. canis* RM666을 인공 감염시킨 후에 형성된 항체 역가는 앞선 논문(백 등, 2000; 허 등, 2001)에서 사용한 *B. abortus* 1119-3과 *B. canis* M- 균주를 배양하여 whole cells를 진단액으로 제조한 STAT, PAT, RBT 그리고 2ME-RSAT를 *B. canis* M- hot saline 추출 항원과 *B. abortus* 1119-3의 세포질성 항원을 항원으로 한 ELISA와 상호 비교시험하였다.

**STAT:** 인공 감염시킨 후의 항체 역가는 허 등 (2001)의 방법에 따라 *B. abortus* 1119-3을 배양하여 STAT 진단 항원으로 제조하여 응집 정도를 혈청 희석배율별로 측정하였으며 3두의 측정치를 산술 평균하였다.

**PAT:** *B. abortus* 1119-3을 Alton 등(1975)의 방법에 따라 PAT 진단 항원으로 제조하여 각 혈청을 희석배율 별로 측정하여 3두의 측정치를 산술 평균하였다. 이들 혈청의 희석배율은 Alton 등(1975)의 STAT 판정기준에서의 혈청 첨가량에 따라 1:25 (80  $\mu$ l), 1:50 (40  $\mu$ l), 1:100 (20  $\mu$ l), 1:200 (10  $\mu$ l), 1:400 (5  $\mu$ l), 1:800 (2.5  $\mu$ l), 1:1,600 (1.25  $\mu$ l) 그리고 1:3,200 (0.625  $\mu$ l)으로 항체 역가를 표시하였다.

**RBT:** *B. abortus* 1119-3을 허 등(2001)의 방법에 따라 제조한 후 각 혈청을 희석배율별로 측정하였다. 이들 혈청의 항체 역가는 위의 PAT와 동일한 방법으로 표시하였다.

**2ME-RSAT:** *B. canis* M- 균주를 백 등(2000)의 방법에 따라 진단용 항원을 준비하여 혈청을 분주한 후 0.2 M 2-mercaptoethanol 40  $\mu$ l를 첨가하고 준비한 진단액 40  $\mu$ l를 첨가한 후 2분 이내에 응집 여부를 확인하였으며, 이들 혈청의 항체 역가는 위 PAT와 동일한 방법으로 표시하였다.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

***B. canis* M- 균주를 ELISA 항원으로 한 경우:** *B. canis* M-를 Mateu-de-Antonio 등(1993)의 방법에 따라 항원을 준비하여 단백질량을 측정한 다음  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 ELISA 항원으로 사용하였다.

준비된 항원은 50 mM carbonate buffer (15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.6)를 사용하여 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 희석하였다. 희석 항원을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 반응시켜 항원을 부착시켰다. 각 well에 Tween 20이 0.05% 함유된 PBS, pH 7.4 (PBST)로 3회 세척하였다. 마지막 세척 후 1% 소혈청 알부민(Sigma Co., Saint Louis, MO, USA)을 함유한 PBS, pH 7.4를 각 well에 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후 PBST로 3회 세척하였다. 비동화된 혈청을 PBS로 희석(1:200)하여 100  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 분주하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 다음 PBST로 3회 세척하였다. 개 IgG (H+L) 항원에 대한 peroxidase 부착 염소 혈청(peroxidase-labeled affinity purified antibody to dog IgG (H+L) goat; KPL Co., MD, USA)을 1:2,000으로 희석하여 100  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 분주한 다음  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 4회 세척하였다. 기질액(0.1 M citric acid 12.5 ml, 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  12.85 ml, DW 25 ml, o-phenyldiamine

20 mg, 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{l}$ )을 100  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 분주하여 30분간 발색시킨 다음 3.0 M 황산을 50  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 분주하여 발색을 정지시키고 ELISA reader (TECAN, Salzburg, Austria)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

***B. abortus* 1119-3의 세포질성 단백질을 ELISA 항원으로 한 경우:** *B. abortus* 1119-3를 김 등(1998)의 방법을 약간 변형하여 ELISA용 항원으로 제조하였다. 즉, *B. abortus*를 김 등(1998)의 방법에 따라 준비하여 불활화 시켰다. 이 불활성화 부유액에 Triton X-100 (Merck Co., Rahway, USA)과 Sarkosyl (N-lauroylsarcosine, Sigma Co., Saint Louis, MO, USA)이 각각 0.4%가 되게 가하여, 세포외막 단백질과 세포질성 단백질을 분리하였다. 이 반응액을  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 100,000 $\times$ g로 1시간 원심분리 하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 다음 세포질성 단백질 항원으로 준비하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

준비된 항원을 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 증류수로 희석하여 50 mM carbonate buffer (pH 9.6)로 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 희석하였다. 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 부착시켰다. 각 well를 PBST로 3회 세척하고 차단 완충액(탈지유가 1.0% 함유된 PBS, pH 7.4)을 200  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 분주하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후 3회 세척하였다. 비동화된 혈청을 PBS를 이용하여 1:200으로 희석하여 100  $\mu\text{l}$ 씩 가한 후  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 다음 3회 세척하였다. Peroxidase 부착 염소 혈청을 100  $\mu\text{l}$ 씩 가해  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시키고 4회 세척 후 기질액을 가해 실온에서 20분간 발색시킨 후 3.0 M 황산으로 반응을 정지시켜 ELISA reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

### STAT

국내 토종견에 *B. abortus* 1119-3과 *B. canis* RM666을 인공 감염시킨 후 형성된 항체 역가를 측정하고자 *B. abortus* 1119-3을 STAT 진단 항원으로 제조하여 비교실험 하였던 바, Table 1에서와 같은 결과를 얻었다. 즉, *B. abortus* 1119-3을 약  $5.0 \times 10^9$  CFU로 인공 감염시킨 경우에는 감염 1주, 2주, 4주, 6주 그리고 10주 후에 각각 1:530, 1:260, 1:160, 1:100 그리고 1:10의 항체 역가가 각

각 관찰되었지만, *B. canis* RM666을 인공 감염시킨 경우와 대조군의 경우에는 응집반응이 관찰되지 않았다.

## PAT

*B. abortus* 1119-3을 PAT 진단 항원으로 제조하여 각 균주를 인공 감염시킨 후 형성된 항체 역가를 측정된 결과는 Table 1에서 보는 바와 같았다. 즉, *B. abortus* 1119-3을 인공 감염시킨 경우에는 STAT의 경우와는 달리 감염 1주, 2주, 4주 그리고 6주 후에 각각 1:330, 1:260, 1:110 그리고 1:30의 항체 역가가 낮게 관찰되었다. 그렇지만 *B. canis* RM666을 인공 감염시킨 후에 얻은 혈청과 대조군 모두에서 응집반응이 관찰되지 않았다.

## RBT

*B. abortus* 1119-3을 RBT 진단 항원으로 제조하여 인공 감염시킨 후의 항체 역가를 측정된 결과는 Table 1에서와

같다. 즉, *B. abortus* 1119-3을 인공 감염시킨 경우에는 감염 1주 후부터 1:260으로 항체 역가가 관찰되기 시작하여 2주, 4주, 6주 그리고 8주 후에 각각 1:260, 1:1,330 그리고 1:1,600의 항체 역가가 관찰되었다. 그렇지만, *B. canis* RM666을 인공 감염시킨 경우와 대조군에서는 실험이 끝날 때까지 응집반응이 관찰되지 않았다.

## 2ME-RSAT

*B. canis* M- 균주를 2ME-RSAT 진단 항원으로 제조하여 인공감염 후 형성된 항체 역가를 측정하였던 바, Table 2에서와 같이 *B. canis* RM666을 약  $5.0 \times 10^9$  CFU로 인공 감염시킨 경우에는 감염 2주 후에 1:50의 항체 역가가 관찰되기 시작하여 4주, 6주 후에 각각 1:660, 1:800의 항체 역가를 관찰되었으며, 감염 10주부터는 1:400 이상의 항체 역가를 계속 유지하였다. 하지만 *B. abortus* 1119-3을 인공 감염시킨 경우와 대조군의 경우에는 *B. canis* M- 균주로 제조한 2ME-RSAT에서 응집

**Table 1.** Reciprocal serum antibody titer in dogs experimentally inoculated with *B. abortus* 1119-3, *B. canis* RM666 or phosphate buffered saline by STAT, PAT and RBT using *B. abortus* 1119-3 whole cells as antigens

Methods of diagnosis	Weeks Post-Inoculation								
	0	1	2	4	6	8	10	12	
STAT*	<i>B. abortus</i> ****	—*****	1:530	1:260	1:160	1:100	1:10	—	—
	<i>B. canis</i> *****	—	—	—	—	—	—	—	—
	Control*****	—	—	—	—	—	—	—	—
PAT**	<i>B. abortus</i>	—	1:330	1:260	1:110	1:50	—	—	—
	<i>B. canis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	Control	—	—	—	—	—	—	—	—
RBT***	<i>B. abortus</i>	—	1:260	1:110	1:100	1:40	1:10	—	—
	<i>B. canis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
	Control	—	—	—	—	—	—	—	—

\*The standard tube agglutination test, \*\*Plate agglutination test, \*\*\*Rose Bengal test, \*\*\*\*Dogs inoculated with approximately  $5.0 \times 10^9$  CFU of *B. abortus* 1119-3, \*\*\*\*\*Dogs inoculated with approximately  $5.0 \times 10^9$  CFU of *B. canis* RM666, \*\*\*\*\*Dogs inoculated with 50 ml of pyrogen-free phosphate buffered saline, \*\*\*\*\*Not agglutinated.

**Table 2.** Results of serum agglutination tests for dogs experimentally inoculated with *B. abortus* 1119-3, *B. canis* RM666 or phosphate buffered saline by 2ME-RSAT using *B. canis* M- whole cells as antigens

Methods of diagnosis	Weeks Post-Inoculation								
	0	1	2	4	6	8	10	12	
2ME-RSAT*	<i>B. abortus</i> **	—*****	—	—	—	—	—	—	—
	<i>B. canis</i> ***	—	—	1:50	1:660	1:800	1:800	1:400	1:460
	Control****	—	—	—	—	—	—	—	—

\*2-mercaptoethanol rapid slide agglutination test, \*\*Dogs inoculated with approximately  $5.0 \times 10^9$  CFU of *B. abortus* 1119-3, \*\*\*Dogs inoculated with approximately  $5.0 \times 10^9$  CFU of *B. canis* RM666, \*\*\*\*Dogs inoculated with 50 ml of pyrogen-free phosphate buffered saline, \*\*\*\*\*Not agglutinated.

반응이 관찰되지 않았다.

## ELISA

***B. canis* M- 균주를 ELISA 항원으로 사용한 경우:** *B. canis* M- 균주를 ELISA 항원으로 하여 *B. canis* RM666과 *B. abortus* biotype 1을 인공 감염시킨 후의 항체 역가를 측정한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같았다. 즉, *B. canis* RM666으로 감염시킨 경우에는 감염 전, 감염 1주, 2주, 4주, 6주, 8주, 10주 그리고 12주 후의 흡광도는 각각 0.658, 0.744, 1.092, 1.109, 1.241, 1.1257, 1.249 그리고 2.16이었으며, *B. abortus* 1119-3으로 인공 감염시킨 경우와 대조군의 경우에는 모든 혈청에서 시험 전 기간 0.7 이하의 흡광도가 관찰되었다.

***B. abortus* 1119-3의 세포질성 항원을 ELISA 항원으로 사용한 경우:** *B. abortus* 1119-3의 세포질성 추출물을 ELISA 항원으로 사용하여 인공 감염 후에 형

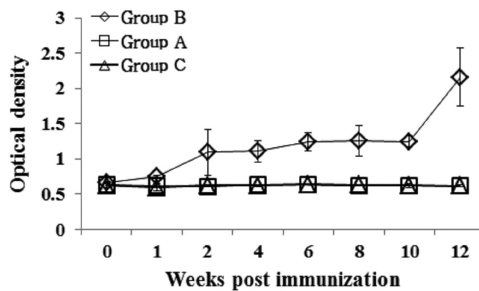


Fig. 1. ELISA results of dogs inoculated with *B. abortus* 1119-3, *B. canis* RM666 or pyrogen-free phosphate buffered saline. The hot saline extracts of *B. canis* M- were used as antigens. Refer to Table 1 for specific immunization conditions of groups A and C.

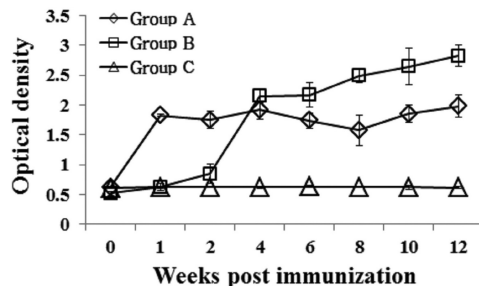


Fig. 2. ELISA results of dogs inoculated with *B. abortus* 1119-3, *B. canis* RM666 or pyrogen-free phosphate buffered saline. The cytoplasmic fractions of *B. abortus* 1119-3 were used as antigens. Refer to Table 1 for specific immunization conditions of groups A and C.

성된 항체 역가를 측정한 결과는 Fig. 2에서처럼 *B. canis* RM666으로 감염시킨 경우에는 감염 전, 감염 1주, 2주, 4주, 6주, 8주, 10주 그리고 12주 후의 흡광도는 각각 0.524, 0.627, 0.85, 2.145, 2.169, 2.285, 2.642 그리고 2.821이었으며, *B. abortus* 1119-3으로 감염시킨 경우에는 감염 전, 감염 1주, 2주, 4주, 6주, 8주, 10주 그리고 12주 후의 흡광도는 각각 0.624, 1.825, 1.75, 1.921, 1.74, 1.579, 1.851 그리고 1.981로 관찰되었지만, 대조군의 혈청은 시험 전 기간 0.7 이하의 흡광도가 관찰되었다.

## 고 찰

국내 소에서 브루셀라병은 중요한 인수공통전염병으로서 최근 5년여 동안 매년 약 5,000여 두 이상에서 발병하고 있지만, 이들과 밀접한 환경에서 사육되고 있는 개에서의 브루셀라병에 대한 감염 실태에 관한 보고는 흔치 않은 실정이지만 문 등(1999)과 박과 오(2001) 그리고 Baek 등(2003)이 개에서 브루셀라병 발생 보고를 하였으며, 박 등(1998)은 경북지방에서 브루셀라의 인체감염을 혈청학적으로 조사보고 하였다.

국내에서 대부분 축산농가는 소, 돼지, 개 그리고 조류 등을 함께 사육하고 있으며 또한 쥐나 야생동물이 가축과 자유로이 접촉할 수 있는 축산 형태임을 고려하여 볼 때 축사를 손쉽게 출입할 수 있는 개 등에 브루셀라병에 감염되어 있을 가능성이 크다고 생각되어 *B. canis*의 고유숙주로 알려진 개에게 *B. canis*를 포함하여 *B. abortus* biotype 1, *B. suis* 및 *B. melitensis*를 인공 감염시켜 이에 따른 면역 반응을 관찰(허 등, 2005) 한데 이어 이번에는 개에게 *B. abortus*와 *B. canis*를 인공감염시킨 후 이들 두 균주를 동시에 진단할 수 있는 진단법을 개발하는 것은 흥미 있는 일이라 생각되었다.

전염병의 전파에서 중요한 것은 병원체와 숙주와의 관계일 것이다. 여러 동물들이 *B. canis*에 대해 감수성과 병원성이 있음이 조사 보고되고 있으며(Carmichael, 1979; Green과 George, 1984; Palmer와 Cheville, 1997), 또한 *B. abortus* 등에 자연 감염된 개가 개, 소, 돼지 그리고 사람에게 이들 병원체를 전염시킬 수 있다는 보고(Barr 등, 1986; Davis 등, 1988; Garin-Basuji 등 1988; Forbes, 1990; Palmer와 Cheville, 1997; Baek 등, 2003)를 쉽게 접할 수 있어 개에서의 브루셀라병은 개에서의 브루셀라병 근절뿐만 아니라 가축에서의 브루셀라병 근절과 인수공통전염병 예방 차원에서도 특별관리 대책

이 필요하다고 생각된다. 더욱 흥미로운 일은 *B. abortus*에 감염된 개가 소나 사람에게 감염원이 될 수 있다는 점이다. 즉, 캐나다 Saskatchewan 주에 있는 소 농장 10여 곳에서 사육 중인 개 18두를 포획하여 조사한 결과는 이들 모두에서 혈청학적으로 양성이었으며 Saskatchewan 주에서 70% 이상의 소에서 분리되는 브루셀라병의 원인 균주인 *B. abortus* biotype 4가 모든 개에서 분리됨으로써 *B. abortus*에 자연 감염된 개는 뇨(Hall, 1974; Bicknell과 Bell, 1979)나 질 분비물(Taylor 등, 1975; Bicknell, 1976; Bicknell과 Bell, 1979), 유산 태아(Taylor 등, 1975; Bicknell, 1976) 그리고 변(Forbes, 1990) 등으로 균을 배출하여 소 브루셀라병의 감염 매개체로 아주 중요한 역할을 하는데 관계를 하고 있다는 보고(Forbes, 1990)를 접할 수 있어, 개에 자연 감염된 *B. canis*와 비특이 균주인 *B. abortus*와 *B. suis* 같은 균주의 자연감염에 대한 감수성 및 이의 감별진단에 관한 새로운 지식의 필요성이 부각되고 있다. 특히 이들 균주에 자연 감염된 개는 임상증상이 유산과 부고환염뿐이어서 모르고 사람이 먹이를 주거나 출산 시 개를 도와주다 자기도 모르는 사이에 감염될 수 있어 이들 개와 같이 동거하는 소나 돼지보다 더 많은 감염 기회가 있을 수 있다고 생각한다(Barr 등, 1986; Forbes, 1990).

개에서 브루셀라병을 근절하기 위해서는 우선 정확한 진단법이 요구된다. 이의 확정 진단은 검사 대상물에서의 균 분리(Carmichael, 1968; Alton 등, 1975)이지만, 균 분리 자체가 쉽지 않고 또한 만성, 불현성인 경우에는 균 분리가 불가능하여 혈청학적 진단법인 RSAT (Flores-Castro와 Carmichael, 1977), TAT (Carmichael, 1967), agarose gel immunodiffusion (Myers 등, 1972), ELISA (Serikawa 등, 1989; Mateu-de-Antonio 등, 1993) 등에 의존했으며, 항상 민감하고 항원 특이성이 높은 혈청학적 진단법 개발이 강조되어 왔다. 임상학적으로 개 브루셀라병 진단이 어려운 이유는 균혈증이 없어진 이후에도 수개월간 높은 항체를 유지하는 경우가 많아 항체 역가에만 의존하는 진단에 혼선이 일어나는 점이라 할 수 있다.

이 때문에 진단 항원의 제조에서 *B. canis*를 열(65°C/2시간)로 처리한 후 특이 항원 물질로서 세포막성 물질과 세포 내 물질을 분리하고자, 각종 단백질 분해 물질(trypsin, CaCl<sub>2</sub>)로 처리한 항원을 활용하여 항체 반응을 관찰 보고한 예도 있으며(Zoha와 Carmichael, 1982), 개 브루셀라병을 진단하기 위하여 *B. abortus*의 세포질성 단백질을 항원으로 한 ELISA를 수행하였던 바(Baldi 등, 1994), RSAT 진단결과와 동일한

진단 결과가 관찰되어 진단 항원으로서 가치가 있음을 밝히면서, R-LPS (*B. canis*, *B. ovis*)를 함유한 진단 항원으로 검출할 수 없는 *Brucella* spp. 즉, *B. abortus*, *B. melitensis* 그리고 *B. suis*에 감염된 개는 *Brucella*의 세포질성 단백질을 항원을 이용하면 진단할 수 있다는 보고가 있어(Carmichael 등, 1984; Baldi 등, 1994), 이 연구에서는 국내 토종견에게 우선 *B. abortus* 1119-3과 *B. canis*를 인공 감염시킨 후 형성된 항체를 소 등에서 브루셀라병 진단에 사용되고 있는 STAT, PAT RBT와 개에서 브루셀라병 진단에 사용되고 있는 2ME-RSAT와 ELISA와 *B. abortus* 세포질성 물질을 이용한 ELISA를 상호 비교하여 보았다.

그 결과 *B. abortus* 1119-3을 진단 항원으로 한 STAT, PAT, RBT의 경우에 *B. abortus* 1119-3을  $5.0 \times 10^9$  CFU로 인공 감염시킨 후 유도된 항체는 모두 감염 1주 후부터 응집반응이 관찰되었지만, 점차 항체 역가가 감소하여 STAT와 RBT에서는 감염 10주 후부터 그리고 PAT에서는 감염 8주 후부터 응집반응이 관찰되지 않았지만 *B. abortus* 1119-3의 세포질성 물질을 항원으로 사용한 ELISA에서는 감염 1주 후부터 시험이 끝나는 전 기간에 걸쳐 1.5 이상의 흡광도가 관찰되었다. 그리고 *B. canis*를  $5.0 \times 10^9$  CFU로 인공 감염시킨 후 STAT, PAT 그리고 RBT를 이용하여 항체 역가를 측정할 결과, 이들 모든 진단법에서 응집반응이 관찰되지 않았지만 *B. abortus* 1119-3의 세포질성 물질을 항원으로 한 ELISA에서는 감염 4주 후부터 2.0 이상의 높은 흡광도가 관찰되었다. *B. canis* M- 균주를 2ME-RSAT 진단 항원으로 하였을 때 *B. canis*를 인공 감염시킨 2주 후에 1:50 정도의 항체 역가가 관찰되기 시작하여 시험 전 기간 1:400 이상의 높은 항체 역가가 관찰되었고 *B. canis* M- 균주를 hot saline extracts를 항원으로 ELISA를 수행한 결과 감염 2주 후부터 1.0 이상의 흡광도를 관찰할 수 있었던 반면 *B. abortus* 1119-3으로 인공 감염시킨 개에서 얻은 혈청에서는 *B. canis* M- 균주를 항원으로 한 어떤 진단법에도 반응이 관찰되지 않음을 확인할 수 있었다. 이 같은 결과는 *B. abortus* 1119-3의 세포질성 단백질을 항원으로 한 ELISA는 개에서 *B. abortus*와 *B. canis*의 감염에 의한 브루셀라병 검출에 유용한 진단법임을 확인할 수 있었다.

끝으로 우리나라에서 최근 5년간 매년 약 5,000여두 이상에서 소 브루셀라병에 의해 살처분 되고 있는 실정을 고려하면 정부가 지금까지 펼쳐온 브루셀라병 방역 정책인 검색과 살처분 정책만으로는 농민의 피해를 막

을 수 없을 뿐만 아니라 이 질병의 확산은 분명할 것으로 생각되어 국내에서 소와 함께 생활하고 있는 개에서의 브루셀라병에 관한 연구가 필요할 것이라 생각하였으며, 국내 토종견에서 *B. abortus* 1119-3 인공 감염에 따른 이 연구 결과는 향후 국내 소에서의 브루셀라병 원인균인 *B. abortus* biotype 1에 대한 개에서의 진단법 확립에 대한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

국내 토종견에 *B. abortus*와 *B. canis*를 인공 감염시킨 후 유도된 항체를 *B. abortus* 세포질성 물질을 이용한 ELISA를 *B. canis* M- hot saline extracts를 항원으로 하는 ELISA와 *B. abortus* 1119-3의 whole cells를 항원으로 하는 STAT, PAT RBT와 *B. canis* M- 균주의 whole cells를 항원으로 하는 2ME-RSAT와 상호 비교하여 보았다.

*B. abortus* 1119-3을 진단항원으로 한 STAT, PAT, RBT의 경우에 *B. abortus*를 인공 감염시킨 개의 혈청에서만 항체 역가가 관찰되었다.

*B. canis* M- 균주를 2ME-RSAT와 ELISA 진단 항원으로 하였을 경우에는 *B. canis*를 인공 감염시킨 개의 혈청에서만 항체 역가가 관찰되었다.

하지만 *B. abortus* 1119-3의 세포질성 물질을 항원으로 사용한 ELISA에서는 *B. abortus*와 *B. canis*로 인공 감염시킨 모든 개에서 감염 1주 내지는 2주 후부터 시험이 끝나는 전 기간에 걸쳐 항체 역가가 관찰되었다.

이와 같은 결과는 *B. abortus* 1119-3의 세포질성 단백질을 항원으로 한 ELISA는 개에서 *B. abortus*와 *B. canis*의 감염에 의한 브루셀라병 검출에 유용한 진단법임을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

김병수, 서창희, 백병길. 1998. *Brucella abortus* 1119-3균의 OMP항원과 타 병원균간의 교차반응에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 22(1): 9-15.  
문진산, 오기석, 박인철, 강병규, 이채웅, 정석찬, 박용호, 신쌍재. 1999. 전남지방의 소형견 번식장으로부터 발생한 canine brucellosis. 대한수의학회지 39(6): 1099-1105.  
박노찬, 김상윤, 조관현, 도재철, 김영환, 신상희, 조민희, 오강희, 김우현, 김정화, 김수용, 김봉환. 1998. 경북지역의 부루셀라병에 관한 연구. 한국가축위생학회지 21(4):

451-465.  
박청규, 오지연. 2001. 대구지역 개의 *Brucella canis* 감염에 대한 세균학적 및 혈청학적 조사. 대한수의학회지 41(1): 67-71.  
백병길, 허진, Matsuda Kiku, 최민준. 2000. *Brucella canis* 인공감염 개에서의 체액성 면역 반응. 한국수의공중보건학회지 24(4): 289-298.  
허진, 임채웅, 백병길. 2001. 개에서 불활화 *Brucella abortus* biotype 1에 대한 면역 반응. 한국수의공중보건학회지 25(2): 89-95.  
허진, Ibulaimu Kakoma, 백병길. 2005. 국내 개에서 *Brucella abortus* biotype 1, *B. abortus* strain RB51, *B. suis*, *B. melitensis* 및 *B. canis* 인공 감염. 한국수의공중보건학회지 29(1): 27-36.  
Alton GG, Jones LM, Pietz DE. 1975. Laboratory techniques in Brucellosis, 2ed. World Health Organization. Geneva: 9-156.  
Baek BK, Lim CW, Rahman MS, Kim CH, Kaloma OI. 2003. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. Can J Vet Res 67(4): 312-314.  
Baldi PC, Wanke MM, Loza ME, Fossati CA. 1994. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis canine brucellosis. Vet Microbiol 41(1-2): 127-134.  
Barr SC, Eikts BE, Roy AF, Miller R. 1986. *Brucella suis* biotype 1 infection in a dog. J Am Vet Med Assoc 189(6): 686-687.  
Bicknell SR. 1976. *Brucella abortus* in the bitch. Vet Rec 99(5): 85-89.  
Bicknell SR, Bell RA. 1979. *Brucella abortus* in the bitch: subclinical infection associated with urinary excretion. J Hyg Camb 82(2): 249-254.  
Blankenship RM, Sanford JP. 1975. *Brucella canis*-a cause of undulant fever. Am J Med 59(3): 424-426.  
Carmichael LE. 1967. Canine brucellosis, Isolation, diagnosis, transmission, Proc Meet US Anim Health Assoc 71: 517-528.  
Carmichael LE. 1979. Brucellosis (*Brucella canis*), In CRC Handbook Series in Zoonoses. Vol 2. Steele JH (ed.). CRC Press. Boca Raton FL: 185-194.  
Carmichael LE. 1990. Animal brucellosis. CRC Press. Boca Raton, Florida: 335-359.  
Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R. 1984. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog response to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. Third International Symposium on Brucellosis. Dev Biol Stand 56: 371-383.  
Clegg FG. 1968. *Brucella abortus* infection in the dog: a case of polyarthritis. Res Vet Sci 9(2): 183-185.  
Davis DS, Heck FC, Williams JD, Simpson TR, Adams LG. 1988. Interspecific transmission of *Brucella abortus* from experimentally infected coyotes (*Canis latrans*) to parturient cattle. J Wildlife Dis 24(3): 533-537.  
Flores-Castro R, Carmichael LE. 1977. Canine brucellosis: Current

- status of methods for diagnosis and treatment. Gaines Vet Symp 27(1): 17-24.
- Forbes LB. 1990. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. J Am Vet Med Assoc 196(6): 911-916.
- Forbes LB, Pantekoek JF. 1988. *Brucella canis* isolates from Canadian dogs. Can Vet J 29: 149-152.
- Garin-Basuji B, Colcanap M, Trap D. 1988. Le chin, reservoir potentiel de l'infection brucellique dans troupeaux bovins assainis: a partir d'un cas les Cotes-du-Nord. Epidemiol Sante Anim 13(2): 69-79.
- Green CE, George LW. 1984. Clinical microbiology and infectious disease of the dog and cat. WB saunders, Philadelphia: 646.
- Hall RF. 1974. A case of open brucellosis in the dog. Vet Rec 94: 454.
- Kormendy B, Nagy GY. 1982. The supposed involvement of dogs carrying *Brucella suis* in the spread of swine brucellosis. Acta Vet Acad Sci Hung 30(1-3): 3-7.
- Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. J Med Microbiol 54(5): 457-461.
- Mateu-de-Antonio EM, Martin M, Soler M. 1993. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. Am J Vet Res 54(7): 1043-1046.
- Myers DM, Jones LM, Varela-Diaz VM. 1972. Studies of antigens for the complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infection caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. Appl Microbiol 23(5): 894-902.
- Palmer MV, Chevillie NF. 1997. Effects of oral or intravenous inoculation with *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in Beagles. Am J Vet Res 58(8): 851-856.
- Pidgeon GL, Scanlan CM, Miller WR, Mayer TW. 1987. Experimental infection of dogs with *Brucella abortus*. Cornell Vet 77(4): 339-347.
- Pikerill PA, Carmichael LE. 1972. Canine brucellosis: control programs in commercial kennels and effect on reproduction. J Am Vet Med Assoc 160(12): 1607-1615.
- Scanlan CM, Pidgeon GL, Richardson BE, Buening GM, Kemppainen RJ. 1989. Experimental infection of dogs with *Brucella abortus*: effect of exposure dose on serologic responses and comparison of culture methods. Cornell Vet 79(1): 93-107.
- Serikawa T, Iwaki S, Mori M, Muraguchi T, Yamada J. 1989. Purification of *Brucella canis* cell antigen by using ELISA for specific diagnosis of canis brucellosis. J Clin Microbiol 27(5): 837-842.
- Taylor DJ, Renton JP, McGregor AB. 1975. *Brucella abortus* bio-type 1 as a cause of abortion in a bitch. Vet Rec 96(19): 428-429.
- Thanappa PM, Nedunchelliyam S, Raghavan N, Thanappapillai M. 1990. Brucellosis in a dog caused by *Brucella suis* bio-var 1 in Madras. Cheiron 19(2): 97-98.
- Zoha SJ, Carmichael LE. 1982. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. Vet Microbiol 7(1): 35-50.