

Brucella 양성유즙의 성질과 각종요인이 Milk Ring Test에 미치는 영향

우 종 태

경기도 가축위생시험소

I. 서 언

Brucella병은 우리나라에서 가축의 법정 전염병으로서 중요시 되는 질병이다. 1887년 David Bruce²⁾가 Mediterranean fever (Malta fever)에서 Micro coccuo melitensis를 발견한 이후 1897년 Bang가³⁾ 소의 전염성 유산에서 Brucella abortus를 분리하였고 Traum은³⁾ 1914년 돼지에서 Brucella suis를 발견하였다. 1924년 Keefer는³⁾ Brucella abortus에 감염된 사람에서 Undulant fever가 나타난다고 하였다.

이와같이 Brucella병은 동물의 전염병으로서 또 인수공통전염병으로서 세계각국에서는 중요시되며 또 본병 박멸에 많은 정열을 기울이고 있으며 우리나라에서도 1956년 박,李 등⁷⁾이 처음으로 Brucella abortus를 분리한 이후 Brucella병 박멸에 온갖 힘을 기울였으나 아직 박멸된 상태는 아니다. 1936년 Fleishauer가⁶⁾ Milk Ring Test용 진단액을 창시한 이후 1952년부터 미국에서는⁵⁾ Milk Ring Test가 Brucella병 박멸대책에 없어서는 안될 부분으로 간주되어 왔다. 현재 우리나라에서는 꾸준한 축산진흥정책과 국민들의 우유 및 유가공품 소비 증가에

따른 젖소의 사육두수가 매년 증가되는 추세이다. 이에 따라 각종 가축전염병 검색에 많은 인력을 필요로 하게 되었다. 특히 부르세라병은 각 개체마다 채혈하는 수고가 있어 1980년, 1981년에 농수산부 및 가축위생연구소에서 Brucella 집단 검색 방법인 Milk Ring Test가 시험사업으로 시도되었다. 시험사업중 경기도 이천군 A 목장에서 시험관내 응집반응 결과 800배, 400배 양성인 유유 2두가 검색된 바 부족한 공시재료에도 불구하고

① Brucella양성유즙의 희석배수에 따른 M.R.T. 반응

② Milk Ring Test에 있어 유방염류 초유 산패유와 Brucella 양성 및 음성유즙과의 관계

③ Brucella 양성 TTCC세균 발육억제 물질 검출시험, 양성 및 음성유즙의 M.R. T. 반응

④ Brucella 양성유즙의 pH변화에 따른 M.R.T. 반응

⑤ Brucella 양성유즙의 온도 변화에 따른 M.R. T. 반응 등을 조사, 연구 함으로써 Brucella 집단 검색방법인 Milk Ring Test의 효과적인 이용에 참고가 되고자 이 보고를 드리는 바이다.

II. 시험재료 및 방법

1. 시험재료

- ① Milk Ring Test용 진단액(가축위생연구소 제공).
- ② Brucella 양성 2두 유즙.
- ③ C.M.T.(California Mastitis Test), M.R.T. 음성인 회석용 원유.
- ④ M.R.T. 음성인 분만 2일째 초유.
- ⑤ C.M.T.(++), M.R.T. 음성인 유방염 우유
- ⑥ 70% Alcohol에서 응결되고 M.R.T. 음성인 산패 우유.
- ⑦ Brucella 음성 M.R.T.(++) 유즙.
- ⑧ Brucella 음성 M.R.T. (±) 유즙.
- ⑨ 기타 등을 시험재료로 하였다.

2. 시험방법

- ① 각 실험에서 회석방법은 Two fold, Ten fold 방법으로 했다.
- ② 온도처리는 water bath 온도를 기준으로 했다.
- ③ pH는 1N Hydrochloric Acid(HCl)과 1N Sodium hydroxide(naoh)를 가지고 pH메타로서 조정했다.
- ④ T.T.C. 양성유즙은 1% Phenol 유즙으로, T.T.C. 음성유즙은 0.1% Phenol 유즙으로 했다.
- ⑤ 각 실험에서 유즙 1ml에 항원(M.R.T.진단액) 0.03ml를 첨가후 잘 흔들어 37°C Incubator에 1시간 정체후 판정했다.
- ⑥ 판정은 Morgan 등¹⁾의 판정을 기준했다.

III. 실험결과

1. Brucella 양성유즙의 회석배수에 따른 M.R.T.반응의 민감도를 알기위해 Brucella 양성 2두 유즙을 표 1 ~ 표 2)와 같이 각각 M.R.T.음성인 회석용 원유와 회석시킨 결과 63호 유즙은 1:500에서, 891호 유즙은 1:200에서 각각 M.R.T.양성(+++)반응이 나타났다.

2. Brucella 음성 유즙의 M.R.T.반응의 민감도를 알기위해 Brucella 음성이며 M.R.T.(++), M.R.T.(±) 유즙을 회석용 원유와 2배, 3배, 4배, 5배로 회석시킨 결과 M.R.T.(++) 유즙은 2배 회석해서 M.R.T.(+), 3배 회석에서 M.R.T.(±) 4배 회석부터는 MRT 음성으로 나타났고 MRT (±) 유즙은 2배 회석부터 MRT 음성으로 나타났다.

3. MRT 반응에 있어 유방염유 초유 산패유가 Brucella 양성 및 음성유즙에 미치는 영향을 알기위해 표 4 ~ 표 5)와 같이 Brucella 양성유즙과 유방염유, 초유, 산패유를 각각 회석시키고 표 6 ~ 표 7)과 같이 Brucella 음성유즙과 유방염유, 초유, 산패유를 각각 회석시킨 결과 유방

표 3) M R T Reaction of Brucella Negative - M R T (++) , (±) Milk Diluted to Various Concentrations

Milk Dilution	U	1:1	1:2	1:3	1:4
MRT (++) Milk	++	+	±	-	-
MRT (±) Milk	±	-	-	-	-

[표 1] Results of M R T. in Brucella Positive Milk (No 63) Diluted Various Concentrations.

Cow No. \ Dilution	U	1:10	1:100	1:500	1:1000	1:2000	1:3000
63	+++	+++	+++	+++	+	±	-

U=Undiluted

[표 2] M R T Reaction of Brucella positive Milk (No 891) Diluted to Various Concentration

Cow No. \ Dilution	U	1:10	1:100	1:200	1:400	1:500	1:1000	1:2000
891	+++	+++	+++	+++	++	+	±	-

U=Undiluted

[표 4] Comparison of M. R. T. Reaction of Mastitic Milk, Colostrum, Sour Milk in Brucella positive Milk (No. 63)

Milk \ Dilution	U	1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:4000	1:8000
63호	+++	+++	+	±	±	-	-
Mastitic Milk	-	++	±	-	-	-	-
Sour milk	-	++	±	-	-	-	-
Colostrum	-	++	++	++	++	++	-

U=Undiluted

[표 5] Comparison of M. R. T Reaction of Mastitic Milk, Colostrum, Sourmilk in Brucella positive Milk (No. 891)

Milk \ Dilution	U	1:10	1:100	1:200	1:400	1:500	1:1000	1:2000
891호	+++	+++	+++	+++	++	+	±	-
Mastitic Milk	-	+++	++	++	+	±	-	-
Sour Milk	-	+++	+++	+++	+	+	-	-
Colostrum	-	+++	+	±	±	-	-	-

U=Undiluted

[표 6] Comparison of M. R. T. reaction of Colostrum, Mastitic Milk, Sour Milk which was Diluted Brucella Negative-M. R. T (++)Milk

Milk \ Dilution	U	1:1	1:2	1:3	1:4
MRT(++)Milk	++	+	±	-	-
Mastitic Milk	-	±	-	-	-
Sour Milk	-	+	±	-	-
Colostrum	-	±	-	-	-

U=Undiluted

[표 7] Comparison of M. R. T. Reaction of Mastitic Milk, Sourmilk, Colostrum which was Diluted Brucella Negative-MRT (±)Milk.

Milk \ Dilution	U	1:1	1:2	1:3	1:4
MRT(±)Milk	±	-	-	-	-
Mastitic Milk	-	-	-	-	-
Sour Milk	-	-	-	-	-
Colostrum	-	-	-	-	-

U=Undiluted

염유, 산패유, 초유는 MRT반응을 다소 억제시켰다.

4. Brucella 양성 유즙이 T.T.C.(잔류 세균 발육 억제물질 검출시험) 양성 및 음성인 경우 MRT변화를 알기위해 Brucella 양성 63호, 891

호 2두 모두를 phenol로 회석시켜 1% phenol 유즙, 0.1% phenol 유즙으로 만든 결과 2두 모두 1% phenol 유즙은 T.T.C.양성, 0.1% phenol 유즙은 T.T.C.음성이었다. 이때 표 8에서와 같이 Brucella 양성이며 T.T.C.양성 및 음성 유즙은

[표 8] M. R. T. Reaction of Brucella positive - T. T. C. positive, N negative Milk

Reaction	Cow No.	6.3		891	
	Phenol	1% phenol	0.1% phenol	1% phenol	0.1% phenol
T. T. C		+	-	+	-
M. R. T		+	+	+	+

MRT반응에 어떤 제약을 가하지 않았다.

5. Brucella 양성 유즙 속의 Agglutinn (항체)의 성질을 알아보고 Brucella 양성유즙의 pH변화에 따른 MRT변화를 알기 위해 IN HCl 및 IN NaOH로 63호, 891호 유즙을 pH 3.0부터 pH12.0까지 처리하고 pH6.7인 희석용 원유로 각 pH에 10배 희석시킨 유즙의 MRT반응 결과는 표 9 와 같다.

[표 9] M R. T. Reaction of Brucella Positive (No.63, No. 891)Milk which was Ranged from pH 3.0 to pH12.

pH	Dilution Cow, No.	U		1:9	
		891	63	891	63
3.0		-	-	+++	+++
4.0		-	-	+++	+++
4.5		-	-	+++	+++
5.0		+++	+++	+++	+++
6.0~9.5		+++	+++	+++	+++
10		++	+++	+++	+++
11		++	++	+++	+++
12		-	++	++	+++

U=Undiluted

6. 표 9 에서 보는 바와 같이 63호 및 891호 유즙은 pH3.0, pH4.0, pH4.5에서는 MRT 음성이나 그들의 10배 희석에서는 MRT 양성반응이 나타났고 891호 유즙의 pH12에서는음성이나 그 10배 희석 유즙에서는 MRT 양성반응이 나타났기에 각 유즙의 pH에 따라 10배로 희석된 유즙의 pH를 측정 한 결과 표10과 같다.

7. Brucella 양성유즙과 온도와의 관계를 알아보고 Brucella 양성유즙안에 있는 Agglutinin (항체)의 안정 온도를 알아보기 위해 Brucella 양

[표10] pH of Brucella Positive (No 63, No 891) Milk which was Diluted to 1:9.

pH \ Dilution	1:9 in Cow No.63	1:9 in Cow No.891
3.0	6.05	6.15
4.0	6.25	6.3
4.5	6.3	6.35
10	7.1	6.9
11	7.25	7.2
12	8.0	7.9

성 891호, 63호 유즙을 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C의 Water bath 온도에서 5분간 처리한 후 각 온도에서의 MRT 변화는 표11과 같다.

V. 고 찰

1. 미농립성보고⁶⁾에서는 Brucella 양성유즙과 음성유즙의 혼합비율이 1:5 내지 1:12 까지 혼합했을 때 비교적 좋은 결과를 얻었다고 보고하였고, J⁶⁾은 유우 Brucella병 진단을 위한 Milk Rmg Test의 이용가치에서 1:6부터 1:10 까지 희석시켜도 좋은 결과가 나타났다고 보고하였다. Morgan⁷⁾은 희석배율이 1:10 또는 그 이상에서 MRT반응이 나타나면 Brucella는 감염을 암시한다고 하였으나 저자의 실험에서는 1:500, 1:200에서 즉 상당히 높은 희석배율에서 MRT양성(+++)반응이 나타났다. 한편 저자의 실험재료인 Brucella양성 2두 혈청은 시험관내 응집반응에서 800배, 400배 양성이며 J⁶⁾의 실험혈청은 혈청반응에서 50배 양성 2두, 100배 의양성 1두로 되어있어 혈청반응이 높을수록 MRT 반응도 높은 희석배수에서 양성반응이 나타난다고 사료된다.

[표11] M R T Reaction of Brucella positive (No 63.No891)Milk placed in Water Bath (45°C ~80°C) for 5Minute

Cow No.	Tem	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C	80°C
63		+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
891		+++	+++	+++	+++	+++	-	-

2. Morqan등¹⁾은 false positive MRT반응이 나타나는 우유에 MRT 음성우유를 희석시키면 false positive 반응이 없어지며 희석배율이 1 : 10 이상에서 MRT반응이 나타나면 Brucella감염이 의심된다고 하였다. 저자 실험에서도 Brucella음성 MRT(±) 우유는 MRT 음성우유와 2배 희석부터 MRT 음성반응이 나타났고 Brucella음성 MRT(+++) 우유는 2배 희석에서는 MRT(+)반응 3배 희석에서는 MRT(±)반응 4배 희석부터는 MRT 음성반응이 나타났다. 표1 ~ 3)에서와 같이 Brucella양성, 음성유즙은 희석배수에 따라 MRT반응에 큰 차이를 나타내므로 Brucella 양성 음성유즙을 희석배수에 따라 감별할 수 있다고 사료된다.

3. 미농림선보고⁴⁾와 Morqan등¹⁾은 유방염유, 초유 건유기우유 등은 비특이 MRT 반응을 또 False positive반응을 유발한다고 보고 하였다. 저자 실험에서는 표4 ~ 6)에서와 같이 상당히 높은 희석배율에서 유방염유 산패유 초유가 MRT반응을 다소 억제시키는 비정상적인 반응을 나타냈으나 그 정확한 원인을 규명치 못하여 매우 유감으로 생각한다.

4. Brucella양성이며 T.T.C. (잔류 세균 발육억제물질 검출실험) 양성 및 음성인 우유는 MRT반응에 아무 제약을 가하지 않으므로(표 7참고) 집유소에서 MRT用 원유 샘플 수거時 집유 몇 시간후 판정되는 T.T.C.반응을 Brucella 검색을 위한 MRT에 참고로 할 필요가 없다고 사료된다.

5. 미농림선보고⁴⁾에서는 과도한 Heating (105° - 110F° 이상)은 Brucella Ring Test의 정상(qualities)이 파괴된다고 하였고, Morqan등¹⁾은 45°C 이상에서 5분이상 처리하면 Brucella 항체가 감소 된다고 보고 하였으나 저자 실험에서는 Water bath 온도 65°C, 70°C에서 각각 5분간 처리해도 MRT양성(+++)반응이 나타났다. 이것은 저자가 실험한 혈청이 800배, 400배의 높은 항체역가 때문이라고 사료된다.

6. Brucella양성 63호 891호를 각각 pH 3.0

부터 pH12까지의 pH변화에 따른 MRT 반응에서 2두 모두 pH3.0, pH4.0, pH4.5에서 MRT 음성반응이 나타났으나 그들의 10배 희석유즙은 2두 모두 MRT 양성반응이 나타났고, pH12로 처리된 891호 유즙도 MRT 음성이나 이것의 10배 희석유즙은 MRT 양성반응이 나타났다. 이때 pH3.0으로 처리된 63호 유즙의 10배 희석유즙의 pH는 6.05이고 891호 유즙의 10배 희석유즙은 pH6.15를 나타냈다. pH12인 891호 우유를 10배 희석시킨 결과 pH가 7.9로 나타났다. (표 9, 10참고) 이것으로 미루어 Brucella 양성 2두 우유속에 있는 Agglutinins(항체)는 pH3.0 ~ pH4.5까지 또 pH12에서 파괴되지 않고 단순히 억제당해 MRT 음성반응이 나타났다고 사료된다.

IV. 결 론

현재 우리나라에서는 정기적인 혈청검사로서 乳牛Brucella병을 검색하고 있으나 보다 인력손실이 적고 검색 시간도 절약되는 Mrk Ring Test가 우리나라에서도 실시되기 바란다. 앞으로 우리나라에서 MRT가 실시될 경우 보다 효과적으로 Mrk Ring Test(MRT)를 이용하고자 시험관내 응집반응 결과 800배, 400배인 Brucella 양성 2두 혈청을 조사 연구한 결과 몇 가지 결론을 얻었다.

① Brucella양성 63호 및 891호를 Brucella음성유즙과 1 : 500, 1 : 200으로 희석시킨 결과 MRT양성(+++)반응이 나타났다.

② 유방염유, 초유, 산패유는 비정상적인 Mrk Ring Test를 나타냈다.

③ Brucella 양성이며 T.T.C.양성 및 음성인 우유는 비정상적인 MRT반응을 유발하지 않았다.

④ 63호 유즙속의 항체는 pH5.0부터 pH12까지 891호 항체는 pH5.0부터 pH11까지 MRT양성반응을 나타냈다.

⑤ 63호 우유속의 항체는 Water bath 온도

70°C에서 891호는 65°C에서 각각 5분간 처리해도 파괴되지 않고 MRT 양성반응을 나타냈다.

《참고문헌》

1. W. J. Brinley Morgan 外 : Brucellosis Diagnosis Standard Laboratory Techniques : 2nd ed. Central Vet. Lab, New Haw, Weybridge, Surrey KT153 NB: 1978 pl~ 6
2. Gillespie, Timoney : Hagan and Bruner's infectious Disease of Domestic Animals : 7th ed Cornell uni press : 1981. p127—128.
3. Merchant and Packer : Veterinary bacteriology and Virology : 7th ed, Ames Iowa 1967. 315~316.
4. USDA . Agricultural Research Service Animal Health Division : Procedures and Approved Methods for conducting Brucella Ring Test.
5. USDA Agricultural Research Service Animal Health Division : A comparison of The tube Agglutination, Supplemental, and Brucellosis Ring Tests in Selected Parry Herds in New york : 1968.
6. 丁炳鐸 : 유우 Brucella병 진단을 위한 Milk Ring Test의 이용가치 : 대한수의학회지 제 9권 제 2호 1969.
7. 朴東權, 李熙熙 : 우리나라에서 발생한 牛 Brucella 병에 대하여 : 수의계 제 3권 제 2호 1959.

Characteristics of Brucella positive Milk and Effect of Some Factors Influenced Milk Ring Test

Jong Tae Woo , D. V. M.

Eastern Branch of Gyonggi-Do Animal Health Center.

Abstract

Now in Korea Brucellosis was diagnosed by individual periodic blood tests. Author hope that individual periodic blood tests was performed after Milk Ring Test, because if Cattles show negative reaction to Milk Ring Test, P-eriodic blood tests are needless. In order that Milk Ring Test was performed more effectively, in case of being tried Milk Ring Test in Korea, studied and researched milks of which standard Seroagglutination Tube Test (S.T.T.) titer of 800(Cow No.63), 400 (Cow No,891). Summary is as follows.

1. The results of Brucella positive(No.63) milks which was diluted to 1 : 500 by Brucella negative milk, is positive reaction(+++) to M.R.T.
2. The M. R. T.results of Brucella positive(No.891) milks diluted to 1 : 200 by Brucella negative milk is positive reaction(+++).
3. Mastitic milk, sour milks, colostrum show a suspicious reaction to M.R.T.
4. Brucella positive - T. T. C. positive and Negative Milk doesnt show a non-specific M.R.T. reactions.
5. Though milk(No.63) was ranged from pH5.0 to pH12, the Agglutinins don't be destroyed, show positive reaction to M.R.T.
6. Though milk(No.891) was ranged from pH5.0 to pH11 the agglutinins don't be destroyed, show positive reaction to M.R.T.
7. Though Cow No.63 milk was placed in water bath at 70°C for 5 min, Agglutinins don't be destroyed show M.R.T. positive(+++) reaction.
8. Though Cow No.891 Milk was placed in water bath at 70°C for 5 min. Agglutinins don't be destroyed, show positive reaction(+++) to M. R. T.