

경북지방 소에서 분리한 *Brucella abortus*의 생화학적 특성

김성국 · 김영환 · 조민희 · 이영주* · 박청규¹*

경상북도가축위생시험소, ¹경북대학교

(접수 2009. 2. 5, 게재승인 2009. 5. 25)

Biochemical characteristics of *Brucella abortus* isolated from cattle in Gyungbuk province

Seong-Guk Kim, Young-Hoan Kim, Min-Hee Cho,
Young-Ju Lee*, Cheong-Kyu Park¹*

Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Daegu 702-210, Korea

¹College of Veterinary medicine, Kyungpook national University, Daegu 702-701, Korea

(Received 5 February 2009, accepted in revised from 25 May 2009)

Abstract

Bovine brucellosis is a zoonosis, long incubation period and chronic infectious disease, usually caused by *Brucella abortus*. This study was carried out to investigate the biotyping and biochemical characterization of *B. abortus* isolated from 208 farm 871 Korean cattle and holstein diagnosed brucellosis by serological positive in Gyeongbuk province during the period from 2002 to 2006. *B. abortus* was isolated from 124 (14.2%) of 871 cattle, and isolated 110 (13.4%) of 820 Korean cattle and 14 (27.5%) of 51 holstein in breed. The uterus of Korean cattle was isolated in 8 (17.8%) of 45 cattle and supramammary lymph none of holstein was isolated 11 (68.8%) of 16 cattle. 101 (12.5%) of 810 serological positive blood samples were isolated *B. abortus*. The isolation rate of *B. abortus* was correlated with antibody titers. The biochemical characterization of isolates was non-hemolytic, production of H₂S, oxidase-positive, catalase-positive, hydrolyzation of urea and growth of basic fuchsin dye medium. As a result, all of isolates was identified *B. abortus* by 1. 124 isolates were susceptible to ampicillin, lincospectin, amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, tetracycline, ciprofloxacin, norfloxacin and enrofloxacin.

Key words : *Brucella* spp, Biochemical characteristic, Antibiotic susceptibility

서 론

소 브루셀라병은 잠복기가 긴 만성 전염병으로써 전 세계적으로 발생하고 있으며, 암소에서 불임, 유산 등의 번식장애를 일으키고, 수소에서는 고환염, 전립선염 등의 생식기 질환을 일으키는 질병으로 국내에서는 제

2종 가축전염병으로 분류하여 검진 및 살처분의 근절 대책을 실시하고 있다. 브루셀라균은 사람에게도 감염되어 파상열, 관절통, 오한, 쇠약 등 감기와 유사한 증상을 일으키는 인수공통의 원인체로 제3군 법정전염병으로 분류되어 공중위생상 매우 중요한 질병으로 취급되며 미국, 유럽 등 세계 각국에서 근절을 위해 많은 노력을 기울이고 있다(Alton 등, 1975; Beran 등, 1994; Brenner 등, 2005; Nielson 등, 1990).

*Corresponding author: Cheong-Kyu Park, Tel. +82-53-950-5973,
Fax. +82-53-950-5955, E-mail. ckpark@knu.ac.kr

소 브루셀라병의 주 원인체는 *B. abortus*이며, 간혹 *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* 등의 감염도 발생하는 것으로 알려져 있고 주 감염경로는 균에 오염된 사료, 물의 섭취에 의한 것이 주요인이며, 감염소와의 교미에 의한 생식기감염 및 감염된 어미소의 태반을 통해 감염되어 정상적으로 분만된 송아지에 의한 수직감염도 발생한다(Hirsh 등, 1999; Timoney 등, 1988).

브루셀라균은 숙주의 종류 및 숙주의 상태에 따라 균혈증의 지속기간이 다르며, *B. abortus*의 경우 수일에서 2개월간 지속되고, 최종적으로 체내의 림프절, 비장, 유선, 자궁, 부고환 및 세망내피계 조직에 정착한다(Lopez-Goni 등, 2004; OIE, 2004; Young 등, 1989).

*B. abortus*는 phage 감수성, 특정색소에서의 성장능, 특이항원결정기(A and M)에 대한 응집유무 등의 특성에 따라 8가지 생물형으로 분류되며, 일반적으로 소와 들소, 물소 등 야생 반추류에 숙주특이성을 가지며, 이외에 말, 낙타, 양, 사슴, 개, 사람, 기타 동물에도 감염된다(Nielson 등 1990; Timoney 등, 1988).

브루셀라균의 thionin과 basic fuchsin 등의 색소에 따른 발육능의 차이는 균의 외막에 존재하는 단백질체인 porin protein channel 직경의 크기에 따라 색소가 균체내 투과성의 차이가 있는 것으로 밝혀졌으며, 상대적으로 *B. canis*가 가장 넓으며, *B. abortus*가 중등도의 크기이고 *B. melitensis*가 가장 좁은 것으로 알려져 있다(Douglas 등, 1984; Santos 등, 1984; Verstrete 등, 1984).

국내에서는 1955년 미국에서 수입한 젖소 124두를 대상으로 실시한 브루셀라병 혈청검사서 양성우 30두(24%)를 검색한 이후 소에서는 1956년 경기도 소재 국립축종장에서 발생한 젖소의 브루셀라병 집단 발생시에 양성소의 유산태아에서 *B. abortus*를 맨 처음 분리하였다(김 등, 1957). 한우 브루셀라병에 대한 항체 양성 검출은 1959년 김 등(1959)의 조사에 의해 맨 처음 보고되었으나 이후 지속적인 검진이 이루어지지 않은 실정이었다.

실험실에서 브루셀라균을 분리하기 위해 주로 이용되는 가검재료는 유즙, 질분비물, 혈액, 유산태아 등이며, 살처분한 소의 장기 중에서는 상유방림프절, 인후두림프절, 장골내림프절, 요추림프절을 비롯한 각종 림프절, 비장, 유선조직, 자궁 등이 많이 이용되고 있으며, 축종별로는 균분리를 위해 소에서는 상유방림프절을 가장 많이 이용하고, 돼지에서는 악하림프절이 많이 이용되며, 개에서는 1년 이상의 균혈증을 나타내는

특성을 고려하여 혈액을 채취하여 균분리에 많이 이용하고 있다(Alton 등, 1975). 국내에서는 양성우의 각종 장기 및 림프절을 재료로 하여 다양한 균분리율이 보고된 바 있으며(김 등, 1968; 김 등, 1988; 김 등, 1991; 김, 1997; 박 등, 1998; 심 등, 1996; 정 등, 1988), 브루셀라병 양성우의 유즙을 대상으로 균분리 및 항체가를 조사한 바 항체가가 높을수록 균분리율이 높다고 보고된 바도 있다(Huber 등, 1986; Wilesmith, 1978).

본 실험에서는 브루셀라병으로 판정된 살처분소의 실질장기, 유즙 및 혈액을 채취하여 항체역가와 균분리율을 조사하였고, 또한 로즈벵갈 진단액을 이용한 1차 혈청검사서 양성 판정된 소의 혈액을 이용하여 항체가 및 균분리를 시도한 후 항체역가와 균분리율을 비교하였으며, 분리균의 동정 및 생화학적 특성을 조사하여 결과를 발표하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료

2002년부터 2003년까지 경상북도에서 브루셀라병으로 판정되어 살처분되는 7호 61두(한우 4호 45두, 젖소 3호 16두)를 대상으로 혈액, 상유방림프절, 간, 비장, 자궁, 유선, 유즙, 질 분비물 등을 채취하였고, 2006년 5월부터 9월 사이에 브루셀라병 정기검진으로 의뢰된 혈액 중 평판응집반응에서 양성반응을 나타낸 혈액 810두에 대해서 항체역가검사 및 균분리를 위한 세균배양을 실시하였다.

분리 및 동정

Alton 등(1975)과 Farrell(1974)의 방법에 따라 오염된 가검재료에서 브루셀라균을 분리하기 위해 선택배지를 제조하였다. 양성반응을 나타낸 혈액은 혈청을 모두 분리하여 항체역가 검사용으로 -70℃의 냉동고에 보관하였고, 항체역가 첨가 액체배지에 나머지 혈괴를 분주하여 37℃에서 30일간 진탕 배양하면서 접종 7일부터 배양액을 7일 간격으로 취하여 5% 면양혈액첨가배지에 도말 접종하고 10% CO₂, 37℃에서 5일간 집락의 유무를 관찰하였다. 유즙은 무균적으로 채취하여 실온에 1시간 정치시킨 후 멸균면봉에 적신 후 선택배지에 도말 접종하여 10% CO₂, 37℃에서 5일간 집락의 유무를 관찰하였다. 질 분비물은 SDA선택배지에 직접

도말 접종하였고, 간, 비장, 상유방림프절, 유선조직 및 자궁은 조직 표면을 화염소독한 후 조직 일부를 취하고 선택배지에 도말 접종하여 10% CO₂, 37°C에서 5일간 집락의 유무를 관찰하였다.

선택배지 및 혈액배지에 자란 집락을 백금이로 채취하여 smooth brucella control antiserum (Abortus-Melitensis-Suis antiserum, DB[®], USA)과 반응시켜 응집유무를 확인하고 응집 형성시 TSA에 계대하여 증균시킨 후 다음 시험까지 -70°C 초저온냉동고에 보관하였다.

항체가 검사

농림부 결핵 및 브루셀라병 방역실시요령(2007) 및 국제수역사무국(OIE, 2004)의 요령에 따라 항체검사를 실시하였다. 분리한 혈청을 56°C, 30분간 비동화한 후 로즈벵갈평판진단액(대성미생물연구소[®], Korea) 30μl와 가검혈청 30μl를 유리평판에서 혼합하여 4분 이내에 응집될 경우 양성, 응집이 되지 않을 경우 음성으로 각각 판정하였다. 국립수의과학검역원에서 분양받은 시험판용표준진단액을 0.5% 석탄산을 첨가한 생리식염수로 100배 희석하여 가검혈청을 시험관내에서 계단희석하고 37°C에서 48시간 감작시킨 후 응집유무를 관찰하여 기록하였다.

생화학적 특성 검사

Alton 등(1975)이 제시한 방법에 준하여 urease, H₂S, 색소발육능, phage 감수성시험을 실시하였고 API 20E (Biomeriux[®], France)와 API 20NE (Biomeriux[®], France)를 이용하여 nitrate 환원능, Voges-Proskauer (VP) test, 아미노산 및 탄수화물 등에 대한 대사능력을 실험하였다.

항균제 감수성 시험

항균제 감수성 시험은 Clinical and Laboratory Stan-

dards Institute (CLSI, 2008) 기준에 따라 디스크 확산법 (disc diffusion method)을 이용하여 항균제 감수성 시험을 실시하였다. 항균제에 대한 감수성 또는 내성 판정은 disc 제조사에서 제시한 기준에 따랐으며 항균제는 BBL sensi-disc (BD[®], USA)제품인 ampicillin (AM, 10μg), penicillin (P, 10U), cephalothin (CF, 30μg), amikacin (AN, 30μg), gentamicin (GM, 10μg), kanamycin (K, 30μg), streptomycin (S, 10μg), neomycin (N, 30μg), ciprofloxacin (CIP, 5μg), norfloxacin (NOR, 10μg), tetracycline (Te, 30μg), lincospectin (L, 20μg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1.25μg), vancomycin (Va, 30μg)과 Oxoid[®] (UK)제품인 enrofloxacin (ENR, 5μg) 등 15종을 사용하였다.

결 과

브루셀라균의 분리율

2002년부터 2003년까지 경상북도에서 브루셀라병으로 판정되어 살처분되는 한우 4호 45두 및 젖소 3호 16두와 로즈벵갈평판응집반응에서 양성인 혈액 201호 810두를 대상으로 균분리를 실시한 결과는 Table 1과 같다. 조직을 채취한 61두 중 23두에서 브루셀라균이 분리되었으며, 품종별로 한우 45두 중 12두(26.7%), 젖소에서는 16두 중 11두(68.7%)에서 균이 분리되어 한우보다는 젖소에서 높은 균분리율을 나타내었다. 로즈벵갈평판반응 양성인 혈액에서는 검사두수 810두 중 101두(12.5%)가 분리되었고 축종별로 한우 775두 중 98두(12.6%), 젖소에서는 35두 중 3두(8.6%)에서 분리되었다.

양성우에서 채취한 장기별 브루셀라균의 분리율은

Table 2. Isolation of *B. abortus* from various specimens of cattle diagnosed brucellosis

Specimen	Korean cattle (%)	Holstein (%)
Liver	-/45 (-)*	3/16 (18.8)
Spleen	1/45 (2.2)	-/16 (-)
Kidney	1/45 (2.2)	-/16 (-)
Uterus	8/45 (17.8)	1/16 (6.3)
Supramammary lymphnode	4/45 (8.9)	11/16 (68.8)
Vaginal swab	2/45 (4.4)	-/16 (-)
Blood treated heparin	-/45 (-)	-/16 (-)
Feces	-/45 (-)	-/16 (-)
Milk	1/45 (2.2)	8/16 (50.0)
Total	17/405 (4.2)	23/144 (15.9)

*No. of isolates/No. of exam

Table 1. Number of *B. abortus* isolated in study

	Breed	Farm	No. of exam	No. of isolates	%
Positive cattle	Korean cattle	4	45	12	26.7
	Holstein	3	16	11	68.8
Positive blood	Korean cattle	192	775	98	12.6
	Holstein	9	35	3	8.6
Total		208	871	124	14.2

Table 2와 같다. 한우에서는 45두중 자궁점막조직에서 8두(17.8%)가 분리되어 가장 높은 분리율을 보였고, 상유방림프절에서 4두(8.9%), 질분비물에서 2두(4.4%), 비장, 신장, 유즙 각각 1두씩(2.2%) 분리되었다. 젖소에서는 16두 중 상유방림프절에서 11두(68.6%)가 분리되어 높은 분리율을 나타내었으며, 유즙에서 8두(50.0%), 간에서 3두(18.8%), 자궁점막조직에서 1두(6.3%)가 분리되었고, 한우와 젖소 모두 혈액 및 분변에서는 균이 분리되지 않았고, 품종 및 장기에 따라 균분리율의 차이가 인정되었다.

Table 3. Isolation of *B. abortus* with antibody titration

Titer	Specimen		Positive blood	
	Korean cattle	Holstein	Korean cattle	Holstein
≥25	-/-	-/-	-/90	-/3
50	-/-	-/-	4/149	-/3
100	-/6	-/1	14/131	1/6
200	5/15	-/-	19/105	2/8
400	-/8	6/8	15/102	-/8
800	4/7	1/2	19/106	-/3
1,600	2/6	2/3	17/62	-/3
3,200	1/3	2/2	4/20	-/-
6,400	1/-	-/-	6/10	-/1
Total	12/45	11/16	98/775	3/35

Table 4. Biochemical characteristics of *B. abortus* isolated in study

Reaction	Strain tested		
	RB51	<i>B. abortus</i> (%)	
Oxidase	positive	124 (100)	
Catalase	positive	124 (100)	
Hemolysis	negative	-	
CO ₂ requirement	negative	124 (100)	
Urease	positive	124 (100)	
Production of H ₂ S	positive	124 (100)	
Phage lysis	Tb	positive	124 (100)
	Wb	positive	124 (100)
	R/C	negative	-
Thionin	A*	negative	-
	B**	negative	-
	C***	negative	-
Basic fuchsin	B**	positive	124 (100)
	C***	positive	124 (100)
β-galactocidase	negative	-	
Lysine decarboxylase	negative	-	
Arginine decarboxylase	negative	-	
Ornithine decarboxylase	negative	-	
Citrate	negative	-	
Tryptophane deaminase	negative	-	
Voges-Proskauer (VP)	positive	124 (100)	
gelatinase	negative	-	

*1: 25,000, **1: 50,000, ***1: 100,000

항체가

브루셀라양성우 및 로즈벡갈평판반응 양성혈액 810 두에 대하여 표준시험관응집반응법에 의한 항체가를 조사한 결과는 Table 3과 같다.

한우는 800배에서 7두 중 4두에서 브루셀라균이 분리되어 가장 높은 분리율을 나타내었고, 항체역가 400 배를 나타낸 8두에서는 균이 분리되지 않았다. 젖소는 항체역가 400배에서 8두 중 6두에서 브루셀라균이 분리되어 높은 분리율을 나타내었다. 로즈벡갈평판반응 양성혈액에서는 항체가 25배 이하에서는 균이 분리되지 않았고 50배의 의양성인 개체에서도 4두(2.63%)가 분리되었으며 6,400배 이상의 고역가에서 검사두수 11두 중 6두(54.5%)가 분리되어 가장 높은 분리율을 나타내었다.

분리균의 생화학적 특성

본 실험에서 분리한 *B. abortus* 야외분리주 124주와 백신주인 RB51를 대상으로 생화학적 성상을 조사한 결과는 Table 4와 같다. Oxidase 및 catalase 양성이었고, 혈액배지에서는 용혈성이 없었고, urease는 양성

Reaction	Strain tested		
	RB51	<i>B. abortus</i> (%)	
Ferment of glucose	glucose	negative	-
	sucrose	negative	-
	mannitol	negative	-
	inositol	negative	-
	sorbitol	negative	-
	rhamnose	negative	-
	sucrose	negative	-
	melibiose	negative	-
	amygdalin	negative	-
arabinose	negative	-	
Reduction of nitrate	negative	124 (100)	
Production of indole	negative	-	
Hydrolysis of esculin	negative	-	
Assimilation of glucose	glucose	negative	-
	arabinose	negative	-
	mannose	positive	124 (100)
	mannitol	negative	-
	maltose	negative	-
	gluconate	negative	-
	caprate	negative	-
	adipate	negative	-
malate	negative	-	
phenylacetate	negative	-	

Table 5. Antimicrobial drug susceptibility of *B. abortus* isolated in study

Antimicrobial drugs	Strain tested	
	RB51	<i>B. abortus</i> (n=124)
Ampicillin	S	S
Penicillin	R	R
Lincospectin	S	S
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	R	R
Vancomycin	R	R
Amikacin	S	S
Gentamicin	S	S
Kanamycin	S	S
Neomycin	S	S
Streptomycin	S	S
Tetracycline	S	S
Cephalothin	R	R
Ciprofloxacin	S	S
Norfloxacin	S	S
Enrofloxacin	S	S

반응으로 분홍색을 나타내었으며, 모든 균주가 H₂S 산생능이 있으며, thionin 첨가배지에서는 집락형성이 없으나 basic fuchsin 색소첨가배지에서는 발육능이 일부 인정되었다. Tibilisi (Tb), Weybridge (Wb), R/C의 phage를 대상으로 1×Routine test dilution (RTD) 방법으로 브루셀라균의 감수성시험을 실시한 결과 모든 균주가 Tb와 Wb에 감수성을 나타내어 용균되었으나 R/C는 용균을 나타내지 않았으며 분리주 모두 *B. abortus* bv 1형으로 동정되었다.

API20E와 API20NE kit를 이용하여 생화학적 성상을 조사한 결과, Nitrate 환원은 백신 RB51주에서는 보이지 않았으나 야외분리주에서는 모두 환원능이 있었고, 모든 균주가 citrate, indole 시험 음성이었다고, Voges-Proskauer (VP) 시험은 모두 양성을 나타내었고, decarboxylase 시험과 탄수화물의 대사능력이 없는 것으로 나타났으며, 동정용 소프트웨어 (APILAB PLUS, France)로 동정한 결과 브루셀라 균일 가능성 (possibility)이 있는 것으로 나타났다.

분리균의 항균제 감수성

본 실험에서 분리한 *B. abortus* 124주, 백신균주인 RB51주를 대상으로 항균제감수성시험을 실시한 결과는 Table 5와 같다. ampicillin (AM), lincospectin (LINS), amikacin (AN), gentamicin (GM), kanamycin (K), neomycin (N), streptomycin (S), tetracycline (Te), ciprofloxacin (CIP), norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENR), 등 11종에 대하여 야외분리주 및 표준균주 모

두 감수성이 있는 것으로 조사되었고, penicillin (P), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), vancomycin (Va), cephalothin (CF) 등 4종에 대해 저항성이 있는 것으로 조사되었다.

고 찰

소 브루셀라병의 원인체인 *B. abortus*는 덴마크의 수의학자인 Bang에 의해 유산한 소의 태아에서 맨 처음 분리되어 소를 사육하는 곳에서는 어디에서나 발병할 수 있으며 막대한 경제적인 피해를 입히고, 사람에게도 감염되어 감기와 유사한 증상을 나타내는 인수공통 병원체로서 공중보건학적으로 매우 중요한 세균이다.

한우의 브루셀라병은 1959년 김 등(1959)이 경남, 경북, 제주지역 한우 1,133두를 대상으로 조사한 성적에서 항체가 100배 이상인 7두(0.62%, 경남 2두, 경북 2두, 제주 3두)의 항체 양성축을 검색하여 보고하고 전국적인 한우에 대한 브루셀라병에 대한 검색의 필요성을 제기한 바 있다.

본 실험에서는 브루셀라 양성으로 판정되어 살처분하는 한우 및 젖소를 대상으로 브루셀라균의 분리를 시도한 바 한우에서는 45두 중 12두(26.7%)에서 균분리가 되었고 젖소에서는 16두 중 11두(64.7%)에서 균분리가 되었으며, 항체역가 100배인 7두에서는 균분리가 되지 않았으나 200배 이상에서는 품종별로 다소 차이는 있으나 균분리가 되어 항체역가가 높을수록 균분리율이 높았으며, 균분리 재료별로 자궁점막조직에서 9두(14.8%), 상유방림프절에서 15두(24.6%)에서 분리되어 김 등(1988)이 제주도 양성우에서의 균분리 성적과 정 등(1988)의 경북지방 젖소를 대상으로 균분리 성적인 자궁내용물과 상유방림프절에서의 균분리율이 높은 것과 김 등(1991)이 제주도 양성우의 상유방림프절에서 가장 많이 브루셀라균이 분리되었다고 한 결과와도 일치하였으나 품종에 따라 균분리율의 차이가 다소 인정되었다. 본 실험에서 한우와 젖소의 품종별 각 장기에서 균분리율을 조사한 바 한우에서 균분리율이 다소 낮은 것으로 나타났으며, 항체역가가 한우에서는 800배인 개체에서 균분리율이 가장 높게 나타났으며, 젖소에서는 400배에서 가장 균이 잘 분리되었다. 한우에서 브루셀라균 분리율이 젖소에 비해 낮은 것은 젖소에서는 착유 등의 이유로 항균제의 사용이 제한적으로 이루어지나 한우의 경우에는 출하목적의 비육시기

이외에는 항균제의 사용이 가능하므로 항균제에 의한 브루셀라균의 성장이 억제되어 체내 분포도가 낮은 것으로 생각되며, 균분리된 한우와 젖소를 대상으로 장기별 균분리율을 보면 젖소는 상유방립프절에서 11두가 균분리되었으나 한우는 4두에서만 상유방립프절에서 브루셀라균이 분리되었고 자궁조직에서는 한우에서 8두가 분리되었으며, 젖소에서는 1두가 분리된 점을 고려할 때 한우에서 브루셀라균 분리에 자궁조직을 채취하여 이용하는 것이 바람직하다고 판단되고 상유방립프절 이외의 다른 림프절에 대한 균분리 배양실험을 추가로 실시하는 것이 고려되어야 할 것으로 생각된다. 김 등(1968)이 브루셀라균에 자연감염 및 인공감염시킨 한우를 대상으로 항체역가 및 장기별 균분리율을 조사한 결과 항체역가가 높을수록 균분리율이 높았으며, 체조직내의 균분포율도 높다는 성적과 Huber 등(1986)이 보체결합반응과 Rivanol test에서 항체역가가 높을수록 균분리율이 높다는 성적과 유사한 결과를 얻었다. 살처분우 61두를 대상으로 혈액을 채취하여 균분리를 실시한 결과 브루셀라균이 분리되지 않았고, 김(1997)과 심 등(1996)도 제주도 및 경기도 지역 브루셀라양성우를 대상으로 혈액에서 균을 분리하지 못하였다고 하였으나 이는 혈액내에 존재하는 브루셀라균의 수가 적었거나 균분리시 부적절한 배양방법의 선택에 의한 것으로 생각된다.

2006년 브루셀라병 정기검진 의뢰된 혈액 중 Rose Bengal 시험에서 양성인 혈액 810두를 대상으로 혈액내 브루셀라균 분리를 위해 장기 세균배양법 및 항체역을 측정하고 결과 101두(12.5%)에서 균분리가 되었으며, 표준시험관응집반응법에 의한 항체역을 측정하여 균분리 성적과 비교한 결과 25배 이하의 혈액에서는 균분리가 되지 않았고 50배에서는 152두 중 4두가 분리되어 낮은 균분리율을 나타내었고, 200배 이상의 양성우 428두에서 82두(19.2%) 분리되었고 1600배 이상의 고역가에서는 27두(28.1%)의 높은 균분리율을 나타내어 살처분소에서 항체역가에 따른 장기별 균분리율과 비교하여 유사한 균분리 성적을 나타내었다.

사람에서는 브루셀라병을 진단하기 위해 항체검사를 실시하고 혈액을 채취하여 BATEC(Becton Dickinson, USA) 등의 혈액자동배양기를 이용하여 장기배양방법으로 균분리를 시도하고 있다(Banna-tyne 등, 1997). 본 실험에서는 혈청분리한 혈괴를 대상으로 브루셀라선택액배지에 30일간 배양하면서 균의 분리를 시도한 바 브루셀라균이 분리되는 것으로 보아 혈

액 등 조직에 존재하는 적은 수의 브루셀라균을 분리하기 위해 1차 증균배양한 후 평판배지에 접종하는 것이 균분리를 위해 가장 올바른 방법이라고 생각된다.

Etemadi 등(1984)은 브루셀라병 양성의 사람 혈액을 대상으로 혈구 용해후 원심분리하여 침전물을 직접 배양하는 방법으로 혈액에서의 브루셀라균 분리를 시도하여 혈액 124건에서 14주(11.1%)를 분리하여 보고한 바 있으며, Gaviria-Ruiz 등(1995)은 인공감염시킨 혈액을 이용하여 다양한 방법으로 혈액을 처리하여 실험한 결과 백혈구 용해 후 세균배양한 경우에 가장 높은 균분리율을 나타내었다고 보고하였다.

브루셀라균은 약제내성과 관련된 plasmid의 존재가 부정확하고, 세포내 기생세균으로 가축에서는 감염시 치료의 가치가 없어 살처분 및 도태 등의 방법이 적용되나 사람의 경우에는 브루셀라병 감염시 감수성항균제의 장기간 투여가 권장되고 있다. 본 실험에서는 브루셀라 야외분리주를 대상으로 항균제 감수성 실험을 한 결과 ampicillin, lincospectin, amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, tetracycline, ciprofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin 등 11종에 감수성이 있으며, 반면에 penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, vancomycin, 등 4종에는 내성이 있는 것으로 조사되었다. 김 등(2000)은 브루셀라백신주인 RB51주를 대상으로 14종의 항균제에 대한 감수성 시험결과 nalidixic acid를 제외한 대부분의 항균제에 감수성을 가진다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었고, Garcia-Rodriguez 등(1993)은 브루셀라균에 대한 streptomycin 등 10종의 항균제에 대한 최소살균농도(MIC)를 조사한 결과 새로운 macrolides계 항생제는 erythromycin에 비해 2에서 8배의 높은 살균농도를 가지며 rifapentine은 rifampin과 같은 농도(1μg/ml)에서 살균효과를 가진다고 보고하였다. Richardson 등(1962)은 streptomycin과 다른 항균제의 병용에 의한 항균제의 상승작용을 실험한 결과 세포내의 살균작용을 위해 세포의 항균제 농도의 5에서 10배의 농도가 필요하며 tetracycline의 경우 같은 농도에서는 세포내 브루셀라균의 정균 또는 성장이 가능하나 streptomycin과 병용시에는 뚜렷한 살균작용을 보인다고 보고하였고 Garcia-Rodriguez 등(1991)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 quinolone계 항균제인 norfloxacin,

ciprofloxacin, enrofloxacin에 대하여 디스크확산법으로 감수성검사를 실시한 바 유효농도에서 감수성이 있는 것으로 나타나 다소 차이점이 있는 것으로 나타났으며, Hall 등(1970)은 27주의 브루셀라균을 대상으로 항균제의 MIC를 실험한 결과 chlortetracyclin, erythromycin, gentamicin, streptomycin, kanamycin, rifampin이 가장 효과적이고 penicilin, cephalosporin계, lincomycin, sulfadiazine, chloramphenicol 등의 항균제는 상대적으로 비효과적이라고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었고, Schurig 등(1991)은 브루셀라 백신 균주인 RB51주, 45/20주와 S19주 및 *B. abortus* 2308주를 대상으로 항균제 감수성 시험을 실시한 결과 실험균주 모두 ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, neomycin, oxytetracycline, carbenicillin, cephalothin, streptomycin, nitrofurantoin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole에 감수성이 있다고 보고하여 본 실험 결과와 유사한 결과를 나타내었으나 cephalothin와 trimethoprim/sulfamethoxazole에 대한 결과에서 차이점이 인정되었다.

사람의 브루셀라병은 수의사, 목부, 도축가공업자 등에 많이 발생하며, 주 감염경로는 유산태아 및 오염 조직의 접촉에 의한 경구를 통하여 주로 감염되고, 실험실에서 균배양 및 계대 등의 작업시 실험자에게 감염된 보고가 있다(Fiori 등, 2000; Meyer 등, 1941; Robichaud 등, 2004). 본 실험에서 혈액에서의 균분리 결과를 고려할 때 브루셀라병 진단을 위해 혈청검사를 실시하는 실험실에서는 검사용 혈액 취급시 감염방지를 위한 안전설비 등의 대책을 마련하여야 하고 혈청검사 요원에 대한 정기적인 안전교육 및 실험실의 생물안전성(biosafety) 개선을 위한 대책이 필요하다고 생각된다.

결 론

2002년부터 2006년까지 경북지방에서 혈청검사에서 소브루셀라병으로 판정된 소를 대상으로 조직 및 혈액을 채취하여 균분리를 시도하고 균의 생물형질, 생화학적 특성 및 항균제 감수성시험을 실시한 결과는 다음과 같다. 한우 및 젖소 208호 871두를 대상으로 조직 및 혈액을 채취하여 항체역가 및 균분리율을 조사한 바 124두(14.2%)에서 균이 분리되었으며, 축종별로 한우에서 820두 중 110두(13.4%)가 분리되었고, 젖소에서는 51두 중 14두(27.5%)가 분리되어 한우보다

다소 높은 분리율을 나타내었다. 장기별로는 한우에서는 자궁점막조직에서 45두 중 8두(17.8%)가 분리되어 가장 높은 분리율을 나타내었고 젖소에서는 상유방림프절에서 16두 중 11두(68.8%)가 분리되어 가장 높은 분리율을 나타내어 축종별로 균분리되는 장기가 다소 차이가 있었으며 양성 혈액을 대상으로 균분리를 시도한 바 한우에서는 775두 중에서 98두가(12.6%)가 분리되었고 젖소에서는 35두 중 3두(8.6%)가 분리되었고 항체역가별 균분리율을 보면 역가가 높을수록 균분리율도 다소 높은 것으로 조사되었다. 색소성장요구성, 생화학적 성상, 파지형 등을 조사한 결과 분리된 균은 모두 *B. abortus* bv 1형으로 조사되었다. 항균제 감수성 실험 결과 ampicillin, lincospectin, amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, tetracycline, ciprofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin 등에 감수성이 있으며, cephalothin, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, vancomycin 등에는 내성을 나타내었다.

참 고 문 헌

- 김두희, 정병택, 문재봉. 1968. 브루셀라감염한우에 대한 혈청학적연구. 농사시험연구보고 11(5): 1-18.
- 김병구, 김동성, 이택주. 1957. Brucellosis에 관한 연구. 제1보 Brucellosis의 면역학적 조사보고. 가축위생연구소 연구보고 5: 79-91.
- 김병구, 송병균, 이택주. 1959. Brucellosis에 관한 연구. 제2보 가축 brucellosis에 대한 면역학적 조사보고. 가축위생연구소 연구보고 6: 9-23.
- 김우택, 이완수, 김공식. 1991. 제주도내 축우 부루셀라병 발생상황 조사. 한국가축위생학회지 14(2): 104-109.
- 김종만, 우승룡, 이지연, 정석찬, 강승원, 김종엽, 윤용덕, 조상래, 유한상, Olson SC. 2000. 부루셀라백신(RB51)의 안전성에 관한 연구. 대한수의학회지 40(3): 533-541.
- 김종만, 정석찬, 박정문, 현관중, 마점술. 1988. 부루셀라 양성우에서 분리한 부루셀라균의 성상과 혈청학적 진단법 비교. 농사시험연구논문집 30(2): 1-6.
- 김종성. 1997. 소 부루셀라병 잠복기간과 방역대책, 제주도 소 부루셀라병 근절대책을 중심으로. 한국가축위생학회지 20(1): 1-10.
- 농림수산식품부. 2007. 결핵 및 브루셀라병 방역실시요령. 농림부.
- 박노찬, 김상윤, 조광현, 김영환, 조민희, 정종식, 김봉환. 1998. 경북지역의 부루셀라병에 관한 연구. 한국가축위생학회지 21(4): 451-465.
- 심항섭, 고태오, 유성중, 우종태, 박병욱, 김성렬, 박유순. 1996. 경기도에서 발생하는 유우부루셀라병에 관한 연구. 한국

- 가축위생학회지 19(3): 189-198.
- 정종식, 조용준, 박청규. 1988. 경북지방 젖소로부터 *Brucella abortus*의 분리 및 균형별. 대한수의학회지 28(2): 339-343.
- Alton GG, Jones LM, Piet DE. 1975. *Laboratory techniques in brucellosis*. 2nd Ed. WHO, Geneva: 11-63.
- Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z. 1997. Rapid diagnosis of *brucella* bacteremia by using the BA-CTEC 9240 System. *J Clin Microbiol* 35(10): 2673-2674.
- Beran GW, Steele JH. 1994. *Handbook of zoonoses*. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton: 9-39.
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd Ed, Vol 2. Springer Press, New York: 370-389.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals*. 3rd. CLSI document M31-A3, Wayne, Pennsylvania.
- Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstrete DR, Winter AJ. 1984. Porins of *brucella* Species. *Infect Immun* 44(1): 16-21.
- Etemadi H, Raissadat A, Pickett J, Vahedifar P. 1984. Isolation of *brucella* spp. from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 20(3): 586.
- Farrell ID. 1974. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res Vet Sci* 16: 280-286.
- Fiori PL, Mastrandrea S, Rappelli P, Cappuccinelli P. 2000. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 38(5): 2005-2006.
- Garcia-Rodriguez JA, Munoz Bellido JL, Fresnadillo MJ, Trujillano I. 1993. *In vitro* activities of new macrolides and rifapentine against *brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 37(4): 911-913.
- Garcia-Rodriguez JA, Garcia Sanchez JE, Trujillano I. 1991. Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against *brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 35(4): 756-759.
- Gaviria-Ruiz MM, Cardona-Castro NM. 1995. Evaluation and comparison of different blood culture techniques for bacteriological isolation of *Salmonella typhi* and *Brucella abortus*. *J Clin Microbiol* 33(4): 868-871.
- Hall WH, Manion RE. 1970. *In vitro* susceptibility of *brucella* to various antibiotics. *Appl Microbiol* 20(4): 600-604.
- Hirsh DC, Zee YC. 1999. *Veterinary microbiology*. Blackwell Science Press: 196-203.
- Huber JD, Nicoletti P. 1986. Comparison of the results of card, rivanol, complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. *Am J Vet Res* 47(7): 1629-1631.
- Lopez-Goni I, Moriyon I. 2004. *Brucella*: Molecular and cellular biology. Horizon Bioscience, Norfolk: 1-432.
- Meyer KF, Eddie B. 1941. Laboratory infections due to *Brucella*. *J Infect Dis* 68: 24-32.
- Nielsen K, Duncan JR. 1990. *Animal brucellosis*. CRC Press, Boston: 1-453.
- OIE. 2004. *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals*. Part 2, Section 2.3, Chapter 2.3.1. OIE Press, France, Paris.
- Richardson M, Holt JN. 1962. Synergistic action of streptomycin with other antibiotics on intracellular *Brucella abortus* *in vitro*. *J Bacteriol* 84: 638-646.
- Robichaud S, Libman M, Behr M, Rubin E. 2004. Prevention of laboratory-acquired Brucellosis. *Clin Infect Dis* 38: 119-122.
- Santos JM, Verstrete DR, Perera VY, Winter AJ. 1984. Outer membrane proteins from rough strains of four *brucella* species. *Infect Immun* 46(1): 188-194.
- Schurig GG, Martin Roop II R, Bagchi T, Boyle S, Buhman D, Srirangnathan N. 1991. Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 28: 171-188.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and infectious disease of domestic animals*. 8th Ed. Cornell University Press, New York: 135-152.
- Verstrete DR, Winter AJ. 1984. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* 46(1): 182-187.
- Wilesmith JW. 1978. The persistence of *Brucella abortus* infection in calves: a retrospective study of heavily infected herds. *Vet Rec* 103(8): 149-153.
- Young EJ, Corbel MJ. 1989. *Brucellosis: Clinical and laboratory aspects*. CRC Press, Boca Raton: 1-192.