

제1차 년도
결과 보고서

소의 브르셀라병에 의한 養畜 農家の 經濟的
損失의 最小化를 위한 對策 研究에 관한 研究

Study on reduction of economic loss of
farmer due to bovine brucellosis

전 북 대 학 교

농 림 수 산 부



제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 소의 브르셀라병에 의한 養畜 農家の 經濟的 損失의 最小化를 위한 對策 研究에 관한 研究 課題의 제1차년도 결과보고서로 제출합니다.

1995년 12월 16일

주관연구기관명:	전 북 대 학 교
총괄연구책임자:	백 병 걸
연구원 :	이 호 일
협동연구기관명:	파 천 연 구 소
협동연구책임자:	김 동 성
협동연구기관명:	서 울 대 학 교
협동연구책임자:	박 용 호

요 약 문

I. 제목: 소의 브르셀라병에 의한 養畜 農家の 經濟的 損失의 最小化를 위한 對策 研究에 관한 研究

II. 연구 개발의 목적 및 중요성:

- Brucellosis는 우리나라에서 중요한 인수공통전병으로서 양축 농가에 경제적 피해를 끼치고 있다.
- 이 질환에 감염되면 가축전염병예방법상 살처분되도록 되어있는 바, 최근 5년간 매년 약 500 두의 살처분으로(국가 보상금 10억/년) 국가 와 양축농가에 큰 경제적 손실을 끼치고 있었다.
- 정확한 진단 방법의 개발을 위하여 살처분되는 소의 축사 위생 상태, 각종 가검물의 분석과 같은 역학적 연구를 수행하였으며, 숫소의 정액에 대한 감염 여부를 Polymerase Chain Reaction으로 검진하여 양성 우 3두를 색출, 살처분함으로써 이질병의 전파를 차단하였다.
- 양축농가의 경제적 손실을 최소화하여서는 살처분되는 소의 개나 고양이의 사료 생산에 활용할 수 있는 특수 도축장의 활용 제도의 필요성을 인정할 수 있었다.
- 이 질병의 확산은 낙농가의 축산 포기하는 국면에 달하게 되며, 이를 막아야 하는 진단 방법의 개선이나 예방접종 시행과 같은 국가 정책의 대 전환에 대한적극적인 역학적 연구가 필요함은 농촌현장에서 예로사항 임을 파악하였다.

III. 연구 개발 내용 및 범위:

- 국내에서 분리한 균주를 이용하여 특이 항원 및 항체의 생산하였다.
- 브르셀라유형 지역인 제주도 133두의 우소의 정액을 채취하여 Polymerase Chain Reaction 법으로 3두의 양성 우를 식출하였다.
- 이 같은 양성 우의 혈청에 대한 기존의 국가 공인 진단 방법인 Tube Agglutination Test 등의 방법과 비교하였던 바, 양성물에 차이가 나타나므로서 Milk Ring Test, Complement Fixative Test, Tube Agglutination Test의 개선과 보안으로서 보다 정확한 진단 방법을 유우의 정기 검진사업에 활용하여야 함을 위한 다양한 진단 방법 개발 연구(CFT, PCR, Latex T, Western blot)가 이루어져야 함을 밝혀내었다.
- 양성 우의 발생 지역에 대한 모든 역학적 연구에 근거한 방역 및 예방 대책을 수립의 필요성을 파악하였다.

IV. 연구 개발과 활용에 대한 건의:

- 정확한 진단을 위하여 미국 등지에서 CFT 활용으로 살처분 두수를 최대한으로 줄이기 위한 정기 착유우 검사 방법의 변경을 적극 건의 함.

- 국가 검진 사업에서 양성 우를 살처분에 앞서 가검물을 본 연구진과 같은 연구기관에 신속히 보내어 PCR기법으로 재확인하여 양성으로 판명된 소만을 살처분 시킬 수 있는 법적 장치를 수립 요청함.
- 우리나라에서의 예방용 백신 활용에 대한 장기적인 국가 차원에서의 계획 수립을 위한 연구의 지원을 건의한다.

Summary

Brucellosis is a worldwide infectious disease of animals which may be transmitted to humans. The disease is transmitted to humans from the unpasteurized milk of infected animal, or by direct contact. Many countries have imposed measures to control or eradicate *Brucella abortus* due to economic losses and hazards to human health associated with the disease. The main approaches for control have included detection usually by serological methods, and elimination of affected animals, vaccination of remaining animals and the observation of general principles of hygiene to prevent reintroduction of infection. Bovine brucellosis is very important zoologies in Korea as well as worldwide. To eradication of this disease in Korean, All dairy cattle are used diagnosed by means of Milk Ring Test at the manufactory of milk not to be sprat out. Recently, The number of slaughter cattle is increased steadily from 180 heads of slaughter cattle in 1989 to above 5 hundred of slaughtered cattle in 1994, There are no way of avoid the economic loss of farmers due to bovine brucellosis, if government do not change or prepare the governmental official diagnosis strategy. In order to reduce a great of economic loss, Epidemiological researches which should be carried out quickly, have to focus to find out the accuracy and sensitive diagnosis methods for brucellosis. For instances, the serological diagnosis method should be enforced by detection of organism from specimen, Brucella DNA by polymerase chain reaction, specific antigen by Western blot. We could get an initial achievement during the 1st year of this project for reducing number of slaughter animals by using PCR for semen of cattle and using Compliment Fixative Test instead of Milk Ring Test and Tube Agglutination Test. This experiments seems to indicate that PCR, CFT methods are useful method for diagnosis the bovine brucellosis in the future.

Contents

Cover Page	1
Project Summary	5
Table of Contents	6
The 1st chapter : Introduction of Research project	8
Project Description	
1. Background and Significance	8
2. Status of Research in this field	16
3. Strategy of Research	20
4. Spectrum of Research	21
5. Survival livestock farmer in WTO	30
6. Preliminary Result/Investigator Capability	33
7 Special Recommendation and Considerations	36
The 2nd Chapter : Development of Diagnosis for Brucellosis	37
The 3rd Chapter : Analysis on the Specificity of <i>Brucella</i> spp	43
The 4th Chapter : Epidemiology of Brucellosis and Specificity and Function of T cells.	53
The 5th Chapter : Product diagnosis Kit and Efficacy of vaccine production for brucellosis.	72
Reference	78

목 차

제1장	서론 -----	8
	제1절 연구의 배경 및 필요성 -----	8
	제2절 국내·외 기술 및 연구현황 -----	16
	제3절 연구추진 전략 -----	20
	제4절 연구 영역 및 범위 -----	21
	제5절 WTO 시대를 맞이하여 연구 필요성 확인 -----	30
	제6절 제 1차년도 연구결과의 기대효과 및 파급효과 -----	33
	제7절 활용방안 -----	36
제2장	제1세부 분야 : Brucellosis진단방법 개발 -----	37
	제1절 Brucellosis 진단을 위한 Polymerase Chain Reaction 방법의 활용 -----	37
	제2절 결과 -----	40
제3장	제2세부 분야 : Brucella spp에 있어서의 균주간 특이성 연구 -	43
	제1절 서설 -----	43
	제2절 재료 및 방법 -----	44
	제3절 결과 -----	51
제4장	제3세부 분야 : Brucella spp 역학조사 및 면역활성세포에 관한 연구 -----	53
	제1절 서설 -----	53
	제2절 재료 및 방법 -----	55
	제3절 결과 -----	60
제5장	제4세부분야 : Brucella spp 예방약의 산업적 생산을 위한 연구 -	72
	제1절 서 설 -----	72
	제2절 재료 및 방법 -----	73
	제3절 결과 -----	74
제6장	참고문헌 -----	78

☆☆

소의 브르셀라병에 의한 養畜農家の 經濟的 損失의 最小化를 위한 對策 研究

☆☆

제 1 장 서 론

제 1 절 . 研究의 背景 및 必要性

1. 研究 背景

< 1994, 1995년도 發生 現況을 注視하면서 >

1958년도 외국 도입우에서 브르셀라병이 발생한 이후 제주도 전역으로의 확산은 물론 전국적으로 확산되어 流産畜, 不妊, 泌乳量 減少 및 증체율 減少 등에서 오는 경제적 손실로 양축업 발전에 큰 영향을 미치고 있을 뿐만 아니라, 이는 人獸共通전염으로서 국민의 보건에도 영향을 주고 있다. 1995년도 10월말 農林水産部の 傳染病 發生 報告에 의한 家畜 중 소의 Brucellosis에 感染한 경우는 241 두이며, 10월 한 달에만 무려 100두의 소가 感染되어 感染 頭數가 연말에는 크게 增加될 것으로 사료된다(첨부 1 1995년도 家畜傳染病 發生 狀況). 사람에게 있어서는 파상열로 알려져 있는 중요한 疾患이며, 皮膚 疾患(Ariza et al 1989; Timothy et al 1981), 간이나 골수에 육아종 형성(Kelly et al 1960; Glasgow 1976; Tekkok et al 1993) 등의 보고가 있다. 人體 感染을 豫防하고자 이에 感染된 소는 모두 殺處分함으로서 최근 농림수산부에서의 연간

賠償額은 약 10억을 超過하고 있는 실정일 뿐만 아니라, 이에 대한 豫防 및 근절 對策이 마련되지 못할 경우에는 앞으로 매년 수십 억원을 賠償하여야 하며, 이는 國家 豫算을 대책 없이 매년 浪費하는 處地 임을 뜻할 것이다.

지난 5년간 우리 나라 農水産部の 家畜 傳染病 發生 統計 報告에 따른 우리 나라에서의 Brucellosis 發生은 趨勢를 보면 그 숫자가 기하 급수적으로 增加를 하고 있다. 즉 1987년도에는 166 두의 소가 이의 感染에 따른 도축이 1993년도에는 428두로 增加 趨勢를 나타내었고 1994년도 말에는 501두가 發生하였다.

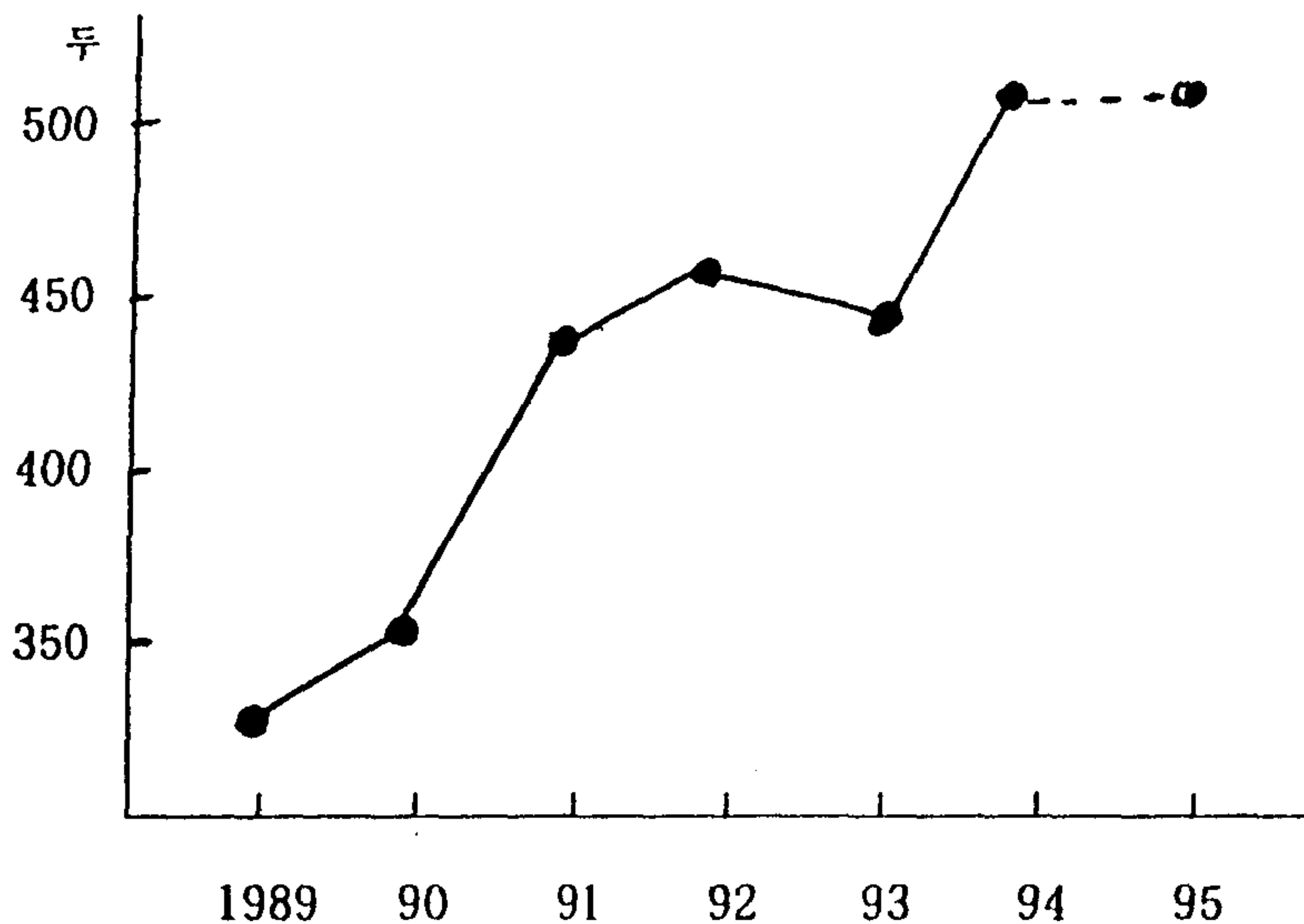


그림 1. 우리나라에서의 소 Brucellosis 발생 상황(傳染病 발생보고)

그 동안 이 疾病의 發生은 주로 제주도 地域에서 많이 발생하는 것으로 알려졌으나, 1990년 이후부터는 全國 各 地域에서 發病이 擴散되고 있었으

며, 본 현장애로사업의 研究의 일환으로 수행한 역학 조사에서, 충남의 젓소 목장의 젓소에서 感染된 牧場의 모든 소는 시기가 다를 뿐 모두 陽性으로 判定되므로서 한 酪農 家의 敗亡을 야기시키는 예를 접할 수 있었다. 앞으로 疾病에 대한 어떤 특별한 管理 對策, 豫防 對策 그리고 診斷 方法에 대한 세심한 研究가 이루어지지 않는다면, 낙농업을 포기하는 양축 농가가 많이 발생할 것이며, 더불어 이 같은 과정 중에 이 疾病의 타 가축에의 蔓延으로 분명히 國民의 健康을 위협할 것이 분명하였다. 즉 이 疾病에 의한 양축 농가의 자멸을 초래할 것으로 예측되는 바이다. 앞으로 疾病에 대한 獸醫學的인 研究가 만약 게을리 된다면 養畜農家에서의 brucellosis 發病 趨勢는 急騰할 것이며, 급등에 다른 젓소의 殺處分 두수는 급등하여 養畜農家에서의 經濟的 損失 規模는 엄청나리라 思料되는 바, 지금부터는 이 疾病에 대한 全般的인 研究가 持續的으로 이루어져야 한다.

또한 政府 當局에서는 이 重要性을 인식하여 양축농가의 현장애로 사업의 당면 課題로서 좀더 더 적극적으로 행정적인 대처안을 마련하여야 할 것이다.

WTO시대를 맞이한 농업 전반에 걸쳐서 생산성이 위축되어 있는 농촌의 현실을 감안 할 때, 이 질환에 의한 경제적 손실의 최소화가 요청되고 있음을 제1차년도 연구 과정에서 파악할 수 있었던 점을 강조하는 바이다.

2. 研究의 必要性

가. 陽性 젖소의 殺處分에 따른 經濟的 損失額 增加

(1) 우리 나라 소에 있어서 Brucellosis는 搾乳牛를 대상으로 매년 milk ring 試驗, 평판 응집반응, 試驗管 凝集 反應 등의 검사 방법으로 브르셀라 感染 牛를 檢索하여 殺處分하고 있는 家畜의 법정 제1종 傳染病에 속하는 심각한 人獸共通傳染病으로서 매년 政府에서는 막대한 殺處分에 따른 보상비를 지출하고 있는 실정이다. 더욱이 1995년 8월 충남 아산시의 한 牧場에서는 60두의 젖소에서 milk ring 과 Plate agglutination test에서 陽性 判定을 받고 18두를 3개월 사이에 살처분하여야 하는 가슴 아픈 酪農家를 접하였는데 내년에는 분명히 이들 나머지 40여 두도 역시 살처분되어야 하는 경우에 달할 것 같아서 家畜의 防疫과 國民의 健康을 보호하여야 하는 우리 수의사의 입장에서 볼 때 안타까웠다. 본 研究 課題의 목적의 하나인 한 마리의 소라도 새로운 診斷 方法을 활용하여 구제하여야 할 것으로 판단되었다.

(2) 소의 Brucellosis는 妊娠牛에 있어서 流死産 등 일으키고, 感染牛의 殺處分에 따른 축산 농가는 막대한 경제적 被害를 받고 있고, 牛乳의 生産量 減少를 일으킨다(Beran 1994; Gillespie & Timoney, 1981) . 또한 본 疾病에 대한 補償額은 현실 가의 약 80%수준이어서 영세 축산 농가에서 더욱 큰 고통을 받고 있다. 최근 그 檢出率이 높아짐에 따라서 더욱 축산의 욕이 저하되고 있는 실정이다.

(3) 최근 이 疾病의 發病率이 增加되는 있는 사실에 입각하여 우리가 염려하여야 할 또 다른 문제점은 人獸共通傳染病으로서 이의 疾病이 차지하는 중요성이다. 즉 Brucellosis는 매년 우리 政府에서 結核과 더불어서 搾乳牛에 대한 感染 與否를 國家 家畜 防疫 事業으로서 매년 檢診 業務를 수행하여

오고 있는 法定傳染病이다.

우리는 육류의 생식을 흔히 즐기는 식생활 문화가 있어, 언제든지 이질병이 소에서 사람으로의 感染 가능성에 대하여 거의 무방비한 식생활과 국민의 공중 보건 의식 때문에 이의 感染 기회에 항상 노출되어 있는 실정이다. 즉, 소고기의 消費量이 계속 增加하고 있는 현 실정에서 유우를 통한 이질병의 인체 感染은 완전히 豫防 할 수 있었으나, 최근의 한우 고기(육회)를 선호하는 사람들 때문에 더욱 위험한 疾病으로서 부각될 것으로 염려되는 바이다.

(4) 1차년도 역학적 조사에서 나타난 바와 같이 균주의 分離가 상유방 임파결절에서 分離되고 있어 牛乳를 경유한 菌體의 사람으로의 感染이 성행할 것인지, 아니면 牛乳의 살균 소독의 결함으로 이 疾病의 병원체가 사람에의 傳波가 성립된다면, 1995년 10월에 크게 문제시 되고 있는 고름 牛乳 사건보다도 더욱 큰 경제적 손실을 양축 농가에 입힐 수 있을 것으로 생각되어 그 동안 우리 정부의 철저하고도 지속적으로 수행하여 온 搾乳牛에 대한 검색 업무의 철저한 감독과 지속적 시행이 있어야 할뿐만 아니라, 이 疾病에 대한 防疫 對策의 수정과 검진 약품이 새로운 개발연구와 개선을 통하여 陽性 牛의 檢索 業務에 효율성을 극대화시켜 주어야 할 현실 임을 밝혀두고자 하는 바이다.

3. 研究 課題 吐出 過程

가. 우리 나라 소에서의 Brucellosis 發病 報告가 점차적으로 增加하고 있어 본 研究者는 1991년도부터 이 疾病에 의한 經濟的 損失을 最小化 할 수 있는 對策 마련을 위하여 基礎的 研究를 수행하여 왔다. 즉, 우리 나라 젖

소의 Brucellosis 感染率을 調査하고자 미국 농림성의 標準 診斷 方法에 의한 檢出 與否를 確認하기 위하여(첨부 2: 미국농림성의 허가를 받고 법적 절차를 밟아서(미국 政府로부터 소 血清 반입을 위한 許可證), 우리 나라에서 사육되고 있는 소 473두의 血清을 채혈하여 미국의 농림성에 의뢰하여 Complement Fixations Test(CFT)에 의하여 brucellosis의 感染 여부 診斷을 의뢰한 바 있다.

나. 그 검사 結果는 473두 모두 陰性 反應을 나타냄으로서(첨부 4: 검사 결과) 우리 나라의 젖소 感染率은 아주 낮거나 또는 診斷 方法의 문제점으로 오진되었지 않았나 의심이 되었다. 이에 감수성 및 특이성이 높은 새로운 診斷 기법의 개발에 대한 관심을 갖게 되었다.

다. 그러나 1993년도 어느 家畜衛生試驗所에서 실시한 搾乳牛 檢索에 의하여 brucella 陽性 牛로 판명되어 殺處分 명령된 3두의 血清을 미국의 농림성에 의뢰하여 Brucellosis의 感染 여부를 의뢰하였던 바, 모두 陰性으로 判定된 診斷 結果를 얻었다(첨부 5. 미국 농림성의 血清 診斷 결과). 이 같은 結果가 의미하는 것은 확실하지 않지만 몇 가지 사실에 대하여 좀더 확실한 疫學的 研究가 이루어져야 할 필요성을 느끼었으며, 본 研究과제를 수행하게 되는 시발점이기도 하다.

라. 본 研究者 등은 이 疾病에 대한 國際的 相互 協力 研究 開發課題로서 1993년 미국 ILLINOIS 대학교 수의과대학과 協力研究를 수행하기로 하고, 이번 7월에 미국으로부터 Brucella abortus, B. canis, B. suis, B. ovis 및 B. melitensis의 미국표준 菌株를 수입하여(첨부 6. 미국 표준 균주의 수입 허가증), 본 研究者가 예전한대로 우리 나라에서 感染 젖소의 檢索에 사용하는 診斷用 kit, 陽性 判定技術 그리고 새로운 診斷 方法을 마련하여 새로이 分離될 菌株와 比較 研究 함으로써 國內에서 보균하고 있는 각종 균주

를 이용한 각 종 診斷 方法의 개선이나 보안을 위한 研究를 수행하고자 한다.

마. 1995년도 1차년도 研究 사업을 수행하면서 얻은 Brucellosis에 대한 農村의 실정을 경험한 본 연구자의 소감은 만약 이 疾病을 그간에 사용해온 診斷 方法과 技術만을 사용한다면 우리 나라에서의 이 疾病의 傳波는 젖소와 한우에서 빠른 시간 내로 이루어질 것이라는 것이다. 이는 우리 나라 축산 특히 젖소의 사육은 농가가 중에서 酪農을 포기하는 수가 增加할 것 같은 느낌을 가질 정도로 크게 위협을 주고 있었다.

바. 본 연구자 등은 陽性 젖소가 발견된 집단 사육 牧場의 소에 대한 검색 方法을 milk ring과 plate agglutination test 方法에서 탈피하여 Complement Fixative Agglutination과 타 方法을 활용하여 陽性 判定 診斷에 신중을 기하는 研究지도를 수행할 수 있었다.

사. 제주도 지역에서의 이 疾病의 만연 원인을 규명하기 위한 研究의 일환으로 종모우의 정액 내에 菌體의 함유여부를 확인하고자 PCR(polymerase Chain Reaction)을 수행하였던 바, 3두에서 陽性으로 判定되어 살처분시키므로서 인공수정에 의한 이 疾病의 傳波를 원천적으로 차단하는 現場의 研究 사업 결과를 도출할 수 있었다.

4. 經濟的 損失의 最小化를 위한 診斷 方法의 重要性

오늘 날 우리 나라 家畜에서 發病하고 있는 Brucellosis, 결핵, 광견병, 탄저 그리고 오제스키 등과 같은 人獸共通傳染病(Beran 1994; 손 등 1986)은 사람과 家畜의 생명을 위협하고 있을 뿐만 아니라 이의 感染

에 대한 感染 두려움이 증대하고 있기 때문에 이와 같은 疾病의 患畜을 신속하면서도 정확한 診斷으로 색출, 살처분의 방역 조치가 긴급히 요구되며, 더욱 나아가서는 앞으로 이들 疾病에 대한 우리 나라에서의 만연 위험을 대비한 研究가 수의공중보건학적 見地에서 이루어져야 할 것이다.

우리 나라에서의 많은 人獸共通傳染病 중에서 결핵과 더불어 Brucellosis의 發生率은 점차적으로 增加하여 1995년도 10월까지의 殺處分에 따른 補償額만도 5억 정도를 超過하고 있다. 이 疾病의 豫防을 위하여서는 현재 農林水産部에서 수행하고 있는 Brucellosis 檢診 事業과 더불어서 獸醫公衆保健學的 견지에서 적극적인 診斷 方法 개발과 疫學的 調査 研究가 폭넓게 이루어져야 할 것으로 思料된다.

Brucellosis는 소, 산양, 면양, 돼지 등과 같은 家畜에서 유산, 불임 등을 유발시키는 細菌性(*Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* 등) 人獸共通傳染病의 하나로서 이 미생물에 오염된 물질이나 또는 완전히 처리되지 않은 牛乳와 유제품을 통하여 經口 또는 皮膚 直接 接觸에 의하여 사람에게 感染된다(Banai et al., 1990; Beran 1994). 사람과 家畜에 있어서 이의 診斷은 용이하지 않으며, 일반적인 方法으로 病原菌의 分離는 불가능할 때가 있다(Alton et al., 1988). 이에 따라서 血清으로부터 *Brucella* 抗體를 檢出하며, 정량 하는 方法이 흔히 사용되고 있다.

本 研究者 등은 최근 家畜 특히 젖소에서 檢索率이 增加함에 따라서 人獸共通傳染病인 Brucellosis의 근절에 조금이나마 보탬이 되어 國民의 健康을 위하여 양축 농가의 소득 증대를 위하여 우리 나라에서 사육되고 있는 家畜을 대상으로 家畜에 있어서의 Brucellosis에 대한 感染狀況을 보다 면밀히 調査 研究하고자 한다.

이 같은 研究를 수행함에 있어서 지금까지 활용되고 있는 診斷方法을 활용함은 물론 抗原과 抗體反應 方法, DNA 檢出 方法, 그리고 PCR에 의한

檢出 方法을 중심으로한 研究가 이루어져야 할 것이며, 1995년의 제 1차 년도에 있어서 이미 종모우의 정액을 대상으로한 PCR기법을 확립하여 (Fich et al. 1989; Herman et al 1992) 실재로 운영하였던 바, 陽性 종 모우를 색출할 수 있었는데 이는 장차 Brucellosis검진을 위한 診斷 方法 活用할 수 있을 것이며, 이는 더욱 더 정확한 家畜(특히 한우를 중심으로)의 感染 狀況을 파악하는데 도움을 줄 수 있을 것이며, 양축농가의 經濟的 損失을 最小化 하기 위하여 診斷 方法의 다양화, 正確性의 향상을 꾀하였다고 생각되어진다.

제2절 國內.外 技術 및 研究 現況

1. 國內 研究 動向

가. 國內에서의 疫學的 調查 研究

우리 나라에서의 한우(김 등 1968; 김 등 1963)와 젖소에 있어서 Brucellosis 에 대한 疫學的 研究는 일찍이 폭넓게 이루어진 바 있다(김 등 1982; 김 등 1957; 김 등 1960; 박 등 1965). 특히 菌株 分離를 위한 研究(김 등 1988; 이 등 1961; 정 등 1988), 免疫學的 調查 研究(김 등 1959; 박 등 1965; 안 등 1982; 임 등 1993) 그리고 人獸 共通傳染病으로서의 중요성(손 등 1986) 등이 활발히 研究 보고된 바 있었다. 그렇지만 이같은 많은 研究에도 불구하고 매년 젖소에서의 發病 例는 增加되고 있

는 趨勢에 있다(정 등 1988; 김 등 1988; 농림수산 통계 연보 1988-1992). 또한 돼지(박 1963), 개(이 1983) 그리고 사슴 등의 Brucellosis에 대한 豫察 研究도 외국으로부터 축산물의 수입 증대됨에 따라 더욱 강화되어야 할 것이다.

나. 診斷方法에 대한 研究 動向

Brucellosis의 診斷 方法에는 여러 가지가 있어 각종 診斷 方法을 이용한 血清學的 調査 研究가 진행된 바 있고(김 등 1963; 김 등 1968; 김 1959; 김 등 1988), 牛乳를 이용한 診斷 方法(정 1969), 血清學的 診斷 方法에 대한 比較 研究(김 등 1982), 그리고 정확한 診斷을 위한 단클론성 抗體를 生産 報告하였으며(정 등 1989), ELISA 方法을 이용한 집단에 대한 診斷 方法에 관한 研究(임 등 1993) 및 *Brucella* spp. 균에 의한 血清 反應은 타 세균과(*Yershinia enterocolitica*)의 交叉 免疫 反應됨이 증명되어 더욱더 정확한 診斷을 수행하여야 함이 강조된 바 있다(안 등 1982).

2. 國外 最近 研究 動向

가. 호주나 뉴질랜드 등과 같은 Brucellosis 유행 地域에서는 거의 모든 家畜에 대한 豫防接種을 수행하고 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에 Hoffmann et al.(1990)이 *Brucella abortus* strain 1119-3을 배양하여 얻은 菌株로부터 分離한 抗原인 lipopolysaccharide를 이용하여 豫防 接種을 실시하여 抗體價가 잘 형성되었음을 보고하였으며, 이 물질은 細胞性 免疫 형성에 관여한다고 報告하였다. 결국 우리 나라에서도 머지 않아서 Brucellosis 豫防을 위하여서는 體液性 免疫과 細胞性 免疫을 유발시킬

수 있는 vaccine과 subunit vaccine 生産하기 위한 抗原에 대한 研究가 폭넓게 이루어져야 할 것이다

나. Brucellosis는 소, 산양, 염소 등에 널리 分布되어 있는 人獸共通 傳染病으로서 사람에게 있어서 이 疾病은 파상열로서 잘알려져있으며(Beran 1994), 피부염, 관절염, 무기력을 야기시킨다(Ariza et al 1989; Berger et al 1981). 이 疾病은 動物과 動物이 傳波시키며, 만약 한마리의 가축이라도 발병되면, 전 집단 군에서 신속히 그리고 적극적으로 檢診되어야 하는 疾病이다(Yinnon et al. , 1993; Zimmerman et al., 1990). 외국에서도 역시 이 疾病의 診斷은 주로 세균학적 그리고 免疫學的인 方法으로 이루어지고 있다(Mayfield et al. 1988). 미생물학적인 診斷 方法은 병원체를 직접 배양하여 檢診하는 方法이기 때문에 용이하지 않으며, 血液 배지를 이용한 배양에는 숙주가 소모되는 經濟的 短點 때문에 免疫學的 研究가 활발히 이루어지고 있지만 이에는 擬陽性의 예가 나타나고 있어 보다 정확한 診斷 結果를 얻고자 최근에는 점차적으로 분자생물학적 診斷 方法에 대한 관심이 지대하여 지고 있다(Pollice et al., 1985; Neumann et al., 1986; Hopper et al, 1989). 또한 *Brucella* spp사이의 抗原의 特異性이 있어 사람에게 있어서의 診斷을 위하여 사용하고자 하는 抗原의 종류에 따라서 凝集 反應의 結果가 각기 다르게 나타나므로써 비록 어떤 종의 *Brucella* 菌株에 感染되어 있을 경우에도 이를 診斷해내지 못한 체 경과하는 경우가 있다(Sarvamangala et al., 1987). 특히 유산한 송아지의 組織으로부터 *B. abortus*를 직접 찾아내었는데 세균수가 약 10^5 가 필요하다는 報告가 있다(Hopper et al., 1989). Mullis et al.(1987)은 Hybridization Dot 方法보다 더 정확한 PCR 方法을 報告하였다. 또한 *Brucella* 抗原은 凝集反應에서 가끔씩 *Yershinia enterocolitica* 와 交叉 反應을 나타내므로 이를 피하기 위하여 *Brucella*의 特異 抗原에 대한 단

크론抗體를 生産하여 신속하면서도 特異性이 높으며, 그리고 저렴한 技術로서 가치가 있는 Coagulation test方法을 소개하고 있다(Vizcaino & Fernandez-Lago, 1992). 그리고 속주 組織내의 DNA를 증폭시키기 위하여 최근에는 PCR은 *Brucella melitensis*와 *Brucella abortus* 동시에 檢出할 수 있는 Primer를 제작하여 Brucellosis를 檢診하는데 사용하고 있어(Baily et al., 1992), 본 연구자 등은 이같은 PCR Primer set(Ficht et al 1989)를 이용한 종모우의 정액 검사를 수행하였던 바, 1000bp에서 DNA의 증폭을 확인할 수 있었으며, 이 같은 研究 결과는 우리 나라에서 이 疾病의 研究 수행에 있어서 활용하여야 할 것이다.

제 3절 研究 推進 戰略

Brucellosis 感染 젖소의 殺處分에 따른 經濟的 損失을 最小化하기 위한 本 研究課題에의 技術 開發과 그 遂行 方法을 要約하여 圖式化하면 다음과 같다.

現在의 檢索 方法	診斷 方法의 多樣化	技術 開發 內容
<p>낙농가 착유 ↓ <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 집유소 검색 </div> ◆ Milk Ring Test ◆ 명판응집 반응 ◆ Rossvegal Test (비공인 진단법) ↓</p>	<p>陽性 젖소 發見 즉시 ↓</p>	<p>☞ 診斷用 Kit 개발</p>
<p>殺處分 命令 ↓ 國家 賠償 (現實價의 80 x) ↓</p>	<p>經濟的 損失을 最小化를 위한 診斷 方法의 多樣化 ◆ Compliment Fixative Test ◆ Latex Agglutinate Test ◆ Western Blot ◆ Polymerase Chain Reaction ◆ Identification of Organism ↓↓</p>	<p>☞ 診斷用 kit 개발 ☞ 活用 方法 確立 ☞ 培養 技術 確立 (검색 요원 교육 및 훈련)</p>
<p>養畜 農家의 被害 內容 ◆ 牛乳 生産 失敗 ◆ 食肉 生産 失敗 ◆ 畜産 拋棄</p>	<p>擬陽性 및 他 菌株와의 交叉 反應 젖소 索出로 殺處分 젖소 數를 현격히 줄일 수 있을 것으로 기대됨.</p>	<p>養畜 農家 保 護</p>

제 4절 研究 領域 및 範圍

1. Brucellosis 感染 소로부터의 可檢物 蒐集

1차년도 研究 기간에는 우리 나라 정부에서 매년 실시하고 있는 Brucellosis검진 사업에서 陽性으로 判定되어 살처분되는 젖소의 血清, 上乳房 組織, 牛乳 등을 수집하여 각종 研究에 活用할 수 있도록 하였다. 陽性 牛의 가검물을 포함하여 擬陽性 牛 등 130 頭의 가검물을 수집하였다(Table 5-p65).

이들 가검물을 이용하여 2차, 3차년도에는 우리 나라에서 사육(한우, 젖소, 산양) 동물의 血清을 수집하여, 既存 診斷 方法으로 확인 검정 시험을 하고자 하며, 擬陽性과 陽性 血清을 대상으로 CFT, ELISA, Western blot, Latex agglutination test 등의 검색 方法과 비교 시험을 수행하므로써 가장 특이성이 높은 診斷 方法을 Brucellosis 檢診 사업에 活用하고자 하며, 이 같은 診斷 方法의 폭 넓은 活用으로 統計學的으로 우리나라에서의 Brucellosis에 대한 전반적인 分布 狀況를 파악한다.

2. 診斷 方法의 比較 試驗

젖소, 한우 등의 Brucellosis 檢索에서 擬陽性 및 陽性으로 판단된 血清을 대상으로 기존에 사용되었던 MRT, Plate agglutination test 診斷법을 본 연구진이 개발하고자 하는 각종 診斷 용 kit과의 診斷 方法을 비교하므로써 앞으로 완전하면서도 안전한 特異性(speciality), 감수성(Sensitivity)이 높은 診斷 方法을 2차년도 生産한다. 이같은 診斷用 KIT를 생산하기위하여서는 SDS-PAGE와 Western blot方法에 근거한 특이 抗原을 찾아내며, Column Chromatography方法으로 특이 항원을 다량 얻

고자 한다.

이 같은 감수성이 높은 抗原을 많은 질병의 혈청학적 診斷 方法으로 활용하고 있는 Compliment fixative agglutination(US 1992)을 착유우의 정기 검색 方法으로 활용하든지, MRT와 Tube Test에서 양성으로 판정된 소만을 대상으로하여 제3의 診斷 方法으로 활용할 수 있도록 抗原性에 관한 研究를 증점적으로 수행하여, 上記의 政府 檢診 方法과 比較研究하고자 한다.

Brucellosis 感染된 소의 診斷 확인을 위하여 菌體의 分離 同定이 필요한 조치이나 菌體의 分離가 용이하지 않아서 20 例의 가검물에서 불과 3 例에서만 성공할 수 있었던 성적을 보면, 앞으로 이 疾病의 診斷 方法으로서 血清學的 診斷 方法 이외에 PCR(Polymerase Chain Reaction) 方法과의 陽性 檢出 率을 比較하고자 한다.

3. *Brucella abortus* 균주에 대한 特異 抗原準備와 抗體의 生産:

우리 나라 젖소에 대한 Brucellosis 檢診 事業에서 擬陽性 및 陽性 젖소의 殺處分에 사용되고 있는 診斷 方法에 반응하면서도 표준 균주의 인공 감염으로 얻어진 양성 혈청내 抗體과의 특이 반응을 할 수 있는 항원의 생산에 제2차년도 研究 目標을 해결하기 위하여서는 제 1차년도에 구입한 균주와 조항원을 접종또는 면역시키어 항체의 形成 狀況을 調査한다.

Brucella abortus 抗原의 純粹 分離는 아주 중요하다. 즉, *Brucella spp*의 표준 균주와 本 研究者 등이 1995년도에 感染 젖소로부터 分離한 균주를 brucella 액체 배지에 배양하여 얻은 菌體를 접종하여 몇 가지 方法을 이용하여 特異 抗體를 얻고자 한다.

먼저 표준 *Brucella spp*에 대한 항원성 물질의 특이성을 파악하기 위하여 흔히 단백질 분리에 활용된 SDS-PAGE와 Western blot 방법을 활용하

였다. 즉 *B. abortus* 외 5종의 표준균주(ATCC)를 배양하여 얻은 균체를 Leong의 방법으로 처리하여 전기영동하였던 바, 그림 2, 3에서 관찰된 바와 같이 특이성이 각 균체별로 관찰되었다. 이처럼 특이 抗原으로 나타났던 lipopolysaccharide를 얻어 이를 Western blot方法으로 특이 抗原이 결정되면 Column Chromatography方法으로 특이 抗原의 분획을 얻어 抗原生産하고자 한다. 이 같은 研究는 특이 抗原과 *Brucella* 感染 陽性 血清과 陰性 血清을 선별할 수 있는 方法으로서 특이성이 높은 抗原生産 가능성이 있음을 研究하고자 한다.

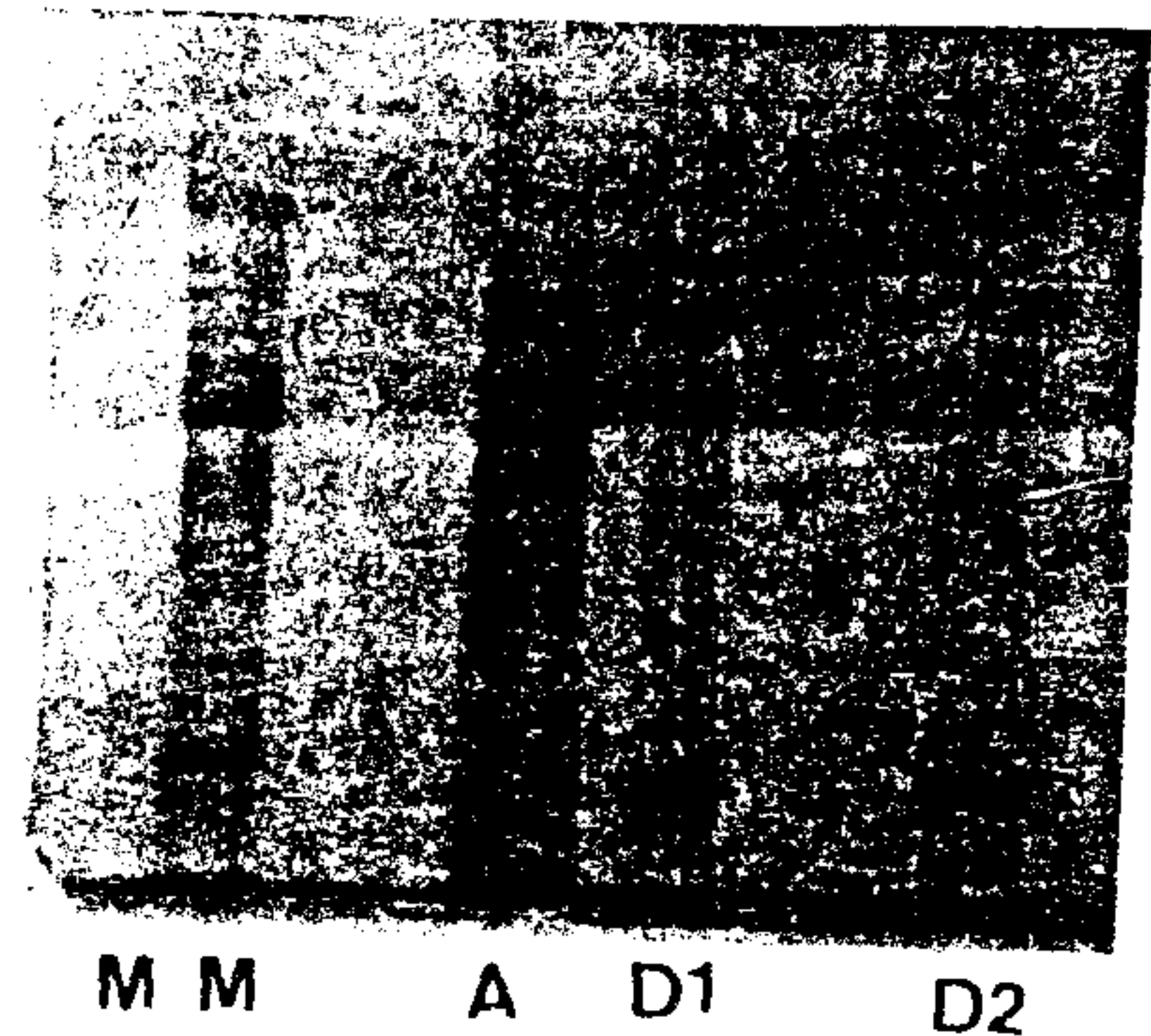
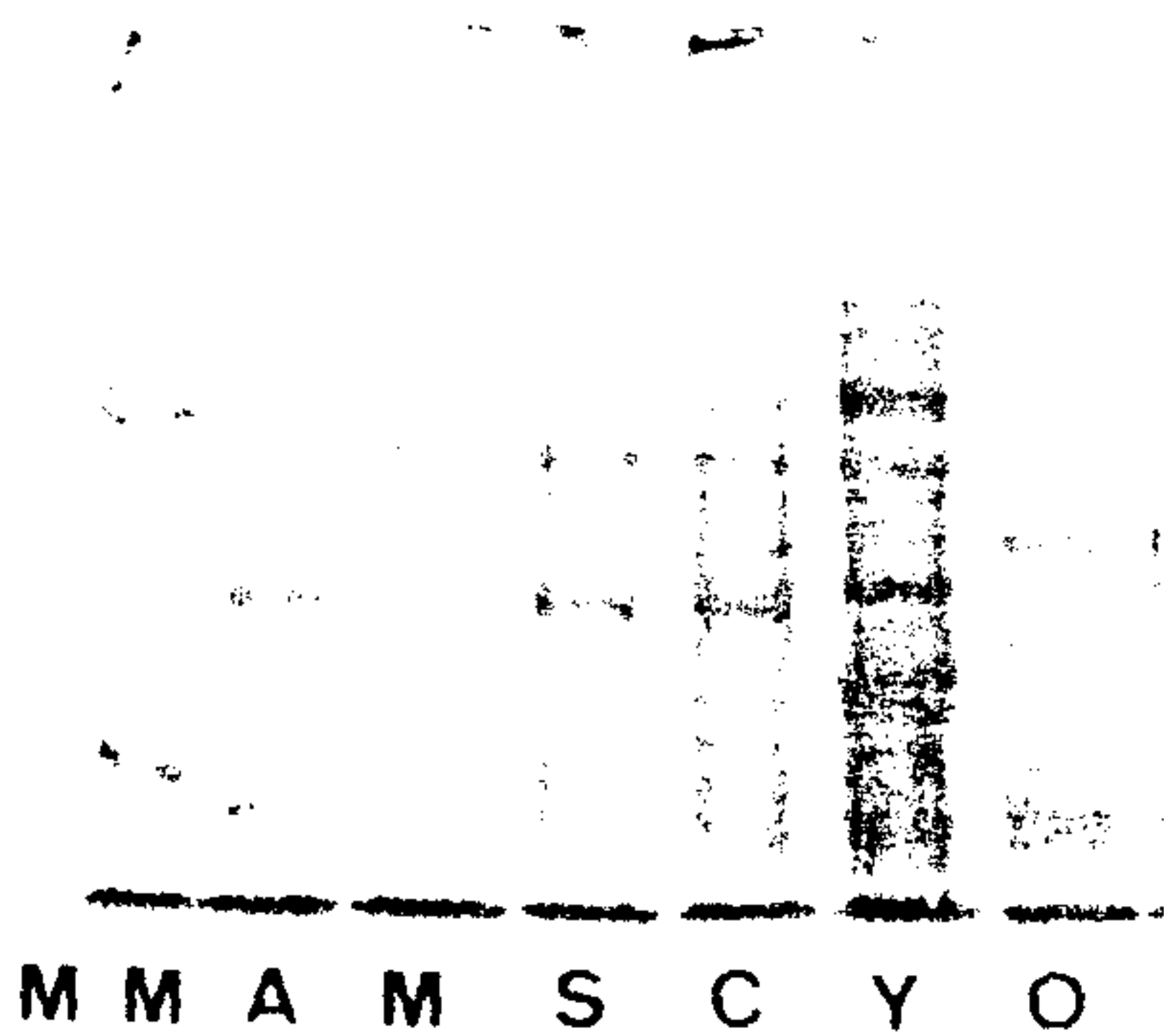


그림 2. 표준균주의 SDS-PAGE소견 그림 3. 국내분리균주의 SDS-PAGE소견

MM: Molecular Marker A: *B. abortus* M: *B. Melitensis*

S: *B. suis* C: *B. canis* Y: *Y. enterocolitica*

O: *B. ovis* D1, 2: *B. abortus*(Domestic Isolated strain)

4. 各種 實驗 動物을 이용한 標準菌株에 대한 抗體 生産:

특이 항원의 생산을 위하여서는 표준에 대한 실험동물을 이용한 항체의 생산이 있어야 하므로 제1차년도에 소, 염소, 돼지, mouse 등의 實驗動物을 이용하여 표준 항체를 생산하였다. 더불어 *Brucella abortus*와 교차 반응을 하는 항체를 생산하는 *Yershinia entericotica*에 대한 항체를

생산하였다. 표준 균주의 細胞 막을 파괴시키지 않고 단순히 80°C/30분에서 불활화 시킨 抗原으로 Freund's complete adjuvant를 접종한 후 2주 후에 4일 간격으로 2×10^6 를 근육접종하여 免疫 혈청을 生産하였다.

이같은 각 균주에 대한 標準 면역 抗體로서의 활용 가치를 CFT, Western blot 등에서 항원. 항체 특이성을 확인하는 研究를 2차년도에 수행하며, 抗原의 純粹分離를 위하여서는 上記의 抗原 처리법(Leong et al 1970)으로 生産한 抗原으로 SDS-PAGE하여 特異 抗原을 색출하고자 한다.

5. 診斷 方法 開發에 관한 研究

최근 각종 疾病의 정확하면서도 신속한 診斷을 위하여 많은 방법이 활용되고 있는 본 연구자 등은 우선 제주도 지역에서의 전파를 차단하기 위하여 瘧疾의 정액에 대한 Polymerase Chain Reaction 方法을 활용하였다. 그 밖에도 特異 DNA probe(Hopper et al., 1989; Fekete, et al., 1990 & 1992), In situ Hybridization, western blot, Latex agglutination test 등의 진단 방법 개발을 위하여 각 家畜 別(한우, 산양, 사슴 등) 擬陽性 및 陽性으로 判定한 血청, 組織(림프결절, 자궁체 등), 유청 등을 활용한 研究를 수행하였다.

가. Western blot과 ELISA 方法 準備

Brucellosis 診斷을 위하여 菌株로부터 얻은 抗原과 자연감염된 숙주의 양성 血청이나 인공면역시켜 얻은 양성 血청과의 免疫反應을 관찰하기 위하여 항원과 항체를 준비하였다. ELISA를 Cloeckaert et al.(1992) 등의 方法으로 抗原의 特異성을 파악하였다. 즉 SDS-PAGE (Laemmli 1970)을 수행하며, 實驗動物에서 얻은 抗血清과의 反應을 통하여 抗原의 특성을 각 菌株별로 파악하므로써 우리 나라에 分布하고 있는 抗原의 특

색을 분석한다. 이같은 研究는 우리 나라에서 Brucellosis가 만연하게 될 경우 이의 豫防을 위한 政策 수립에 基礎的 情報를 제공하게 될 것이다.

나. *Brucella* spp DNA 증폭을 위한 PCR 수행:

외국에서는 Brucellosis의 診斷을 위하여 감수성과 特異性이 높은 Polymerase Chain Reaction 方法은 이미 실용단계에 이르렀으며(Baily et al., 1992; Herman et al 1992), 이의 診斷效果를 극대화하기 위하여서는 Fekete et al.(1990 & 1992)의 方法에 준하여 primer를 설계하여 활용하였던 바, 정액으로부터 菌體의 확인이 가능하였다.

제 2차년도와 3차년도에는 國內 分離菌株와 외국 分離菌株를 Deley et al(1987)의 方法으로 *Brucella* spp의 genomic DNA를 template로 하여 PCR을 수행하며, 더욱 나아가서는 血液이나 림프결절과 같은 組織에서의 *Brucella* spp.의 DNA 증폭하므로써 血液이나 組織으로부터도 brucella DNA를 確認하고자 한다.

다. PCR기법의 확립과 활용 성적

우리 나라에서 가장 많은 소가 Brucellosis로 살처분되어온 제주도를 1995년 2월 방문하여, brucellosis 집단 발생의 원인을 분석 방안의 일환으로 제주도에서 Table 1(p 27)에서 보는 바와 같이 인공수정 精液 채취용 젖소를 대상으로 brucellosis 感染 여부를 검색하였던 바, 陽性 判定 젖소를 색출할 수 있었으며, 이처럼 陽性 牛는 동거하고 있는 다른 소에게 傳波 위험성이 높음을 감안 하여 신속히 살처분 조치를 취하므로써 感染된 수소에 의한 brucellosis 傳波 위험을 차단하였다. 그러나 제주도를 제외한 타 지역에서의 brucellosis 豫防을 위한 인공수정 精液의 검색 事業은 防疫 면에서 볼 때 새로운 당면 課題로서 부각되고 있다.

더욱이 국가에서 법적으로 매년 실시하고 있는 搾乳 乳牛만을 대상으로한 검색 국책 사업은 앞으로 이 疾病이 수소에 의하여서도 傳波될 수 있다는 사실에 착안한 防疫 대책이 수립되어야 한다는 사실을 처음으로 농림수산에 보고하는 例가 될 것이다.

①. 제주도 젖소의 精液 檢査를 위한 PCR: 제주도의 牧場에서 사육되고 있는 종모우의 精液을 인공 채취하여, Ficht et al(1989) 의 *Brucella abortus*의 세포 외막 단백질 생산 gene중 36KD 표현 DNA의 sequence에서 primer를 결정하였다. Primer I: GTA TCG TTC TTG AAG CCT AC; Primer II: GTG CAT TTC AAT AGG CTA GAG 를 準備하여 표준균주를 DNA Template로 하여 가검물에 대한 PCR을 수행하였던 바(95°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min, 95°C/1min/30 cycles, 72°C/5min), 약 1,000bp의 特異 DNA 증폭으로 診斷하였다(그림 4 참조). 그러나 43KD의 세포외막 단백질의 gene을 검색하기 위하여 PCR을 수행한 Herman et al(1992)도 역시 여러 종류의 세균들과의 특이성을 입증하였는데 이때 사용한 Primer (5' TGC TAA TAC CGT ATG TGC TT 3', 5' TAA CCG CGA CCG GGA TGT CAA3')(denaturation, annealing, extension: 95°C, 50°C, 72°C) 으로 증폭시켰을 경우 800bp의 물질을 얻었다.

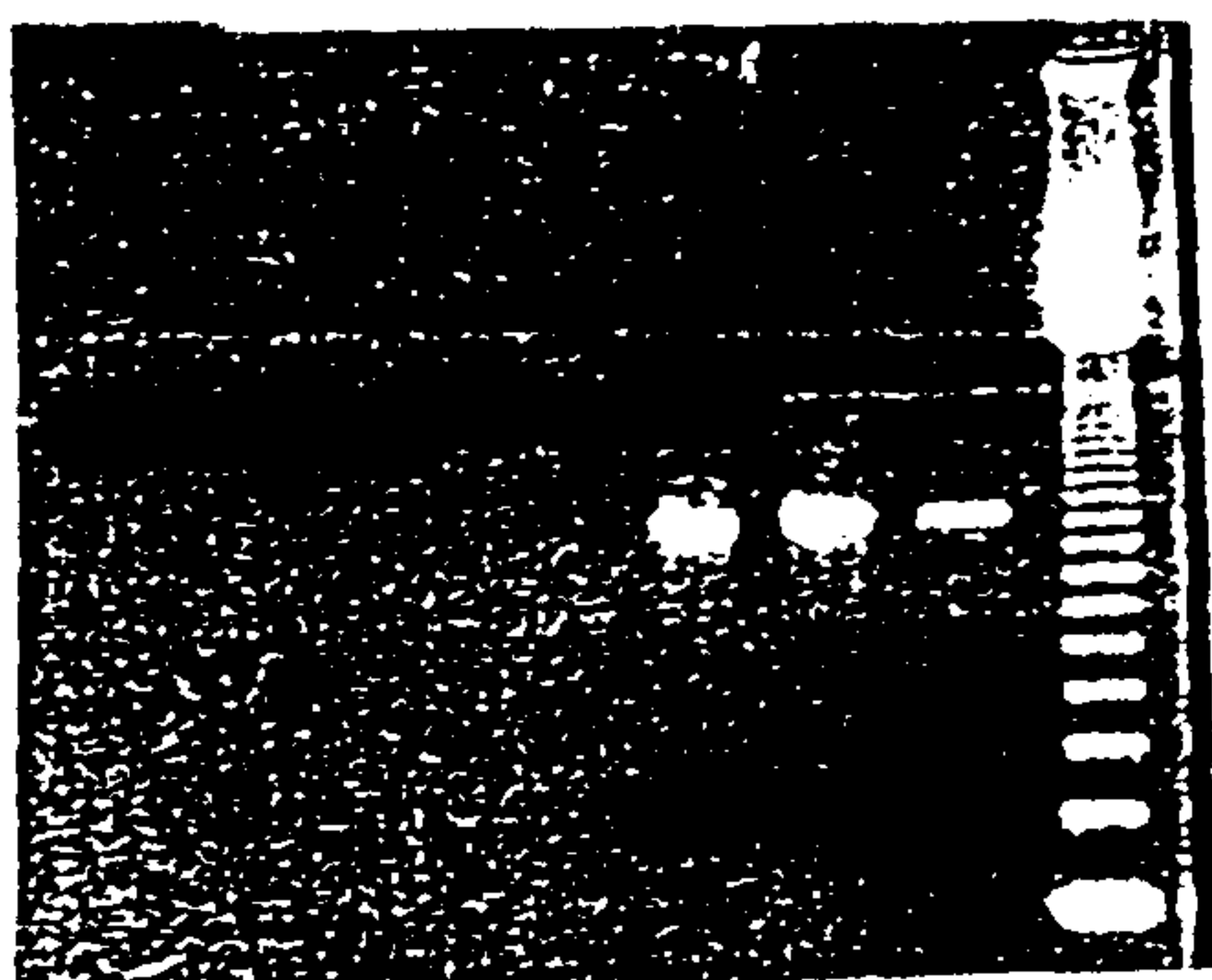


그림 2. 젖소의 정액의 PCR 산물

본 연구진은 研究 제1차년도에는 제주지역을 2 차에 걸쳐서 방문하여 정(1994)의 보고 내용에 따라서 제주도의 brucellosis만연은 숫소와도 밀접한 관계가 있을 것으로 미루어 역학 조사의 일환으로 정액을 채취하여 PCR를 수행하였다. 1차 52두, 2차 133두의 정액과 血清을 수거하여 PCR를 수행하였던 바, 感染 수소를 색출할 수 있었다. 이 같은 方法은 다른 血清을 이용한 검색 方法보다도 월등히 우수한 결과를 가져왔으며, 우리나라에서의 Brucellosis검색 方法으로 활용할 가치가 있을 것으로 생각되어 2차년도에는 각 표준 균주의 DNA특성을 관찰하고 組織이나 乳로부터의 Brucella spp DNA檢出을 시도하고자 한다.

Table 1. 濟州道 種牡牛의 精液 檢査 PCR 成績

검사 시기	검사 두 수	구 분	항체 검사			균 확인		결과
			로스 벵갈	평판	시험관	균분리	PCR	
1 차 ('95. 3)	52	의양성	-	2	2	-	-	2
		양 성	1	0	1	2	2	3
2차 ('95. 4)	133 (1차52 두포함)	의양성	2	2	3	-	-	3
		양 성	1	0	0	3	3	3

Table 1에서 관찰된 바와 같이 총 133두의 정액을 채취하여 Ficht et al(1989) 방법에 의하여 PCR을 수행하였던 바, 3두가 양성으로 나타났다(그림 4 - p 26 참조). 이들 소의 혈청은 로스벵갈, 평판응집 반응, 시험관 응집 반응에 음성 또는 의양성으로 나타났지만, 이들로부터의 균분리가 가능하였다.

② 感染 組織으로부터의 *Brucella spp*의 DNA: 感染 소의 淋巴組織으로부터의 *Brucella spp*의 DNA를 확인하기 위하여 In situ hybridization 方法을 확립하고자 한다. 즉, 생체 검사를 위한 PCR: 제2차년도에는 血清 檢査에서 陽性 判定 받은 소의 상유방 임파절이나, 체표 임파절로부터 가검물을 취하여 DNA를 추출하여, primer를 이용하여 *Brucella* DNA를 증폭시키고자 한다.

Table 2. 제2차년도 *Brucella spp* 檢出用 PCR Primer 準備

Primer	nucleotide sequence('5-'3)
BCSP 1(F)	GTA TCG TTC TTG AAG CCT AC
BCSP 3(R)	GTG CAT TTC AAT AGG CTA GAG
OMP(B)	ACT GGA GGT VAG AAA TGA AC
OMP(R)	GAT TAG AAC GAA CGC TGG AA

③ 사후 검사를 위한 PCR: 제2차년도에는 血清 檢査에서 陽性 判定 받아 살처분되는 각종 장기(상유방 임파절, 간, 비장, 폐, 체표 임파절)를 취하여 DNA를 추출하여 Primer I 과 II를 이용하여 DNA의 증폭을 시도한다.

④ 牛乳로부터의 *Brucella* 균 검사를 위한 PCR: 생유로부터의 균 分離와 PCR 법에 의한 DNA 檢出을 확인하였던 소로부터의 균주를 분리하였으며, 충남 아산지역에서 검색된 젖소의 상유방 조직으로부터 균주를 分離하였는 바, 제2차년도에 우유로부터의 균주 분리를 위하여 PCR 기법

을 활용하고자하나 우유내의 PCR수행에 제한적 요소가 있어 성공여부는
의심이 가고 있지만 철저한 정보 수립과정을 거쳐 시도하고자 함.

제 5절 WTO 시대를 마지하여 研究 必要性 確認

우리나라에서의 착유우에 대한 Brucellosis 診斷을 위한 각종 診斷用 kit는 그 동안 國內 産業體 의하여 生産하여, 國家 검정 후 生産하여, 이의 정확성은 미국 농림성의 각종 標準 診斷用 kit를 이용하여 確認되어 왔었다.

이들 診斷用 약이나 技法은 우리 나라에서의 brucellosis 感染 소를 檢出하는데 크게 공헌하여 왔으며, 국민의 보건 유지를 위하여 꾸준히 노력해온 수의학계의 업적 중에 하나이다.

그러나 우리나라의 철저한 검역, 방역 업무의 수행에도 불구하고 WTO와 같은 세계시장의 개방으로 이 질병의 국내 가축에 급속도로 전파시킬 가능성은 아주 높아지고 있다. 즉, 축산 시장의 개방화에 따른 많은 家畜과 축산물이 손쉽게 수입되고 있는 상황을 고려하건대, 이 같은 疾病의 國內 반입 기회는 증폭되었다고 思料되는 바이며, 이 같은 人獸共通 傳染病의 國內 發生率 저하를 위하여서는 국내외 학자들의 단독 또는 협력 研究가 뒤받침되었어야 했음은 두말할 나위 없고 새로운 診斷 方法이나 豫防 方法에 대한 제안이 있어야 할 당위성이 크게 부상되고 있다.

미국의 농림성 산하의 Brucellosis 研究 분야에서도 이 疾病의 새로운 傳波를 막고 이 疾病에 의한 경제적 손실을 最小化하기 위하여 많은 研究費가 사용되고 있어 우리 나라에서도 이 疾病에 대한 외국으로부터의 정보나 技術 개발의 협력 研究를 취한다면 충분히 정확한 診斷 方法을 개발할 수 있을 것이며, 보다 진단능력이 우수한 진단 방법의 활용을 위하여서는 필요에 따라서는 그 동안에 활용해온 진단 방법에 대한 전체적인 검토가 필요하다. 또한 앞으로 이 疾病의 만연을 위하여서는 새로운 개념

의 백신 生産을 위한 基礎的 研究을 수행할 수 있어야 할 것이다.

〈 政府 次元의 根絶을 對策 〉

우리 나라 전역에 걸쳐서 젖소와 산양에 대한 정기 檢診 정책을 매년 실시하여 陽性牛를 색출 및 殺處分 시키므로써 우리 나라의 Brucellosis 感染地域으로서의 청전화를 위하여 막대한 國家 예산(수억원 / 매년)을 투자하고 있다. 그러나 점차적으로 축산물과 야생동물의 수입이 증대되고 있는 경향을 고려해 보면, 젖소를 포함한 전 家畜과 몇 종의 야생동물에 대한 Brucellosis에 대한 疫學的 研究는 이루어져야 할 것이며, 집단적인 檢索業務를 위한 研究 方法의 개발이 필요해지며, 陽性 牛의 增加 趨勢를 겪고 있는 한 앞으로는 DNA Probe를 이용해 carrier 상태 여부를 確認해야 하고, PCR 方法으로 檢索 業務를 실재 화하여야 할 것으로 思料되며, 이같은 研究는 우리 國民의 날고기를 즐기고 있는 食생활의 Pattern 과 사슴 등의 血液을 날 것으로 마시는 문화 Pattern을 고려하면 정부 차원적으로 이 疾病의 사람으로의 傳波를 차단할 수 있는 적극적인 疫學的 研究가 광범위하게 이루어져야 할 것으로 思料된다.

〈 豫防藥 生産 樹立에 대한 見解 〉

현재 우리 나라에서의 젖소에 대한 전국적인 檢診 業務를 통해 陽性 牛를 색출하여 陽性 牛를 殺處分 시키고 있으나, 아직 한우에 대한 검색 업무가 추진된 바 없어 전반적인 豫防 계획을 세우는 데는 시기적으로 이르다고 생각된다. 특히 국가 防疫사업의 성공으로 1990년 이 후의 발생 두수가 거의 정지되는 것 같아 당분간은 感染 牛의 색출과 살처분 政策을 계속 유지하여야 하겠지만, 感染 젖소를 보유하고 있는 양축 농가의 경제

적 손실을 최소화하기 위하여서 診斷方法의 다양화가 필요하다고 생각되어 진다.

특히 국제 무역의 자유화에 따른 외국으로부터 수입되는 家畜을 통한 感染 가능성이 높아지고 있다고 思料되고 있다. 여러 종류의 야생 動物(산양, 사슴 등)이 검역과정을 거쳐서 수입되고 있지만 增加되고 있는 수입량의 趨勢를 고려하건대 앞으로는 豫防 接種 方法에 의한 Brucellosis 근절 정책 수립의 필요성이 증대될 상황을 고려해야 할 것으로 思料된다.

제 6절 제1차년도 연구결과의 期待 效果 및 波及 效果

< 技術的인 側面 >

우리 나라에서 brucellosis 를 診斷하기 위한 각종 診斷用 kit는 그동안 이 疾病의 診斷에 어떠한 어려움 없이 사용되어 왔으며, 양축 농가에 유익하면서도 國民 보건 향상에 크게 공헌하여 왔다. 즉 *Brucella* spp의 菌株를 이용한 診斷用 抗原 生産은 잘 이루어져 왔으나, 본 研究者의 의견으로서는 이들 診斷 方法에 대한 최신 尖端 技術을 도입한 診斷用 KIT 개발을 위한 研究가 이루어져야 할 것이다.

그러나 診斷 方法에 의한 感染 소로부터 원인 균의 分離技術은 활발히 그리고 정확히 활용되지 않고 있는 실정이며, 診斷 方法에 있어서도 Milk ring Test, Plate Agglutination test의 陽性 判定이 되면 젖소를 殺處分시키고 있어 *Brucella* spp이 타 균에 의한 抗體 와 交叉 反應의 結果를 가져 올 수 있음에도 불구하고 檢索된지 10일 이내에 대부분이 殺處分하고 있어 양축 농가의 입장에서 보면 막대한 經濟的 손실을 받게 될 가능성이 높다고 思料되는 바이다. 미국의 농림성에서는 血清학적 診斷 方法에 의한 陽性 判定된 動物로부터 菌體의 分離 확인을 원칙으로 하고 있는 만큼 우리 나라에서도 이 菌體의 組織으로부터의 分離 동정이 필요하다고 思料되며, 좀더 확실한 確認 方法으로는 *Brucella* spp의 DNA를 이용한 Southern hybridization 方法에 대한 研究 개발의 필요성 점차 露出되어 가고 있다.

< 經濟的인 側面 >

최근 5년간에 걸쳐서 우리 나라 젖소에서의 Brucellosis 發生은 매년 增加되고 있다. 즉 1987년에는 166두수가 陽性 判定되었으나 점차적

으로 增加되어 1992년에는 450두, 그리고 1993년에는 428두 그리고 1994년 8월 현재 297로서 增加 경향이 뚜렷하여 이의 發病에 따른 殺處分 배상액은 벌써 10억원을 상회하는 것으로 알려져 전 家畜의 법정 傳染病 發生에 따른 補償額의 전부를 단순히 이 疾病과 결핵 陽性 젖소의 殺處分 補償額으로 지출되고 있는 실정으로서 이 같은 손실은 양축농가 뿐만 아니라 政府에서의 이 疾病에 대한 經濟的 부담은 대단히 크다고 思料되는 바이다.

이처럼 매년 정기검사과정을 거쳐서 陽性 感染 소를 색출하여 殺處分 함에도 불구하고 그 增加 趨勢가 현저한 것에 대한 對策을 강구하기 위하여서는 본 研究者의 예비적 실험에서 얻은 殺處分되는 소에 있어서의 擬陽性, 陰性 判定되고 있는 사실을 증시하여야 할 診斷 方法상의 새로이 고려하여야 할 균 교대 感染症 또는 抗原의 변이 가능성, 표준 抗體의 偽陽性 가능성 등을 總括적으로 고려하여야 할 문제점이다.

또한 이 疾病에 의한 살처분의 최종 확정은 미국에서와 같이 신속한 균의 동정과 더불어 DNA probe과 PCR을 이용 診斷 方法의 國內에서의 활용이 용이하고 신속히 처리되어야 技術 향상의 방안 마련이 이 疾病에 의한 經濟的 손실의 最小化를 위한 첫 단계의 研究 目標일 것으로 思料되는 바이다.

< 期待되는 效果 >

우리 나라에서는 젖소와 산양에 대한 Brucellosis의 診斷 業務와 防疫 管理 業務는 완전한 행정적 구축 망을 설정하여 이에 대한 防疫業務를 훌륭히 수행하여 오고 있었으며, 이같은 國家的 管理 事業은 사람에게 있어서의 Brucellosis 發病을 완전히 豫防할 수 있는 기틀과 여건을 제공하여 주었다.

그렇지만, 최근 狂犬病 發生이나 炭疽의 發生에서 볼 수 있었던 바와

같이 각종 人獸共通傳染病이 돌발하고 있어 國民의 두려움을 유발시키고 있다. 이같은 人獸共通傳染病의 發病시 가장 중요한 豫防 對策의 마련은 疫學的 調查 研究 정도에 따라서 신속하면서도 적절한 對策을 마련할 수 있을 것이다. 특히 우리 나라 國民의 食생활 문화가 생식을 거리낌없이 攝取하고 있을 뿐만 아니라, 健康 增進의 목적으로 동양 醫學的 文化에 의하여 사슴 血液을 위시로 하여 소 血液, 노루 血液, 멧돼지 血液 등을 비위생적으로 攝取하는 習性이 있어 각 종 人獸共通傳染病의 蔓延 위험이 常存하여 있다고 思料되는 바이다.

결국 우리 나라 國民의 Brucellosis의 感染 經路를 차단하기 위하여서는 政府에서 수행하고 있는 젖소의 檢診 業務를 기반으로한 他家畜 즉, 한우, 염소, 사슴 그리고 개 등의 血清學的 檢診 業務의 수행함에 있어서 대학의 규모에 어울리는 Brucellosis에 대한 疫學的 調查 研究는 교육적 차원과 國民保健的 次元에서 크게 유익한 結果로 가져오리라 기대되는 바이다. 이 疾病에 대한 檢診의 效率的인 疫學的 調查가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 판단되어 본 研究 課題를 수행하고자 하는 바이다.

제 7절. 활 용 방 안

1. 診斷 方法의 改善으로 擬陽性 및 陰性 判定 試소의 檢索 機能의 正確性을 기하기 위하여 Compliment Fixative Test, Latex Agglutination test, Western blot 등과 같은 診斷 方法의 多樣化 필요성을 밝힐 수 있었으므로 이의 활용을 위한 生産 技術을 보급하고자 한다.

2. 感染 試소로부터의 菌 分離 同定の 어려움 때문에 진단의 精確性을 기할 수 있는 Brucella DNA를 검색할 수 있는 Polymerase Chain Reaction Test을 활용한다. 이의 효능은 이미 제1차년도에 제주도의 畜 소에서 확인하였는 바, 그 기술의 확정을 위한 研究와 技術의 實用化를 위하여 지속적인 研究를 수행하고자 한다.

3. 疫學 調査를 통하여 豫防藥 生産 必要性 有.無를 판단하는 國家的인 事業 性格의 研究를 WTO를 마지하여 준비하여야 할 것이다.

4. 결국, 本 研究課題가 성실히 그리고 성공적으로 이루어진다면 최근 이 疾病으로 매년 10억원 이상의 國家 豫算을 節減시킬 수 있을 것이며, 이는 U.R 협정에 따라서 畜産에 대한 意慾의 低下로 畜産에 대한 希望을 버리고 있는 養畜 農家の 經濟的 損失을 最小化는데 크게 貢獻하게 될 것이다.

제2장: 제1세부 분야

책임연구자소속	전북대학교 수의과대학	직 급	교 수	성 명	백 병 걸
협력연구자소속	서울대학교 수의과대학	직 급	조교수	성 명	박 용 호
연구 제목	Brucellosis 진단 방법 개발				
내 용	PCR, Latex agglutination test, Western blot 방법의 활용에 관한 연구				
진행정도(3년)	제 1차년도	제 2차년도			제 3차년도
	100% 목표달성				

제 1 절: Brucellosis 診斷을 위한 polymerase Chain Reaction 方法의 活用

1. 緒 論

우리나라에서의 brucellosis에 의한 양축 농가의 피해 정도는 제주도가 가장 심각한 한 곳으로 알려져 있었으며(정 1994), 이의 방제를 위한 研究의 일환으로 수소의 정액을 채취하여 PCR과 균분리 그리고 각종 다른 진단 방법과 비교 시험을 수행하였다.

2. 材料 및 方法

가. 지역: 제주 지역에서의 brucellosis 집단 感染 발생하고 있는 목장을 대상 소로 선발하였다.

나. 대상 동물: 수소의 정액에 대한 Brucella spp의한 균체 검색을

위하여 PCR법을 외국의 자료에 근거하여 검색하였던 바, 정액에서 양성 수소를 국내에서 맨 처음으로 색출하였다.

다. 시기: 본 연구진은 우리 나라에서 가장 많은 소가 Brucellosis로 살처분되어온 제주도를 1995년 2월 방문하여,

라. PCR의 조건: Ficht et al(1989)의 方法에 의하여 *Brucella abortus*의 세포막 형성 gene을 검색하기 위하여 PCR을 수행하였다. 즉, *Brucella* 검색용 primer(GTA TCG TTC TTG AAG CCT AC; Primer II:GTG CAT TTC AAT AGG CTA GAG)를 준비하여 PCR을 수행하였던 바(95°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min, 95°C/1min)/30cycles, 72°C/5min), 약 1,000bp의 특이 DNA 증폭으로 診斷하였다.

마. 牛乳로부터의 항체 검증

① 牛乳 가검물로부터의 검사菌體 확인을 위한 PCR수행: 소의 유방 주위를 70% 알코올로 잘 세척한 후 처음 몇 번의 牛乳는 버린 다음, 20ml의 牛乳를 멸균 용기를 사용하여 착유한다.

② 즉 시 오염되지 않도록 하여 냉장고에 보관한다. 이 牛乳를 직접 취하여 Sambrook(1988)의 方法으로 DNA를 추출하여 PCR의 template로 사용한다.

③ 牛乳내 cacein을 제거하기 위하여 CaCl₂를 첨가한 후 renin효소를 첨가하여 응유되도록 한 후 유청을 회수한다. 즉, 유청 회수를 위하여 rennine 효소를 첨가한 유를 24시간 4°C에 1 주야 방치한 후, 高速遠心分離(6,000-7,000 g/ 15 minute) 후 침전물 제거한 후 Western blot 方法으로 抗體의 검색 특색을 확인한다.

바. 感染 動物 組織 可檢物로부터의 菌體의 배양:

① 1995년도 家畜의 상유방임파 결절(Supramammary lymph node)을

95% 알코올에 침지시킨 후에 소독약으로 절제부위를 소독한 후

- ② 약 20 gm을 취하여 組織 마쇄기를 사용하여 분쇄한다.
- ③ brucella 배지에 분쇄組織을 接種한 후
- ④ CO₂ Incubater에서 배양한 후 colony의 특색을 確認한다.
- ⑤ 표준 菌株와의 SDS-PAGE方法으로 재차 抗原의 特異性を 確認하다.

사. *In Situ* Hybridization :

제 2차년도에는 감염 소의 조직으로부터의 Brucella DNA검색을 위한 In Situ hybridization기법을 확립하기 위하여 Brucella 檢出用 PCR Primer를 Table 2-p28 과 같이 준비하고, 각종 가검물에 대한 in situ hybridization 을 수행하고자 한다.

아. Latex 응집 반응법 개발

Latex 응집 반응 법을 개발하고자, 서 등(1993)이 보고한 방법에 준하여 Brucella abortus 細胞膜으로부터 항원을 분리하였으며, 牛乳의 양성 판정으로 살처분되는 1994년도와 1995년도 살처분되는 소로부터 혈청(132 두)을 수거하여 냉동실에 보관 중임.

국가 공인 검색 方法의 하나인 MRT, Plate 응집 반응에 대한 특이성을 확립시켜 주기 위하여 양성 판정을 받은 혈청에 대하여 補助的 診斷 方法으로 활용 가치를 평가하고자 제반 기초 실험을 완료하였으나, 보다 월등한 研究 결과를 얻기 위하여서는 항원의 특수 분리 과정과 연결되어야 하는 研究 추진 상의 특수성이 있다.

제 2절 결 과

1. 菌株의 純粹 分離:

우리 나라에서 診斷되어 살처분되는 소의 상유방 임파절을 수거하여 균주를 分離하여 얻은 5예와 제주도의 슷소 정액에서 양성우로 진단된 3예의 균주를 분리하였다.

2. 국내 분리균주의 항원성:

국내 분리균주의 항원성을 파악하기 위하여 미국의 표준 Brucella 菌株(ATCC)를 확보하여 SDS-PAGE의 방법으로 비교 검사주에 있으며, 그림 2에서 보는 바와 같이 약간의 차이가 있음을 관찰하였다. 본 研究의 각종 診斷에 필요한 抗原으로 사용할 수 있도록 研究한다. 그러나 이 균의 分離가 용이하지 않은 점과 균 細胞壁으로부터 지방물질의 제거, 용매별 分離 물질 특색 양상에 차이가 있어 特異 抗原물질로서 사용 가능한 물질의 확보는 대학의 소규모 시설의 조건을 갖고 있는 실험실 사정으로는 시간이 많이 소요되었다(6개월). 이처럼 균주의 다량 生産이 제 1차년도에 주요 수행내용이었으나 제 2차년도에는 이들 抗原의 순수분리를 위하여서는 HPLC를 이용한 항원 특성 파악과 診斷用 항원 생산에 보다 많은 研究를 수행하고자 한다.

3. 역학적 조치 사항:

Brucellosis 집단 발생의 원인을 분석 방안의 일환으로 제주도에서 Table 1(p 27)에서 보는 바와 같이 인공수정 精液 채취용 젖소를 대상으로 brucellosis 感染 여부를 검색하였던 바, 양성 판정 젖소를 색출할 수 있었으며, 이처럼 양성우 받은 소는 이 疾病의 傳波 위험성이 높아서 급히 살처분시키는 행정적 조치를 취하므로써 感染된 수소에 의한 brucellosis 傳波 위

힘을 차단하였다.

그러나 제주도를 제외한 타 지역에서의 brucellosis 豫防을 위한 인공 수정 精液의 검색 事業은 防疫 면에서 볼 때 새로운 당면 과제로서 부각되고 있다. 더욱이 국가에서 법적으로 매년 실시하고 있는 搾乳牛만을 대상으로 한 검색 國策 사업은 앞으로 이 疾病이 수소에 의하여서도 傳波되 있다는 사실을 착안한 防疫 대책이 수립되어야 한다는 사실을 처음으로 농림수산에 보고한 예가 될 것이다. 또한 Brucellosis에 感染된 소의 조직, 牛乳, 혈액 등의 가검물로부터 Brucella DNA물질의 확인은 최근 의학계에서는 疾病의 확정 診斷하기 위한 方法으로 폭넓게 활용되고 있다.

4. 검사 성적:

제주도 지역에서의 총 133두에 대한 정액을 채취하여 PCR기법으로 검색하였던 바, Table 1 (p 27)에서 보는 바와같이 양성 우 3두를 색출할 수 있었으며, 이들 소를 살처분시키므로써 인공수정액에 의한 이질병 전파를 차단하였음.

< 제 2, 3 차년도 연구계획 >

생체 검사를 위한 PCR: 제2차년도에는 혈청 檢査에서 양성 판정 받은 소의 상유방 임파절이나, 체표 임파절로부터 가검물을 취하여 DNA를 추출하여, Table 2 (p 28)의 primer를 이용하여 Brucella DNA를 증폭시키고자 한다.

사후 검사를 위한 PCR: 제2차년도에는 혈청 檢査에서 양성 판정 받아 살처분되는 각종 장기(상유방 임파절, 간, 비장, 폐, 체표 임파절)를 취하

여 DNA를 추출하여 Table 2(p 28)의 Primer I 과 II를 이용하여 DNA의 증폭을 시도한다.

牛乳로부터의 Brucella 균 검사를 위한 PCR: 생유로부터의 균 분리와 PCR 법에 의한 DNA 檢出을 확인하고자 하며, 이미 牛乳로부터 하나의 균주를 분리하였음.

제 3 장: 제 2 세부 분야

세부책임자소속	전북대학교 수의과대학	직 급	교 수	성 명	이 호 일
협력연구자소속	전북대학교 수의과대학	직 급	교 수	성 명	백 병 걸
연구 제목	<i>Brucella spp</i> 에 있어서의 균주간 특이성 연구				
내 용	<i>Brucella abortus, B. ovis, B. melitenisis, B. canis, B. suis, Yershinia enterocolitica</i> 국내 분리균주 SDS-PAGE, Western blot				
진행정도(3년)	제 1차년도	제 2차년도			제 3차년도
	100 % 완결				

Brucella spp 에 있어서의 균주간 특이성 研究

제 1 절 서 설

우리나라에는 brucellosis 感染 診斷된 젖소는 診斷 확인 즉시 살처분시킴으로서 경제적 손실이 연간 10억원을 상회하고 있는 실정이다.

Brucellosis 感染에 의한 殺處分 대상 소에 의한 養畜農家の 피해 상황 파악하여 養畜農家の 피해를 減少시킬 수 있는 방안을 마련하여 정부에 건의하고자 한다.

1994년도에 이어서 1995년도에도 약 500두의 젖소에서 發病, 殺處分하므로써 養畜農家の 막대한 경제적 손실을 입고 있는 실정이며, 더욱이

금년에는 예년과 달리 發病의 pattern이 대단위로 發病되고 있어 한 마리의 牛라도 구제할 수 있는 즉, 養畜 農家의 피해 정도를 최소화할 수 있는 방안을 마련할 수 있도록 診斷 方法을 보완하여 신중한 診斷, 살처분을 강조하고자 한다.

제2절 材料 및 方法

가. 표준 균주의 확보 및 배양:

미국의 ATCC에서 구입한 *Brucella abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. suis*, 그리고 *Yershinia enterocolitica* 표준 균주를 일반적인 方法 準하여 배양하였다. 즉, brucella 특수배지에 진동 incubater에서 72시간 배양하였으며 5000 G에서 30분간 원심분리하여 세포만을 회수하여 -70°C 에 보관하였다.

나. 국내 균주의 분리 지역:

경기지역, 충청지역, 그리고 제주 지역에서 살처분 되는 소로부터 살처분 되는 소와 PCR기법에 의한 양성 소의 정액 검색에서 양성으로 판정된 소로부터 균을 분리하였다.

다. 抗原 處理:

抗原의 生産은 여러 가지 方法이 응용될 수 있을 것이다. 즉 제1차년도에는 抗原을 分離함에 있어서의 方法을 활용하였지만 제 2, 3차년도에는 特異성이 높은 抗原을 生産하기 위하여서는 hot phenol water method, hot sodium dodecyl sulfate extraction, dimethyl sulfoxide extraction 方法 등이 활용되어야 할 것이다(Garin-Bastuji et al 1990).

*Brucella abortus*의 국내分離균과 표준균를 배양하여, $60^{\circ}\text{C}/1$ 시간에

서 불활화한 후 12,000 x g로 4°C/30분 遠心分離하여 침전물질만을 회수한다 이를 LSP抗原으로 사용하기 위한 물질로 準備한다. 배양 보관했던 細胞를 Proteinase K로 소화시킨다(Hitchcick et al 1983; Dubray et al 1987). 細胞를 0.0625M 2%(wt/wt) SDS(0.5g 을 細胞부유액 10ml)가 함유된 Tris buffer(pH6.8)로 보유시킨 후, 100°C/ 10분 열을 가한다. 이 lystate를 55°C로 냉각시킨 다음 Proteinase K를 0.15mg/ml첨가한 후, 55°C/3시간 배양한 후 20°C의 1주야 방치한다.

LSP 는 3배의 isopropanol을 넣어 4°C 방치하므로서 침전시킨다. 30분 후에 이 침전물질을 회수하여 (12,000x g, 4°C/30분), 10 ml의 증류수로 재부유한다. 이를 반복한 후, 침전물질은 RNase와 DNase(0.01 mg/ml; 37°C/30분)로 소화 처리한다, 이어서 Proteinase K를 0.01mg/ml, 55°C/3시간으로 소화한 후 20°C에서 1주야 방치한 후 다시 isopropanol로 3차 처리한다.이같은 과정을 거쳐서 pellet얻어서 LSP 抗原을 확보하여 Phenol water extraction수행한다(Leong et al 1970).

우리 나라에서 사육되는 家畜으로부터 分離 될 Brucella spp. 菌株에 대한 特異性を 규명하는 것은 그 동안 이 疾病의 診斷에 사용되는 抗原의 特異性, sensitivity 그리고 診斷의 정확성을 판단하는데 가장 基礎적으로 활용될 수 있는 자료 일 것으로 思料되는 바, 제2細部研究課題에서는 주로 分離菌株에 대한 표준菌株와의 特異성을 전기영동장치와 免疫酵素 反應을 중심으로 하여 比較 研究이며, 抗原의 特異성은 결국 Burgess (1987)의 方法에 준하여 Two-Dimensional Electrophoresis 方法으로 규명될 것이다.

라. SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis):

Brucella spp 菌株의 수용성 抗原의 특성을 파악하기 위하여 전기영

동을 실시한다(Lammi 1970). 전기영동은 수직 전기영동장치(Bio-Rad Co.)를 이용하며, Gel은 30% 저장용 polyacrylamide(4.2M acrylamide, 52 mM BIS)를 準備한 후, running gel(30 % polyacrylamide 5.7ml, 1M Tris-HCl pH 8.8 8.6ml, 증류수 2.7ml, 10 % ammonium persulfate 171ul, TEMED 17ul)를 충전한 다음, stacking gel(30% polyacrylamide 1.2ml, 0.5M Tris-HCl pH 6.8 2ml, 증류수 2.7ml, 10% SDS 60ul, 10% ammonium persulfate 60ul, TEMED 6ul)로 채워 넣고, 약 1시간 방치한 후 전기영동 장치의 상, 하방(chamber)에 전기영동액(25 mM Tris, 192 mM Glycine, 3.5 mM SDS)을 넣고 150 volt(0.03-0.05mA)하에서 전기영동을 실시한다. 전기영동하기 위한 抗原의 처치는 sample buffer(0.5M Tris-HCl pH6.8 2.5ml, 20%SDS 2ml, 2-mercaptoethanol 1ml, 0.5% bromphenol blue 250ul, 증류수로 10ml되게 함)와 동일 량을 넣어 100℃에서 5분간 증탕한 후 stacking gel에 10-15ul씩 주입, 전기영동하였으며 전기영동한 gel내의 抗原의 분자량(M W: molecular weight)의 크기는 표준 분자량(14Kd-200Kd, Bio-Rad Co.)으로 比較 측정한다. 抗原을 전기영동하여 얻은 gel을 Coomassian brilliant blue R-250(1g Coomassie blue R-250, 400ml methyl alcohol, 600ml 10% acetic acid)으로 염색한 후, 5 % acetic acid : 95 % ethyl alcohol을 3 : 2, 4 : 1 그리고 5 : 1로 희석한 혼합액으로 탈색 후 gel 건조기(KPL)를 이용 건조시킨다.

마. 免疫酵素反應(western blot):

전기 영동한 *Brucella* spp의 抗原을 표준 陽性 및 陰性 抗體과 反應시켜 免疫酵素학적으로 관찰하고자 Tsang(1982) 등의 方法에 準하여 western blot을 실시한다. 즉, 전기영동한 gel을 0.45 um nitrocellulose(Schleicher & Schull Co.)에 sandwich처럼 접촉시킨 후 전기이동액(25mM Tris, 192 mM glycine, 4.7 M methyl alcohol)내에서 30 volt로 5시간 통전시킨 후, 90 volt에서 1시간 전기적으로 전이시킨다.

이 막을 gel로부터 分離시켜 抗原의 blocking을 위하여 0.2% Tween 20 PBS pH 7.4에서 1주야 정치(4℃)시킨 후, 血清을 0.05% Tween 20 PBS pH 7.4로 1 : 200희석한 액에서 1시간 동안 서서히 진탕시킨다. 血清을 제거시킨 다음 0.1% Tween 20 / PBS pH 7.4로 10분/3회 세척, 다시 이 막 위에 Phosphatase labeled affinity purified antibody to goat IgG (KPL) 를 1 : 1000으로 희석, 1시간 접촉시킨 후, 0.1% Tween 20 PBS pH 7.4로 10분/2회 세척한 다음, PBS pH 7.4만으로 10분간 다시 세척한다. 이 nitrocellulose막에 기질용액(BCIP : NBT : 0.1 M Tris buffer/1 : 1 : 10 혼합)을 접촉, 발색된 polypeptide의 반응대(bands)관찰 한다. 感染 陽性 血清의 準備를 위하여 *Brucella* 菌株를 實驗動物에게 근육接種시킨 후 30일째 채혈, 分離한 血清을 陽性 血清으로 정한다.

바. 診斷 方法의 比較 試驗:

Brucellosis 感染 陽性 判定을 위하여서는 무엇보다도 중요한 것은 診斷用 抗原의 감수성(Sensitivity)과 特異性(Speciality)가 가장 중요한 기준(Criteria)이다. 각 종 실험 方法을 기초로 하여 감수성 및 特異性을 파악하고자 하며, 본 研究서 사용하고자 하는 診斷 方法에는 다음과 같은 것이 있다(Huber at al. 1986). 즉 牛乳를 대상으로한 感染 菌體의 檢出은 Milk Ring Test 方法을 사용하며, 이어 숙주내의 抗體價

는 Plate Agglutination, Rose Bengal Test, Complement Fixation Test, ELISA, 그리고 Western blot의 방법으로 수행한다. 이어서 PCR의 방법으로 증폭된 Brucella DNA는 特異 Probe를 生産하여 Southern blot 방법으로 이를 確認 檢索하는 방법을 활용한다.

1) Milk Ring Test:

현재 집유소에 실시하고 있는 검색 방법으로 검색을 한다. 개체별로 또는 여러 마리의 소에서 착유한 牛乳를 실험하기 전에 실온에서 45-60분 정도 방치한 가검 牛乳 1ml와 *B. abortus* 1119-3균의 사균 체를 Hematoxylin으로 염색하여 0.5% 석탄산과 생리식염수를 가한 균 부유액으로 만들어진 診斷額 0.03ml 을 試驗管에 넣고 혼합하여 37.5°C 에서 45-60분간 작용시킨 후 判定한다.

2) Latex Agglutination Test.

일종의 급속 평판응집反應으로서 각 菌株 별로 生産, 準備한 抗原을 Latex 입자에 감작시킨 후 유리판 위에 놓은 다음 抗血清을 접촉하여 抗原과 抗體가 反應할 수 있도록 하여 抗體를 檢出하는 방법을 모색한다.

3) Rivanol test

만약 우리 나라에서 이 疾病이 만연이 된다면 수의공중보건학적으로 이 疾病을 豫防하기 위하여 家畜에 대한 豫防接種 事業이 國家的으로 이루어져야 할 것이다. 이처럼 國內에서 生産한 豫防接種에 다른 家畜에서의 抗體 형성이나 豫防 능력을 평가하기 위하여서는 감수성 特異성이 인정받을 수 있는 診斷 方法이 2가지 이상 있어야 할 것으로 思料되는 바 Huber et al(1986)의 몇 개의 診斷 方法중 rivanol test으로 抗體 형성 상황을 檢索하여야 할 것이다.

4) SDS-PAGE 와 Western blot方法

SDS-PAGE : 이미소 및 그들의 신생송아지의 혈액으로 부터 준비한 *T. sergenti* merozoite 수용성 항원에서 특이 항원성 단백질을 확인하기 위하여 Laemmli(1970)의 방법에 준하여 전기 영동을 실시하였다. 전기 영동 장치는 Mini-Protean II Cell(Bio Rad Co.)을 이용하였으며 running gel(10% polyacrylamide, 0.1% ammonium persulfate, 0.5 M Tris-HCl; pH 8.8, 0.01% TEMED)과 stacking gel(5% polyacrylamide, 0.1% ammonium persulfate, 0.5 M Tris-HCl; pH 6.8, 0.1% SDS, 0.01% TEMED)을 각각 증충하여 젤이 polymerization된 후 항원의 단백질 함량은 protein assay kit(Bio Rad Co.)로 측정하여 단백질을 μ 당 1 mg의 농도로 PBS를 이용하여 희석하였다. 희석된 항원과 sample buffer(130 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 0.013% bromphenol blue)를 동량 혼합하여 100 °C의 수욕상에서 5분간 증탕한 후 30 μ 를 전기 영동하였다. 전기 영동은 영동 buffer(25 mM Tris, 192 mM glycine, 3.5 mM SDS)에서 80V로 실시하였으며 영동이 끝난 젤을 coomassie brilliant blue R-250(Bio Rad Co.)으로 염색한 후 탈색하여 *Brucella* spp의 특이 단백질을 확인하였다.

Western blot : *Brucella* spp 특이 항원 물질을 면역학적인 방법으로 규명하기 위하여 Tsang *et al.*(1983)과 Towbin *et al.*(1979)의 방법에 준하여 Western blot을 실시하였다. 전기 영동이 끝난 젤을 blotting buffer(25 mM Tris, 192 mM glycine, 4.7 M methyl alcohol)를 이용하여 30V에서 2시간, 60V에서 30분간 젤로 부터 전개된 단백질을 0.45 μ m nitrocellulose membrane(Bio Rad Co.)에 전이시켰다. 단백질이 이동된 nitrocellulose membrane을 0.2% Tween 20이 함유된 PBS로 4°C에서 12시간 blocking 시키고, 양성 혈청과 음성 혈청을 1시간 반응시킨 후, alkaline phosphatase가

부착된 goat anti-mouse IgG(KPL Co.)를 1:1,000으로 희석하여 1시간 반응시키고 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium(BCIP/NBT, KPL Co.)으로 발색시켜 특이 항원성 물질을 확인하고자 한다.

이와같은 일련의 항원에 대한 분석 연구는 앞으로 Brucellosis 診斷을 위하여 菌株로부터 얻은 抗原을 免疫反應과 Monoclonal antibody를 이용하여 ELISA를 Cloeckert et al.(1992)등의 方法으로 抗原의 特異性を 파악하였다. 즉 SDS-PAGE (Laemmli 1970)를 수행하며, 實驗動物에서 얻은 血清과의 反應을 통하여 抗原의 특성을 각 菌株별로 파악하므로써 우리나라에 分布하고 있는 抗原의 특색을 분석한다. 이같은 研究는 우리나라에서 Brucellosis가 만연하게 될 경우 이의 豫防을 위한 정책 수립에 基礎的 정보를 제공하게 될 것이다.

5) Brucella spp DNA 증폭을 위한 PCR

외국에서는 Brucellosis의 診斷을 위하여 감수성과 特異성이 높은 Polymerase Chain Reaction 方法은 이미 실용단계에 이르렀으며(Baily et al., 1992), 이의 診斷效果를 극대화하기 위하여서는 Fekete et al.(1990 & 1992)의 方法에 준하여 primer를 설계하며, 國內 分離菌株와 外國 分離菌株를 Deley et al.(1987)의 方法으로 Brucella spp의 genomic DNA를 template로 하여 PCR을 수행하며, 더욱 나아가서는 血液이나 림프 結核과 같은 組織에서의 Brucella spp.의 DNA 증폭하므로써 血液이나 組織 내에서 確認하는 실험을 수행하고자 한다.

6) PCR(Polymerase Chain Reaction)

Brucella 균에 대하여 PCR를 수행하기 위하여 Fekete et al(1992)의 方法에 준하여 primer의 염기 서열을 결정하여 합성한 후(P1 ;

5'-GGACTGCATAAAAATTGGCAC-3', P2 ; 5'-CAGCAGCAGCAAGACCTTCA-3', P3 ;
5'-CGGCCACTGT-3', P4 ; 5'-CGGCCCTGT-3', P5 ; 5'-CGGCCCCGGT-3')

GeneAmp PCR Reagent Kit(Perkin Elmer Cetus)를 이용하여 Taq polymerase를 비롯한 ATP, CTP, GTP, TTP 등을 첨가시킨 후 이를 PCR 기기에 옮긴 후 94°C, 72°C, 55°C에서 각각 1분씩 denature, extension, annealing를 32회 반복하여 실시한 후 特異 DNA 절편 형성 유무를 1% Agarose gel에서 전기영동하여 검사한다.

제 3절 결 과

가. 표준 균주의 SDS-PAGE 소견:

표준균주와 국내 분리균주를 SDS-PAGE하였던 바, 30KD에서부터 70 KD에 걸쳐서 많은 물질 들이 관찰되었으며(Garin-Bastuji et al 1990), 국내 분리균주에서는 30KD, 39 KD 그리고 많은 종류의 다른 물질들이 관찰되었다.

나. 국내 분리균주의 SDS-PAGE소견:

국내에서 분리한 균주의 SDS-PAGE 소견은 그림 2.3 (p 23)에서 보는 바와 같이 표준균주의 소견과 조금씩 차이가 인정되었지만 가장 특이 물질이라고 사료되는 39KD물질은 국내 분리균중서도 관찰되었다.

〈 防疫 政策의 變更 建議 〉

1. 이같은 집단 발병 목장에 대한 검색은 MRT, tube test 외에도 양성 판정 확인을 위하여 최소한 2 가지 이상의 진단 방법을 보강, 확증 판정토록 한다.
2. 진단 방법의 보강은 CFT, Western blot 등의 활용을 가축전염병법에 명기하는 법적 조치를 마련한다.
3. 양성 판정의 보조적 조치 즉, 생체 조직을 취하여 PCR방법으로 균체 DNA 검색 결과에 따라서 살처분 명령을 수행토록 법적 조치를 건의함.

제 4 장: 제 3 세부 분야

세부책임자소속	서울대학교 수의과대학	직 급	조교수	성 명	박 용 호
협력연구자소속	전북대학교 수의과대학	직 급	교 수	성 명	백 병 결
연구 제목	<i>Brucella spp</i> 역학조사 및 면역활성 세포에 관한 연구				
내 용	<i>Brucella abortus, B. ovis, B. melitenisis, B. canis, B. suis, Yershinla entericolitica</i> 국내 분리균주, T cell, B Cell, Cytoflowmeter				
진행정도(3년)	제 1차년도	제 2차년도			제 3차년도
	100% 완결				

제 1절 서 설

Brucellosis는 가축의 疾患으로서 인체에 感染되어 皮膚 疾患, 척수골 장애, 생식기 장애 등을 야기시키는 人獸共通傳染病이다(Beran, 1994). Brucellosis병인체로서는 *Brucella abortus, B. ovis, B. melitenisis, B. canis, B. suis*등이 있지만, 소에서 문제가되는 균형은 *Brucella abortus*이다. 특히 우리나라 소에서 발병되고 있는 Brucellosis의 정확한 診斷을 위하여서는 먼저 MRT, TT검색 方法으로 살처분되는 소의 혈청이

필요하며, 또한 지속적으로 침입되는 균의 感染에 대한 항체의 생산과 밀접한 관계가 있어 면역 기계에 관련된 세포의 활성을 파악하여야 할 것이며, Brucellosis 양성 젖소의 백혈구 아군별 분포율 조사는 숙주의 면역 기능의 정도를 이해하는데 있어서 매우 중요하다. 따라서 최근 이같은 숙주 면역세포를 분리하고 이들 세포의 기능을 조사하는 研究가 많이 진행되고 있다.

사람을 포함한 동물의 면역체계는 매우 복잡하여 그 성상과 기능을 달리 하는 복수 세포간 협동작용에 의하여 진행되는데, 최근 마우스를 중심으로 세포 수준에서의 研究가 진행되어 그 윤곽이 급속히 밝혀지고 있다. 림프구를 기능별로 분류하기 위한 方法이 지금까지 SRBC와의 rosette형성능, 세포 표면 면역글로불린(surface immunoglobulin: sig) 함유 여부 및 nylon wool과의 부착성 검사 등이 研究 개발되어 왔으나, 이러한 方法들로 는 단순히 T 세포와 B 세포의 구별만이 가능할 뿐 그이상의 세분화된 분류는 불가능하였다. 그러나 이러한 문제는 항원을 인식하고(recognition), 전달(presenting) 하는데 중요한 역할을 하는 세포표면분자(cell surface molecules) 에 대한 단클론항체의 개발이 이후어짐으로서 해결하게 되었고, 아울러 세포성면역에 큰 진전을 가져오게 되었다. 그리하여 젖소를 비롯한 양, 염소 등 반추류의 면역체계 분석 결과, 면역 반응의 중추역할을 하는 임파조직의 세포는 크게 T, B, N 림프구로서 CD2, CD5, CD6의 표면특이항원을 공통으로 가지고 있으며 CD4나 CD8을 선택적으로 하나 더 소유하고 있다. B 림프구는 표면에 면역글로불린(sIgM)과 B 림프구 특유의 표면항원(CD19, CD20, CD21 등) 을 소유함으로써 구별되고 있다. 또한 최근 그 기능 및 역할에 있어서 괄목할만한 研究가 집중되고 있는 N 림프구는 양에서 Non T/Non B 세포(N세포)로 구별되어 표현되기 시작한 후 젖소 및 면양에서 CD4/CD8 복합음성세포 또는 공(null) 세포로 명명되었다. 그 뒤 N 세포는 $\gamma \delta$ T cell receptor(TCR1 : WC1) 와 CD3, CD5 표면항원을 소유하고 있음이 알려졌으며, 그중 TCR1+ WC1+ 림프구는 $\alpha\beta$ TCR을 공유하면서 CD3, CD5 항원을 가지고 있

지만 CD2와 CD6 항원은 소유하지않는 것으로 밝혀졌다. 한편 TCR1+ WC1- 림프구는 CD5이외에 CD2와 CD8 표면항원을 갖고 있는 세포로서 흉선이나 비장에서는 거의 찾아볼 수 없고 주로 상피세포에 많이 존재함이 밝혀졌다.

이와 같이 외국에서는 소를 비롯한 각종 동물에서 주조직적합체(major histocompatibility complex;MHC) 및 백혈구감별항원(cluster differentiation : CD항원)에 대한 특이 단클론항체를 이용하여 정상 젖소와 여러 반추류의 전신면역체계에 관한 많은 研究가 진행되고있다.

한편 국내에서는 우리나라 고유 품종인 한우의 혈액학치 및 혈액화학치에 관한 보고는 많으나, 단클론항체를 이용한 림프구 아군별 분포율에 관한 보고는 거의 없으며, 단지 rosette 형성능을 이용하여 건강한 정상 한우의 말초혈액 T 및 B 세포의 분포율을 조사했을 뿐이다. 또한 병적인 한우의 백혈구 아군 분포 변화상을 알기 위해서는 건강한 한우의 백혈구아군 분포의 기준치가 매우 필요한 실정이다.

따라서 본 研究의 목적은 젖소의 주조직적합체 및 백혈구 표면항원 특이 단클론항체와 flow cytometry 를 이용하여 백혈구 아군별 분포율을 比較 조사하고, 시험관내 림프구 유약화반응에 의한 림프구 증식성을 比較함으로써 한우의 유전면역학적 특성을 밝히는데 있다.

제 2절 材料 및 方法

1. 실험 동물:

제주도와 충남지역에서 Brucellosis 양성으로 판정되어 살처분되는 젖소 20두의 혈액을 채취한 뒤 혈액학치응 검사한 후 정상 범주에 있는 한우 50두와 젖소 10두를 실험에 사용하였다.

2. 혈액학치 검사:

Hematology blood cell counter(cell-Dyn 800)를 사용하러 적혈구치(RBC), 백혈구치(WBC), 헤모글로빈치(hemoglobin), hematocrit치(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구헤모글로빈량(MCH), 평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)를 측정하였다.

백혈구 분포율은 혈액을 slide glass에 도말한 후 methanol로 5분 고정한 뒤 Giemsa 염색액으로 30분간 염색하여 현미경하에서 백혈구 핵의 형태에 따라 조사하였다.

3. 단크론항체를 이용한 백혈구아군별 분포율 검사

가. 말초혈액 채취 및 백혈구 분리: 말초혈액 백혈구(peripheral blood leukocyte:PBL)는 Davis 등의 方法에 따라 경정맥으로 부터 채혈한 혈액과 항응고제인 acid citrate dextrose(ACD: sodium citrate 22.0g, citric acid 7.3g, dextrose 24.5g, D.W 1,000ml)용액을 3:1의 비율로 혼합하여 잘 섞은 다음, 1,500rpm에서 30분간 원심분리하였다. Buffy coat층을 채취한 후 36℃로 가온한 0.87% tris-buffered ammonium chloride(tris-NH₄Cl : 0.01M Tris, pH7.2)용액과 혼합하여 37℃항온수조에 넣어 약 5분간 적혈구를 용혈시켰다. 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버린후 pellet을 phosphate buffered saline(PBS: sodium chloride 7.6g, disodium phosphate 1.2g, monosodium phosphate 0.1g, monopotassium phosphate 0.2g, pH 7.2)과 ACD용액을 9:1로 혼합한 PBS_ACD buffer로 3회이상 원심 세척하였다. 마지막 원심 후 pellet은 1.0ml의 PBS로 부유시킨 다음 tryphan blue exclusion technique에 의해 생존세포수를 측정한 후 최종농도가 1×10^7 /ml 정도로 조절하여 이용하였다.

나. 젯소 백혈구 아군 검사용 단크론 항체: 미국 워싱턴 주립대학교

수의과대학 단크론항체 센터로부터 분양받은 MHC class I 및 II, T cell, B cell, N cell, granulocyte, monocyte, interleukin 2(IL-2)수용체에 대한 단크론 항체와 식물성유래의 concanavalin A(Con A)mitogen 의 자극에 의해서 발현되는 활성화 세포(activated cell: ACT)에 특이적으로 반응하는 단크론항체 등 모두 23종을 실험에 사용하였다.(Table 3 - p 59)

다. 형광세포유출장치 분석(Flow cytometry analysis): Davis 등의 方法에 준해서 conical bottom microplate의 한 well당 단크론항체 50ul(15ug/ml)와 1×10^7 /ml의 림프구를 감작시킨 다음 4℃의 first washing buffer(PBS 450 ml, ACD 50ml, 20% NaN₃ 5ml, gamma globulin free horse serum 10ml, 250mM EDTA 20ml, 0.5% phenol red 1ml)로 3회 원심(2,000rpm, 3분, 4℃)세척한 후 상층액을 버리고 밑부분에 모인 백혈구의 pellet을 plate 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다.

4. 림프구 유약화반응:

가. 말초혈액 림프구의 분리

림프구는 Kehrl이 등의 percoll을 이용한 方法에 따라 순수 분리하였다. ACD용액을 넣은 혈액을 1,500rpm, 30분 원심분리한 후 buffy coat cell를 분리하여 Dulbecco's modified Eagle's medium((DMEM, Gibco)배지에 부유시킨 후 percoll(비중 1.083, Sigma)에 중층시킨 후 1,500rpm으로 20분간 원심분리한 다음 percoll과 혈장과의 경계면에서 림프구를 채취하였다. 분리된 림프구는 PBS로 3회 세척하여 15% fetal bovine serum이 함유된 DMEM배지가 들어있는 조직배양용 플라스틱 샬레에 5ml씩 분주한 다음 CO₂ 항온기(37℃)에서 2시간 배양하였다. 그 뒤 부유세포만을 선택하여 trypan blue 염색과 hematocytometer를 이용하여 현미경하에서 계산한 뒤 1×10^6 /ml되게 조정하여 부유시켰다.

내용누락

Table 3. Monoclonal antibodies specifically reactive with bovine leukocyte differentiation antigens.

specificity of * monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies **	Cell type ***
MHC class I	I158A	All nucleated cell
MHC class II	H42A(DP)	Antigen presenting cell
	TH81A5(DQ)	"
	TH14B(DR)	"
BoCD2	BAQ95A	T cell
BoCD4	CACT138A	T helper/inducer cell
BoCD8	CACT80C	T cytotoxic/suppressor cell
BoCD5	CACT105A	T cell, B subset
sIgM	PIG45A	B cell
	BAQ44A(B2)	B subset
	BIG501E(k)	B cell
	BIG43A(λ)	"
TCR1-N12	CACT61A	Non T/B cell
WC1-N1	BAQ4A9	"
WC1-N2	B7A1	"
TCR1-N6	CACTB6A	"
TCR1-N7	CACTB81A	"
ACT1	CACT101A	Activated cell
ACT2	CACT26A	N cell and activated BoCD8
ACT3	CACT114A	N cell and activated BoCD4
IL-2 receptor	CACT16A	T helper cell
G	CHI38A	Granulocyte
G+M	DH59B	Granulocyte + Monocyte

* Bovine leukocyte differentiation molecules.

** Monoclonal antibodies that specifically react with leukocyte differentiation antigen.

*** Cells expressing molecules.

나. 림프구 유약화반응: 분리한 림프구를 10^4 /well 로 조절하여 96well U-bottom microplate에 분주한 다음, Con A, pokeweed mitogen(PMN), Salmonella typhimurium 유래의 water soluble proteinaceous 추출물(STM), Escherichia coli 유래의 lipopolysaccharide(LPS) 등 4종의 mitogen을 적정 농도별로 100ul씩 가하여 실험실내에서 반응시켰다. 48시간 후 ^3H -thymidine 1uci씩 첨가하여 다시 18시간 배양 후 cell harvester에 의해 glass fiber filter paper에 흡착시켜 실온에서 건조시킨 다음 scintillation tube에 fiber disc를 넣어 4ml scintillation cocktail로 용해시켰다. 모든 작업이 완료된 후 β -liquid scintillation counter(Packard Model 1,66 TCR)로 방사능 활성을 측정하였으며 모든 실험은 3개 well의 평균치를 구하였다.

제 3절 결 과

1. Brucellosis 感染 소의 免疫 細胞 분포율: Brucellosis 感染 소의 免疫 細胞 분포율:을 cytoflower meter로 조사하였던 바, Table 4(p 61) 과 그림 5(p 62)에서 보는 바와 같이 brucellosis 感染 牛는 免疫 細胞 중 T cell의 분포율이 낮았고, 특히 T helper cell인 CD 4Cell 의 분포가 음성 소보다도 월등히 낮게 관찰되었다. 이 자료를 통하여 이 疾病의 발병 豫防은 免疫 기능 細胞의 활성을 피할 수 있다면 豫防이 가능할 수 있을 것 같은 단서를 얻게 되었다.

Table 4. Brucellosis 感染 젖소의 免疫 細胞의 分포

구 분	T 세포			B 세포	N 세포	MHC- Class I	MHC- Class II
	CD 2	CD 4	CD 8				
양성우 (n=20)	19.1	4.3	9.8	19.6	30.5	91.8	24.1
의양성우 (n=20)	40.3	13.9	23.1	25.8	24.8	94.9	22.2
음성우 (n=20)	51.8	29.8	17.9	11.9	20.2	94.3	15.9

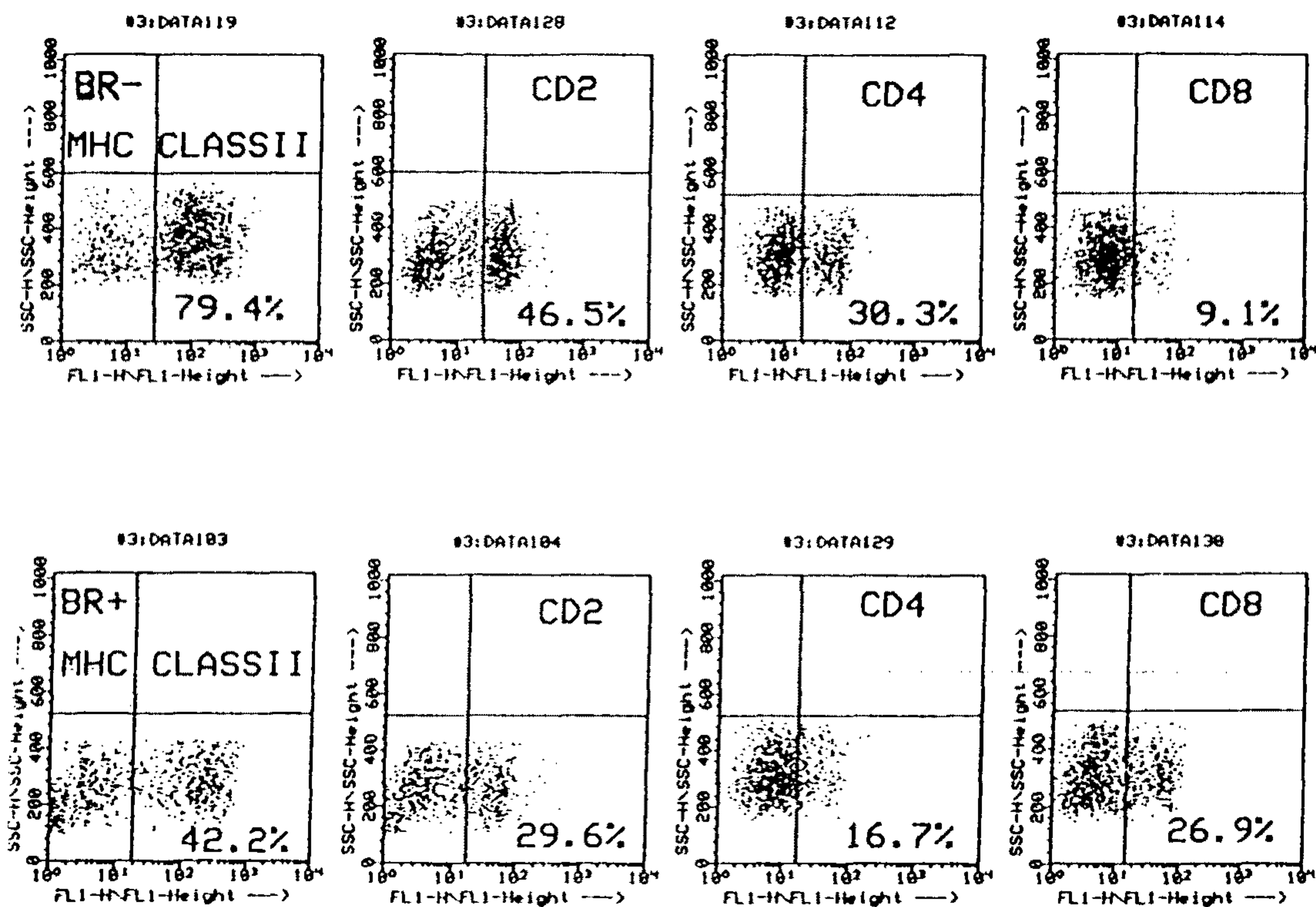


Fig. 5. Representative dot plot profiles of lymphocytes from peripheral blood labeled with one monoclonal antibodies specific to bovine MHC class II, CD2, CD4 and CD8 molecules. The upper four profiles were obtained with peripheral blood mononuclear cell of healthy cows(BR-). The lower four profiles were obtained with peripheral blood mononuclear cell of *B. abortus*-infected cow(BR+).

내용누락

2. 疫學 調査

1995년도 역학조사의 일환으로 MRT, TT검사에서 양성으로 판정되어 살 처분되는 양축 농가를 방문하여 그 피해 실태를 파악하였던 바, 단순히 하나의 질병때문이라고 끝이기에는 너무나도 엄청난 양축농가의 피해이어서 축 산을 포기하는 아래의 한 예를 접할 수 있었다.

< 피해 농가의 한 예 >

1995년 7월에 60두의 적소를 사육하고 있었으나, 착유우 검사(MRT, Tube test)에서 5의 적소가 양성 判定을 받고 두당 약 1,500,000원 정도의 보상금을 받고 殺處分 하였다. 그러나 8월에 추가 검사에서 또 다시 4두가 양성 判定을 받고 또 殺處分을 시키었다. 그런데 불행히도 9월에 또 다시 5두가 양성 判定되어 다시 殺處分을 함으로서 모두 14두를 손실하게 되었으며, 9월의 검사 소견에서도 의양성 소가 20 여두나 되어 앞으로 모두 양성으로 전환된다면, 이 목장은 불과 4개월사이에 20년간 하루도 쉬지 않고 목장을 건설, 경영해온 하나의 큰 목장을 완전히 잃게 되는 피해 농가에 몇마디의 위로 뿐, 그 어떤 도움도 줄 수 없었던 상황을 경험하였다.

불행은 그것으로 끝나지 않고 1995년 10월 9일 3두가 다시 양성 判定을 받게 되어 살처분되었다. 앞으로 이 목장의 겪어야 하는 길은 아무도 예측을 못하는 정량뿐이 없다.

疫學調査를 위한 陽性 牛로부터의 可檢物 收去:

① 우리 나라에서 發病하고 있는 brucellosis에 대한 疫學調査를 위하여 제주도, 전라북도, 충청남도, 경기도 지역 등 牛乳 檢査, tube test, PCR에서 양성 判定으로 살처분되는 현장에서 각종 가검물(상유방 임파절, 牛乳, 혈청, 혈액)을 취하여 실험실에 옮겨 왔다.

② 지역별 가검물 수거 현황

Table 5. 가검물 수거 현황

지역 가검물	전 북				경 기	충 남			충 북	제 주	계	
	남 원	임 실	장 수	전 주	안 양	아 산	흥 성	기 타	제 천	제 주		
혈 청	양 성의 양	3	-	2	-	3	57	4	2	5	10	86
	양 성음 성	-	7	-	12	-	25	-	-	-	-	44
	음 성	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(300)
	계	3	7	2	12	3	82	4	2	5	10	130
우 유		7	-	-	-	10	2	-	1	-	-	20
조 직	-	-	-	-	-	5	-	-	2	-	-	7
정 액	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	20

Polyclone antibody 生産 現況: 표준 Brucella spp를 배양하여 항원을 생산하여 단백질량을 소에 있어서는 0.6gm씩 되도록 Freund adjuvant과

함께 2차에 걸쳐서 접종하였으며, 염소와 돼지는 0.4gml를 상기의 방법으로 접종하였다. mouse와 Rat는 0.1 gml씩 상기 방법에 준하여 접종하였다.

Table 6. Polyclone antibody 生産 現況

동물명	사용한 균주	생산 기간
소	<i>Brucella abortus</i>	1995. 7 -1995. 9
	<i>B. melitensis</i>	
	<i>Yershinia enterocolitica</i>	
염소	<i>B. ovis</i>	1995. 7 - 1995. 8
	<i>B. abortus</i>	
	<i>B. melitensis</i>	
	<i>B. suis</i>	
	<i>B. canis</i>	
	<i>Y. enterocolitica</i>	
Rat	<i>B. abortus</i>	1995.9 -1995. 10
	<i>B. melitensis</i>	
	<i>B. suis</i>	
	<i>B. canis</i>	
	<i>Yershinia enterocolitica</i>	
돼지	<i>B. abotus</i>	1995.9 -1995. 10
	<i>B. melitensis</i>	
	<i>B. suis</i>	
Mouse	<i>B. abortus</i>	1995.9 -1995. 10
	<i>B. melitensis</i>	
	<i>B. canis</i>	
	<i>Y. enterocolitica</i>	

< In situ Hybridization >

Brucella spp의 DNA 추출 : 4% paraformaldehyde 액에 고정된 조직으로부터 DNA의 추출은 Sambrook *et al.*(1989) 등의 방법에 준하였다. 고정된 조직은 5 mm 두께로 절편하여 12시간 수돗물에서 paraformaldehyde를 제거한 후, 세절하였으며 세절한 조직을 proteinase K(0.3 mg/ml)와 1% SDS로 37℃에서 1시간 소화시킨 후 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)과 동량 혼합하여 단백질을 제거하였으며, 수용성 층의 DNA에 -20℃의 무수 에타놀을 2배 용량을 혼합하여 -70℃에서 30분간 방치시키고 10,000 × g로 10분간 원심 분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 멸균된 증류수에 재부유 시켜 냉동 보관하여 PCR 수행시 DNA template로 사용하였다. 대조로서 *Brucella*에 감염된 비장적출 송아지의 4% paraformaldehyde 액에 고정한 임파절, 감염되지 않은 소의 임파결절로부터 상기의 방법에 준하여 DNA를 추출하여 PCR 수행시 음성 대조로서 각각 사용하였다.

조직 표본의 제작: Brucellosis양성 판정 소의 상유방 임파절을 4% paraformaldehyde 액에 고정하여 조직 표본 제작에 사용하였다. 고정된 조직을 약 5 mm크기로 절단하여 수돗물에서 12 시간 세척하여 paraformaldehyde를 제거하였으며 에타놀로 탈수시켰다. 이를 xylene으로 투명화 시키고 파라핀을 이용하여 포매하였다. 포매된 각 표본을 5-7 μm 두께로 절편하여 poly-L-lysine(Sigma Co.)이 처리된 slide glass 위에 고정시켜 hematoxylin-eosin 염색, ABC 면역 염색과 *In situ* hybridization용 조직 표본으로 사용하였다.

< Avidin Biotin Complex 면역조직화학적 염색 >

Brucellosis양성 조직:

상유방 임파절의 조직 표본을 ABC 방법으로 면역조직화학적으로 염색하기 위하여 파라핀 포매된 조직을 5-7 μm 두께로 절편하였다. 절편된 조직을 xylene으로 파라핀을 제거하고 ABC kit(Dako Co.)를 이용하여 면역 염색을 실시하였다. 파라핀이 제거된 조직 절편을 proteinase K(0.1 mg/ml)으로 15분간 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기에 방치하여 단백질을 부분적으로 용해시켜 항원의 노출을 용이하게 하였으며 3% hydrogen peroxide로 10분간 처리하여 조직 내인성 peroxidase를 불활화 시켰다.

비특이적인 반응을 차단하기 위하여 3% bovine serum albumin으로 실온에서 10분간 처리한 후, 1차 항체는 polyclonal antibody를 실온에서 1시간 반응시켰으며, 2차 항체는 biotinylated anti-mouse IgG conjugate(Dako Co.)를 10분간 반응시킨 후, horseradish peroxidase(Dako Co.)가 부착된 streptavidin-biotin를 10분간 처리하였다. 항원에 부착한 peroxidase는 3-amino-9-ethylcarbazole으로 10분간 발색시켰으며, 대조 염색으로서는 Mayer's hematoxylin을 사용하였다. 음성 대조로서는 생쥐의 정상 혈청을 사용하여 염색한 경우와 2차 항체를 biotin이 부착되지 않은 항체로 처리하여 비특이적 염색 반응 유무를 관찰하였다.

*In situ hybridization*용 probe 준비: *In situ hybridization*에 있어서의 DNA probe는 PCR 기기를 이용하여 준비하였다. Probe를 만들기 위한 PCR은 100 μl 의 PCR 혼합액에 각각의 deoxynucleotide triphosphate 200 μM 과 digoxigenin-11-dUTP 10 μM (Boehringer Mannheim), 1 \times PCR buffer(1 mM MgCl_2 를 추가), 2.5 U의 *AmpliTaq* polymerase (Perkin Elmer Cetus)와 template로 표준 균주에 추추한 하였다. Digoxigenin이 부착된 DNA의

증폭은 Programmable Thermal Controller(MJ Research)에서 34 cycle를 수행하였다. 각 cycle의 구성은 denaturation은 95℃에서 1분(첫번째는 4분), annealing은 55℃에서 1분(첫번째는 95℃에서 5초 간격으로 1℃씩 55℃까지 하강시킴) 그리고 extension은 70℃에서 1분(마지막은 4분)를 실시하여 DNA probe을 제작하였다. 제작된 probe은 1% agarose gel에서 전기영동하여 앞에서 기술한 방법(II-3)으로 전개된 DNA의 크기를 비교 관찰하였다.

In situ hybridization : 각 조직 표본에 대한 *In situ hybridization*은 약 5-7 μm 두께로 절편한 조직은 xylene을 이용하여 파라핀을 제거하였으며 0.2 N HCl에서 20분간 처리한 후 tris-buffered saline(TBS: 0.5 M Tris, 0.85% sodium chloride, pH 7.6) 용액으로 세척하였다. 조직 절편을 0.1 mg/ml의 proteinase K로 15분간 37℃에서 처리한 후, 슬라이드 글라스를 0.1 M triethanolamine으로 30분간 처리한 다음 acetic anhydride (0.08%)를 추가하여 5분간 acetylation한 후, 0.2% glycine(pH 2.0)으로 5분간 2회 세척하고 TBS로 10분간 세척하였다.

상기의 조직 표본을 4% paraformaldehyde로 1분간 재 고정시킨 후 TBS으로 세척하고 pre-hybridization 혼합액(50% deionized formamide, 4 × SSC, 10% dextran sulfate, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured salmon sperm DNA, 1 × Denhard's solution) 25 μl 를 조직 표본 위에 적용시키고 42℃에서 2시간 pre-hybridization을 실시하였다. Hybridization은 새로운 pre-hybridization 혼합액에 digoxigenin이 부착된 probe를 300 ng/ml되게 첨가하여 hybridization 혼합액 50 μl 를 조직 표본 위에 적용시키고 95℃에서 5분간 denature 시킨 다음, 4℃에서 5분간 유지시킨 후 43℃에서 12-16시간 hybridization 시켰다. Hybridization한 슬라이드 글라스를 2 × SSC, 1 × SSC와 0.2 × SSC 용액에서 각각 1시간씩 서서히 교반하면서 세척하였다.

Hybridization 반응을 검사하기 위하여 상기의 slide glass를 TBS로 세

적한 후, anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate를 실온에서 1시간 반응시켰다. TBS로 세척한 후 기질액 BCIP/NBT(KPL Co.)를 이용하여 조직내 *T. sergenti* DNA의 존재 여부를 광학현미경하(Nikon Co.)에서 검사하였다. *In situ* hybridization에 있어서의 음성 대조는 *T. sergenti*에 대한 unlabelled probe를 처리한 경우와 anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate를 처리하지 않은 경우를 비교 관찰하고자 한다.

예견되는 결과

ABC 면역조직화학적 염색 : 조직 표본에 대한 ABC 면역조직화학적 염색에서 *Brucella* spp의 Polyclonal antibody가 부착되어 3-amino-9-ethylcarbazole의 발색제에 의해 붉은 색으로 염색되어 다른 숙주의 조직과 뚜렷히 구별되므로서 조직내 총체가 존재하고 있음을 확인할 수 있을 것이다.

In situ hybridization : *Brucella* spp에 대한 특이적인 probe를 작성하기 위하여 비방사선 물질을 부착시킨 digoxigenin-11-dUTP를 첨가하여 PCR을 수행하여 제작한 probe는 1% agarose gel 전기 영동에서 digoxigenin-11-dUTP가 첨가되지 않은 PCR 산물에 비하여 DNA 절편이 약간 위에 위치하여 probe가 형성됨을 전기영동상에서 확인할 수 있을 것이다.

Digoxigenin-11-dUTP가 부착된 probe를 사용하여 *In situ* hybridization을 실시한 결과 조직에서 *Brucella* DNA에 probe가 hybridization되어 다른 숙주 세포와 명확히 비교되는 암청색으로 염색되는 *Brucella* DNA를 뚜렷하게 관찰할 수 있는 분자생물학적 반응을 확인할 수 있을 것이다.

내용누락

제 5 장: 제 4 세부 분야

세부책임자소속	파치연구소	직 급	소 장	성 명	김 동 성
협력연구자소속	전북대학교 수의과대학	직 급	교 수	성 명	백 병 걸
연구 제목	<i>Brucella spp</i> 예방약 및 진단약의 산업적 생산을 위한 연구				
내 용	<i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella abortus</i> RB51, Vaccine, CFT, Latex Agglutination test 국내 분리균주,				
진행정도(3년)	제 1차년도	제 2차년도			제 3차년도
	100 % 완결				

제1절 서 설

우리나라의 젖소에서 최근 5년간 brucellosis의 발생 추이를 傳染病 발생 통보에 근거하여 미루어 보건데 젖소만이 感染되었다고 간주하기에는 너무나 많은 소가 感染, 진단되어 살처분되고 있는 실정이라고 사료되는 바이다(1994년도 500두 이상/년).

만약 2차년도의 研究 수행 중에 젖소를 포함함 한우에서 계속적으로 발병된다면 우리나라의 Brucellosis에 대한 정책을 새로이 수립하든가, 변경되어야 할 것이다. 즉, 感染 牛의 檢索 方法과 일부 濃感染 지역에서 사육되고 있는 소에 대한 豫防接種이 필요할 것이다. 철저한 豫防 接種한 소의 관리를 위하여서는 모든 소에 대한 전산화로 개체 별 등록 번호의 부착하는 것과 같은 전국규모의 소에 대한 관리 정책의 수립과 실

행이 있어야 한다.

그간에 Brucellosis豫防을 위하여서는 *Brucella abortus* S19가 성우에 오랫동안 사용되어 왔으나 소의 저항성 항혈청에 관련되어 感染이 되는 예가 있었으며, 국가 검정 診斷用 Kit에 감지 되지 않았다, 그래서 균체량을 減少시켜 豫防接種하므로서 豫防 效果를 기대하였지만 이같은 문제점을 해결할 수 없었다(Crawford et al 1991). 만약 임신 중인 소에게 接種되면 영원히 보균 소가 되기때문에 더이상의 豫防 接種 方法으로서는 추천하고 있지 않고 있는 나라도 있다(Nicoletti et al 1986).

제 2절 材 料 및 方 法

1. 사용 균주의 확보 방안: 최근 *Brucella abortus* S 19의 문제점 때문에 사용을 꺼려하고 있는 바, Schurig et al(1991)이 보고한 *Brucella* RB51 균주를 사용하고자 한다.

2. 항원성 보강: Dzara et al(1991)의 方法으로 세포성 면역 반응을 강화하기 위하여 dimethyl dioctadecyl ammoinium bromide과 trehalose dimycolate 등을 첨가하며 체액성 면역을 보강하기 위하여서도 이들 물질을 활용한다. 앞으로 이같은 研究 방향은 각광을 받을 것으로 사료된다.

3. *Brucella* 豫防에 관한 각국의 정책 파악: 우리나라에서의 Brucellosis豫防을 국가적 防疫 정책 수립을 위하여서는 다른나라의 예가 중요하리라 생각되어 이에 대한 研究가 필요할 것이다.

더욱이 국가적 防疫 program의 확립에 앞서서 실험실적 豫防用 백신의 개발과 방어 능력 등을 研究 하여 두어야 함은 필수적인 조치중에 하나이

라고 생각된다.

4. **診斷약의 개발:** 본 研究과제에서 농촌의 현장에서 활용할 수 있는 診斷用 kit의 생산은 많은 研究와 시간이 필요하다. 이 같은 診斷 용 KIT의 제조를 위하여서는 제 1, 2, 3세부연구분야의 研究과제가 研究결과를 얻었을 경우에만 비로서 가능한 일로서 제3차년도는 다음과 같은 診斷用 kit를 제작하려고 한다.

제 3절 결 과

1. **診斷用 KIT 생산:** 현재 사용되고 있는 Milk Ring Test(MRT)와 Tube Agglutination Test(TT)에서 양성 판정된 소의 살처분 전에 제3,4의 診斷 方法으로 활용할 수 있는 Table 7 과 같이 診斷用 KIT를 생산한다.

Table 7 시작품 제조 계획 항목

품 명	활 용
Compliment Fixative Test Kit	Milk Ring Test과 Tube Agglutination Test에서 양성 판정된 소에 대한 재확인 진단
Latex Agglutination Test Kit	CFT, MRT, TT 검색의 보조적 진단 방법용 KIT 생산

2. 豫防藥 生産 정책 수립을 위한 研究:

본 현장에로 사업의 수행 제1차년도와 2차년도의 疫學的 研究가 완료되면 제 3차년도에 있어서는 역학적 상황에 부합된 항원의 특색과 면역

학적 특색에 근거를 둔 경험으로 우리나라에서 활용할 수 있는 豫防藥 생산을 위한 研究를 수행한다. 즉, 우리 나라 家畜에 있어서의 Brucellosis 에 대한 疫學的 調査에서 診斷, 殺處分의 과정만으로는 Brucellosis를 豫防 할 수 없을 경우에는 호주, 뉴질랜드에서 처럼 豫防藥을 接種하여 抗體를 형성하므로써 실제로 소가 이 疾病의 感染에 대한 免疫 형성을 시켜 주어야 할 것이다(Stevens et al 1995; Schurig et al 1991). 이 같은 研究를 위하여서는 지금의 Brucellosis 感染 실정과 같이 管理가 가능한 시기에 이같은 基礎的 研究를 수행하여 그 지식을 國內에서 완벽하게 보유하고 있어야 할 것이다.

제1, 2세부 研究課題의 研究 結果에서 우리 나라에 分布하고 있는 Brucella 菌株의 特異性, 分布 樣相, 發病율, 感受性, 그리고 피해 정도가 규명되면 우리 나라 家畜에서의 豫防 接種에 대한 技術的 검토를 고려하여야 할 것이다. 이유는 만약 젖소가 豫防接種을 하게 되면, Milk Ring Test에서 陽性 反應을 나타내므로 集乳所의 檢診 結果는 陽性으로 나타나므로 그간의 診斷 方法에 의한 陽性牛 檢索은 불가능하기 때문이다. 그러므로 우리 나라에서의 豫防藥을 生産하여 豫防接種하는 문제는 신중히 고려하여야 함은 당연한 일이지만, 만약, 1993년이나 1994년도처럼 陽性牛가 400 두를超過여 國家에서의 배상액이 10억을 超過 할 경우에는 응당히 豫防接種 필요성을 고려하여야만이 양축 농가에서의 경제적 손실을 最小化 할 수 있을 것이다.

3. 細部 課題別 設計 內容

세 부 과 제 명 (책 임 자)	실 계 내 용
Brucellosis 진단 방법 개발 (백 병 절)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우리 나라 소와 가축으로부터의 Brucella spp의 순수 분리 및 항원 분석에 관한 연구 2. 진단 방법의 개발(Complement Fixative Test, Latex 응집반응 기술 확립) 3. Polymerase Chain Reaction에 의한 진단 방법 확립 4. Brucellosis 양성 판정된 소의 살처분을 위한 확인 진단 방법 개발로 경제적 손실의 최소화 방안 제시
Brucella spp에 있어서의 균주간 특이성 연구 (이 호 일)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Brucella spp 균주간의 항원항체의 교차반응관계를 실험동물을 이용, 비교 함.
우리 나라에서의 Brucellosis 역학 조사 및 면역 활성 세포에 관한 연구 (박 용 호)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우리 나라 가축의 brucellosis 발병에 대한 혈청학 및 세균학적 역학조사 2. 예방용 백신의 소의 임파구 활성화에 관한 연구
Brucellosis 예방약 진단 KIT의 산업적 생산을 위한 연구 (김 동 성)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 예방용 불활화 백신 생산에 관한 연구 2. 실험동물에서의 백신의 항체 형성능력 및 안전성 실험을 수행한다. 3. CFT진단용 KIT 생산성 분석 및 제조

내용누락

제 6장 參 考 文 獻

김금화, 안수환, 박용호, 김동성. (1982) 부루셀라병 檢索에 사용되
는 여러가지 血清 診斷法의 比較研究. 대한수의사회지.
22(2): 149-153.

김두희, 정병택, 문제봉. (1968) 부루셀라 感染 한우에 대한 血清학적
研究. 농사試驗研究보고서 11(15):1-18.

김병구, 김동성, 이택주. (1957) Brucellosis에 관한 研究 제 1 보.
Brucellosis의 免疫學的 調查報告. 家畜衛生研究所 研究報告.
5:79-91.

김병구, 정병택, 차연호. (1963) Brucellosis에 대한 血清학적 검사
(1) (특히 인공 感染 한우를 중심으로 한 관찰) 家畜衛生研究
報告. 9:40-50.

김병구, 주병균, 이택성. (1960) 브루셀라증에 관한 研究. 家畜衛生
研究所보. 10:9.

김병구, 안병균, 이택주(1959). Brusellosis에 관한 研究 제2보 家
畜 Brucellosis에 대한 免疫學的 調查報告. 家畜研究衛生研
究報告. 6:9-23.

김종만, 유종찬, 박정문, 현관종, 마점술(1988). 브루셀라 陽性우에
서 分離한 브루셀라균의 성장과 血清학적 診斷法 比較. 농사

논문집(家畜衛生). 30(2):1-6. 農林水産部(1988-1992) 농림수
산통계연보.

박동권. (1963) 축산試驗장에서 發生한 돈의 유산중에 대한 병원학적
調査研究. 家畜衛生研究報告. 9:34-39.

박봉조, 하민식. (1965) Brucella병에 관한 研究. 도입 유우및 한우
의 부루셀라 응집역가의 동요에 대하여. 농사試驗研究報告.
8(3):95-104.

서명득, 이용구(1993) Latex 응집 반응을 이용한 동물의 특소플라스
마병 진단액 개발에 관한 연구. 대한수의학회. 33(4):623-632.

손준용, 이길용, 유재창, 박만석 등 (1986) Zoonosis 브루셀라증에
관한 研究. 국립보건원보. 23:281-295.

안수환, 김금화, 박용호, 김동성. (1982) 부루셀라병과 Yersinia
enterocolitica 感染의 血清학적 鑑別診斷에 관한 研究. 농사
報告(축산家畜). 24:106-111.

이영수(1983) 犬브루셀라병. 대한수의사회지. 2:19.

이현수, 김병구, 송병균. (1961) 한국에서 分離된 Brucella균형에 관
하여. 家畜衛生 研究所 研究報告. 7:13-18.

임윤규, 이두식, 박전홍, 양기천, 김승호, 김공식, 현관종, 김우택,

이영순(1993). 축우 부루셀라병의 ELISA 診斷法에 관한 研究.
대한수학회지. 33(1):131-135.

임윤규, 양기천, 이경갑, 박전홍, 이두식, 박용호, 강승원, 목지원,
이영순(1995) SDS처리한 브루셀라 항원과 *Yersinia*
enterocolitica 0:9 주의 혈청학적 교차 반응 연구. 대한수
학회지. 35(1):143-148.

정병탁(1969). 유우 부루셀라병 診斷을 위한 Milk Ring Test의 이용
가치. 대한수의학회지. 9(2):55-59.

정석찬, 김종만, 박정문, 안수환. (1989). 부루셀라균에 대한 단클론
성 抗體 生産. 농시논문집. 31(4):19-23.

정종식, 조용준, 박정규(1988) 경북지방 젖소로부터 *Brucella*
*abortus*의 分離 및 균 형별. Korean J Vet Res.
28(2):339-343.

정영석(1994) 소 부루셀라병 근절사업 결과보고서. 제주도축산진흥
원. 5-43

Arixa J, Servitje, O, Pallares R, Fernandez Viladrich P, Rufi
G, Peyri J Gudiol F(1989) Characteristic cutaneous
lesions in patients with brucellosis. Arch Dermatol.
125:380-383.

- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. & Verger, J. M.(1988) Techniques for the brucellosis laboratory. Institute National de la Recherche Agronomique, Paris.
- Baily, G. G., Krahn, J.B., Drasar, B. S.& Stoker, N. G.(1992) Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. Tropical Med. and Hygiene. 95(4):271-275.
- Banai, M. B., Mayer, I. & Cohen, A.(1990) Isolation, identification and characterization in Israel of *Brucella melitensis* bivar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. J. Clin. Microbiol. 28:1057-1059.
- Berger T G, Guill M A, Goette D K(1981) Cutaneous lesions in brucellosis. Arch Dermatol. 117:40-42.
- Beran G W(1994) Handbook of zoonoses. CRC. 9-39.
- Castaneda, M. R.(1947) A practical method for routine blood culture in Brucellosis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 64:114-115.
- Cloeckaert, A., Kerkhofs, P.& Limet, J. N.(1992) Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine

brucellosis: Immunoblotanalysis and competitive enzyme-linked immunosorbent using monoclonal antibodies. *J. of Clin. Microb.* 30(12): 3168-3174.

Crawford RP, Huber JD, Ficht T A, Templeton J W, Williams JD(1991): Effect of stage of gestation on efficacy of *Brucella abortus* strain-19 vaccination in cattle. *American Journal of Veterinary Research* 52:1848-1851.

Dzata GK, Wyckoff JH, Confer AW(1991) Immunopotential of cattle vaccinated with a soluble *Brucella abortus* antigen with low LPS content: an analysis of cellular and humoral immune responses. *Veterinary Microbiology*. 29:15-26.

Deley, J., Mannheim, W., Segers, P., Lievens, A., Denin, M., Vanhoucke, M. & Gillis, M.(1987) Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37:35-42.

Dubray G and Limet J(1987) Evidence of heterogeneity of lipopolysaccharides among *Brucella* biobars in relation of A and M specificities. *Ann Inst. Pasteur Microbiol*. 138:27-37.

- Dunbar, B. S. (1987) Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological techniques. Plenum Press. New York and London.
- Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M. and Sanborn, M. R. (1990) Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*. 69:216-227.
- Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M. and Stich, R. W. (1992) Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *Journal of Bacteriology*. 174(23): 7778-7783.
- Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG (1989) DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*. 57(11):3281-3291.
- Herman L, Herman De Ridder (1992) Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(6):2099-2101.
- Gillespie JH, Timoney JF (1981) Hagens and Bruner's Infectious diseases of domestic animals. Cornell University. 127-150.

Glasgow MMS(1976) Brucellosis of the spine. *Br. J. Surg.* 63:283-288.

Garin-Bastudi B, Bowden R A, Dubray G, Limet J(1990) Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *Journal of Clinical Microbiology.* 28(10):2169-2174.

Hitchcock PJ and Brown TM(1983) Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver stained polyacrylamide gels. *J. Bacterial.* 154:269-277.

Hoffmann, E. M., Shapiro, S. J. & Nicoletti, P(1990) Evaluation of serologic and cellular immune responses of cattle to a nonlipopolysaccharide antigen from *Brucella abortus*. *Am J Vet Res.* 51(2): 216-221.

Hopper, B.R., Sanborn, M.R. and Bantle, J.A.(1989) Detection of *B. abortus* in mammalian tissue using biotinylated whole genomic DNA as a molecular probe. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 50: 2064-2070.

Hsu SM, Raine L & Fanger H(1981) A comparative study of the

peroxidase-antiperoxidase method and an avidine-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75: 734-738.

Huber J. D., 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): 1529-1532.

Kelly PJ, Martin WJ, Schirger A, Weed LA(1960) Brucellosis of the bones and joints. *Journal of the American Medical Association*. 174(4):347-353.

Laemmli, V. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Leong DR, Diaz R, Miller K, Rudbach J and Wilson JB(1970) Some structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. *Infect Immun*, 1:174-182.

Mayfield, J.E., Bantle, J.A., Ewalt, D.R., Meador, V.P. and Tatabal, L.B. (1988) Detection of *Brucella* cells and cell components. In: *Animal Brucellosis*. Boca Ration: Chemical Rubber corporation.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods of Enzymology*. 155: 335-350.

Neumann, R., Rudloff, P. and Eggers, H.J. (1986) Biotinylated DNA probes: Sensitivity and application. *Naturwissenschaften*. 73:553-555.

Nicoletti P (1986) Effects of brucellosis on bovine reproductive efficiency. *In Current Therapy in Theriogenology*. 2. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Co. PP 271-274.

Pollice, M. and Yang, H.L. (1985) Use of nonradioactive DNA probes for the detection of bacteria. *Clinic in laboratory science*. 5:463-473.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 1.3-9.58.

Sarvamangala, J. N., Devi, Polt, S. S., Boctor, F. N., Peter, J. B. (1987) Serological evaluation of brucellosis: Importance of species in antigen preparation. *The Journal of Infectious Diseases*. 156(4): 658-661.

Schurig G G, Roop R M, Bagcji T, Boyles S, Buhrman D,

Strianganathan N(1991) Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*. 28:171-188.

Sley JE(1993) *Immunocytochemistry*. Oxford Uni. Press. pp. 7-203.

Stevens MG, Olsen S C, Cheville N F, (1995) Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB 51. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 44:223-235.

Splitter GA., Everlith KM., (1989) *Brucella abortus* regulates bovine macrophage-T cell interaction by major histocompatibility complex class II and interleukin-1 expression. *Infect Immun*. 57:1151-1157.

Shultz RD(1981) The role of cell mediated immunity in infectious diseases of cattle. *Adv. Exp Biol Med*. 137:57-90.

Tekkok I H, Berker M, Ozcan O E, Ozgen T, Akalin E(1993) Brucellosis of the spine. *Neurosurgery*. 33(5): 838-844.

Tokuda Y, Nakamura T, Satonaka K, Maeda S, Doi K, Baba S & Sugiyama T(1990) Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissue fixed in formaldehyde. *J Clin Pathol*

43: 748-751.

Towbin H, Staehelin T & Gordon J(1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc Natl Acad Sci 76: 4350-4354.

Tsang VCW, Peralta JM & Simons AR(1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques(EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Methods Enzymol 92: 337-391.

Tuan RS, Shepley KJ, Mulligan MM, Abraham D & Perler FB(1991) Histochemical localization of gene expression in *Onchocerca volvulus*: in situ DNA histo hybridization and immunocytochemistry. Mol Biochem Parasitol 49: 191-204.

U.S. Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Services(1986). Microtitration Complement Fixation techniques. *National Veterinary Services Laboratories*. 35-52. Ames, Iowa

Vizcaino, N.& Fernandez-Lago, L(1992) A rapid and sensitive method for the identification of *Brucella* species with a monoclonal antibody. Res. Microbiol. 143:513-518.

Yinnon, A. M., Morali, G. A., Goren, A., Rudensky, B. Isacsohn, M., Michel, J. & Hershiko, C.(1993) Effect of age and

duration of disease on the Clinical manifestations of
brucellosis. Isr J Med Sci. 29:11-16.

Zimmerman, S., Gillikin, S. A., Sofat, N., Bartholomew, W. R.
& Amsterdam, D. (1990) Case report and seeded blood
culture study of *Brucella bacteremia*. *J. of Clin.*
Microb. 28(9):2139-2141.

첨부 2: 미국으로의 소血清 반입을 위한 허가증

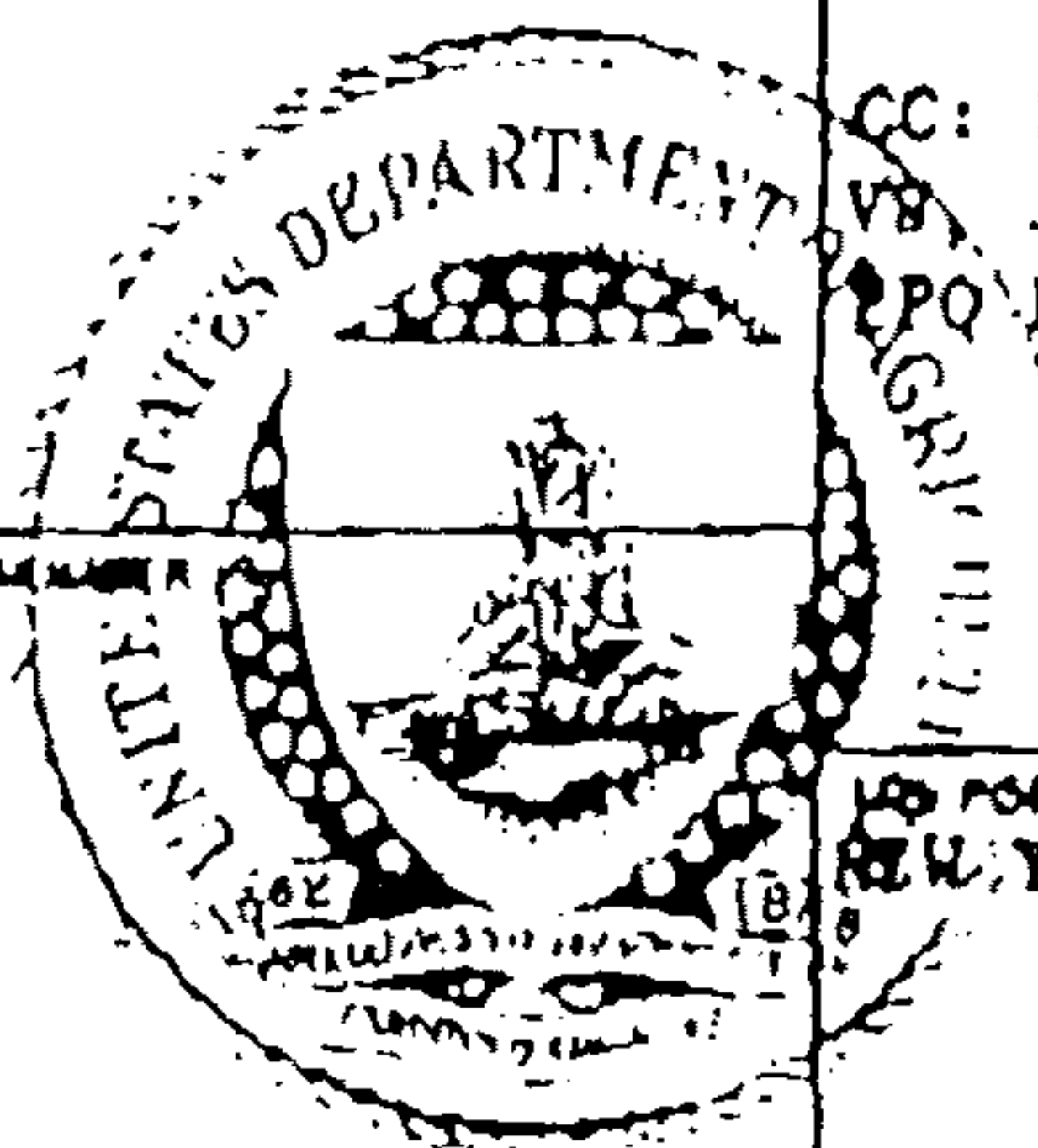
ORGANISMS AND VECTORS

04/23/92

NAME AND ADDRESS OF SHIPPER(S)

Dr. B. K. Baek
Chonbuk National University
Chonju
SOUTH KOREA

CC: R. Caffey, PPQ, Hyattsville,
VS, JFK Int'l Airport
PPQ Director, Moorestown, NJ



NAME AND ADDRESS OF PERMITTEE INCLUDING ZIP CODE AND TELEPHONE NUMBER

TO:
Dr. Charles Habus
FADDL, USDA, APHIS
P. O. Box 848
Greenport, NY 11944-0848
(516) 323-2500

PORT OF ARRIVAL
NEW YORK, NY

MODE OF TRANSPORTATION AIR

AS REQUESTED IN YOUR APPLICATION YOU ARE AUTHORIZED TO IMPORT OR TRANSPORT THE FOLLOWING MATERIALS

Bovine serum samples
UQA-533

RESTRICTIONS AND PRECAUTIONS FOR TRANSPORTING AND HANDLING MATERIALS AND ALL DERIVATIVES

THIS PERMIT IS ISSUED UNDER AUTHORITY CONTAINED IN 9 CFR CHAPTER I, PARTS 94, 95, AND 122. THE AUTHORIZED MATERIALS OR THEIR DERIVATIVES SHALL BE USED IN ACCORDANCE WITH THE RESTRICTIONS AND PRECAUTIONS SPECIFIED BELOW (ALTERATIONS OF RESTRICTIONS CAN BE MADE ONLY WHEN AUTHORIZED BY USDA, APHIS).

- o Adequate safety precautions shall be maintained during shipment and handling to prevent dissemination of disease.
- o ***This material must be imported through JFK International Airport in New York, NY to be picked up by USDA personnel for transport to USDA, APHIS, FADDL for g-irradiation purposes:
*NOTIFY, PRIOR TO SHIPMENT, WITH THE FLIGHT, WAYBILL NUMBER, DATE & TIME OF ARRIVAL:
1) USDA, FADDL - telephone - (516) 323-2500 (for FAX, ask for extension 366); AND
2) USDA, APHIS, VS at JFK - telephone - (718) 917-1727 (by FAX (718) 244-0757).
- o Package must be addressed to Dr. C.A. Habus, c/o Veterinary Services (Inspector Bifano) Cargo Building 80, JFK International Airport, Jamaica, NY 11430.
- o Please notify Import-Export Products Staff in Hyattsville, MD as soon as gamma irradiation is complete so a transfer permit can be issued. IEXPS telephone number is Area Code (301) 436-7830, FAX number is (301) 436-8226.
- o ***The imported material must be irradiated with 3 megarads of gamma radiation at the Foreign Animal Disease Diagnostic Laboratory (FADDL) before they can be released to:
Dr. I. Kakoma
- o ***Hold shipment at JFK International Airport, Jamaica, NY for pick-up by USDA/APHIS.
- o cc: Dr. I. Kakoma, College of Veterinary Medicine, University of Illinois, 2001 South Lincoln Ave., Urbana, IL 61801
- o Materials must be shipped directly to JFK International Airport in New York, NY by same plane service. If a change in planes in the U.S. is required, the materials must be accompanied by a courier (hand-carried).

TO EXPEDITE CLEARANCES AT THE PORT OF ENTRY, BILL OF LADING, AIRBILL OR OTHER DOCUMENTS ACCOMPANYING THE SHIPMENT SHALL BEAR THE PERMIT NUMBER

SIGNATURE 	TITLE Senior Staff Veterinarian Import-Export Products Staff	NO. LABELS
---------------	--	------------

첨부 4. 검사 결과서

DR. B. K. BAEK

FAX# 9-011-82-652-70-3780

FROM: DR. I. KAKOMA
217-333-4628

FEBRUARY 18 1994

DEAR DR. BAEK,

THANK YOU FOR YOUR FAX TODAY. UNFORGOTTEN PLEASE SEND A COPY OF THE PAPER WE PUBLISHED TOGETHER IN: JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, VOL. 32, PAGES 170-175 1994. I HOPE YOU HAVE A GOOD VISIT WITH DR. YOON. PLEASE SEND MY GREETINGS AND TELL HIM TO HIM.
AS I TOLD YOU YESTERDAY, I AM TEACHING UNTIL END OF MAY. AND I WILL BE FREE DURING THE MONTH OF JUNE AND THE FIRST 2 WEEKS OF JULY. FROM JULY 9 TO 13 I WILL BE ATTENDING THE AVMA MEETING. AFTER JULY 14 I AM FREE UNTIL SEPTEMBER.

REGARDING YOUR MANUSCRIPTS I AM GOING TO SEND THE DISC BY EXPRESS MAIL AND YOU SHOULD GET THEM BY FRIDAY FEBRUARY THE 24 TH.

PLEASE NOTE:

- 1) THE BOVINE SERUM SAMPLE WAS NEGATIVE FOR BRUCELOSIS BY THE COMPLEMENT FIXATION TEST DONE BY USDA, ARIZONA.
- 2) THE HUMAN SAMPLE WAS SEROLOGICALLY POSITIVE FOR EHRlichiosis. . . . CDC HAVE NOT YET SENT THE OFFICIAL RESULTS AND COMPLETE INTERPRETATION. I WILL SEND THE INFO TO YOU IF I GET IT.

THANK YOU AND HAVE A NICE DAY AND BEST WISHES TO YOU, YOUR FAMILY AND YOUR COLLEAGUES.

SINCERELY,

I. KAKOMA

첨부 5: 미국 농림성의 血清 診斷 결과

University of Illinois
at Urbana-Champaign

College of Veterinary Medicine
2001 South Lincoln Avenue
Urbana, IL 61801

Department of Veterinary Pathobiology
217 333-2449
217 333-4628 fax

NAME OF CLINICIAN: Dr. I. Kakoma

SPECIMEN: Diluted Bovine Serum (1/8 dilution in PBS)

7-6-92

7-6-92

SPECIMEN ID#	ANAPLASMOSIS (CFT RESULTS)	BRUCellosIS TEST RESULTS
1	Neg	Neg
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		

* Please return samples when finished

ILLINOIS DEPARTMENT OF AGRICULTURE
ANIMAL DISEASE LABORATORY
SIATTUC ROAD
CENTRALIA, ILLINOIS 62801-9289

SPECIMEN ID#	ANAPLASMOSIS (CFT RESULTS)	BRUCELLOSIS TEST RESULTS
470	Neg	Neg
1		
2		
3		
	L. Brucella	

첨부 6: 미국 표준균주의 수입허가증

수입허가증명서
(CERTIFICATE FOR IMPORT PERMIT)

수입허가번호 Import permit No.	94 - 4
수입허가일자 Date of issue	2, Jun. 1994

아래와 같이 가축전염병예방법 제21조 및 동법시행규칙 제15조의2의 규정에 의하여 수입허가를 받은 것임을 증명합니다.

This is to certify that import permit was obtained as the following under Article 21 of "Livestock Epidemic Prevention and Control Act" and Article 15-2 of "its Enforcement Ordinance"

신청인 성명·주소 (Name & Address of applicant)	전북대학교 수의과대학 백 병 길 Baek Byong Kirl College of Veterinary Medicine, Chunbuk National University Chunbuk, Rep. of Korea
동물의 종류·품종 또는 물품의 종류 (Species of animal or kind of article)	Brucella abortus, Brucella canis, Brucella suis, Brucella ovis, Brucella melitensis, Vibrio vulnificus, Yersinia enterocolitica.
두수 또는 수량(Total head or quantity)	Lyophilized ampule 7 EA
송하인 성명·주소 (Name & Address of consignor)	Ibulaimu Kakoma Dep. of Veterinary pathobiology and Veterinary Clinical Medicine, University of Illinois, Urbana, Illinois 61802, U. S. A.

※ 주의
(Remarks)

1. 상기 동물 또는 물품의 발송시에는 이 증명서를 첨부하여야 합니다.
In consigning the above animals or packages in which the above articles are packed, they should be accompanied with this certificate.
2. 송하인은 상기 화물을 이 증명서와 같이 뒷면에 기재된 동물검역소(지소 혹은 출장소)로 발송하여야 합니다.
The consignor should address the above commodities to the Animal Quarantine Service(or Branch or Sub-branch thereof)indicated on the back of this certificate along with this certificate.
3. 수하인은 상기 화물을 상기 동물검역소가 행한 검사를 받은 후 수취하여야 합니다.
The consignee should receive the above commodities after the completion of inspection at the above Animal Quarantine Service.

농림수산부장관
MINISTER OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES.