최 종
연구보고서

소의 부루셀라병에 의한 양축 농가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책 연구

Studies on the prophylactic strategy to reduce economic loss due to bovine brucellosis in Korea.

진단 방법 및 예방약 생산을 위한 기술 연구

Studies on developments of diagnostic methods and vaccines

Brucella spp의 항원 특성 규명.

Studies on the characteristics of *Brucella* spp antigens.

면역 효과 검정과 면역세포의 활성 연구

Studies on the immunological efficacies and the activities of immune cells.

진단약 및 예방약 생산

Production of diagnostic methods and vaccines.

전 북 대 학 교

농 림 부

최 종
연구보고서

우리나라 소에 있어서의 Brucellosis에 의한 양축 농가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책연구

1997년 12월

전북대학교 백 병 걸

제 출 문

농 림 부 장관 귀하

본 보고서를 “우리나라 소에 있어서의 Brucellosis에 의한 양축농가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책연구 ”의 최종 보고서로 제출합니다.

1997년 12월

총괄연구책임자 전북대학교 백 병 걸
연 구 원 전북대학교 이 호 일
협동연구기관 서울대학교 박 용 호
협동연구기관 파천연구소 윤 인 중

요 약 문

I. 제목: 우리나라 소에 있어서의 Brucellosis 에 의한 양축농가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

우리나라에서 Brucellosis는 1956년에 처음 발생하여 잠시 발생보고가 없었으나 최근 10여년전부터 재발생하기 시작하였으며, 농림부의 전염병 발생보고에 따르면 지속적으로 이루어지고 있을 뿐만 아니라 그 숫자도 급격히 증가되어 1995년도부터 1997년까지 무려 500 900여두가 매년 살처분되고 있는 실정이다.

우리나라에서 Brucellosis는 중요한 인수공통전염병 중 하나로서 이의 전파를 막기 위하여 매년 착유우를 대상으로 정기검사를 수행하여 왔으며, 감염된 소는 즉시 살처분하는 박멸정책을 수행하여 왔다. 그럼에도 불구하고 제주도를 중심으로 경기도, 충청도 그리고 전라북도 등의 지역에서 박멸되지 않고 그 발병 두수가 증가되어 양축농가의 경제적 손실이 지대한 실정이다.

이처럼 우리나라는 Brucellosis 만연지역임에도 불구하고 이 질병의 박멸을 위한 연구는 활발하지 않아서 우리나라에 분포하고 있는 Brucellosis 의 박멸과 예방을 위한 연구를 수행하기 위하여 먼저 Brucellosis에 대한 역학적 연구를 통한 효율적인 진단방법의 개발과 면역학적으로 이 질병의 방제를 위한 연구활

동을 수행함으로서 우리나라에 만연화되어 가고 있는 Brucellosis의 근절방안을 마련하여 양축농가의 경제적 손실을 최소화하고자 함은 물론 이의 인체감염을 예방하고자 하는 것이 본 연구의 목적이다.

2. 연구개발의 중요성

가. 기술개발의 필요성

1) 진단기술 분야: Brucellosis에 대한 진단방법에 있어서 공인진단법인 Milk Ring Test(MRT)나 Tube Agglutination Test(TAT)에 대한 타 혈청학적 진단법과의 정확성과 민감성을 비교 관찰하였으며, brucellosis 진단에 있어서 공인진단법보다 특이도와 민감도가 높은 Complement Fixation Test(CFT)와 Latex Agglutination Test(LAT)의 진단법을 확립하여 실용가능성에 대하여 비교함이 필요하였으며 가능하다면 그 동안 공인진단법으로 활용해온 TAT, PAT와 교체할 수 있는 연구가 필요하였다.

2) 예방약 생산: 우리나라에서 만연하고 있는 Brucellosis에 감염된 젖소의 면역관련세포의 분포율을 각종 임파의 monoclone antibody를 이용, 규명하여 그 높은 감염율의 원인을 확인할 필요성이 있어, 이들 면역관련세포의 분포율을 관찰하므로서 이 질병의 예방을 위한 세균성 면역을 유발시킬 수 있는지 여부에 대한 연구가 필요하였다. 즉, 세포성 면역을 강하게 유발시킬 수 있는 예방약의 생산기술을 개발하기 위하여 항원성 물질을 개발할 필요성이 강하게 요구되고 있어, 이에따라 미국에서 예방접종균주로 활용하고 있는 *Brucella abortus* RB51 균주를 생산하여 한우와 젖소 그리고 사슴 등에 예방접종할 수 있는 적응시험이

있어야 할 것으로 사료되었다. 물론 *Brucella* spp의 새로운 변이종균주를 생산하여 여러 가축의 예방약 생산을 위한 처리기술을 터득하여 축적되어야 한다고 판단되었다.

나. 경제·산업적 측면의 중요성

1) 본 연구과제가 수행 중이던 1995년도부터 1997년까지 500 900여두의 착유우가 매년 살처분되어 국가는 이들 소를 무상으로 배상하였으며, 농가는 이에 다른 생산성 손실과 막대한 경제적 손실을 겪음은 물론 종국에는 낙농을 포기하므로서 국가와 양축농가 모두에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있는 법정 가축전염병으로서 이 질병의 퇴치는 우리나라 뿐만 아니라 세계 모든 나라에서 문제시되고 있는 질병이다.

2) 이렇게 경제적 그리고 인수공통전염병으로서 중요한 Brucellosis에 대한 정확한 진단방법 개발과 기존 공인진단법의 활발한 활용은 살처분되는 소의 두수를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 방제계획 수립에 일익을 담당할 것이다. 이에 brucellosis로 진단된 혈청을 이용하여 CFT 그리고 LAT와의 비교시험에서 양성일치율(70%)이 낮기 때문에 다른 확인진단 없이 감염된 것으로 믿고 살처분한다면 경제적 손실을 입게 될 것으로 판단되므로, 앞으로는 CFT의 진단성적과 거의 일치율이 높은 금번에 개발한 LAT가 공인진단법으로 활용된다면 정확한 진단방법이 이루어져 많은 경제적 손실을 최소화할 수 있을 것이다.

3) 만약 이 질병에 대한 예방대책이 세워지지 않은 체 계속적으로 착유우가 살처분된다면 우리나라 낙농업은 절망의 위치에 놓이는 경우가 될 것이며, 더 나가서는 IMF와 같은 경제적 위기속에서 생유의 수입마저도 가능하게 될는지도 모르는 처지이므로 국가 경제에 막대한 영향을 끼칠 것이다.

4) 우리나라에서 사육되고 있는 약 50여만두의 젖소를 대상으로 한 예방접종용 Program의 확립이 없다면 국가 낙농업의 몰락이 예견되는 바, 예방접종을 위한 연구가 해결해야할 가장 큰 당면과제로 사료되어 이에 대한 연구활동을 하였으며, 각종 *Brucella* spp에 대한 변이균주를 생산할 수 있는 변이유도기술을 확립하였다(특허출원 제97-63213호).

다. 사회, 문화적 측면

1) 젖소를 사육하고 있는 축산농가를 보호할 수 있다. 1997년에도 무려 900여두의 착유우가 brucellosis로 판정, 살처분되고 있는 처지는 사회문제로서 대두 될 것은 분명하나 정부가 현실가로 보상하여 줌으로서 무마되고 있다고 생각되었다. 그러나 양축농가가 겪고 있는 고통은 사회적 문제점으로 부각되고 있는 실정이었다.

2) 이 같은 우리 농촌의 문제점을 해결하기 위하여 국가가축방역대책위원회에서는 본 연구과제를 활용하여 1998년도부터 우리나라 모든 젖소에 이 질병의 예방접종을 위한 예산을 확보하여 추진하는 등 정부가 적극적인 정책을 수립하는 계기를 부여하는 연구결과를 가져왔다.

3) 우리나라 수의학 분야에서 문제시되었던 인수공통전염병 중 하나를 외국의 기술과 지식을 신속하게 도입하여 국민의 보건과 국가 경제에 조금이나마 유익한 학술활동을 하였으며, 우리나라 수의학이 한발 앞서갈 수 있는 기틀을 마련하였다고 자체평가를 하는 바이다.

4) 우리나라에서의 가축방역대책에 대한 양축농가의 신뢰성을 높일 수 있는 정확하면서도 다양화된 진단방법개발의 활용과 예방약의 생산, 보급은 양축농가의 소득증대 뿐만 아니라, 우리나라 수의학 분야의 발전을 나타낼 수 있는 기회를 만들 수 있었다.

3. Brucellosis에 대한 국외의 연구동향 파악

가. 미국, 호주나 뉴질랜드 등과 같은 Brucellosis 유행지역에서는 거의 모든 가축에 대하여 예방접종을 수행하였던 것으로 알려져있으며, 최근에 Hoffmann et al.(1990)이 *Brucella abortus* strain 1119-3을 배양하여 얻은 균주로부터 분리한 항원인 lipopolysaccharide를 이용하여 예방접종을 실시하여 항체가 잘 형성되며, 또한 이 물질은 세포성 면역형성에 관여한다고 보고하였다.

결국 우리나라에서도 Brucellosis 예방을 위하여 체액성 면역과 세포성 면역을 유발시킬 수 있는 vaccine을 생산하기 위해 균주에 대한 연구가 폭넓게 이루어져 우리나라에서도 Brucellosis의 방제를 위한 예방접종의 시책수립 필요성을 농림부에 보고(전북대 연구 81510-409, 1997. 3. 6) "건의" 한 바 있다.

나. Brucellosis는 소, 산양, 염소, 사슴 그리고 개 등에 널리 분포되어 있는 인수공통전염병으로서 사람에 있어서 이 질병은 피부염, 관절염, 무기력을 야기시킨다(Ariza et al 1989, Berger et al 1981). 이 질병은 동물과 동물 사이에 전파되며, 전 집단 군에서 신속히 그리고 적극적으로 검진되어야 하는 질병으로써 중요시 되고 있다(Yinnon et al. 1993, Zimmerman et al. 1990). 외국에서도 역시 이 질병의 진단은 주로 세균학적 그리고 면역학적인 방법으로 이루어지고 있다(Mayfield et al. 1988). 미생물학적인 진단방법은 병원체를 직접 감염조직으로 분리, 배양하여 검진하는 방법이기 때문에 용이하지 않으며, 숙주의 어떤 장기를 사용하여야 하기 때문에 숙주가 소모되어야 하는 경제적 손실의 단점 때문에 혈청을 이용한 면역학적 연구가 활발히 이루어지고 있지만 이에는 의양성의 예가 나타나고 있어 보다 정확한 진단결과를 얻고자 최근에는 점차적으로 분자생물학적 진단방법에 대한 관심이 지대하여 지고 있다(Pollice

et al. 1985, Neumann et al. 1986, Hopper et al, 1989). 또한 *Brucella* spp 사이에 항원의 특이성때문에 사람에 있어서의 진단을 위한 항원의 종류에 따라서 응집반응의 결과가 각기 다르게 나타남으로써 비록 어떤 종의 *Brucella* 균주에 감염되어 있을 경우에도 이를 진단하지 못한 체 지나는 경우가 있다 (Sarvamangala et al. 1987). 특히 유산한 송아지의 조직으로부터 *B. abortus*를 직접 찾아내는데 세균수가 약 10^5이 필요하다는 보고가 있다(Hopper et al. 1989). Mullis et al.(1987)은 Hybridization Dot 방법보다 더 정확한 Polymernase Chain Reaction(PCR) 방법을 보고하였다. 또한 *Brucella* 항원은 응집반응에서 가끔씩 *Yershinia enterocolitica*와 교차반응을 나타내므로 이를 피하기 위하여 *Brucella*의 특이 항원에 대한 단크론항체를 생산하여 신속하면서도 특이성이 높으며, 저렴한 기술로서 가치가 있는 Coaggulation test방법을 소개하고 있다(Vizcaino & Fernandez-Lago, 1992). 그리고 숙주조직 내의 DNA를 증폭시키기 위하여 최근 PCR에서 *Brucella melitensis*와 *Brucella abortus*를 동시에 검출할 수 있는 Primer를 제작하여 Brucellosis를 검진하는데 사용하고 있어 (Baily et al. 1992), 연자 등은 이 PCR Primer set를 이용하여 종모우의 정액을 대상으로 *Brucella* DNA의 증폭을 위한 PCR을 수행하였던 바, 875bp에서 DNA의 증폭을 확인할 수 있었으며, 이 같은 연구결과는 우리나라에서 이 질병이 보다 광범위하게 연구되어야 한다는 결과를 얻었으며, 타 가축에 대해서도 이런 측면의 연구활동을 수행하여야 할 것이다.

다. 1996년부터의 미국 예방정책의 변화와 국내의 정책변화: 1996년 1월 1일부터 brucellosis가 유행하고 있는 미국의 농림성은 brucellosis 예방접종을 소에게 실시하도록 법적으로 허락하고 있는 실정이다. 물론 사람이나 동물에 안전하면서도 가축에서의 예방접종에 따른 부작용이 전혀 없는 안전한 예방약을 생산하여 미국 거의 전역에 활용하고 있다. 이렇게 새롭게 생산된 균주는 *Brucella abortus* RB51으로서 우리나라에서 brucellosis 발생농장에 적응시험과

전북대학교에서 국내 분리균주를 활용한 도전시험을 함으로서 그 예방효과가 인정되어 국가방역정책에 활용할 수 있도록 행정적 조치를 취하므로서 우리나라 젖소를 사육하고 있는 양축농가의 경제적 손실을 최소화할 수 있는 기틀을 마련하여 그 성적과 시책수립을 위한 결과보고서를 농림부에 제출하였다(전북대 연구 81510-2148, 1997. 10.30).

4. Brucellosis에 대한 국내 시험연구의 환경변화

가. 1997년까지 국내 연구환경의 변화(1997년 12월 현재)

우리나라 전역에 걸쳐서 젖소에 대한 정기검진을 매년 실시하여 양성 우를 색출 및 살처분시키므로써 우리나라 Brucellosis 감염지역에서의 청정화를 위하여 막대한 국가예산(수억원/매년)을 투자하고 있지만, brucellosis박멸을 위한 정책적 변화는 없었으며, 이 질병의 예방과 진단을 위한 국가적인 변화가 있었던 것은 본 연구과제가 지난 3년간 강력히 정부에 이 질병의 중요성을 강조한 것이 일익을 담당하였을 것이다.

1) **진단방법의 보강정책 수립**: 이 질병의 공인진단방법인 Milk Ring Test(MRT)와 Tube Agglutination Test(TAT) 방법을 보강한 보다 완전한 진단을 위하여 CFT와 Latex Agglution Test방법을 확립하므로서 앞으로 brucellosis의 진단수행에 있어서 하나의 오진마저도 막을 수 있는 기회가 있다고 보여지며, brucellosis에 의한 양축농가의 피해를 최소화할 수 있는 계기가 되었다.

2) **예방접종시험사업의 실시 활로**: Brucellosis 유행 목장에서 소에 대한 면역효과판정시험을 위한 연구 목적의 **예방 접종 사업을 농림부장관의 허가(농림부 고시 제** 1996-100**호**, 1996. 12)를 받아 실시할 수 있도록 하는 전염병 예방시행규칙에서의 결핵과 부루셀라병 방역실시요령이 세워짐으로써 brucellosis에 의한 최소한의 경제적 손실을 최소화하기 위한 예방접종 시험연구의 활로를 여는 정책적 변화를 가져왔다(국가 가축 방역 대책 심의 위원회 결정).

5. Brucellosis 국가 방역정책의 수립경위

정부는 지속적으로 발병되고 있는 Brucellosis의 박멸정책을 계속 추진하여 나아가며, 일부 지역에서 집단 발병하고 있는 목장에서는 경제적 손실을 최소화하기 위하여 예방대책 수립을 위한 연구목적의 일환으로 예방약을 연구용으로 생산하여 접종할 수 있도록 국가가축방역대책위원회에서 결정하게 되었는바, 우리나라에서도 미국에서 1996년 1월부터 예방약으로 사용하고 있는 *Brucella abortus* RB51주를 이용한 예방접종약의 국내 생산을 위한 연구를 수행하여야 할 것으로 판단되어 1996년 2월 미국에서 연구용 균주를 농림부장관의 수입승인[농림부 민)위생 51507-152, 1997. 04.09]을 받아서 국내에 분포하고 있는 *Brucella abortus* biotype I에 대한 적응능력시험을 수행하기 위하여 경기도의 brucellosis 만연 목장을 대상으로한 예방접종 승인을 요청하여 농림부로부터 그 실험을 승인받아(농림부 위생 51583-311, 1997. 4. 1) 야외시험을 수행하게 되었으며, 임상적 및 면역학적으로 예방효과를 인정할 수 있었기에, 1998년부터 가능한 예방접종 program을 세워 국가방역정책을 세울 수 있도록 그 동안의 연구시험성적을 소의 Brucellosis 예방접종시험결과보고서(전북대 연구 81510-2148, 1997. 10.30 로서 제출하였으며, 이 같은 시험 성적을 바탕으로한 국가가축방역대책위원회에서 1998년부터 젖소를 대상으로 예방접종을 수행하도록 정책을 수립하였다. 이 같은 연구 결과의 산업화를 위하여 실시기업(한국미생물연구소)을 선정하여 보고하므로서(농림수산기술개발사업 성과활용에 따른 기술실시 계약체결보고, 전북대 연구 81510-16. 1998. 1. 7) 실시기업으로 하여금 예방약을 생산할 수 있도록 하였으며, 앞으로 예방약의 생산을 위한 산업용 균주를 확보하여 예방약이 생산된다면 양축농가가 brucellosis에 의한 살처분에 대한 공포와 경제적 피해를 벗어날 수 있도록 연구 결과를 토출하였다.

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

1. 연구 개발의 내용

가. 외국의 brucellosis 연구와의 관계 유지:

1) 제 1차년도에는 University of Illinois 수의과대학의 협조로 *Brucella* spp의 확보방안을 마련하였으며, 우리나라에서 양성으로 판정된 혈청에 대한 확인진단을 수행하였다.

2) 제 2차년도에는 미국 콜로라도주립대학교의 협조를 받아서 *Brucella abortus* RB51의 균주를 확보하여, 국내 실험에서 계대 배양한 후 국내 분포균주에 대한 적응능력시험을 거쳐서 야외 접종시험을 수행하였다.

3) 제 3차년도에는 미국의 Brucellosis의 박멸 및 예방접종 program의 현황을 좀더 구체적으로 파악하여 우리나라에서의 활용가능성 유무를 구체적으로 파악하여, 이들의 정책을 국내에서도 도입, 활용할 수 있도록 농수산부에 보고하였다.

4) 국가의 brucellosis에 대한 장기예방대책을 세워 나아갈 경우 *Brucella abortus* RB 51과 같은 예방접종균주의 활용이 필요한 실정인 바, 국내 발생농장에 대한 예방접종시험을 농수산부장관의 승인을 받아 예방효능시험을 수행하였다.

5) 이들 균주에 대한 많은 연구를 수행하고 있는 외국의 연구소와의 밀접한 교류는 우리 연구진에게 유용할 것으로 판단되어 지속적인 교류 활동을 유치하고 있음.

나. 역학 조사:

1) 우리나라 제주도에서 Brucellosis 양성으로 판정되어 살처분된 젖소의 상유방 결절로부터 분리한 원인균은 *B. abortus* biotype I으로 파악되었으나, 아직 다른 가축에서의 원인균의 분포 양상에 관한 조사 연구는 없어 앞으로 계속되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

2) 특히, 최근 brucellosis의 집단 발병이 크게 문제시되고 있는 바, 집단 발병 목장을 중심으로한 주변의 환경조건, 인접 목장의 감염여부, 인근 목장의 한우에 대한 감염율 조사, 그리고 예방을 위한 vaccine 접종 효과판정을 위한 혈청학적 연구를 수행하였다.

3) 예방접종에 따른 우유의 진단방법과 혈청학적 진단방법을 개선하기 위한 연구가 각종 진단방법의 기술확립을 통하여 이루어졌으며, 앞으로 *B. abortus* RB51의 항체 검출기술을 더욱 더 연구 개발하여야 할 것이다.

다. Brucellosis 진단 Kit 생산을 위한 연구:

2연차까지 본 연구진은 brucellosis 진단기술을 확립하여 각종 진단방법과 상호 비교시험하였으며 3차년도에는 정확하면서도 손쉽게 진단을 할 수 있는 진단용 KIT를 생산하기 위한 연구를 생산업체를 선정하여 구체적으로 수행하였다 (특허 제 97-63214호).

1) Complement Fixation Test **기술**:

CFT 시험방법은 타 진단방법보다도 민감도 및 특이도가 높아서 양성우의 색출에 활용될 수 있지만 그 술식이 대단히 복잡한 것이 단점으로 인정되었다. 그래서 확립한 진단방법을 적절히 운용하기 위해서는 전문적으로 진단업무를 수행할 수 있는 기관에서 전문인이 수행하여야 할 것으로 판단되었으며, 진단 kit와 같은 간편한 방법의 실용화를 수행할 수 없겠지만, 그 기술은 완전히 확립되어 있다.

2) Latex Agglutination Test Kit **생산**:

혈청학적 진단방법으로 Brucellosis에 기인한 항체형성 정도를 검출할 수 있는 방법으로 Brucellosis의 보조적 진단방법으로서 TAT보다 손쉽고 정확히 진단할 수 있는 방법이라고 할 수 있다. Tube Agglutination Test 수행을 하여 보면 의양성 판정이 되는 예, 즉 진단을 내리는데 있어서 애매한 예의 혈청이 있어 신속 정확한 진단을 내리는데 있어서 어려움이 있지만 LAT방법을 활용하면 훨씬 정확한 결과 판정을 내릴 수 있다(특허출원 제97-63214호).

3) ELISA Kit **기술**:

ELISA 방법을 이용한 연구는 많은 학자들에 의하여 이루어진 바 있으며, 본 예에서도 이 진단 방법은 많은 수의 가검물을 대상으로한 검색업무 수행에 유효적절한 방법으로 판단되었다. 이 진단방법을 임상적으로 활용하기 위해서는 먼저 ELISA Reader를 구입하여야 하는 경제적 부담을 갖고 있지만, 이미 지방의 가축위생시험소나 대학에는 확보되어 있는 실정인 바, 정확한 항체반응을 유발시킬 수 있는 진단용 Kit의 생산이 필요하다.

라. 예방용 vaccine 개발 및 생산

Brucellosis의 집단발생지역의 확대를 3년간의 연구에서 보아온 바와 같이 그 발병 두수가 정부의 기대와는 다르게 매년 약 500 900여두 수준을 유지하고 있어 점차적으로 우리나라의 몇 개 지역은 상재지역으로서 명확하게 부각되고 있다. 즉, 충남의 아산지역, 충북 제천지역, 전북의 임실지역, 경기 일부 지역 그리고 제주 지역 등의 젖소와 한우에 대한 Brucellosis예방 사업의 필요성은 양축농가의 경제적 손실규모를 최소화하기 위하여서는 절대적으로 필요한 현장의 애로사항이었다.

1) **실험실에서의 면역학적 연구**

1차년도의 brucellosis에 대한 전반적인 역학적 특성을 파악한 후 2차년도에는 Brucellosis의 예방접종균주로 세계적으로 많은 연구가 이루어지고 있는 *Brucella abortus* RB 51균주를 수입하여 실험실적으로 각종 항원항체 면역 반응 그리고 면역관련세포의 활성도 측정과 같은 실험실적 연구를 수행하였다. 즉, *Brucella abortus* RB 51 항원의 생산을 위한 배양, 항원을 회수하여 한우에게 면역시키면서 항체를 매주 측정하였다. 한편 *Brucella abortus* RB 51의 생균을 한우에 접종한 후 추가 접종을 2차에 걸쳐서 접종하여 항체를 생산하며, 이 생산한 항체를 각종 진단방법에 있어서의 항원과의 반응정도를 관찰함으로서 유우에서의 Milk Ring Test 검사에서의 양성반응 유무와 자연감염되는 *B. abortus*에 대한 저항능력을 면역학적으로 확인하였다.

2) **양성목장의 젖소에 대한 방제효과 시험연구**

3차년도에는 백신을 시험생산하기 위하여 관련법규에 따라서 연구활동을 펼쳐왔다. 즉, 수입된 균주를 fermenter를 이용하여, *B. abortus* RB 51을 생산한 후, 냉동건조 vaccine을 생산하여, 예방약의 생균접종량을 결정, 접종한 후, 국내분리균주를 접종하여 방어효과를 관찰하여 보았다. 이 예방약의 조기 산업

화를 꾀하기 위하여 생산한 Vaccine의 병원성, 안전성, 완전성, 면역성 등을 mouse, rat 그리고 한우 등을 이용하여 면역적으로 관찰 측정하였다.

3) **야외 예방접종시험**: 1995년도와 1996년도에 걸쳐서 Brucellosis 발생 pattern이 단일 목장에서 집단적으로 발병되고 있는 현실을 고려하건대, 집단 발생지역의 대규모 젖소와 한우사육목장의 예방접종은 정부가 신속하게 대응하여야 할 것으로 생각되어, 2차년도의 실험실적면역관련 연구에 이어서 3차년도에는 예방약을 시작품으로 생산하여 예방접종시험을 몇 개의 목장을 대상으로 수행하여 보았다.

▶ 이번 연구에 사용한 균주는 미국의 USDA로부터 연구목적으로 분양받아서 활용하고 있으나, 이의 방제효과가 우리나라에 분포하고 있는 *Brucella abortus* biotype I과 V형에 대하여 활용할 수 있는 예방균주임이 확인되었는 바, 그 생산기술 그리고 면역학적 면역반응의 특성을 입증하여 금번 실시기업으로 선정된 한국미생물연구소로 하여금 상용화할 수 있는 균주를 확보하여 국제상법상 분쟁의 소지가 없는 상황에서 예방약을 생산토록 하여 양축농가가 더 이상의 경제적 피해를 입지 않토록 조치를 해주어야 할 것이다.

2. 연구개발의 범위

가. 역학적 조사

우리나라에서의 brucellosis 유행지역을 파악하며, 집단발병지역에서의 유병율, 양성전환율, 그리고 방어율 등을 파악하므로서 vaccine 개발의 필요성을 파악하기 위한 연구범위내에서 활동하였다. 특히 Brucellosis 발생목장에서 미

감염 소나 동거우에 대한 이동제한의 필요성을 파악하였으며, 이들 동거우는 거의 100% 양성으로 전환된다는 사실을 확인하였으며, 결국에는 현재의 국가방역 시책인 검색, 살처분 정책을 예방접종정책으로의 전환을 조속히 세워 나아갈 수 있도록 야외 및 실험실적 연구결과를 예방효과 판정을 위한 자료로서 활용할 수 있도록 주로 면역학적 시험성적을 농림부에 1997년 10월 30일 보고하였다.

나. 진단약 생산을 위한 연구

공인진단방법으로 사용되고 있는 MRT와 TAT방법의 민감성, 특이성이 CFT나 LAT와 비교하여 약 70%수준인 바, 이를 보안할 수 있는 민감도가 높은 ELISA방법과 특이도 높은 것으로 알려진 Latex agglutination test방법을 새로이 공인진단방법으로 활용할 수 있도록 보고하였다.

다. 예방약 생산을 위한 연구

1) 예방균주의 확보: *Brucella abortus* RB51균주를 미국으로부터 연구목적으로 구입하여(농림부 위생 51583-311, 1997. 4. 1) 본 연구에 활용하였다.

2) *Brucella abortus* RB51의 항원성을 *Brucella abortus*나 *Brucella melitensis*, *B. suis*, *B. canis* 등의 균주와 차이를 구명하기 위하여 SDS-PAGE 방법으로 분석하며, 항체형성에 관한 연구를 실험동물을 이용하여 수행하였다.

3) 연구목적으로 생산한 예방약의 산업화를 위한 생산에 필요한 각종 정보를 얻고자 예방약에 대한 방어능력, 안전성, 보존성 등을 파악하였으며, 야외에 분포하고 있는 균형에 대한 방어능력을 현실적으로 입증하기 위하여 야외목장에서 임상학적으로 연구를 수행하였다.

4) 야외 및 일반 수의사들이 안심하고 활용할 수 있는 냉동건조 백신을 제조하기 위하여 국내 가축약품생산업체와의 기술이전을 위한 행정적 조치를 수행하며, 제품허가를 받아 활용할 수 있는 법적조치를 수행하였다.

5) 3차년도 연구사업에서 brucellosis를 예방할 수 있는 예방약의 흡족한 방어능력이 인정되는 결과를 얻었으며, 이 연구사업이 완결과 더불어, 정부의 Brucellosis에 대한 정책을 예방정책으로 변환(국가방역대책위원회 결정)으로 변경함에 따른 양축농가에서 실제적으로 활용할 수 있는 vaccine을 상품화할 수 있는 법적조치 과정(동물약품제조허가신청)을 농림부에 취하고 있다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발의 결과

1) 진단용 LAT KIT 생산

지금까지 공인 방법으로 활용되어온 MRT와 TAT방법을 보안하기 위하여 민감도와 감수성이 높은 ELISA와 Latex beads를 이용한 Latex Agglutination test(LAT)방법의 활용 필요성을 확인하였다. 이는 국내 가축약품생산업체로부터의 진단 Kit를 개발할 수 있도록 할 것이다(특허 출원 제 97-63214호).

2) 예방약 생산(*Brucella abortus* RB51 vaccine) 산업화 추진

정부가 그 동안 펼쳐 온 Brucellosis의 박멸을 위한 검색과 살처분정책만으로 조속한 기간내에 이 질병에 의한 피해를 줄일 수 없다면 집단발병지역에서만이라도 연구목적 또는 잠정적 방역대책으로서 이 예방약을 활용하여야 하는 하는 당면과제로서 강조한 바 있다.

본 연구과제의 3차년도 수행에서 젖소에서의 예방효과를 야외시험을 통하여 면역학적 측면에서 수행했던 바, 우리나라에 분포하고 있는 균주형에 대하여 강한 면역효과가 인정되어, 예방약으로서 개발하여도 된다는 연구 결과보고서(전북대 연구 81510-2148, 1997. 10. 30)를 제출하였는 바, *Brucella abortus* RB 51에 대한 예방약생산을 위한 항체의 형성정도를 Western blot, DOT blot, T & B Cell의 면역활성도 등을 연구하였던 바, 우리나라에서의 이 균주를 이용한 방제효과를 기대하여도 될 것으로 판단되어 예방약생산기술을 국내 가축약품생산업체에게 시험성적을 포함한 그 기술을 한국미생물연구소에 전수시키어, 산업적 생산을 위한 기반을 조성하였다.(실시기업 선정 전북대 연구 81510-16, 1998. 1. 7) 물론, 이번에 사용한 균주는 미국법 내에서 재산권을 보호받고 있

는 만큼, 적절한 합법적 절차를 거쳐서 우리나라에서도 산업화를 할 수 있도록 연구 사후관리를 합법적으로 수행해 줄 것을 건의합니다.

3) **인공수정용 숫소에 대한 정기검사실시 건의**

우리나라에서의 젖소나 한우에 있어서 번식을 위한 인공수정액을 생산함에 있어서 숫소의 brucellosis 감염유무를 검색하므로서 정액을 통한 감염경로를 차단하여야 한다는 새로운 사실을 확인하였으며, 정액채취용 숫소에 대한 brucellosis검색의 필요성을 밝히는 바, 인공수정용 숫소에 대한 정기검사를 실시하여야 할 필요성이 있음을 강조하는 바이다.

4) **한우에 대한 예방접종정책 수립 필요성 강조**

젖소에 대한 정기검사를 수행하여 감염우를 색출하여 도태시키는 정책을 수행하여 왔으나, 한우에 대한 검색은 착유를 하지 않으므로 검색이나 진단할 기회가 전혀 없는 바, 감염여부를 검색할 수 있는 기회를 갖지 못하고 있어 지금까지 감염실태를 전혀 파악할 수 없는 실정이다. 그러나 한우에서도 Brecellosis가 발생되고 있어 국민 보건에 위협을 줄 수 있을 것으로 예측되는 바, 그러한 까닭으로 앞으로 한우에 대한 감염율을 소규모만이라도 표본검사를 실시하여 그 실태를 파악, 한우에 대해서도 예방접종하여야 하는 program을 수립하여야 할 것으로 판단된다.

S u m m a r y

Brucellosis is a major zoonosis and is also known of its considerable economic impact slaughtering several hundreds of dairy cattle every year in the Republic of Korea. Bovine brucellosis is a worldwide infectious disease of animals which is usually caused by *Brucella abortus*, less frequently by *B. melitensis* and rarely by *B. suis*, and manifested by abortion and infertility, with excretion of the organisms in urine discharges and in milk, and also highly pathogenic for man causing undulant fever/malta fever. In Korea, bovine brucellosis is the most important disease among zoonosis and Korean government has been adapted a prophylactic strategy against the disease which means **"test and slaughter policy"** for last 40 years.

Recently the number of slaughtered dairy cattle due to brucellosis are increased steadily from 180 heads of slaughtered cattle in 1989 to more than nine hundreds of slaughtered dairy cattle in 1997. The test and slaughter strategy for only dairy cattle's brucellosis may be difficult to eradicate out bovine brucellosis from Korean peninsula, Korean indigenous cattle which is the most part of all cattle(2,500,000 heads) in Korea, have never been tested so far. so that , the prevalence rate of brucellosis could not be figured out yet.

In order to reduce the a great of economic loss of cattle farmers due to bovine brucellosis, epidemiological researches which was carried out in sporademic infection location in Keongki, Chungnam, Chungbuk and Chonbuk province. Milk Ring Test(MRT) and Tube Agglutination Test(TAT) were focused to compare the accuracy, sensitivity and specificity with ELISA,

Complement Fixations Test(CFT) and Latex Agglutination Test(LAT) for brucellosis. Various *Brucella* spp specific antigen and *Yersinia enterocolitica* were prepared to analyze the characterictics by means of Western blot, CFT, ELISA and LAT. Sera of brucellosis infected bovine were analyzed by immunoblotting using sonicated cell extracts of *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* and *B. ovis*. Isolated *Brucella abortus* in Korea has very broad spectrum antigens and antibody reaction from 24KD to 85KD using positive serum of brucellosis. The sera were shown a cross reaction with *B. melitensis* antigen as well as *B. abortus* by means of western blot. Immunoblot analysis indicated that the antibody responses in infected animals was largely different from each other.

The ELISA has a 93.8% specificity and 81.5 sensitivity compared with TAT method using 130 sera which were collected from 1995 to 1997. CFT ($\geq$1:20) for the positive sera shown a specificity and sensitivity as 100% and 73.8% with TAT and negative sera and dubious sera were diagnosed as negative with CFT. In LAT, more than 1:200 dilution of brucellosis positive sera could agglutinate with latex beads sensitized with *B. abortus* whole cells. However, even negative sera do not agglutinate with 1:2 dilution of negative sera. The LAT have also a 100% of specificity and 73.8% of sensitivity compared with the TAT methods as well as CFT. LAT which is very convience for diagnosis of brucellosis, should be taken by Government as recommanding diagnostic Kit.

We proposed to develop and optimize the rational and techniques the CFT as well as the LAT which are able to use in the laboratory and field conditions in this country. we anticipate that these approaches will facilitate the rapid detection of infected individual animals and herds.

The CFT is a highly sensitive and specific method, however CFT not only complicate the procedures is difficult and also time consuming one. In contrast, LAT is a simple and sensitive method, and partially used for the diagnosis of human brucellosis in some countries. In this study, we adapted LAT for the diagnosis of bovine brucellosis in Korea by optimizing the buffers as follows. the optimal antigen coating buffer was 0.1M Tris-HCl pH 8.0, blocking buffer 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA(Bovine Serum Albumin) and serum dilution buffer 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20. Incubation time for the binding of the antigen to latex beads was 60min at 37℃. one volume of 2% latex beads diluted with antigen coating buffer(0.1M Tris-HCl pH 8.0) was mixed with 24 volume of 2% antigen(PBS pH 7.2) and incubated for 60min at 37℃. The antigen-coated latex beads were washed two times with blocking buffer (0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA) and resuspended in the blocking buffer at the final concentration of 0.08% (v/v). The reacting results were observed after 60min at room temperature. By comparison with specificity and sensitivity between MRT/TAT and LAT using 130 bovine sera, the LAT results showed 100% specificity comparing to 75.3% sensitivity of MRT/TAT. Serum titers of 1:2 and less were considered negative and reciprocal antibody titers of above 1:4 enough considered positive.

In spite of considerable economic impact slaughtering several hundreds of dairy cattle every year in the Republic of Korea, Any prophylatic strategy for diagnosing brucellosis, so far, have never been included Korean indigenous cattle which is the most part(75%) of all the cattle in Korea, it may be one of difficult reasons to eradicate out dairy cattle brucellosis. In forward to expect and tp establish new National Eradication Program of vaccination of

Korean indigenous cattle as well as dairy cattle, The hyperimmunized serum of Korean indigenous cattle by *Brucella abortus* 1119-3, *B. melitensis* biotype 2, and *Yersinia enterocolitica* O:9 were prepared in order to evaluate the accuracy of ordinary diagnosis methods. Inactivated whole cell were immunized to Korean indigenous cattle with Freund's complete adjuvant and incomplete adjuvant. and then evaluated their immunological reactions against each antigens by means of western blot, TAT, CFT, LAT, and the ELISA. *Brucella abortus* 1119-3 whole cell antigen positively reacted with hyperimmunized serum against both *B. abortus* 1119-3 and *B. melitensis* biotype 2 in all serodiagnosis test. Immunological responses in Korean indigenous cattle for *Brucella* spp was shown the possibility for immunologically protection of the infection by *Brucella* spp.

More worse, any bulls of dairy cattle have never been tested to know the prevalence rate of brucellosis. Polymerase Chain Reaction could find out infected bull from semen. Amplified DNA could be obsereved at 875bp. which orginated from DNA of *Brucella abortus* in Jejudo. To eradiction brucellosis, Donors for artificial insemination should be tested by serogically method.

In order to establish for National Eradication Program of brucellosis in Korea, The imported *Brucella abortus* RB51(5 X 10⁹CFU) was vaccinated subcutaneously to 250 heads of dairy cattle which reared in sporadic infection farms by brucellosis in Kyeongkido, the vaccine strain is a rough mutant strain derived from strain 2308 by passing on rifampin or penicillin. To evaluate whether *Brucella abortus* RB51 strain is effective against agent caused brucellosis in Korea or not. Korean field isolated strain are identified as B. abortus biotype 1 and V. The protection was evaluated by observing

the several diagnose method of seroconversion cattle by means TAT, PAT, LAT and several immunological aspects responses. The vaccinated cattle which could be protected by natural infection since eight months later, did not detect any seroconversion by ordinary diagnostic methods. The cattle were verified to be very strong cellular immunity from two month later by cytoflow meter. Immunological responses induced by *B. abortus* RB51 in dairy cattle are also enough to protect infection challenged by Korean isolated strain(4 X 10^{10}/CFU; subcutaneously) in campus experimental farm.

Our research are enough to be able to recommend and also enforce to establishment the new National Prophylactic Strategy for Brucellosis, which means "Test and Slaughter Strategy" have to shift to "Vaccination Strategy" of all dairy cattle(approximately 400,000 heads) using *Brucella abortus* RB51 by Korean government's decision as soon as possible. The Vaccine strain should be approved to use in Korea by developer(Dr. G. Schurig in USA). It will be brought a lot of economic benefits to dairy farmer as well as contribution a better human public health status in Korea.

Contents

1. Chapter 1: Outline of this research projects

2. Chapter 2: Epidemiological studies for brucellosis in Korea
   (1) Characteristics of *Brucella spp* antigens by SDS-PAGE and Western blot
   (2) Comparison for serological diagnostic methods
   (3) Characteristic cellular immunity in brucellosis of cattle
   (4) Comparison *Brucella spp* antigen in Korean indigenous cattle

3. Chapter 3: Improvement of Diagnostic methods for brucellosis
   (1) Compliment Fixation Test for brucellosis
   (2) Latex Agglutination Test
   (3) Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)
   (4) Polymerase Chain Reaction(PCR) for sperm and lymphnode

4. Chapter 4: Immunoprophylactic strategies of vaccination for brucellosis of cattle in Korea
   (1) Propose experimental vaccination of *Brucella abortus* RB51 to korean government
   (2) Field vaccination of *Brucella abortus* RB51 to diary cattle
   (3) Challenge by Domestic isolated strain
   (4) Application and Recommending

5. Chapter 5: References

6. Chapter 6: Reporting on Newspapers

목 차

제 1 장: 소의 Brucellosis에 의한 양축 농가의 경제적 손실의 최소활르 위한 대책 연구
서 론 : ---------- 28
제 1 절: 연구 개발의 목적 ---------- 31
제 2 절: 연구 개발의 중요성 ---------- 34
제 3 절: Brucell에 대한 국내 연구 환경변화 ---------- 37
제 4 절: Brucellosis의 국가 방역 정책 수립 경위 ---------- 38
제 5 절: Brucellosis에 대한 외국의 연구 동향 파악 ---------- 40
제 6 절: 연구 개발 내용 및 범위 ---------- 43
제 7 절: 연구 개발의 범위 ---------- 48
제 8 절: 연구 과제 개발 추진 동기 및 사후 관리 ---------- 52

제 2 장: 우리나라의 Brucellosis에 대한 역학적 특성연구
제 1 절: 국내Brucella abortus의 분리 ---------- 56
제 2 절: Brucella spp의 항원과 항체의 특성 연구 ---------- 57
제 3 절: Brucellosis감염 젖소의 면역세포에 대한 연구 ---------- 74
제 4 절: 한우에 있어서 불활화 *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* 그리고 *Yersinia enterocloitica*에의한 면역반응 --------- 89

제 3 장: Brucellosis 진단 방법 비교 연구
서 론 ---------- 108
제 1 절: Compliment Fixation Test를 이용한 Brucellosis진단 ---- 110
제 2 절: Latex Aggluination Test진단 방법 개발 ---------- 120
제 3 절: ELISA법을 이용한 Brucellosis진단 ---------- 148
제 4 절: PCR에 의한 정액과 임파조직으로부터의 Brucella DNA검색 --- 155

제 4 장: 우리나라 Brucellosis방제를 위한 *Brucella abotus* RB51의 예방효과 시험
제 1 절: Brucellosis예방접종 계획안(대정부 건의안) ---------- 161
제 2 절: Brucellosis예방 접종 시험 결과 보고서 ---------- 169
제 3 절: 국내 분리 균주의 도전에 대한 예방효과 ---------- 177
제 4 절: 예방접종 시험의 활용 및 기대 효과 ---------- 197

제 5 장: 참고문헌 ---------- 199
제 6 장: 신문 보도자료----------2153

제 1 장 소의 Brucellosis에 의한 양축 농가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책 연구

제1절 연구개발의 목적

제2절 연구개발의 중요성

제3절 Brucellosis에 대한 국내 연구환경 변화

제4절 Brucellosis의 국가 방역 정책 수립 경위

제5절 Brucellosis에 대한 외국의 연구 동향 파악

제6절 연구개발 내용

제7절 연구개발의 범위

제8절 연구 과제 개발 추진 동기 및 사후 관리

제 1 장. 소의 Brucellosis에 의한 양축 농가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책 연구

서 론

최근 우리나라 젖소에 있어서 Brucellosis 발생은 증가 추세를 취하고 있으며, 더욱이 집단적으로 발병하므로서(가축 1996, 임윤규 등 1995a, 정 등 1989) 양축농가에 피해를 끼치고 있는 실정이다. 소, 돼지를 포함한 산양 및 면양 등에 있어 부루셀라병은 유산 및 불임증을 유발함으로서 (Beran 1994, Davis et al. 1990, Mayfield et al. 1988, Turson et al. 1992) 막대한 경제적 손실을 야기시키므로서 이로 인한 경제적 손실의 최소화와 근절을 위한 대책이 시급히 요청되는 대단히 중요한 인수공통전염병이다(손 등 1986, Ariza et al. 1989, Barger et al. 1981, Hossain et al. 1991, Tekko et al. 1993, Scully et al, 1986). 특히 사람이 감염되면 Malta fever 또는 파상열을 유발하므로 공중보건상 매우 주의를 요하는 중요 질병중의 하나이다. 국내에서의 브루셀라병은 주로 젖소를 중심으로 하여 이루어졌다. 우리나라에서의 부루셀라병은 1956년에 미국에서 도입한 젖소군에서 처음 발생보고가 있은 이래 지속적으로 발생하여 국내 축산업농가에 막대한 경제적 손실을 주게 되었으며(가위 1996), 1960년도에는 제주도의 도입 비육소군에서 집단발생되기도 하였다.

소의 Brucellosis는 현재 몇 몇 선진국에서만이 성공적으로 퇴치되어 있을 뿐이며(OIE 1992), 세계적으로 많은 나라에서는 여전히 그 피해가 심하여 국가적으로도 큰 경제적 피해를 받고 있다. 부루셀라병의 주된 감염원은 다양하여 자궁, 감염소의 분비물, 정액등이 있다.

부루셀라병의 예방과 관리를 위한 주요 3가지 방법이 현재 각국에서 활용되

고 있다. 즉, 백신접종, 양성우의 검색 및 격리 혹은 도살처분이 시행되고 있으며 이들 방법은 관리대상 동물, 환경 그리고 실험실적 조건 등에 따라 각각 다를 수 있다. Brucellosis의 진단방법은 여러 가지가 활용되어 왔으며(김 등 1982), 보다 효율적인 진단방법을 색출하는데 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 *B. abortus* strain 19으로 예방접종된 소는 야외에서 자연감염된 항혈청과의 mlik ring test에서 *B. abortus* 균주에 감염되었을 경우와 마찬가지로 항체가가 MRT와 TAT 등에서 양성으로 판정되고 있으므로서 진단상의 혼돈이 일어난다. 그렇지만 *B. abortus* RB 51(Schurig et al. 1991)은 이 같은 면역반응이 관찰되지 않는 이점이 있어 바람직한 예방백신 균주라 할 수 있다.

우리나라에서 집단적으로 발병하고 있는 예의 지역에서는 예방접종을 위해 장기적으로 정부차원의 대책수립이 필요할 것이다. 최근 집단발병하고 있는 Brucellosis를 면역학적으로 규명하기 위해 감염된 소의 면역관련세포의 활성 분포도를 관찰하고자 Davis (1987)의 면역임파구의 분류방법에 의존하여 세포의 분포를 조사하였던 바, T세포와 B세포의 분포양상이 전반적으로 양성화되어 있었다. 본 연구에서는 야외감염소와 비감염우간의 혈중 면역세포의 분석을 위하여 cytoflow meter를 이용하였으며, 각종 면역반응시 관여하는 세포군을 분석함으로써 *Brucella* spp 감염시 생체방어기전을 밝히는데 면역학적 기초연구를 수행하였으며, *Brucella* spp에 대한 항원성 물질을 분석하고자 균체를 SDS-PAGE하여 항원의 특색을 면역효소학적으로 분석하여 종별 특이 항원성 물질을 규명하고자 하였다. 앞으로 이들 항원을 이용한 단크론 항체생산에 활용하여 각종 진단방법의 표준 항혈청으로 사용하고자 하며, 이는 MRT와 TAT에서 양성으로 진단되어 살처분되는 젖소의 조직으로 부터 세균을 분리하였으며, 이들 혈청을 수거하여 다른 진단방법에 의한 재 조사를 수행하였다. 이들 항원을 이용하여 보체결합반응시험, ELISA 및 Latex Agglutination Test법으로 특이성과 감수성을 검사법별로 비교 분석하였던 바, 그 양성율이 일치하지 않고 있어 이의 정확한 진단을 내리는 것은 어려움이 있어 앞으로 있을 예방접종 사업이나,

진단목적의 집단검색시 활용할 수 있는 진단방법을 확립하고자 몇 가지 진단방법을 비교시험하였다.

결론적으로 이번 연구를 통하여 우리나라에서 brucellosis가 근절되지 않고 증가될 경우를 대비한 예방 program을 세우기 위한 기초적 연구로서 발생 농장의 역학적 특색, 진단방법에 따른 정확도 및 민감도, 각종 *Brucella* 항원, 항체의 면역반응특색, 그리고 예방약의 접종에 따른 면역관련세포의 활성도를 중심으로 기초적 그리고 임상적으로 연구하였기에 그 결과를 최종보고하는 바 이다.

제 1 절 연구개발의 목적

우리나라에서의 brucellosis의 발병은 1956년에 처음 발생하여 잠시 발생 보고가 없었으나, 최근 10년전부터 재발생하기 시작하였으며, 농림부의 전염병 발생 보고에 따르면 지속적으로 이루어지고 있을 뿐만 아니라 그 숫자도 급격히 증가되어 1995년도부터 1997년까지 무려 500 900여두가 매년 살처분되어 (Fig. 1) 매년 약 20억 정도의 직·간접적인 피해를 입고 있는 실정이다. 이같은 피해는 한우에서도 발병하여 살처분되는 예가 발생한 바 있어(Fig.2), 우리나라 한우비육사업에서는 문제가 될 것으로 예측된다. 물론 이 질병에 한번 침입된 목장은 결국 목장을 폐쇄하는 지경에 도달하는 아타까운 실정에 놓이게 되고 말았다.

우리나라에서의 Brucellosis는 인수공통전염병의 하나로서 이의 전파를 막기 위하여 매년 착유우를 대상으로 정기검사를 수행하여 왔으며, **감염된 소는 즉시 살처분하는 박멸 정책을 수행하여 왔다.** 그럼에도 불구하고 제주도를 중심으로 경기도, 충청도 그리고 전라북도 등의 지역에서 그 발병 두수가 줄어들기보다는 오히려 증가되어 양축농가의 경제적 손실이 지대한 실정이다.

이처럼 우리나라가 Brucellosis 만연 지역임에도 불구하고 이 질병의 박멸을 위한 지난 40여년간 연구활동이 미흡하였다고 생각되어 본 연구진은 우리 나라에 분포하고 있는 Brucellosis의 박멸과 예방을 위한 연구를 수행하기 위하여 먼저 brucellosis에 대한 역학적 연구를 통한 효율적인 진단방법의 개발과 면역학적으로 이 질병의 방제를 위한 연구활동을 수행하므로서 우리나라에 만연화되어 가고 있는 Brucellosis의 근절방안을 마련하여 양축농가의 경제적 손실을 최소화하고자 함은 물론 이의 인체 감염을 예방하고자 하는 것을 본 연구 목적으로하여 연구활동을 수행하였다.

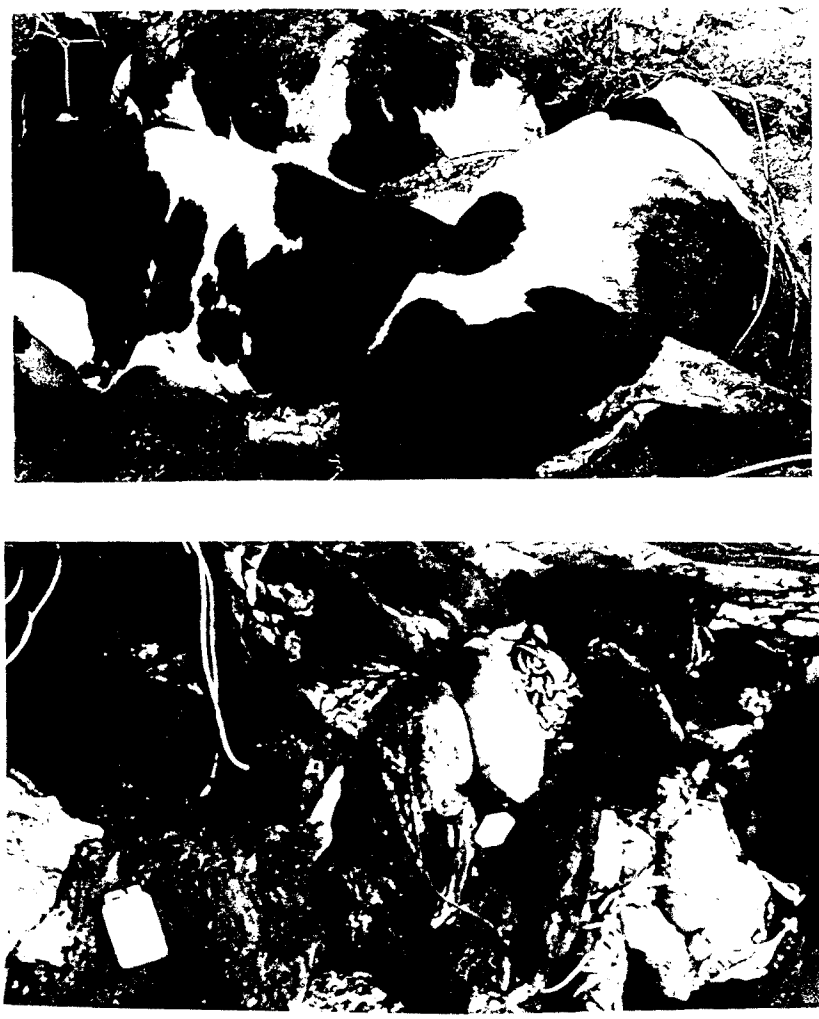

Fig. 1. Pictures of slaughted dairy cattle and Korean indigenous cattle(1997)

Fig. 2. Tombs for slaughted diary cattle and Korean indigenous cattle due to brucellosis in 1997

제2절 연구 개발의 중요성

1. 기술 개발의 필요성

가. 진단방법 개발 분야

Brucellosis에 대한 진단방법에 있어서의 공인진단방법인 Milk Ring Test(MRT)나 Tube Agglutination Test(TAT)에 대한 타 면역학적 진단방법과의 정확성과 민감성을 비교 관찰하였던 바, brucellosis 진단에 있어서 공인진단방법 보다 특이도와 민감도가 높은 CFT 와 LAT의 진단방법을 확립하여 실용가능성에 대하여 비교하므로서 가능하다면 그 동안 공인진단방법으로 활용해온 TAT, PAT, rose bangal test등과 더불어 공동활용 가능성에 대한 연구가 필요하였다.

나. 예방약의 면역효과 시험 분야

우리나라에서 만연하고 있는 Brucellosis에 감염된 젖소의 면역관련세포의 분포율을 각종 임파의 monoclone antibody를 이용, 규명하여 그 높은 감염율의 원인을 확인할 필요성이 있어, 이들 면역관련세포의 분포율을 관찰하므로서 이 질병의 예방을 위한 세포성 면역유발 가능성을 확인할 필요가 있었다. 즉, 강한 세포성 면역을 유발시킬 수 있는 예방약의 생산기술을 개발하기 위하여 항원성 물질의 개발 필요성이 강하게 요구되었다. 이에 미국에서 예방접종균주로 활용하고 있는 *Brucella abortus* RB51 균주를 이용한 예방약을 생산하여 한우나 젖소 그리고 사슴 등에 예방접종할 수 있는 적응시험이 있어야 할 것이다. 물론 예방약 생산을 위한 기술과 처리 기술 또한 충분히 축적되어야 할 것으로 판단되었다.

2. **경제·산업적 측면의 중요성**

가. 본 연구과제가 연구 수행 중이던 1995년도부터 1997년까지 500 900여두의 착유우가 매년 살처분되어, 국가는 이들 소를 무상으로 배상하였으며, 농가는 이에 다른 생산성 손실이 막대했음은 물론 결국에는 낙농을 포기하는 예가 있어 국가적 그리고 개인적으로도 막대한 경제적 손실이 아닐 수 없다.

나. Brucellosis에 의하여 양성으로 판정되어 살처분된 소의 혈청을 대상으로하여 미국의 공인진단기관에서 재 진단한 결과와 CFT 그리고 LAT와의 비교에서 TAT의 양성 일치율이 70%로 낮게 나타나고 있어 우리나라에서 확인진단 없이 TAT만으로 Brucellosis에 감염된 것으로 판정하여 살처분 한다면 경제적으로 큰 손실을 입게 될 것이다. 따라서 CFT의 진단성적과 거의 일치율이 높은 LAT가 공인진단방법으로 활용된다면 정확한 진단효과를 얻어 경제적 손실을 최소화 할 수 있을 것이다.

다. 만약 이 질병에 대한 예방대책이 세워지지 않은 체 계속적으로 착유우가 살처분된다면 우리나라 낙농업은 절망의 경우가 될 것이며, 더욱 나가서는 IMF와 같은 경제적 위기 속에서 생유의 수입마저 초래하게 될지도 모르는 처지가 되어 결국 국가경제에 막대한 영향을 끼칠 것이다.

라. 우리나라에서 사육되고 있는 약 50만여두의 젖소를 대상으로 한 예방접종용 vaccine 균주가 미국에서 개발한 새로운 변이종임을 고려하건데 우리나라에서 사육되고 있는 돼지, 개 그리고 사슴 등에 활용할 수 있는 예방용균주로서 활용할 수 있는 변이종 생산을 위한 기술을 파악하여 활용할 수 있는 연구의 필요성이 강조된다. 이에 먼저 제주지역에서 분리한 *Brucella abortus* biotype I 으로부터의 변이종 생산을 위한 기술을 터득하여 특허출원하였으며(특허 출원제 97-63213호), 이는 앞으로 여러 단계의 면역학적 시험연구가 이루어져 할 사후관리 대상의 연구과제로서 처리되어야 할 것이다.

3. **사회, 문화적 측면**

가. 젖소를 사육하고 있는 축산농가를 보호할 수 있어야 하겠다. 1997년에도 무려 900여두의 착유우가 brucellosis로 살처분되고 있는 처지는 사회 문제로서 대두 될 것은 분명하나 정부가 현실가로 보상하여 줌으로서 무마되고 있다고 사려된다.

나. 이 같은 우리 농촌의 문제점을 해결하기 위하여 국가가축방역대책위원회에서는 본 연구과제를 활용하여 1998년도부터 우리나라 모든 젖소에 이 질병에 대한 예방접종을 하려고 예산을 확보하여 추진하고 있는 실정이다.

다. 우리나라에서의 가축방역대책에 대한 양축농가의 신뢰성을 높일 수 있는 정확하면서도 다양화된 진단방법 개발의 활용과 예방약의 생산 보급은 양축농가의 소득증대 뿐만 아니라 우리나라 수의학 분야의 발전상을 나타낼 수 있는 기회를 만들 수 있을 것이다.

제 3 절 Brucellosis에 대한 국내 연구환경 변화

1. 1997년까지 국외 연구환경의 변화(1997년 12월 현재)

우리나라 전역에 걸쳐서 젖소에 대한 정기검진을 매년 실시하여 양성우를 색출 및 살처분시킴으로써 우리나라에서 Brucellosis 감염으로부터 청정화를 위해 막대한 국가 예산(수억원/매년)을 투자하여 brucellosis 박멸을 위한 정책을 펼쳐왔음에도 불구하고 계속적으로 이 질병이 만연되고 있었다. 이 질병의 예방과 진단을 위한 국가적인 변화가 있었던 것은 본 연구과제가 농림부로부터 채택되어 연구를 수행할 수 있는 기회를 얻게 되어 지난 3년간 강력히 정부에 이 질병의 중요성을 강조한 것이 국가방역정책의 변화와 중요성을 파악하는데 일익을 담당한 것으로 추측된다.

가. 진단방법의 보강정책수립: 이 질병의 공인 진단방법인 MRT와 TAT 진단방법을 보완하기 위해 CFT와 Latex Agglutination Test의 진단방법을 확립하므로서 앞으로 brucellosis의 진단수행에 있어서 하나의 오진마저도 막을 수 있다고 보여지며, brucellosis에 의한 양축농가의 피해를 최소화할 수 있는 하나의 계기가 되었다고 생각된다.

나. 예방접종시험사업 실시 활로: Brucellosis 유행목장내 소의 면역효과 판정시험을 위한 연구목적의 예방접종사업을 농림부장관의 허가(농림부 고시 제 1996-100호, 1996. 12)를 받아 brucellosis에 대한 예방접종을 실시할 수 있도록 하는 전염병 예방법 시행규칙에서의 결핵과 부루셀라병 방역실시요령이 세우지므로서 brucellosis에 의한 경제적 손실을 최소화하기 위한 예방접종 시험연구의 활로를 여는 정책적 변화를 가져왔다(국가가축방역대책심의위원회 결정).

제 4 절. Brucellosis의 국가 방역 정책 수립 경위

우리정부는 지난 40여년간 Fig. 2에서 보는 바와 같이 지속적으로 발병되고 있는 Brucellosis의 박멸정책을 계속 추진하여 나아가며, 일부지역에서 집단발병하고 있는 목장에서는 경제적 손실을 최소화하기 위하여 예방대책수립을 위한 연구목적의 일환으로 예방약을 연구용으로 생산하여 접종할 수 있도록 젖소의 brucellosis 가축방역정책의 변환을 위한 건의 (전북대 연구 51510-409, 1997. 3. 6)를 하였으며, 이 같은 정책의 변환을 위한 농림부의 노력으로 우리 나라에서 맨처음으로 예방접종시험을 할 수 있도록 결정하게 되었는 바, 우리 나라에서도 미국에서 1996년 1월부터 예방약으로 사용하고 있는 *Brucella abortus* RB51주를 이용한 예방접종약의 국내 사용을 위한 연구를 수행하고자, 1996년 2월 미국에서 균주를 농림부장관의 수입승인 (농림부 위생 51507-152, 1997. 04.09)을 받아 국내에 분포하고 있는 *Brucella abortus* biotype I에 대한 적응능력시험을 수행하고자, 경기도의 brucellosis 만연 목장을 대상으로한 예방접종 승인을 요청하여 농림부로부터 그 실험을 승인 받아(농림부 위생 51583-311, 1997. 4. 1) 야외 시험을 수행하게 되었으며, 임상적 예방효과를 인정할 수 있었기에, 가능한 예방접종 program을 세워 국가 방역 정책을 세울 수 있도록 소의 Brucellosis 예방접종시험결과 보고서(전북대 연구 81510-2148, 1997. 10.30)를 제출하였으며, 이 같은 시험성적을 바탕으로 한 국가가축방역대책위원회에서 1998년부터 젖소를 대상으로 예방접종을 수행하도록 정책을 수립하였다. 이 같은 연구결과의 산업화를 위하여 실시기업을 선정하여 보고하므로서(농림수산기술개발 사업 성과 활용에 따른 기술 실시 계약 체결 보고, 전북대 연구 81510-16. 1998. 1. 7) 실시기업으로 하여금 예방약을 생산할 수 있는 모든 연구를 완료하므로서 양축농가가 brucellosis에 의한 살처분에 대한 공포와 경제적 피해를 벗어날 수 있도록 하였다.

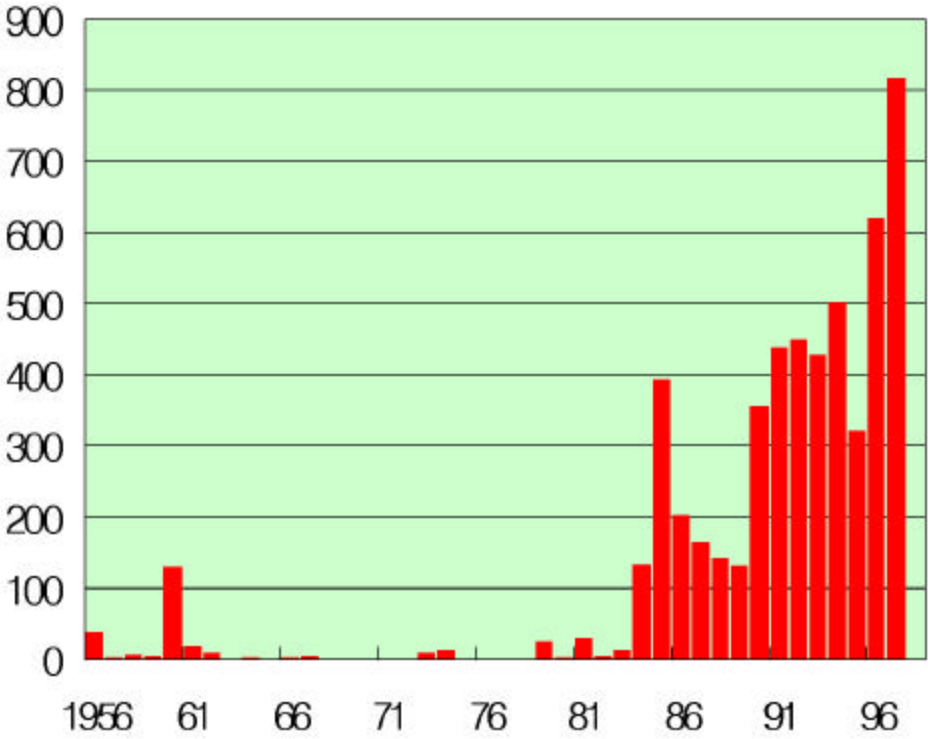

Fig. 2. Outbreaks of dairy cattle brucellosis from 1956 to 1997

제 5 절 Brucellosis에 대한 외국의 연구 동향 파악

1. 미국, 호주나 뉴질랜드 등과 같은 Brucellosis 유행지역에서는 거의 모든 가축에 대하여 예방접종을 수행하였던 것으로 알려져 있으며, 최근에 Hoffmann et al.(1990)이 *Erucella abortus* strain 1119-3을 배양하여 얻은 균주로부터 분리한 항원인 lipopolysaccharide를 이용하여 예방접종을 실시하였던 바 항체가 잘 형성되며, 또한 이 물질은 세포성 면역형성에 관여한다고 보고하였다.

결국 우리나라에서도 Brucellosis 예방을 위하여 체액성 면역과 세포성 면역을 유발시킬 수 있는 vaccine을 생산하기 위해 균주에 대한 연구가 폭넓게 이루어져 농림부에 보고한 바 있다. 즉, *Erucella abortus* RB51과의 비교실험에서 우리가 제조한 변이종도 강한 방어효과를 얻을 수 있었다. 앞으로 이 균주를 이용한 연구가 이루어져야할 것이다.

2. Brucellosis는 소, 산양, 염소, 사슴 등에 널리 분포되어 있는 인수공통전염병으로서 사람에 있어서 이 질병은 피부염, 관절염, 무기력을 야기시킨다(Arixa et al. 1989, Berger et al 1981). 이 질병은 동물과 동물 사이에 전파되어, 전 집단 군에서 신속히 그리고 적극적으로 검진되어야 하는 질병으로써 중요시되고 있다(Yinnon et al. 1993, Zimmerman et al. 1990). 외국에서도 역시 이 질병의 진단은 주로 세균학적 그리고 면역학적인 방법으로 이루어지고 있다(Mayfield et al. 1988). 미생물학적인 진단방법은 병원체를 직접 배양하여 검진하는 방법이기 때문에 용이하지 않으며, 혈액배지를 이용한 배양에는 숙주가 소모되는 경제적 단점 때문에 면역학적 연구가 활발히 이루어지고 있지만 이에는 의양성의 예가 나타나고 있어 보다 정확한 진단결과를 얻고자 최근에는 점차적으로 분자생물학적 진단방법에 대한 관심이 지대하여 지고 있다 (Pollice

et al. 1985, Neumann et al. 1986, Hopper et al. 1989). 또한 *Erucella* spp 사이에 항원의 특이성이 있어 사람에 있어서는 진단을 위해 사용되어지는 항원의 종류에 따라서 응집반응의 결과가 각기 다르게 나타남으로써 비록 어떤 종의 *Erucella* 균주에 감염되어 있을 경우에도 이를 진단하지 못한 체 지나는 경우가 있다(Sarvamangala et al. 1987). 특히 유산한 송아지의 조직으로부터 *E. abortus*를 직접 찾아내는데 세균수가 약 10^5이 필요하다는 보고가 있다(Hopper et al. 1989). Mullis et al.(1987)은 Hybridization Dot 방법보다 더 정확한 PCR 방법을 보고하였다. 또한 *Erucella* 항원은 응집반응에서 가끔씩 *Yershinia enterocolitica*와 교차반응을 나타내므로 이를 피하기 위하여 *Erucella*의 특이 항원에 대한 단크론항체를 생산하여 신속하면서도 특이성이 높으며, 그리고 저렴한 Coagulation test방법을 소개하고 있다(Vizcaino & Fernandez-Lago, 1992). 그리고 숙주조직 내의 DNA를 증폭시키기 위하여 최근 PCR에서는 *Erucella melitensis*와 *Erucella abortus* 동시에 검출할 수 있는 Primer를 제작하여 Brucellosis를 검진하는데 사용하고 있어(Baily et al., 1992), 연자 등은 이 PCR Primer set를 이용한 종모우의 정액 검사를 수행하였던 바, 875bp에서 DNA의 증폭을 확인할 수 있었으며, 이 같은 연구결과는 우리나라에서 이 질병의 연구수행에 있어서 활용하여야 할 것이다.

3. 1996년부터 미국 예방정책의 변화와 국내의 정책변화: 1996년 1월 1일부터 brucellosis가 유행하고 있는 미국의 농림성은 brucellosis 예방접종을 소에게 실시하도록 법적으로 허락하고 있는 실정이다. 물론 사람이나 동물에 안전하면서도 가축에서의 예방접종에 따른 부작용이 전혀 없는 안전한 예방약을 생산하여 미국 거의 전역에 활용하고 있다. 이렇게 새롭게 생산된 균주는 *Erucella abortus* RB51으로서 우리나라에서 brucellosis 발생농장에 적응시험과 전북대학교에서 국내 분리균주를 활용한 도전시험을 하므로서 그 예방효과가 인정되어 국가방역정책에 활용할 수 있도록 행정적 조치를 취하므로 우리나라 젖

소를 사육하고 있는 농가의 경제적 손실을 최소화할 수 있는 기틀을 마련하여 그 성적과 시책 수립을 위한 결과보고서를 농림부에 제출하였다(전북대 연구 81510-2148, 1997. 10.30).

제 6 절 연구개발 내용

1. **외국의** brucellosis **연구 기관들과의 관계 유지**:

가. 제 1차년도에는 University of Illinoise **수의과대학의 협조로** B*rucella* spp**의 확보방안을 마련하였으며, 우리나라에서** brucellosis**양성으로 판정된 혈청에 대한 확인진단을 수행하였다.**

나. 제 2차년도에는 미국 콜로라도주립대학교의 협조를 받아서 *Brucella abortus* RB51**의 균주를 확보하여, 국내 실험에서 계대 배양한 후 국내 분포 균주에 대한 적응능력시험을 거쳐서 야외 접종시험을 수행하였다.**

다. 제 3차년도에는 미국의 Brucellosis**의 박멸 및 예방접종** program**의 현황을 좀더 구체적으로 파악하여 우리나라에서의 활용 가능성 유무를 구체적으로 파악하여, 이들의 정책을 국내에서도 활용하도록 건의함.**

라. 국가의 brucellosis**에 대한 장기 예방대책을 세워 나아갈 경우** *Erucella abortus* RB 51**과 같은 예방접종가능 균주의 활용이 필요한 실정인 바, 국내 발생 농장에 대한 예방접종시험을 농수산부장관의 승인을 받아 예방 효능시험을 수행함.**

마. 이들 균주에 대한 많은 연구를 수행하고 있는 외국 연구소와의 밀접한 교류는 우리에게 유용할 것으로 판단되어 지속적인 교류 활동을 하였음.

2. **역학 조사**:

가. 우리나라 제주도에서 Brucellosis 양성으로 판정되어 살처분된 젖소의 상유방 결절로부터 분리한 원인균은 *B. abortus* biotype I과 V으로 파악되었으나 아직 다른 가축에서의 원인균의 분포 양상에 관한 조사 연구는 계속되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

나. 특히, 최근 brucellosis의 집단 발병이 크게 문제시되고 있는 바, 집단 발병 목장을 중심으로한 주변의 환경조건, 인접 목장의 감염여부, 인근 목장의 한우에 대한 감염율 조사, 그리고 예방을 위한 vaccine 접종효과 판정을 위한 혈청학적 연구를 수행하였다.

다. 예방접종에 따른 유우의 진단방법과 혈청학적 진단방법을 개선하기 위한 연구가 각종 진단방법의 확립을 통하여 이루어졌으며, 앞으로 *B. abortus* RB51의 항체검출기술을 더욱 더 연구 개발하여야 할 것이다.

3. Brucellosis **진단** Kit **생산을 위한 연구**:

본 연구진은 brucellosis 진단기술을 확립하여 각종 진단방법과 상호비교 시험하였으며 3차년도에는 정확하면서도 손쉽게 진단을 할 수 있는 진단용 KIT를 생산하기 위한 연구를 생산업체를 선정하여 구체적으로 수행하였다.

가. Complement Fixation Test **기술 확립**

CFT 시험방법은 타 진단방법보다도 민감도 및 특이도가 높아서 양성우의 색출에 활용될 수 있지만, 그 술식이 대단히 복잡한 것이 단점으로 인정되었다. 그래서 새로히 확립한 진단방법을 적절히 운용하기 위해서는 전문적으로 진단 업무를 수행할 수 있는 기관에서의 기술확립이 필요한 실정이다.

나. Latex Agglutination Test Kit **생산 기술 확보(산업화)**

혈청학적 진단방법으로 Brucellosis에 기인한 항체의 형성정도를 검출할 수 있는 방법으로 Brucellosis의 보조적 진단방법으로서 활용이 가능하며 이 진단 방법은 TAT보다 손쉽고 정확히 진단할 수 있는 방법이라 할 수 있다. TAT 방법을 수행하여 보면 의양성 판정이 되는 예, 즉 진단을 내리는데 있어서 애매한 예의 혈청에 대하여 신속 정확한 진단을 내리는데 있어서 어려움이 있지만 LAT 방법을 활용하면 훨씬 정확히 판정을 내릴 수 있다.

다. ELISA Kit **기술 확보**

이 진단방법을 임상적으로 활용하기 위해서는 먼저 ELISA Reader를 구입하여야 하는 경제적 부담을 갖고 있지만, 이미 지방의 가축위생시험소나 대학에는 이미 확보되어 있는 실정인 바, 집단 검색의 목적으로 그리고 정확한 진단을 위하여서 정확한 항체 반응을 유발시킬 수 있는 상품화를 위한 진단용 Kit의 생산이 필요하다.

4. **예방용** vaccine **개발 및 생산**

Brucellosis의 집단 발생지역에서의 이 질병예방을 위한 지난 3년간의 연구에서 보아온 바와 같이 그 발병 두수가 정부의 기대와는 다르게 매년 약 500 900여두 수준을 유지하고 있어 점차적으로 우리나라의 몇 개 지역은 상재지역으로서 나타나고 있다. 즉, 충남의 아산지역, 충북 제천지역, 전북의 임실 지역, 경기 일부지역 그리고 제주지역 등의 젖소와 한우에 대한 Brucellosis예방사업의 필요성은 양축농가의 경제적 손실규모를 최소화하기 위해서는 절대적으로 필요한 조치이다.

가. 실험실적 면역반응 관찰 연구

2차년도와 3차년도에 Brucellosis의 예방접종균주로 세계적으로 많은 연구가 이루어지고 있는 *Erucella abortus* RB 51균주를 구입하여 실험실적 연구를 수행하였다. 즉, *Erucella abortus* RB 51 항원의 생산을 위한 배양, 항원을 회수하여 한우에게 면역시키면서 항체를 매주 측정하였다. 한편 *Brucella abortus* RB 51의 생균을 한우에 접종한 후 추가 접종을 2차에 걸쳐서 접종하여 항체를 생산하며, 이 생산한 항체를 각종 진단방법에 있어서의 항원과의 반응 정도를 관찰함으로서 유우에서의 Milk Ring Test 검사에서의 양성반응 유무와 자연감염되는 *E. abortus*에 대한 저항능력을 면역학적으로 확인하였다.

나. Brucellosis 만연 목장에서의 임상적 면역 효과 연구

연구가 종료된 시점에 우리나라에 분포하고 있는 *Erucella abortus* Biotype I과 V에 대한 *Erucella abortus* RB51을 이용한 백신을 생산하기 위하여 fermenter를 이용하여, *E. abortus* RB 51을 배양한 후, 냉동건조 vaccine을 생산하여, 예방약의 생균 접종량을 결정, 접종한 후, 2개월 후에 국내 분리균주를 접종하여 방어효과를 임상학적 그리고 면역학적으로 관찰하였다. 또한 생산한 Vaccine의 안전성, 완전성, 면역성 등을 mouse, rat나 한우 등을 이용하여 측정하였던 바, 전혀 유산이나 폐사와 같은 부작용을 관찰할 수 없었다.

다. 야외 예방접종시험: 1996년에 Brucellosis 발생 pattern이 단일 목장에서 집단적으로 발병되고 있는 현실을 고려하건대, 집단 발생지역의 대규모 젖소와 한우 사육 목장의 예방접종은 정부가 신속하게 대응하여야 할 것으로, 연구용 예방약을 생산하여 몇 개의 목장의 젖소에게 예방접종하였다. 2차년도에 이미 예방접종균주를 준비하여 일반적인 항원성 및 면역성에 대한 조사와 더불어서 1997년도에는 집단 발생지역에서의 예방접종은 정부의 통제하에서 실시될 수 있도록 가축전염병의 내규(시행규칙)안이 마련되었다.

라. 산업화를 위한 균주의 확보: 금번에 활용한 *Brucella abortus* RB51은 미국의 USDA로부터 연구용으로 구입하여(농림부 승인균주), 각종 시험연구에 활용하였으나, 앞으로 산업화를 위하여서는 실시기업으로 하여금 상용화할 수 있는 균주를 활용한 예방약을 생산할 수 있도록 하고자 한다.

제 7 절 연구개발의 범위

1. 역학적 조사

우리나라에서 brucellosis 유행지역을 파악하며, 집단 발병지역에서의 연구용 vaccine을 제조하여 활용한다. 특히 Brucellosis 발생 목장에서의 미감염 소나 동거우에 대한 예방접종사업을 조속히 수행하여 예방효과를 면역세포의 활성도를 중심으로 관찰한다.

2. 진단약 생산을 위한 연구

공인진단방법으로 사용되고 있는 MRT와 TAT방법의 민감성, 특이성이 약 70%수준인 바, 이를 보안할 수 있는 민감도가 높은 ELISA방법과 특이도 높은 것으로 알려진 Latex agglutination test방법을 새로이 공인진단방법으로 활용할 수 있도록 지속적인 연구를 수행하고자 한다.

3. 예방약 생산을 위한 연구

가. 예방균주의 확보: *Erucella abortus* RB51균주의 미국으로부터 연구목적으로 구입하여 우리나라에서 연구목적의 연구활동을 수행하였다.

나. *Erucella abortus* RB51의 항원성을 *Erucella abortus*나 *Erucella melitensis* 등의 균주의 차이를 구명하기 위하여 SDS-PAGE방법으로 분석하며, 항체형성에 관한 연구를 수행하였다.

다. 예방약 생산을 위한 방어능력, 안전성, 보존성 등을 보다 현실적으로 수행하기 위하여 야외 목장에서 수행하였다.

라. 야외 및 일반 수의사들이 안심하고 활용할 수 있는 냉동건조 백신을 제조하기 위하여 국내 가축약품생산업체와의 기술 이전을 위한 행정적 조치를 수행하며, 제품허가를 받아 활용할 수 있는 법적 조치를 수행한다.

마. 3차년도 연구사업에서 흡족한 방어능력이 인정되는 결과를 얻어, 이 연구사업이 완결되면, 정부의 Brucellosis에 대한 정책이 예방정책으로 변환(국가방역대책위원회 결정)될 경우를 대비한 양축농가에서 활용할 수 있는 vaccine을 상품화한다.

4. **국내 분리균주의 변이종 개발을 위한 연구**

부루셀라병 (Brucellosis)은 포유동물 특히 소, 돼지, 산양, 면양, 개, 사슴 등에서 유산 및 불임 등을 일으키며 *Brucella abortus*, B*rucella melitensis*, *Brucella suis* 및 *Brucella canis* 등이 감염되어 유발되는 것으로 보고되어 있다. 이에 이들 균주가 병원성은 없으면서도 방어능력이 있는 균형을 얻어서 소 뿐만 아니라 타 가축의 예방용 변이균종을 생산하기 위한 과정을 확립하였다. 결국 우리나라에서 분포하고 있는 *Brucella abortus* biotype I으로부터의 변이종을 생산하기 위한 항생제 및 저장방법을 표시한 실험 추진을 Fig. 3 모형도에 따라서 수행하여 새로운 변이종의 생산을 위한 연구를 수행하였다.

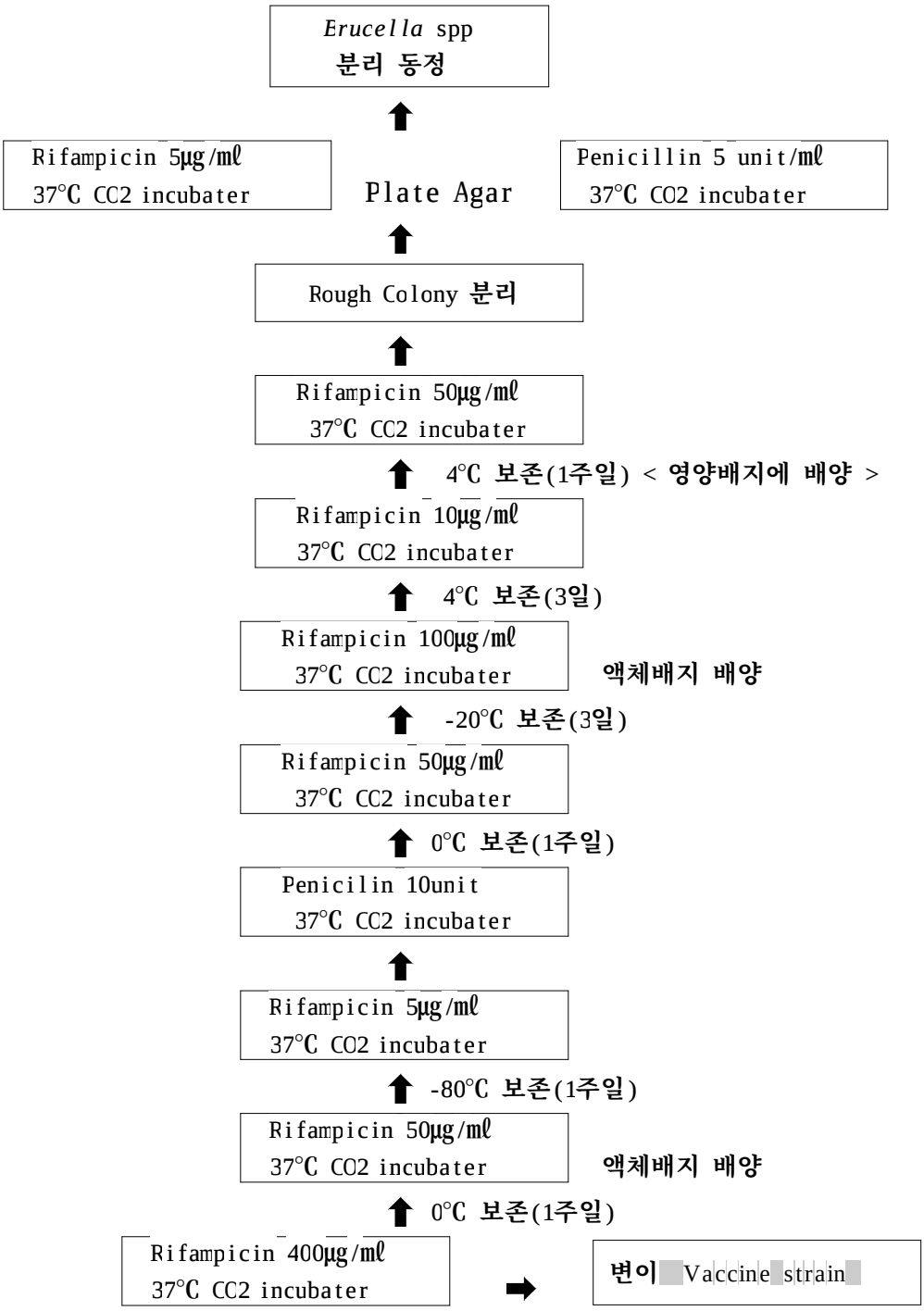

Fig. 3. *Erucella* spp의 변이종 생산을 위한 모형도

Model for inducement of mutant Brucella strain

또한, 상기 과정의 agar배지에서 *Erucella abortus* 균주를 48시간 동안 배양한 다음 24시간 동안 0℃에서 보관한 후, 이를 다시 20회 반복하여 균주의 변이 유발 효과를 증가시킨다. 이때, 항생제로는 리팜피신 (rifampicin)을 사용하는 것이 바람직하고, 그의 농도는 50 - 400μg/㎖ 범위인 것을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 균주 배양액을 glycine과 동량씩 넣어서 -80℃ 이하에서 5 7일간 보관하여, 다시 agar 배지와 액체 배지에 접종하는 과정으로 균주의 변이 유발을 신속하게 유도한다. Brucella agar 상에 형성된 colony 과립상의 약간 흰색을 띄는 노란색이고, 외형 윤곽이 거칠고 건조한 균주를 분리한다. 물론 모든 가축의 *Brucella* spp 균주를 분리하여 Fig. 3 과 같은 모형도의 방법에 다라서 변이종을 생산하는 시도는 앞으로 새로이 추진되어야 할 연구분야이다.

제 8 절 연구 과제 개발 추진 동기 및 사후 관리

1. 연구 과제 개발 동기

최근에 있어서 brucellosis가 양축농가에 미치는 경제적 손실의 규모나 양축농가에 미치는 영향은 간과할 수 없는 정책적 문제점을 제시하여야 할 것으로 판단되었던 것이 본 연구과제를 수행하게 된 가장 큰 이유 중에 하나이다.

최근 우리나라 젖소에 있어서 Brucellosis 발생은 증가추세를 취하고 있으며, 더욱이 집단적으로 발병하므로서(가축 1996; 임윤규 1995a; 정 등 1989) 양축농가에 막대한 피해를 주고 있는 실정이다. 소, 돼지를 포함한 산양 및 면양 등에 있어 부루셀라병은 유산 및 불임 등을 유발함으로서(Beran 1994, Davis et al. 1990, Mayfield et al. 1988, Turkson et al. 1992) 막대한 경제적 손실을 야기시키므로서 이로 인한 손실의 최소화와 근절을 위한 대책이 시급한 대단히 중요한 인수 공통전염병이다. 특히 사람에 감염되면 Malta fever 또는 파상열이 유발되므로 공중보건상 매우 주의를 요하는 중요 질병중의 하나이다. 국내에서 부루셀라병은 주로 젖소를 중심으로하여 이루어졌다. 우리 나라에서의 부루셀라병은 1956년 미국에서 도입한 젖소군에서 처음 발생보고가 있은 이래 지속적으로 발생하여 국내 축산업 농가에 막대한 경제적 손실 및 우려를 주게 되었으며, 1960년도에는 제주도의 도입 비육소군에서 집단 발생하는 등, 1996년에는 이미 300 두 이상이 양성으로 판정되고 이를 경제적으로 분석하여 손실액을 계산하였던 바 년간 79억원으로 추산하였다. 그러나 1997년도 약 900여마리의 젖소와 10여두의 한우가 살처분됨에 따라서 우리 농촌에서의 경제적 손실은 약 150억정도에 달할 것으로 추산되고 있는 실정이다.

소의 Brucellosis는 현재 몇몇 선진국에서만이 성공적으로 퇴치되어 있을 뿐이며, 세계적으로 많은 나라에서 여전히 그 피해가 심각하게 발생하여 국가적으로도 위협의 존제로 남아 있다. 아시아지역의 경우 방글라데시와 네팔 등이

주요 유행지역이며 부탄, 인도네시아 및 한국 등은 산발적으로 발생되는 지역국가로 FAC, WHO및 CIE에서 보고한 바 있다.

부루셀라병의 예방과 관리를 위한 주요 3가지 방법이 현재 각국에서 활용되고 있다. 즉, 백신접종, 양성우의 검색 및 격리 혹은 도살처분이 시행되고 있으며 이들 방법은 관리 대상 동물, 환경 그리고 실험실적 조건 등에 따라 각각 다를 수 있다. Brucellosis의 예방은 오래 전부터 활용되어왔다. Brucellosis의 진단방법은 여러 가지가 활용되어 왔으며(김 등 1982), 감염 소에 대한 진단결과에는 약간의 차이가 보다 효율적인 진단 방법을 색출하는데 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 예방접종된 소는 야외에서 자연감염된 항혈청과의 Mlik Ring Test에서 *B. abortus* 균주에 감염되었을 경우에 있어서 교차반응을 일으키지 않는 *B. abortus* RB 51이 활용되고 있다.

우리나라에서 집단적으로 발병하고 있는 예의 지역에서는 예방접종을 위하여는 장기적인 정부 차원의 대책 수립이 필요할 것이다. 최근 집단 발병하고 있는 Brucellosis를 면역학적으로 규명하기 위해 감염된 소의 면역관련세포 활성도의 그 분포도를 관찰하고자 면역 임파구의 분류 방법에 의존하여 세포의 분포를 조사하였던 바, T세포와 B세포의 분포 양상이 전반적으로 약화되어 있었다.

본 연구에서는 야외 감염소와 비감염우간의 혈중 면역세포의 분석을 위하여 cytoflow meter를 이용하였고, 향후 각종 면역반응시 관여하는 세포군을 분석함으로써 *Brucella* 감염시 생체방어 기전을 밝히는데 면역학적 기초연구를 수행하였으며, *Brucella* spp에 대한 항원성 물질을 분석하고자 균체를 SDS-PAGE하여 항원의 특색을 면역효소학적으로 분석하여 종별 특이 항원성 물질을 규명하고자 하였다. 이는 MRT와 TAT에서 양성으로 진단되어 살처분되는 젖소의 조직으로 부터 세균을 분리하였으며, 양성 혈청을 수거하여 다른 진단방법에 의한 재조사를 수행하였다. 이들 항원을 이용하여 보체결합반응시험, ELISA 및 Latex LAT법으로 특이성과 감수성을 검사법별로 비교 분석하였던 바, 그 양성율이 일치하지 않고 있어 이의 정확한 진단을 내리는 것은 어려움이 있어 앞으로 있을 예방접

종사업이나, 진단목적의 집단검색에 활용할 수 있는 진단방법을 확립하고자 몇 가지 진단방법을 비교시험하였다.

결론적으로 이번 연구를 통하여 우리나라에서 brucellosis가 근절되지 않고 증가될 경우를 대비한 예방 program을 세우기 위한 기초적 연구로서 진단 방법의 비교항원의 특색, 그리고 감염된 소의 면역 활성도를 중심으로 연구하였으며 *Brucella abortus* RB51의 국내 분포 균형에 대한 방제효과가 완전했음과 이 예방약은 세포성 면역을 유발하고 있음이 임상적으로 확인되었다.

2. 연구결과 사후관리

가. 실시기업의 산업화 보호장치: 이는 국가가축질병방역정책에 반영하므로서 더 이상의 Brucellosis에 의해 젖소를 사육하는 양축농가가 경제적 손실을 입지 않도록 활용할 수 있어야 할 것이며, 그 동안 연구성적을 농림기술관리센타에 보고하였는 바, 이들 연구결과를 활용한 모든 산업화에는 연구자의 권익이 보호받을 수 있는 법적장치가 필요하다. 특히 산업화를 위하여 실시기업으로 선정된 산업체가 생산활동을 자유로이 하므로서 양축농가의 수입증대를 위하여 기여할 수 있는 제도가 있어 보호받을 수 있도록 하여야 할 것이다.

나. 계속적인 연구지원 : 물론 연구가 주어지 조건에 따라서 완결되었지만 연구수행중에 토출된 세로운 연구분야에 대해서는 계속적으로 연구비를 지원해 주는 사후관리 또한 필요하다.

제 2 장 우리나라의 Brucellosis에 대한 역학적 특성 연구

제1절 국내 Brucella abortus의 분리

제2절 Brucella spp의 항원과 항체의 특성 연구

제3절 Brucellosis감염 젖소의 면역세포에 대한 연구

제4절 한우에 있어서 불활화된 Brucella abortus, Brucella melitensis 그리고 Yersinia enterocolitica에 의한 면역반응 관찰

제 2 장: 우리나라의 Brucellosis에 대한 역학적 특성 연구

제 1 절: 국내 *Brucella abortus*의 분리:

제주도, 경기도 그리고 전북지역에서 1995년부터 1997년 사이에 brucellosis로 양성 판정되어 살처분되는 소의 상유방 임파결절을 전북대학교와 수의과학연구소로 운반하여 -20℃보관하였다가, 무균적으로 절편하여, Ewalt et al (1989)의 방법에 준하여 분리하였다. 즉, 임파결절을 95% ethanol에 침지한 후, ethanol을 증발시킨 다음, 임파결절을 2등분하여 파쇄시켰다. 파쇄시킨 조직액을 5% 소혈청, 항생제 등이 첨가된 tryptose agar에 도포하여 배양하였다. 이와 동시에 Brucella agar배지를 이용하여 Table 1과 같은 군내 분리균주를 확보하였으며 이들은 대부분 *Brucella abortus* biotype I으로 분리동정되었다.

Table 1. Isolated Brucella Strains in Korean

균주 번호	일 자	주 소	균 형
1	96-06-24	제주도 양태희	*B. abortus* biotype I
2	96-06-24	제주 동명목장	
3	96-06-24	제주 동명목장	
4	96-06-24	제주 동명목장	
6	96-06-24	제주 한림 7063	
7	96-08-20	전북남원 1	
8	96-12-18	수의과학연구소 제공	
9	96-06-22	경기도 이천	
10	97-10-31	경기 이천 하나우유	
11	97-10-31	전북 임실	

제 2 절: *Brucella* spp의 항원과 항체의 특성 연구

서 론

우리나라에서 Brucellosis는 1956년에 미국에서 도입한 젖소군에서 처음 발생보고가 있은 이래 지속적으로 발생하여 국내 축산업 농가에 막대한 경제적 손실 및 인체 감염우려를 주고 있다. 즉, 1960년도에 제주도의 도입 비육소군에서 부루셀라병이 집단 발생하여 감염된 전두수를 도태한 바 있었으며, 1995년부터 1997년에만도 매년 500여두에서 900여두가 양성으로 판정되어 살처분되었다. 이 등(1991)은 300여두의 젖소가 살처분되었을 경우 이를 경제적으로 분석하여 그 손실액은 년간 79억원으로 추산 보고하였는데 약 900여두가 살처분된다면 그 피해액은 약 200억원 정도에 달할 것으로 추정된다. 소의 Brucellosis는 현재 미국, 캐나다 및 호주, 유럽국가 등에서 퇴치 활동이 활발히 이루어지고 있으나, 세계적으로 많은 나라에서는 여전히 그 피해가 심하여 국가 경제에 큰 위협의 존제로 남아 있다. Brucellosis의 주된 감염원은 태반, 질분비물, 태아 및 정액 등 다양하며, 암소에서는 주로 생식기로서 질분비물과 숫소에서는 타액선 및 정액으로 균이 배출된다. 또한 감염원인으로서 인공수정과 자연교미도 중요함을 보고한 바 있다(Timoney 등 1988). 이같은 많은 요인에 의하여 이 질병이 전파가 이루어지므로서 사람으로 폭로 위험성을 경감시키기 위해서는 착유우 정기검사를 통한 철저한 검색활동이 있어야 할 것이며, 더불어서 이 진단에 활용되는 항원의 양성우 검색을 위한 진단방법의 특이성과 감수성이 있어야 할 것으로 생각된다.

우리나라에서 사용되고 있는 MRT나 TAT는 타 진단방법과 비교하여 특이성 및 감수성이 낮게 측정되는 것으로 보고된 적이 있었던 바(김 등 1982), 최근처럼 양성우 검출율이 많아지고 집단 발병하고 있는 현실에서 보다 특이성과 민감성 높은 진단법을 활용하여야 함은 당연한 일이라 생각된다.

본 연구자는 우리나라 젖소에 대한 brucellosis진단에 활용할 수 있는 진단용 항원을 생산하기 위하여 미국의 ATCC로부터 *Brucella* spp(*E. abortus, E. melitensis, E. suis, E. ovis, E. canis*)와 *Yersinia enderocolitica*를 구입하여 배양, 세포막성 물질을 초음파 파쇄하여 상층을 SDS-PAGE를 수행하였으며, *E. abortus* 1119-3를 항원으로 MRT와 TAT에서 양성으로 판정된 혈청을 이용하여 Western blot를 실시하므로서 국내분포균형에 대한 면역반응특색을 규명하였으며, 더불어 타 세균과의 교차면역관계를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 가검 혈청 준비

전북, 충남·북 그리고 제주도지역 등에서 Table 1과 같이 Brucellosis로 진단된 혈청과 의양성 그리고 음성으로 진단된 혈청을 활용하였다. 즉, 1995년에서부터 1996년사이에 MRT와 TAT 진단법으로 판정된 Brucellosis의 양성 혈청 65건, 의양성 혈청 19건 그리고 음성 혈청 32건을 본 시험에 사용하였다.

2. *Brucella* 균의 증식 및 항원의 준비:

미국의 ATCC에서 구입한 *Erucella* spp를 Brucella agar에서 배양 한 후, Brucella medium(DIFCC)에서 CC2 Incubater에서 37℃/72시간 증균하여 사용하였다. 배양한 세포를 원심분리하여(3,200rpm) 침전물을 수거하여 단백질을 Lowry(1951) 방법으로 측정하여 활용하였다.

3. Brucellosis양성 및 음성 혈청 준비

우리나라에서 정기 착유우 검색으로, MRT에서 양성 그리고 개체검사 방법인 TAT(≥1:100이상)에서 양성으로 판정된 소의 혈청을 수거하여, 본 실험에 양성 혈청으로 사용하였다. 특히 MRT와 TAT에서 양성, 의양성 및 음성으로 판정된 소의 혈청을 Complement Fixation Test로 확인한 후에 미국(USDA)의 Brucellosis

연구소에 보내어 확인하였던 바, 우리의 진단성적과 동일하기에 이둘 혈청을 본 연구에 있어서 표준 양성 그리고 음성 혈청으로 사용하였다.

4. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Erucella spp(*E. mlitensis*, *B. oivs*, *B. canis*, 그리고 *B. suis*) 균주를 Brucella broth를 이용하여 증균시킨 뒤 원심 세척하여 균체를 수집하였다. *Yersinia enterocolitica*는 일반 영양배지에 배양하여 균체를 회수하여 전기영동에 사용할 항원으로 준비하였으며 이들 항원의 단백질 함량을 결정하기 위하여 protein assay kit(Bio Rad Co.)를 이용하여 단백질을 1mg/ml의 농도로 PBS(pH 7.4)를 이용하여 희석한 다음 항원과 sample buffer(0.13M Tris-HCl ; pH 6.8, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 0.013% bromphenol blue)와 동량 희석하여 100℃의 자비 수욕상에서 5분간 중탕하였다.

Brucellosis에 감염이 획인되어 살처분된 소와 의양성 및 음성으로 확인된 소로 부터 채혈한 혈액으로부터 상기의 방법에 의하여 준비된 항원에 대하여 *Erucella abortus*에 대한 특이 단백질을 확인하기 위하여 Laemmli(1970)의 방법에 준하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동장치는 대형 전기영동장치(Hoffer Co.)와 minicell(Bio Rad Co.)를 이용하였으며, running gel(10% polyacrylamide, 0.1% ammonium persulphate, 0.5M Tris-HCl ; pH 8.8, 0.01% TEMED)과 stacking gel(5% polyacrylamide, 0.1% ammonium persulphate, 0.5M Tris-HCl ; pH 6.8, 0.1% SDS, 0.01% TEMED)를 각각 충진하여 gel의 polymerization을 형성시켰다. 전기영동은 영동 buffer(25mM Tris, 192mM glycine, 3.5mM SDS)에서 80V로 실시하였으며, 영동이 끝난 gel을 coomassian brilliant blue R-250(Bio Rad Co.)으로 염색하여 *B. abortus*에 대한 특이 단백질을 확인하였다.

5. Western Blot

SDS-PAGE하여 얻은 gel에서 분리된 항원성 단백질에 대하여 *B. abortus* 검색에서 양성으로 판정된 항혈청을 반응시켜, 면역학적인 방법으로 구명하기 위하여 western blot을 실시하였다. 즉, 전기영동이 끝난 gel을 blotting buffer(25mM Tris, 192mM glycine, 4.7M methyl alcohol)를 이용하여 30V에서 2시간 60V에서 30분 동안 gel로부터 단백질을 0.45um nitrocellulose membrane(Bio Rad Co.)에 이동시켰다. 단백질 이동이 끝난 nitrocellulose membrane을 0.2% Tween 20이 함유된 PBS(pH 7.4)로 4℃에서 12시간 blocking 시키고, *Erucella abortus*의 양성 혈청을 단계희석하여 접촉시킨 뒤 nitro blue tetrazolium/bromchloro indolyphosphate (BCIP/NBT, KPL Co.)를 이용하여 발색시켜 *B. abortus*의 감염여부를 확인하였다.

결 과

1. **가검물 혈청의 수집**:

경기, 전북, 충남·북 그리고 제주도지역에서 1994년과 1996년에 걸쳐서 Brucellosis 양성 혈청 65건, 의양성 혈청 19건 그리고 음성 혈청 32건의 지역별 수거 현황은 Table 1에서 보는 바와 같다.

2. SDS-PAGE**소견**

Brucella abortus 표준 균주를 포함한 *Brucella* spp에 대한 SDS-PAGE를 수행하였던 바, Fig 1에서 보는 바와 같이 *B abortus*의 주요 band로는 21KD과 50KD 등이었다. *B. abortus*의 경우 15KD, 43KD, 49KD, 116KD가 관찰되었으며, *B. melitensis*는 25KD, 26KD, 28KD, 30KD, 40KD, 44KD, 49KD, 62KD, 72.5KD, 76KD, 100KD, 114KD, 170KD 등의 많은 물질을 관찰할 수 있었다.

Table 1. Collection of the bovine sera form several provinces in Korea

Brucellosis \ Region		ChonBuk	KyeongGi	ChungNam	ChungBuk	JeJu	Total
Sera	Positive	7	3	40	5	10	65
	False Positive	7	-	12	-	-	19
	Negative	10	-	15	7	-	32
	Sub-total	24	3	67	12	10	116

두 종간의 공통항원으로는 43KD, 49KD, 116KD 였으며 *Brucella* spp에 대한 표준 균주들 역시 많은 항원성 물질이 관찰되었다. 즉, 6KD, 6.5KD, 17KD, 18.4 KD, 23KD, 28KD, 29KD, 30KD, 62KD, 94KD 그리고 100KD의 물질이 공통항원물질로서 인정되었다. 그리고 각종별 특이 항원성 물질로는, *B. suis*는 15KD, 25 KD, 49KD, 76KD, 116KD, 170KD로서 *B. abortus* 및 *B. meltensis*와의 공통항원으로서는 49KD및 116KD 이었다. 또한, *B. ovis* 에 있어서는 15KD, 25KD, 76KD가 각각 관찰 되었다. *B. canis*의 경우는 15KD의 항원 물질만이 관찰되었으나, 이 물질도 *B. meltensis* 를 제외한 모든 종에서 공통으로 관찰되었다. 한편, *Yernisia enterocolitica*의 경우 6KD, 6.5KD, 19KD, 21KD, 26KD, 49KD의 물질이 관찰었으며, 이들 항원이 *brucella*항원과의 교차 반응을 나타내었던 것으로 생각되었다(Fig. 1).

3. Western Blot 소견 :

*Brucella abortus*와 *B. meltensis*균주를 포함한 타 *Brucella* 항원을 SDS-PAGE하여 국내에서 *B abortus* 양성으로 판정된 항혈청 및 음성 혈청을 이용하여 면역 블롯 반응을 관찰하였던 바, Fig 2에서 관찰되는 바와 같이

*E.abortus*항원과 *B. melitenis* 양성혈청과의 반응은 29KD에서 50KD사이에 강한 반응대를 나타냈으며, 67KD 이상의 단백질대에서도 음성혈청과의 반응에 비해 강하게 항원항체의 반응이 인정되었다. 한편, 음성 혈청과의 반응에서는 10KD, 23KD, 28KD, 62KD 및 67KD등이 나타나므로서 우리나라에 감염된 소의 혈청에서의 특이 항체는 29KD 50KD와 67KD 이상의 물질 중 특히 100KD와 116KD에서 찾을 수 있었다. 또한 *B. meltensis*균주 항원에 대한 교차반응 물질로 인정할수 있었던 것은 10, 15, 23, 28, 62 및 67KD등 이었다.

5종의 *Brcellosis* spp 및 *Yersinia enterocolitica* 0:9주에 항원을 전기영동하여 *Brucella abortus* 양성혈청과 *Brucella* spp 음성혈청에 대한 반응에서 관찰하였던 바, Fig. 2에서 보는 바와 같이 *B. abortus*, *B. melitensis*는 전형적 양성 반응을 나타내었고, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* 및 *Y. enterocolitica* 항원과의 반응에서도 몇몇의 반응물질이 관찰되고 있음으로서 이들이 종간 교차반응 관련 원인 물질일 것으로 생각되었다.

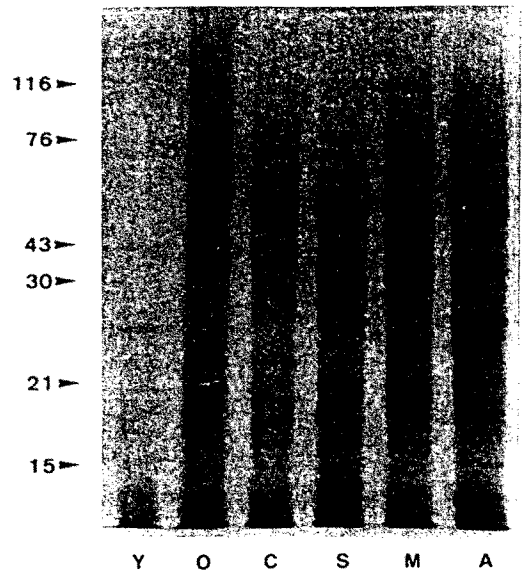

Fig. 1 SDS-PAGE profiles of SDS-extracted antigen for *Brucella spp*

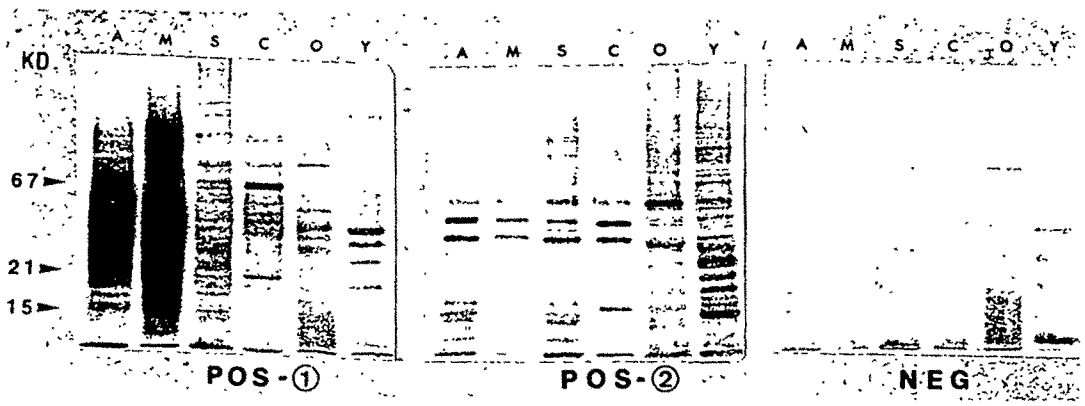

Fig. 2 Immunoblot analysis of a *Brucella spp* antigens with positive and negative sera to against *B. abortus*

A: *B. abortus* B: *B. melitensis* S: *B. suis* C: *B. canis* O: *B. ovis* Y: *Y. enterocoliyica*

POS-①: Brucellosis -positive serum of cattle in Chungbuk province

POS-②: Brucellosis-positive serum of cattle in Chonbul province

NEG: Brucellosis negative serum of cattle

Arrows indicate protein molecular weight(KD)

고 찰

부루셀라병은 유럽, 아프리카, 지중해 등 세계적으로 관범위하게 분포되어 있는 인수공통전염병의 하나로서 mediterranean fever, Malter fever등으로 알려졌다(Turkson et al. 1992, McLean ER et al 1992). 1887년에 David Bruce에 의하여 원인균이 최초 발견보고된 이래 *B. abortus*와 *E. suis*가 소와 돼지에서 분리되었지만 사람에서는 *B. melitensis*가 1920세기 중반에 중요한 질병으로서 보고되었다(Last 1986, Timoney et al. 1988, Mahajian et al. 1986). 현재에는 모두 6종(*B. abortus, B. melitensis, E. suis, B. canis B. ovis, E. neotomae)*이 보고되었으며 *B. neotomae*를 제외한 모든 종은 병원성이 있는 것으로 알려져 있다(Timoney at al 1988).

부루셀라병은 소, 산양, 염소, 개 등에 널리 분포되어 있는 인수공통전염병으로서 사람에 있어서 이 질병은 피부염, 관절염, 무기력을 야기시킨다(Arixa et al. 1989, Berger et al. 1981). 이 질병은 동물과 동물사이를 전파시키며, 전 집단군에서 신속히 그리고 적극적으로 검진되어야 하는 질병으로서 중요시되고 있다(Yinnon et al. 1993, Zimmerman et al. 1990). 소, 면양, 염소 등 암컷의 번식기계와 reticuloendotherial tissue에 감염되며(Cheers et al 1979, Jiang et al 1993), 골수염(Smeak et al 1987) 그리고 태아나 태자에 감염되었을 경우 유산을 일으켜 경제적 손실을 야기시키고, 또한 사람에 감염되면 불규칙적인 발열과, 발한, 만성인 경우에는 무기력, 복통, 피부 발적, 관절통, 위장염, 두통 등의 신경증세를 나타낸다(Kerr et al 1966; McLean et al 1992). 전파는 주로 유산 태자나, 태물질 등과의 접촉에 의하여 이루어지며, 우유을 소독하지 않았을 경우 그리고 감염동물의 배설물을 통한 공기감염에 의하여 이루어질 수 있다(Hausler 1972).

외국에서도 일반적으로 이 질병의 진단은 주로 세균학적 그리고 면역학적인 진단방법으로 이루어지고 있다(Mayfield et al. 1988). 미생물학적인 진단방법은 병원체를 감염조직으로부터 직접 배양하여 검진하는 방법(Banai et al 1990)

이기 때문에 용이하지 않다. 특히 유산한 송아지의 조직으로부터 *E. abortus*를 직접 찾아내는데 세균수가 약 10^5이 필요하다는 보고가 있어(Hopper et al. 1989), 농감염의 예가 아니면 진단이 어렵다. 혈청학적 진단방법과 Hybridization Cot 방법보다 더 정확한 PCR과 같은 면역학적 진단방법(Essenberg 1995, Cellier et al. 1992)이 활발히 이루어지고 있지만 이에는 의양성의 예가 있어, 최근에는 분자생물학적 진단 방법에 대한 관심이 증가하고 있다(Pollice et al 1985, Neumann et al 1986, Hopper et al 1989, Mullis et al 1987)). 또한 혈청학적 진단방법에 있어서 각각의 *Erucella* spp 항원은 서로 다른 특이성이 있어 그 응집반응의 결과가 각기 다르게 나타나므로써(Aparicio et al 1993) 비록 어떤 종의 *Erucella* 균주에 감염되어 있을 경우에도 이를 진단하지 못한 체 지나는 경우가 있다(Sarvamangala et al. 1987). 특히 *Erucella* 항원은 응집반응에서 가끔씩 *Yersinia enterocolitica* 와 교차반응을 나타내므로(임 등 1995b, Weynants et al 1996) 이를 피하기 위하여 *Erucella*의 특이 항원에 대한 단크론항체를 생산하여 신속하면서도 특이성이 높으며, 그리고 저렴한 응집반응시험법들이 연구되고 있다(Vizcaino et al 1992).

부루셀라병의 진단방법에는 Milk Ring Test(Alton 1981), 피내반응법(MacDiarmid et al 1987, Cunningham et al 1980, Chukwu 1985), Rose Bangal test(Morgan et al 1969), Tube Agglutination Test(Alton et al 1975), Complement Fixation Test(Timoney et al 1988) 우유나 그 침전물에서 균체를 분리 배양하는 방법과 이들 물질을 직접 Guinea pig에 접종하는 방법(Hausler 1972, Smith et al 1964) 등이 있다.

이 같은 진단방법은 완전한 정확성을 나타낼 수는 없다. 심지어 *Erucella* 균체가 검출됨에도 불구하고 Card test에서는 모두 양성으로 나타나지 않는 예가 있다(Huber et al 1986). 물론 Card test에서 양성인 경우, 세균의 분리를 위한 Card test의 특이성은 30.8%에 달할 뿐이다. 비록 우유에서 세균이 검출되는 306예에서 Milk ring test에서 양성으로 판정되는 예는 302로서 98.7%의 진단결과를 얻을 수 있었다.

세균 배양에서 양성으로 판정된 49예 중에서 44예가 MRI있어서는 양성으로 진단되는 등과 같은 진단방법에 따른 차이점이 보고되고 있어 brucellosis양성우의 살처분은 각별한 주의가 필요한 것으로 믿어지고 있다(Huber et al 1986). 또한 우리나라에서도 Erucellosis의 진단을 위하여 사용한 TAT에서 양성으로 판정된 43예에서 ELISA방법에서는 40예가 양성으로 판정되었으며, 의양성의 12예에서는 양성으로 판정된 예는 11예, 음성으로 판정된 예는 1예로 보고하므로서 진단방법에 따른 차이가 보고되고 있다(임 등 1993)

소의 부루셀라병은 현재 몇몇 선진국에서만이 성공적으로 퇴치되어 있을 뿐이며(CIE 1992), 세계적으로 많은 나라에서는 여전히 그 피해가 심하여 국가적으로도 위협의 존제로 남아 있다(McLean et al 1992). 아시아지역의 저개발 국가 등지에서의 가축의 주요 질병이며, 사람에게도 큰 문제점을 야기시키고 있다(Beran 1994).

우리나라에서의 부루셀라병은 1956년에 미국에서 도입한 젖소군에서 처음 발생보고(박 등 1959)가 있은 이래 지속적으로 발생하여 최근에는 국내 축산업 농가에 막대한 경제적 손실을 주고 있으며, 60년대 1%의 발생을 보이다가 70년대에는 거의 발생보고가 없었으나, 80년대에 이르러 전면적 검진사업에 의한 추적조사의 결과 0.2% 수준에 감염사실이 밝혀지게 되었으며, 1990년대 이후에는 매년 약 500여두의 젖소가 Brucellosis에 기인되어 살처분되므로서 실제적인 손실액만도 매년 수십억원에 달할 것으로 추정되며 정부의 이에 대한 보상액만도 매년 10억원 이상을 사용하고 있는 실정이다(가축전염병발생현황 1996). 우리정부의 Brucellosis에 대한 철저한 방역사업의 수행으로 매년 500여두의 살처분에도 불구하고 점차 증가추세에 있는 점에 대하여서는 전염원, 병원성 및 숙주의 저항성등에 관한 보다 구체적인 역학조사의 필요성이 강조되고 있다.

현재까지 우리나라에서 이루어진 Brucellosis에 대한 역학적 조사연구는 주로 균체의 동정분리(박 등 1959, 우 등 1986, 정 등 1988), 혈청학적 조사 연구(김 등 1963, 김 등 1968, 김 1959, 김 등 1988), 우유로부터의 진단방법(정

1969), 혈청학적 진단방법에 대한 비교연구(김 등 1982), 그리고 단크론성 항체의 생산(정 등 1989), ELISA 방법을 이용한 집단검색 방법에 관한 연구(임 등 1993) 및 타 세균(*Yershinia enterocolitica*)과의 교차면역 관계 등(안 등 1982)이 이루어진 바 있다. 그러나 아직 젖소에서의 감염율이 0.01%에 불과하여 예방을 위한 대책 program의 개발이나 첨단기술을 이용한 진단방법에 관한 연구는 아직 활발히 이루어지지 않고 있다. 최근 계속적으로 검출되는 추세를 감안하여 보면 우리나라에서는 미국처럼 부루셀라병의 검진 사업을 1년에 4회이상 그리고 4회중 3회 이상을 꼭 검색(Beran 1994)하여야 하지 않을까 생각되고, 매년 4회의 검진사업이 이루어진다면 아마도 우리나라에서의 검색율이 상승될 가능성이 높지만 이를 위해서는 수반되어야 할 여러 문제점이 있을 것이다.

우리나라에서는 박 등(1959)이 1956년 소의 유산증에서 유산태아로부터 *B. abortus*를 분리하였고, 박(1963)이 돼지의 유산증에서 *B. suis*를 분리한 바 있으며, 우 등(1986)은 유우의 상유방결절에서 *B. abortus*를 분리하였다. 또한 우리나라에서 분리한 균주를 표준 항혈청 *B. abortus* 와 *B. melitensis*을 반응시키었던 바 모두에서 응집반응이 나타난다고 하였다(우 등1986). 부루셀라병은 진단 방법에 따라서 감염율에 차이가 있어 개개인의 경우 1%에서 6%에 달하는 것으로 알려지고 있어 이에 대한 조사연구도 이루어져야 할 것이다 (Flores-Castro et al 1980).

국내에서 분리된 *Brucella* 속에 대한 생화학적 특성을 우 등(1986)이 보고하였으나 항원성의 연구는 최근에 임 등(1995a)이 세포를 배양하여 세포막 물질을 SDS-PAGE하여 보고한 것 이외에 전혀 항원의 특색을 보고한 예가 없다. 따라서 *Brucella* 속의 표준 균주를 SDS-PAGE한 후, 우리나라에서 채혈된 양성 및 음성혈청을 이용하여 western blot반응을 관찰하였을 때 Fig 3에서 보는 바와 같이 *B. abortus* 와 *B. melitensis*의 항원에 대한 면역효소학적 반응이 강하게 나타났으며, 타 균주와의 반응에서도 교차반응을 보였으나, *Yersinia enterocolitica*와의 반응정도는 임 등(1995b)의 보고보다는 약간 미약하게 인정되었다.

Brucella 속 균체는 자연환경에서 수개월간 생존하므로 축사환경과도 밀접한 관계가 있고, 유산한 태아나 태반에서 냉동되었을 경우 상당 기간동안 생존할 수 있어 그 전염위험성이 크다(Beran 1994). 본 역학조사의 경우 집단발생한 목장인 경우 대부분의 계류장과 운동장 바닥이 모두 습한 진흙지대인 환경적 특색을 알 수 있었다. *Brucella abortus*의 경우 온도, 햇빛, 산성 등에 약하지만, 12℃ slurry tank에서는 8개월 이상 생존하는 것으로 알려져 있다. 한편, 균체의 성장 중 숙주 방어기작이나 약제에 대해 자신을 방어할 수 있으며 특히 Macrophage에 의해 신속히 탐식은 되지만 lysosome 등의 효소작용에 의한 용균작용에 대하여 저항성을 나타내므로 상유방 임파절을 포함한 신체 모든 세포내에 분포하는 것으로 알려져 있다(Tizard 1982, Cheville et al 1992, Detilleus et al 1990).

예방접종은 생체내에서 면역관련세포의 활성을 자극하여 접종후 자연감염되는 균체에 저항성을 나타내거나 균의 증가를 억제할 수 있는 면역효과를 나타낸다(Confer et al 1985, Corner et al 1981). 즉, brucellosis의 임상증세 발현은 숙주의 어떤 원인에 의하여 면역성이 저하되므로서 발병이 가능할 것이다. 본 예에서 MRT와 TAT에서 양성으로 판정된 소의 면역관련세포의 분포율은 T세포의 숫자가 정상군의 T세포 보다도 월등히 적은 것으로 관찰되었다.

일반적으로 세균들 사이에는 공통 항원성 물질이 많이 함유되어 있기 때문에 혈청응집반응과 같은 경우에는 교차반응이 흔하게 일어난다. 예를 들면, *Escherichia coli* O:116, O:117과 *Francisella turarensis*, *Pseudomonas maltophila*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 등의 세균과 교차반응이 발생하며(Nielson et al. 1980, Stuart & Corbel 1982), 이들 세균에는 lipopolysaccharide somatic antigen의 O chain에 존재하는 N-acetylated 4-amino-4,6-dideoxi-D-manose에 의해서 교차반응이 이루어지는 것으로 알려져 있다. 특히 *Y. enterocolitica* O:9 항원의 경우 교차반응 항체를 감별하는 것은 어려움이 많으나 면역확산법, 면역전기영동법, ELISA 및 RIA

법으로 진단시 감별이 가능한 것으로 보고되어 있다(M J Corbel 1985). 본 예에서는 LPS 항원을 준비하기에 앞서서 먼저 세균의 polypeptide의 특색을 규명하고자 SDS-PAGE와 Western blot, CFT, LAT 그리고 ELISA등을 수행하였음에도 불구하고, 그 동안 우리나라에서 사용되어온 공인진단방법인 MRT와 TAT의 결과를 비교하였던 점은 의미 있는 일이라 생각된다.

앞으로 polypeptide성 물질인 항원 단백질을 SDS-PACE하여 Western blot한다면 Fig 2나 3에서 보았던 것처럼 분자량의 크기로서 25KD에서 85KD까지 나타난 강한 반응대를 나타내지 않을 것이다. 각종 부루셀라 진단에 유용한 항원의 분리 등을 위하여 그 동안 수 많은 연구(Diaz et al 1968, Berman et al 1980, Verstreate et al 1984)가 수행되어 왔고, 특히 *Erucella* 세포벽 외막의 peptidogycan complex로부터 분리한 4개의 주요 물질로서 88, 40, 35.7 그리고 26 kDA이 보고된 바 있고(Sowa et al 1991, 세포막성 물질의 polysaccharide에 대한 연구(Schrig et al 1978, Wong et al 1992)가 가장 상세히 이루어져 있다. SLPS는 *Erucella* strain의 외막에 위치한 immunalominant 항원으로써 감염시 가장 일찍 혈중에 출현한다. 따라서 부루셀라 외막(CMPS)에 대한 10, 16.5, 19, 25-27, 31-34, 36-38 그리고 89kDa에 대한 Mabs는 *Yersinia enterocolitica* O:9이나 E. coli O:157과는 교차반응이 되지 않으며, 특히 *E. abortus*와 *B. melitensis*의 초음파추출항원과 특이적으로 반응되는 주요 물질로는 25-27kDa와 36-38kDa인 것으로 밝혀져 있다. 소의 부루셀라병은 임신우에 있어서 유사산 등 일으키고 감염우의 살처분에 따른 축산농가에서도 역시 매년 막대한 경제적 피해 및 우유의 생산량 감소를 당하고 있다. 역학조사에서 나타난 바와 같이 균주의 분리가 상유방 임파결절에서 분리되고 있어 우유를 경유한 사람으로의 균체감염이 성행을 하던지, 아니면 우유의 살균소독의 결함으로 이 질병의 병원체가 사람으로의 전파가 성립될 우려가 클 것이다. 현재 우리나라에서는 착우유 소에 대한 부루셀라병검색 진단방법으로 MRT(Milk Ring Test), 혈청의 TAT만을 수행하여 판정시 살처분시키고 있으나, 이 2가지 방법에 의한 감염 젖소의 살처분은

양축농가에 막대한 경제적 손실을 끼치고 있는 바, 새로운 진단방법의 보안이 절실이 요구되고 있다. 한편, 소를 포함한 타 가축에 있어서의 부루셀라병 발생 상황의 파악으로 우리나라가 더 이상의 부루셀라병 청정지역으로서의 입지가 불가능하다면 예방용 백신의 생산을 재고해야 될 필요성이 있는 것으로 사료된다.

그러나 자유무역시대를 마지하여 brucellosis 유행지역으로부터의 각종 동물의 국내 유입가능성이 높아지고 있다, 물론 철저한 검역과정으로 어떠한 *Erucella* spp 균주의 국내 침입이 불가능하겠지만, 최근에 들어서 부루셀라병의 발생이 멈추지 않는 것으로 미루어 보아 보다 더 Brucellosis에 대한 강력한 예방대책과 정확한 진단방법의 개발 필요성이 증대되고 있다. 여러 종류의 야생동물(산양, 사슴 등)이 검역과정을 거쳐서 수입되고 있지만 증가되고 있는 수입량의 추세를 고려하건대 앞으로는 예방접종방법에 의한 부루셀라병 근절정책수립의 필요성이 증대될 상황을 고려해야 할 것으로 사료된다. 호주나 뉴질랜드 등과 같은 부루셀라병 유행지역에서는 거의 모든 소에 대하여 예방접종을 수행하고 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 *Erucella abortus* strain 1119-3을 배양하여 얻은 균주로부터 분리한 항원인 nonlipopolysaccharide를 이용하여 예방접종을 실시하여 항체가 잘 형성되었음을 보고하였으며, 이 물질은 세포성 면역형성에 관여한다고 보고하였다. 결국 우리나라에서도 머지 않아서 부루셀라병 예방을 위하해서는 체액성 면역과 세포성 면역을 유발시킬 수 있는 *E. abortus* RB51이나 subunit vaccine과 같은 사람에 비병원성이면서 면역형성이 우월한 항원에 대한 연구가 폭넓게 이루어져야 할 것이다.

부루셀라병은 법정전염병의 하나로서 착유우인 경우 결핵과 더불어서 매년 정기검사를 받도록 규정되어 있으며, 정부의 지원으로 Milk Ring Test와 Tube Agglutination Test 시행을 위하여 항원을 생산, 각 도의 가축위생시험소에 지급하여 국가의 방역관(수의직 공무원)으로 하여금 검색 업무를 수행하도록 법정화되어 있다. 그런데 이 두 가지 검색방법은 screening을 위하여서 오래 전부터

활용되어 왔으나, 그 민감도는 다른 진단방법과 비교하여 떨어지는 것으로 보고하였을 뿐만 아니라, Tube Agglutination Test방법 보다도 정확한 진단방법의 개발 또는 활용 필요성을 강조하게 되었다. 이같은 경향의 brucellosis의 집단발생 예가 5개도(경기도, 충청남•북도, 전라북도, 제주도)의 극히 제한된 지역에서만 발생하고 있어 이 지역에 대한 특별 방제 program의 설정이 필요하다. 왜냐하면, 이 질병의 원인균의 성격상 남부지역(따뜻한 지역)으로 확산 번져 나아갈 경우, 이 균의 성상이 한냉지역보다는 습한 온대지역으로 더욱 더 번져 갈 경우에는 경상남도, 전라남도와 같은 지역에서의 확산기회는 증폭될 것인 바, 지금까지 펼쳐 온 감염 젖소의 발견 즉시 살처분하는 정책만으로는 양축 농가의 경제적 손실을 보상하여 줄 수 없기 때문에 부루셀라병에 대한 정부의 중장기 대책의 활용이 필요하며, 그 운영상에 있어서도 역학적 상황을 고려한 유연성 있는 정책의 수행이 필요하다고 생각된다. 부루셀라병의 진단방법 중에 Milk ring test방법은 우유에서의 항체를 검출하는 방법이지만 혈청학적 진단은 대단위 가축이나 개체 진단에 유효한 진단방법으로 알려지고 있다. 일반적으로 양성으로 판정된 개체는 반드시 CFT나 Enzyme immunoassay방법으로 재검사 하므로서 진단을 확정함이 타당하다고 한다(CIE Manual 1992), 더불어 한우나 미착유우 젖소에 대한 피내반응은 이용한 전국적인 규모의 감염상태를 파악하여 장기 및 예방계획을 세워 나아가야 할 것으로 믿어지는 일련의 연구 결과를 얻었다.

결 론

우리나라에서의 젖소에 있어서 Brucellosis에 의한 양축농가의 경제적 손실 규모가 커짐에 따라서 이의 규모를 최소화하기 위하여 전북, 충남•북, 경기도 지역에서 Milk Ring Test와 Tube Agglutination Test에서 brucellosis 양성 판정을 받은 소를 중심으로 국내 분리균주의 항원성과 면역성, 각종 혈청학적 진단 방법의 특이성과 감수성을 관찰하였으며, brucellosis 감염 양성, 의양성, 그리고 음성인 소를 8두씩 선발하여 면역관련세포의 동태를 파악하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 소에서 분리한 *Brucella abortus*와 *B. melitensis*의 세포막성 물질을 항원으로 SDS-PAGE와 Western blot하였던 바, 국내 분리균인 *B. abortus*의 경우 15KD, 43KD, 49KD, 116KD가 관찰되었으며, *B. melitensis*는 25KD, 26KD, 28KD, 30KD, 40KD, 44KD, 49KD, 62KD, 72.5KD, 76KD, 100KD, 114KD, 170KD 등의 많은 물질을 관찰할 수 있었다. 두 종간의 공통항원으로는 43KD, 49KD, 116KD 였으며 *Brucella* spp에 대한 표준 균주들 역시 많은 항원성 물질이 관찰되었다. 즉, 6KD, 6.5KD, 17KD, 18.4KD, 23KD, 28KD, 29KD, 30KD, 62KD, 94KD 그리고 100KD의 물질이 공통항원물질로서 인정되었다.

2. 국내 Brucellosis 양성 혈청을 이용한 *Brucella* spp(*B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, 그리고 *B. ovis*)에 대하여 교차반응을 나타내는 항원을 함유하고 있었으며, *Yersinia enterocolitica* 항원에 대하여서도 교차반응 항원을 갖고 있었다.

3. 결론적으로 우리나라에서 유행되고 있는 Brucellosis는 매년 그 발병 규모가 커지고 있으면서 집단화되고 있음은 우리나라가 Brucellosis의 상재지역임을 뜻하는 것이며, 진단 대상 동물을 한우를 포함하여 비착유우까지 확대한다면 이의 감염율은 더욱 증가할 것이다. 현재 시행하고 있는 MRT나 TAT검색방

법으로 양성우를 색출하므로서 하는데는 위양성 판정 가능성이 많은 만큼 확인 진단을 위한 진단방법으로서 CFT, ELISA 그리고 LAT가 활용되어야 할 것으로 사료되며, brucellosis의 진단은 착유우로 국한되어 실시하는 만큼, 비착유의 brucellosis 감염사실을 놓치기 쉬운 만큼, 정부의 결핵 검진사업시 Tuberclin과 더불어 brucellin을 함께 사용하므로서 양성 우를 조기에 색출하므로서 근본적인 방역대책을 세워나아가야 할 것이다. 더불어 Brucellosis가 집단 발병하고 있는 유행지역의 소에 대한 예방접종을 실시하는 방역대책을 확고히 수립하여야 할 것으로 사료된다.

제3절 Brucellosis감염 젖소의 면역세포에 대한 연구

서 론

소에 있어서의 brucellosis가 집단 발병하므로서 양축농가에 미치는 경제적 손실 규모가 커짐에 따라 brucellosis의 철저한 진단을 통한 박멸 노력을 기울여야 하겠지만 현실적으로 이의 박멸은 불가능한 것으로 사료되는 바이다. 최근 집단 발병하는 것은 아마도 면역관련세포의 활성 저하와 병원균의 병원성이 강하게 되므로서 발병될 수 있을 것으로 추정된다. 결핵균, 나병, brucellosis 그리고 salmonellosis와 같은 대식세포(macrophage)에서 자라는 세균들은 특징적으로 만성감염증세를 야기시킨다(Cheers & Pagram 1979). 이 같은 세포내에 생존하는 세균으로부터 야기되는 세균증은 이 질병으로부터 회복하던가 아니면 방어능력을 형성하는 T세포가 생산하는 lymphokine에 의하여 좌우된다(Fowles et al 1973). 물론 brucellosis의 예방을 위해서는 항체도 중요한 역활을 한다(Sulitzeanu 1965).

우리나라에서 최근 집단 발병하고 있는 Brucellosis가 만약 면역관련세포의 면역활성이 저하되어 발병되었다면, 그 원인 규명이 중요할 것이며, 나아가서는 면역활성을 촉진시키기 위한 예방접종을 실시하는 방법이다. *Erucella abortus*는 대식세포의 살균력에 대하여 저항하는 예가 있으며, 그 후에는 감염된 대식세포는 그 활력이 저하되는 것으로 알려지고 있어 면역관련세포의 활성 저하는 직접적으로 관련되어 있는 것으로 보고 되고있다(Cheers & Pagram 1979). 즉, 면역관련세포에게 면역을 시킨다면 충분한 세포성 면역을 유지할 수 있을 것이다.

최근 Erucellosis의 집단발병추세가 증가하는 것은 원인 불명이지만 면역관련세포의 균체 침입에 대한 저항력의 감소에 기인할 것으로 사료되어 본 연구에서는 부루셀라 감염 젖소와 정상 소를 대상으로 면역 체계의 변화를 분석하고자

하였다. 이의 분석을 위해 생체내 주요 면역반응세포인 T(CD2, CD5, CD8), B, N 림프구와 MHC-I과 MHC-II 세포들의 분포율을 유세포계측기(flow cytometry)를 이용하여 조사 연구하였다.유세포계측기는 생체표본에서 수천개의 세포(>1,000cells/sec)에 대한 신속한 검색이 가능하고 그 과정중에 개개 세포들의 크기, 형태 그리고 생화학적 또는 항원적 구성상 등 다양한 특성을 개별적으로 또는 통합적으로 분석할 수 있으며 극히 적은 양의 형광물질까지 인지할 수 있어 정확도와 민감도가 대단히 우수하여 다양한 단클론 항체들을 이용한 림프구 표지검색, 세포의 DNA함량을 측정하는 성장주기분석, 망상적혈구수의 측정, 종양단백질의 검출등 매우 다양하게 임상적으로 이용되고 있다.

본 연구에서는 야외 감염소와 비감염우간의 혈중 면역세포의 분석을 위하여 유세포측정기를 이용하여 분석하므로 향후 *brucella* 감염시 생체내 면역세포를 분석하여 면역발현의 기전을 구명하고자 T, B 및 N cell 그리고 MHC-I 과 MHC-II의 분포 비율을 단세포성 항원을 이용하여 각기 산정하므로서 예방백신의 효과판정에 기초자료로서 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 동물 및 시료 채취: 충남지역에서 사육되고 있는 젖소중 부루셀라 감염우 및 비감염우의 혈액을 채혈하여 일반 혈액소견을 관찰한 후 buffy coat를 채취하여 활용하였다.

2. 혈액에서의 림프구 아집단 분포율 조사

(1) 혈액중의 림프구 분리 : 말초 혈액 백혈구(peripheral blood leukocyte;PBL)의 분리는 Davis 등(1987)의 방법으로 실시하였다. 즉 미정맥으로부터 채혈한 혈액과 항응고제인 acid citrate dextrose(ACD ; sodium citrate 22.0gm, citric acid 7.3gm, dextrose 24.5gm, D.W 1,000ml)용액을 3:1의 비율로 혼합하여 잘 섞은 다음, 1,500rpm에서 30분간 원심분리하였다. Buffy coat층

을 채취한 후 36℃로 가온한 0.87% tris-buffered ammonium chloride(tris-NH_4Cl ; 0.01M tris, pH 7.2)용액과 혼합하여 37℃ 항온수조에 넣어 약 5분간 적혈구을 용혈시켰다. 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 pellet을 phosphate buffered saline(PBS ; sodium chloride 7.6gm, disodium phosphate 1.2688g, monosodium phosphate 0.1g, monopotassium phosphate 0.2113g, pH 7.2)과 ACD용액을 9:1로 혼합한 PBS-ACD buffer로 2회 정도 원심 세척하였다. 마지막 원심 후 pellet은 RPMI 1640(Sigma)배지에 부유시킨 뒤 Histopaque(비중 1.083, Sigma)에 중층시킨 후 1,500rpm 으로 20분간 원심분리한 다음 Histopaque과 혈장과의 경계면에서 림프구를 채취하였다. 분리된 림프구는 PBS로 3회 세척하여 PBS에 보유시킨 다음 tryphan blue exclusion technique에 의해 생존 세포수를 측정한 후 최종 농도가 1 x 10^7/ml 정도로 조절하여 이용하였다.

(2) 림프구 아집단 검사용 단크론 항체 : 미국 워싱턴주립대학교 수의과대학 단크론항체센터로부터 분양받은 anti-T cell, anti-B cell, anti-N cell에 대한 단크론항체와 식물성 유래의 Concanavalin A(Con A) mitogen의 자극에 의해서 활성화된 세포(activated cell;ACT)에 특이적으로 반응하는 단크론항체인 anti-ACT 등 총 7종을 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. Monoclonal antibodies specific to bovine leukocyte differentiation molecules used to define the composition of leukocyte subpopulations from peripheral blood and mammary gland secretions.

Molecules1	MAb2	Isotype of MAb	Cell type3
BoCD2	BAQ95A	IgG1	T
BoCD4	CACT138A	IgG1	T helper,inducer
BoCD8	CACT80C	IgG1	T cytotoxic,suppressor
surface IgM	PIG45A	IgG2b	B
N12	CACT61A	IgG1	nonT/nonB
ACT2	CACT26A	IgG1	N and activated BoCD8
ACT3	CACT114A	IgG2b	N and activated BoCD4

1 Molecules = Bovine leukocyte differentiation molecules.
2 MAb = Monoclonal antibodies which specifically react with leukocyte differentiation antigen. 3 Cell type = Cells expressing molecules.

(3) **형광세포 유출장치 분석**(flow cytometry analysis) : **림프구 아군별 분포율 분석은** Davis **등**(1990)**의 방법에 준해서** flow cytometry**를 이용하여 실시하였다**. **즉** conical bottom microplate**의 한** well**당 단크론항체** 50㎕(15㎍/ml)**를 단일 염색을 위해서는** 1**종만 넣고 이중염색을 위해서는** 2**종을 함께 미리 넣은 다음 여기에 혈액에서 분리한** 1 x 10⁷/ml**의 림프구를 첨가한 후** 4℃**에서** 30**분간 감작시킨 다음** 4℃**의** first washing buffer (PBS 450ml, ACD 50ml, 20% NaN3 5ml, gamma globulin free horse serum 10ml, 250mM EDTA 20ml, 0.5% phenol red 1ml)**로** 3**회 원심**(2,000 rpm, 3**분**, 4℃) **세척한 후 상층액을 버리고 밑부분에 모인 백혈구의** pellet**을** plate **또는** vortex mixer**를 이용하여 부유시켰다**. **부유된 백혈구은** secondary antibody**로 단일염색을 하기 위하여**

fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody(caltag, Lab, Inc, south san Franeisco, U.S.A)를 200배 희석한 후 각 well에 100㎕씩 첨가하고, 이중염색을 위해 각각 사용된 단크론항체의 Ig isotype와 일치하는 FITC 또는 R-phycoerytherin(PE)-concugated goat anti-mouse isotype-specific antibodies (IgM, IgG1, IgG2a 또는 IgG2b;Caltag Lab., Inc)를 약 150배로 희석한 후 각각 50ul/well가 되도록 가하였다. 이를 다시 4℃에서 30분간 감작시킨 다음 4℃의 secondary washing buffer(first washing buffer 성분 중 horse serum만 제거한 것)로 3회 원심 세척한 다음 2% PBS-formalin(38% formalin 20ml, PBS 980ml)용액을 200㎕/well가 되도록 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사때까지 모두 냉암소(4℃)에 보관하였다. 염색이 완료된 재료는 flow cytometer를 이용하여 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성 반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 Becton Dickinson사의 Consort 32 컴퓨터 및 Lysys II program을 이용하여 실시하였다.

Table 2. Monoclonal antibodies specifically reactive with bovine leukocyte differentiation antigens.

specificity of monoclonal antibodies *	Monoclonal antibodies **	Cell type ***
MHC class I	H58A	All nucleoted 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
IL-2 receptor	CACT16A	T helper cell
G	CH138A	Granulocyte
G+M	DH59B	Granulocyte + Monocyte

* Bovine leukocyte differentiation molecules.

** Monoclonal antibodies that specifically react with leukocyte differentiation antigen. *** Cells expressing molecules.

결 과

1. 실험에 사용된 젖소에 있어서의 총적혈구수, 총백혈구수, 임파구수, 혈소판수 그리고 적혈구 용적비율 등의 혈액학적 소견은 전반적으로 정상적인 정상 혈액치의 범주에 포함되어 있었다

2. Brucellosis로 양성 판정된 소의 각 면역관련세포의 분포율은 Table 3과 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 즉, T 세포의 분포율은 33.2%이었으며, 임파구 아군별 분포 양상은 CD2, CD4 그리고 CD8의 분포율은 19.1%, 4.3%, 그리고 9.8% 였으며, B 세포는 19.6%, N세포는 30.5%, MHC-Class I 그리고 MHC-Class II는 91.8%와 24.1%로 각각 관찰되었다. Brucellosis 의양성 판정된 소에 있어서 T 세포의 비율은 77.3%인데 임파구 아군별 분포 양상은 CD2, CD4 그리고 CD8는 40.3%, 13.9% 그리고 23.1%로 관찰되었으며, B 세포는 25.8%, N 세포는 24.8% 그리고 MHC-Class I과 MHC-Class II는 94.9% 그리고 22.2%로서 나타났다. 음성인 소에 있어서는 T 세포의 비율은 99.5%이었으며, 임파구 아군별 분포 양상은 CD2, CD4 그리고 CD8는 51.8%, 29.8% 그리고 17.9%로서 관찰되었으며, B 세포는 11.9%, N 세포는 94.3%, MHC-Class I과 MHC-Class II는 94.3%와 15.9%로 관찰되었다. 이상의 성적으로 미루어 보아 brucellosis에 감염된 소에 있어서 T 세포의 비율이 현저히 낮게 측정되었고 임파구 아군에 있어서도 CD2가 가장 낮게 측정됨으로서 일반적으로 세포매개성 면역능이 음성우에 비하여 현격하게 떨어진 것을 확인하였고, 또한 체액성 면역에 관련된 B cell의 분포는 양성우에서 다소간 상승되었으나 그 변화가 양성군과 음성군에 있어서 T cell의 변화에 비하여 큰 차이를 나타내지는 않으므로 *brucella* 감염시 생체내 방어기전은 주로 세포성 면역에 의함을 확인할 수 있었다. 한편, T 림프구에 의한 면역조절시 MHC class I과 MHC class II의 본래 기능이 복잡한 생물학적 활성기전에 의해 B세포 표면 면역글로불린의 idiotype을 인지하는 등 각종 면역반응을 증폭시키는데 필

수적인 요인이므로 주의깊게 관찰하였던 바 특히 MHC class I항원의 분포는 양성우에 비하여 음성우에서는 상승된 반면 MHC class II항원은 감소됨을 관찰할 수 있었다.

Table 3 Brucellosis 감염 젖소의 면역세포의 분포

구 분	T 세포			B 세포	N 세포	MHC-Class I	MHC-Class II
	CD 2	CD 4	CD 8				
양성우(n=3)	19.1	4.3	9.8	19.6	30.5	91.8	24.1
의양성우(n=3)	40.3	13.9	23.1	25.8	24.8	94.9	22.2
음성우(n=3)	51.8	29.8	17.9	11.9	20.2	94.3	15.9

음성인 소의 면역관련세포의 특색을 관찰하였던 바, 총 T 세포의 비율은 양성우, 의양성우 그리고 음성인 경우는 33.2%, 77.3% 그리고 99.5%이었으나, B 세포인 경우는 19.6%, 25.8% 그리고 11.9%로서 나타났다. 특히, T 세포중 CD4는 타 면역관련세포의 분포보다도 월등히 낮게(4.3%) 관찰됨으로서 Brucellosis에 감염된 소의 면역활성 능력이 저하되어 있음을 밝힐 수 있었다. 음성인 경우에 있어서의 CD2는 제일 높게(51. 8%) 관찰되므로서 면역관련세포의 활성도에 따라서 양성으로의 전환에 차이가 있을 것으로 기대되었다. 그렇지만 MHC-Class I이나 II는 큰 차이를 보여주고 있지 않았다.

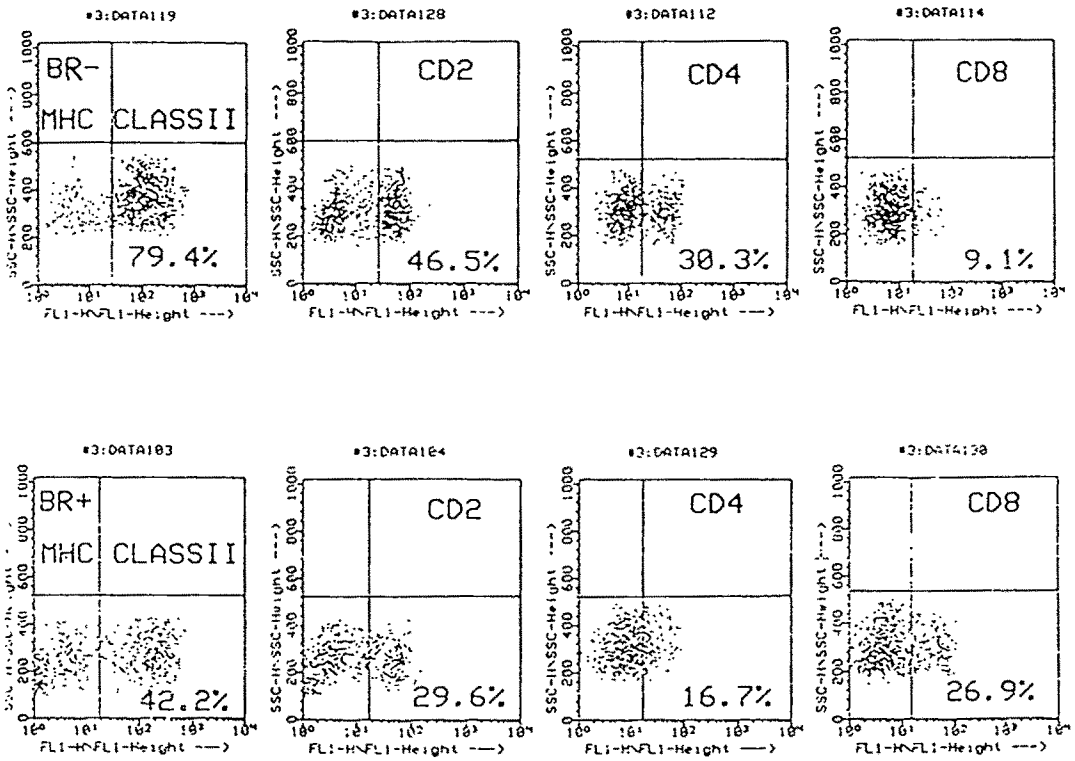

Fig. 1. Representive dot plot profile of peripheral blood leukocytes from brucellosis-positive and negative cattle using monoclonal antibodies specicifically reactive with MHC Class II BoCD2, BoCD4 and BoCD8 antigens, respectively.

고 찰

부루셀라병은 소, 산양, 염소, 개 등에 널리 분포되어 있는 인수공통전염병으로서 사람에 있어서 이 질병은 피부염, 관절염, 무기력을 야기시킨다(Ariza et al 1989; Berger et al 1981). 이 질병은 동물과 동물사이를 전파시키며, 전 집단 군에서 신속히 그리고 적극적으로 검진되어야 하는 질병으로서 중요시되고 있다(Yinnon et al 1993, Zimmerman et al 1990). 소, 면양, 염소 등 암컷의 번식기계와 reticuloendotherial tissue에 감염되며(Cheers et al 1979, Jiang et al 1993), 그리고 태아나 태자에 감염되었을 경우 유산을 일으켜 경제적 손실을 야기시키고, 또한 사람에 감염되면 불규칙적인 발열과, 발한, 만성인 경우에는 무기력, 복통, 피부 발적, 관절통, 위장염, 두통 등의 신경증세를 나타낸다(Kerr et al 1966, McLean et al 1992). 전파는 주로 유산 태자나, 태물질 등과의 접촉에 의하여 이루어지며, 우유을 소독하지 않았을 경우 그리고 감염동물의 배설물을 통한 공기감염에 의하여 이루어 질 수 있다(Hausler 1972).

우리나라에서의 부루셀라병은 1956년에 미국에서 도입한 젖소군에서 처음 발생보고(박 등 1959)가 있은 이래 지속적으로 발생하여 최근에는 국내 축산업 농가에 막대한 경제적 손실을 주고 있으며, 60년대 1%의 발생을 보이다가 70년대에는 거의 발생보고가 없었으나, 80년대에 이르러 전면적 검진사업에 의한 추적조사의 결과 0.2% 수준에 감염사실이 밝혀지게 되었으며, 1990년대 이후에는 매년 약 500여두에서부터 900여두의 젖소가 Brucellosis에 기인되어 살처분되므로서 실제적인 손실액만도 매년 수십억원에 달할 것으로 추정되며 정부의 이에 대한 보상액만도 매년 10억원을 사용하고 있는 실정이다(가축전염병발생현황 1997).

*Brucella abortus*의 경우 온도, 햇빛, 산성 등에 약하지만, 12℃ slurry tank에서는 8개월 이상 생존하는 것으로 알려져 있다. 한편, 균체의 성장 중 숙주 방어기작이나 약제에 대해 자신을 방어할 수 있으며 특히 Macrophage에 의해

신속히 탐식은 되지만 lysosome 등의 효소작용에 의한 용균작용에 대하여 저항성을 나타내므로 상유방임파절을 포함한 신체 모든 세포내에 분포하는 것으로 알려져 있다(Tizard, 1982, Cheville et al 1992, Detilleus et al 1990).

선진국의 경우 부루셀라병이 유행하고 있는 지역에서는 *B. abortus* strain 19 등의 생균, 사균등을 이용한 예방접종 program을 활용하고 있다.

백신의 접종은 임신말기의 경우를 제외하고 유산의 피해는 없는 것으로 알려져 있다. 그러나 백신 접종부위의 부종, 고열, 식욕감퇴, 쇠약 및 유량의 일시적 감소 등의 단점이 보고된 바 있다(Tizard 1982). 또한 문제가 있다면 예방접종하여 형성된 항체가 자연감염되어 형성된 항체인지가 구분되지 않는 것이 문제점으로 대두되었다. 이같은 결점을 보안할 수 있는 *Erucella abortus* RB 51의 균주가 발견되어 소에게 예방접종하여 그 면역효과를 얻을 수 있었다(Bagus et al 1994, Schrig et al 1991). 예방접종은 생체내에서 면역관련세포의 활성을 자극하여 접종 후 자연감염되는 균체에 저항성을 나타내거나 균의 증가를 억제할 수 있는 면역효과를 나타낸다(Confer et al 1985, Corner et al 1981). 우리나라에서의 소의 면역관련세포 T세포, B 세포, N 세포등의 분류가 이루어진 바 있으며(문 등 1996b), 본 연구에서는 야외 감염소와 비감염우간의 혈중 면역세포의 분석을 Davis et al(1990)의 방법으로 cytoflow meter에 의해 분석하므로서 부루셀라병의 발병후 각종 면역반응관련세포의 변화를 관찰하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 감염이 않된 세포와 비교하여 월등히 낮은 점을 고려하건데 이들 면역세포의 활성은 높지만 면역능력은 향상시킬 수 있는 것으로 기대가 되었다. 즉, brucellosis의 임상 증세 발현은 숙주의 어떤 원인에 의하여 면역성이 저하되므로서 발병이 가능할 것이다. 본 예에서 MRI와 TAT에서 양성으로 판정된 소의 면역관련세포의 분포율은 T세포의 숫자가 정상군의 T 세포 보다도 월등히 적은 것으로 관찰되었으며, 이 같은 결과는 일찍이 Mackaness(1964)가 T세포의존 세포성 면역이 부루셀라에 대한 생체 저항의 주된 역할을 한다는 주장과 일치하며, Pavlove et al(1982)은 지연성 과민반응력과

helper/inducer 중재에 관련되는 것이 Ly-1+ 2+ T lymphocyte인 것으로 보고하였다. 또한 Roger et al(1990)은 T 림파구를 장시간 배양하면서 분화과정에 따른 세포막 활성부위의 marker를 ILA 26, B26A 및 BAQ82A 등의 T lymphocyte 표면 표지 단큰론 항체와 BAQ44A와 BAS9A(B cell marker)로서 각각 분석한 결과 *Erucella*균체 반응시 면역세포의 활성은 주로 T lymphocyte가 활성화됨을 ILA 26, B26A 및 BAQ82A 등의 반응으로서 확인할 수 있었다. 일반적으로 이 같은 면역관련세포의 작용에 기인하여 질병의 감염에 대한 혈청학적 진단시 그 결과에 약간의 차이가 있는 것으로 알려지고 있다(Greene et al 1993). 부루셀라병에 있어서 혈청학적 검사방법들의 결과를 비교시에는 상호간의 일치율은 상당히 차이가 있는 것으로 알려진 바(김 등 1982; Lambert et al 1962)와 같이 본 예에서도 TAT에서 양성으로 판정 살처분된 예의 혈청을 이용하여 ELISA와 CFT에서 약 81.5%와 73.8%의 일치율을 나타내고 있었다.

자연계 동물이나 사람의 면역관련세포에 대한 연구는 최근에 광범위하게 이루지고 있다. T 림프구는 항원을 인지할 때 B 림프구와는 달리 주조직적합체(MHC)분자의 제한을 받으며, α와 β사슬이 disulfide 결합에 의해 이종이합체(heterodimer)로서 존제하고 적어도 γδεζη등 5개의 사슬로 이루어진 CD3 복합체가 비공유결합으로 이종이합체와 연관되어 존제한다. 본 실험에서 MHC class II가 양성우에서 24.1%인 반면 음성우에서는 15.9%로 양성우에서 상승되게 관찰 된 것은 CD4+ T림프구가 다른 세포의 표면에 있는 MHC class II에 결합되어 있는 peptide를 인지하는 성질에 일치하는 결과이고, MHC class I는 CD8+ T 림프구는 CTL(cytotoxic T lymphocyte)의 표적세포 표면에 있는 class I 분자에 결합되어 있는 펩타이드를 인지한다.

즉, 질병감염에 대한 면역반응세포의 변동, 초유에 대한 면역관련세포의 출현 등이 있다. 특히 부루셀라병의 집단발병은 면역체계의 약화와 긴밀한 관계가 있어 면역반응의 중추 역할을 하는 임파세포 T, B, N 림프구의 역할을 짐작하게 할 것이며, 임파구중 T세포는 CD2, CD5, CD6의 표면 특이 항원을 공통으로

가지고 있으며 CD4나 CD8을 선택적으로 하나 더 소유하고 있다. B 림프구는 표면에 면역글로불린(sIgM)과 B 림프구 특유의 표면 항원(CD19, CD20, CD21 등)을 소유함으로써 구별된다. 또한 최근 그 기능 및 역할에 있어서 괄목할 만한 연구가 집중되고 있는 N 림프구는 양에서 Non T/Non B 세포(N세포)로 구별되어 표현되기 시작한 후 젖소 및 면양에서 CD4/CD8 복합 음성세포 또는 공(null) 세포로 명명되었다. 그 뒤 N 세포는 γδ T cell recepter(TCR1 ; WC1) 와 CD3, CD5 표면항원을 소유하고 있음이 알려졌으며, 그중 TCR1+ WC1+ 림프구는 αβ TCR을 공유하면서 CD3, CD5 항원을 가지고 있지만 CD2와 CD6 항원은 소유하지 않는 것으로 밝혀졌다. 한편 TCR1+ WC1- 림프구는 CD5이외에 CD2와 CD8 표면항원을 갖고 있는 세포로서 흉선이나 비장에서는 거의 찾아볼 수 없고 주로 상피 세포에 많이 존재함이 밝혀졌다.

Brucellosis감염 소의 면역세포 분포율을 cytoflower meter로 조사하였던 바, 표 1 에서 보는 바와 같이 brucellosis 감염우는 면역세포 중 T cell의 분포율이 낮았고, 특히 T helper cell인 CD4 Cell 의 분포가 음성 소보다도 월등히 낮게 관찰되었다. 즉, 이 질병의 발병 예방은 면역기능세포의 활성을 인위적으로 꾀할 수 있다면 예방이 가능할 수 있을 것 같은 단서를 얻었다. 우리나라에서 부루셀라병 감염 젖소의 숫자가 증가함은 물론 단일 목장에서 집단적 발생하고 있어 그 피해가 점차 커지고 있는 실정이다. 집단적으로 부루셀라병의 발생의 증가 요인으로서 젖소에 있어서 면역형성 저하기전과 병원체의 병원성 등을 들 수 있다. 1995년 제주도와 충청남도 지역에서 발병하여 살처분 되는 젖소 8두와 의양성으로 판정받은 소의 면역세포 분포조사는 이 질병을 이해하는데 큰 보탬이 되리라고 사료되는 바, 이에 각 종 면역세포 단크론 항체를 이용하여(Davis et al 1987) 그 분포율을 조사하였던 바, 감염된 소의 면역세포 즉, CD2, CD4 그리고 CD8의 분포율이 정상 젖소의 분포율과 큰 차이를 나타내고 있음을 알 수 있었다. 이같은 면역조절세포의 기능저하는 *brucella* spp의 감염에 따른 면역세포의 생성에 어떤 영향을 미치지 않았는가라고 생각되는 일

련의 결과를 얻었다. 표준 *Brucella abortus*나 야외 독성균주의 면역원은 lipopolysaccharide(LSP)의 O-side chain이며, 이에 의하여 형성된 항체를 찾아내는 진단이 표준실험관응집반응이다(Schurig 1991). 이 균주의 변형주는 O-side Chain량의 감소와 더불어 *B. abortus* RB51을 소에게 예방접종하였을때 형성되는 항체의 형성을 억제하여 card test나, CFT, 형광면역검사방법에서 검출되는 항체를 형성하지 않는 것으로 보고되고 있어 흥미를 가져다준다(Schurig et al 1991, Cheville et al 1992, Stevens et al 1994). Kunkle et al (1996)은 *Erucella abortus* RB51과 strain 19을 예방접종(생균 1 X 10^10)한 소의 상경피림파절(Superficial cervical lymph nodes)의 T lymphocytes subpopulation을 형태학적으로 관찰하였던 바, 각 균주와 대조군 사이에 있었서의 CD4, CD8 그리고 γδ lymphocyte를 image analysis software를 이용하여 그 숫자나 상대적 분포 정도를 관찰하였던 바, 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다. 3개의 T cell subset의 분포에 있어서의 통계학적으로 유의적인 차이가 있으며(P=0.001) CD4 세포는 가장 유사하였다. 이 같은 결과는 lymphocyte의 감소를 주장하고 있는 다른 연구들에서 예방접종 *Brucella abortus* Strain에 의한 감염의 결과로 발생하는 것은 아님을 뜻한다.

본 연구의 목적은 Brucellosis에 감염된 젖소의 주조직적합체 및 백혈구 표면항원 특이 단크론항체와 flow cytometry을 이용하여 백혈구 아군별 분포율을 비교조사하고, 시험관내 림프구 유약화반응에 의한 림프구 증식성을 비교함으로써 부르셀라 감염시 체내 면역학적 특이성을 밝히게 되었다. 즉, 부루셀라병 감염소의 면역세포 분포율을 flow cytometry로 조사하였던 바, Table 1에서 보는 바와 같이 brucellosis 감염우는 면역세포 중 T cell의 분포율이 비감염우에 비하여 33.3%정도로 낮았고, 특히 T helper cell인 CD4 Cell의 분포가 음성 소보다도 월등히 낮게 관찰되었다.

부루셀라병은 법정전염병의 하나로서 착유우인 경우 결핵과 더불어서 매년 정기검사를 받도록 규정되어 있으며, 정부의 지원으로 Milk Ring Test와

Tube Agglutination Test 시행을 위하여 항원을 생산, 각 도의 가축위생시험소에 지급하여 국가의 방역관(수의직 공무원)으로 하여금 검색업무를 수행하도록 법정화되어 있다. 그런데 이 두가지 검색방법은 screening을 위하여서 오래 전부터 활용되어 왔으나, 그 민감도는 다른 진단방법과 비교하여 떨어지는 것으로 보고하였을 뿐만 아니라, tube agglutination test방법 보다도 정확한 진단방법의 개발 또는 활용 필요성을 강조하게 되었다. 이같은 경향의 brucellosis의 집단 발생 예가 5개도(경기도, 충청남•북도, 전라북도, 제주도)의 극히 제한된 지역에서만 발생하고 있어 이 지역에 대한 특별 방제 program의 설정이 필요하다. 왜냐하면, 이 질병의 원인균의 성격상 남부 지역(따뜻한 지역)으로 확산 번져 나아갈 경우, 이 균의 성상이 한냉지역보다는 습한 온대지역으로 더욱 더 번져 갈 경우에는 경상남도, 전라남도와 같은 지역에서의 확산기회는 증폭될 것인 바 지금까지 펼쳐 온 감염 젖소의 발견 즉시 살처분하는 정책만으로는 양축농가의 경제적 손실을 보상하여 줄 수 없기 때문에 부루셀라병에 대한 정부의 중장기 대책의 활용이 필요하며, 그 운영상에 있어서도 역학적 상황을 고려한 유연성 있는 정책의 수행이 필요하다고 생각된다.

결 론

우리나라에서 젖소의 Brucellosis에 의한 양축농가의 경제적 손실 규모가 커짐에 따라서 이의 규모를 최소화하기 위하여 전북, 충남•북, 경기도 지역에서 Milk Ring Test와 Tube Agglutination Test에서 brucellosis 양성 판정을 받은 젖소를 중심으로 brucellosis 감염양성, 의양성 그리고 음성인 소를 8두씩 선발하여 면역관련세포의 동태를 파악하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

음성인 소의 면역관련세포의 특색을 관찰하였던 바 총 T세포의 비율은 양성우, 의양성우 그리고 음성인 경우는 33.2%, 77.3% 그리고 99.5%이었으나, B세포인 경우는 30.5%, 24.8% 그리고 20.2%로서 나타났다. 특히 CD4는 타 면역관련세포의 분포보다도 월등히 낮게 관찰됨으로서 Brucellosis에 감염된 소의 면역활성능력이 저하되어 있음을 밝힐 수 있었다.

제4절 한우에 있어서 불활화된 *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* 그리고 *Yersinia enterocolitica*에 의한 면역반응 관찰

서 론

부루셀라병은 소, 돼지, 양, 말, 개에 발병할 뿐만 아니라 사람에 전염되는 인수공통전염병으로서 가축에 감염되면 유산 및 불임이 유발되며, 사람에서는 Malta fever 및 파상열로도 불리며 관절염, 오한, 골수염, 고환염, 피부염 등을 일으킨다(Berger *et al*. 1981, Lambert *et al*. 1962). 소의 부루셀라병은 유산이나 불임 이외에는 특이한 임상적 증상이 없기 때문에 임상적으로 감염 유무를 판단하기 어려울 뿐만 아니라 감염경로는 생식기, 호흡기, 피부 등 다양하여 질병의 전파를 억제시키기 위한 효과적 차단방법 확정이 어려운 실정이다 (Beran et al, 1994).

젖소에 있어서 부루셀라병에 대한 역학적 조사, 원인균 분리(김 등, 1988; 우&서, 1986), 그리고 혈청학적 진단연구가 보고된 바 있으며 최근에는 자연 감염된 젖소의 면역혈청을 이용한 항원•항체의 면역반응에서 지역별로 차이가 있음을 보고한 바 있지만(백 등, 1997a) 한우에 대해서는 발병보고나 혈청학적 진단방법에 대한 연구내용을 접하기가 용이하지 않았다. 결국, 우리나라에서 사육되고 있는 젖소와 한우에서의 이 질병의 완전한 근절을 위해서는 현재 수행되고 있는 검진 대상이 착유우 이외에도 비육우와 한우까지 확대되어야 방제 사업의 효과를 가져오리라 생각된다. 본 연구는 한우에 *B. abortus* 1119-3, *B. melitensis* biotype 2 및 *Y. enterocolitica* O:9을 인공면역시킨 후 형성된 항혈청을 이용하여 western blot, TAT, CFT, LAT, ELISA 등의 진단방법으로 한우에 있어서 *B. abortus*와 *B. melitensis* 그리고 *Y. enterocolitica* 항원에 대한

면역반응을 혈청학적으로 비교 관찰하였다(문 등 1996b, Chappel *et al*. 1978, Dohoo *et al*. 1986). 또한 *Yersinia enterocolitica* O:9는 부루셀라 균주들과 강한 혈청학적 교차반응을 일으키는 것으로 알려져 있어(Nielson et al., 1996) 이와의 관련성을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. *Brucella* spp 및 *Yersinia enterocolitica* 배양과 항원의 준비

수의과학연구소로부터 *E. abortus* 1119-3과 *E. melitensis* biotype 2를 구입하여 Brucella agar(Difco)에서 48시간 배양한 후, Brucella broth(Difco)에서 37℃, 72시간 배양시켰다(Ewalt 1989). *Yersinia enterocolitica* O:9은 nutrient agar(Difco)에서 48시간 배양 후 nutrient broth(Difco)에서 25℃, 72시간 배양시켰다. 배양한 세균을 80℃에서 90분간 불활화(CIE 1992)시킨 후 4℃에서 30분간 원심분리하여(4,000g) 침전된 세균을 수거한 후, 멸균 PBS(pH 7.2)로 6회 세척 후 본 시험에 항원으로서 사용하였다.

2. 공시 동물

동일한 조건하에 집단 사육 중인 한우중 생후 24개월령의 Tube agglutination Test(TAT)과 CFI(Complete Fixation Test)등의 방법으로 부루셀라병 음성인 한우 6두를 공시 동물로 선발하여 사용하였다.

3. 항원 접종

배양한 균주를 원심분리(3000rpm/20min)하여 침전물을 PBS(pH 7.2)로 10% 되게 부유시키고(10.88㎎/㎖) 이 부유액 1.5㎖에 동량의 complete freund's adjuvant로 유탁액을 만들었다. 각각의 균주 유탁액 3㎖를 공시 동물 6두에 각

각 1차 피하접종하였다. 2차 접종은 1주일 후에 동량의 incomplete freund's adjuvant로 유탁액을 만들어 각각의 균주 유탁액 3㎖를 공시동물 6두의 액와 부위에 피하접종하였다. 3차 접종은 1주일 후에 adjuvant를 사용하지 않고 균 부유액 1.5㎖ 만을 피하접종하여 고 면역시켰다(Cheville *et al*. 1993, Chin *et al*. 1989).

4. **채혈**

공시 혈청은 접종 전에 채혈한 후 항원 접종 때마다 3차에 걸쳐서 채혈하여 혈청을 분리, 실험에 사용하였다.

5. SDS-PAGE 및 Western blot

Erucella abortus, *E. melitensis* 그리고 *Y. enterocolitica*를 배양, 65℃에서 60분간 불활화 시킨 후 원심분리(3,200rpm)하여 침전된 세균을 수거한 후, ice bath내에서 120w, 20분간 초음파 분쇄한 후에 원심분리(20,000×g, 20분, 4℃)하여 침전된 균체 분쇄물을 생리식염수로 10회 세척한 후 sodium dodecyl sulfate를 0.01%되게 용해하여 30℃에서 1시간 방치한 다음 원심분리(60,000×g, 20분)하였다. 얻어진 상층액을 취하여, 백 등(1997a)의 방법에 준하여 SDS-PAGE한 후 purified affinity goat phosphatase anti-bovine IgG (1:1000)을 이용하여 Western blot을 실시하였다.

6. Tube agglutination test(TAT)

TAT 방법으로 인공 면역시킨 항원에 대한 각 균주의 혈청내 항체 역가를 측정하였다. 즉 4개의 10ml 시험관에 가검 혈청을 80㎕, 40㎕, 20㎕, 10㎕씩 각각 가하고, 여기에 *E. abortus* 1119-3 균주를 배양하여 만든 부루셀라병 진단용 항원액(수의과학연구소)을 멸균된 생리식염수에 0.5% phenol을 가하여 만든 phenol-saline을 이용하여 1:100으로 희석한 후, 각각의 시험관에 2ml씩 분주

혼합한 후 37.5℃에서 48시간 방치한 후 응집정도를 혈청 희석 배율별로 관찰하였다.

7. Complement fixation test(CFT)

Erucella spp 접종 후 항체 역가를 측정하기 위한 방법의 일환으로 USDA(1986)과 백 등(1997b)의 방법에 준하여 다음과 같이 보체결합반응을 수행하였다. 즉, microplate의 각 well에 가검 혈청을 1:10-1:160까지 25㎕씩 단계 희석하고, 각각의 well에 항원의 농도 결정에 의해 희석된 항원액 25㎕와 1¼ unit로 희석된 보체액 25㎕를 가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 여기에 결정된 용혈소액과 동량의 3% 면양 적혈구를 혼합하여 실온에서 15분간 감작시킨 감작 적혈구액 50㎕를 가하여 잘 섞은 다음, 37℃에서 15분간 반응시킨 후 이를 다시 섞어 주고 15분간 재 반응시킨 후 용혈 여부를 관찰하였다

8. Latex agglutination test(LAT)

Brucella 항원 접종에 대한 항원·항체의 응집정도를 측정하기 위하여 허(1997)의 방법에 준하여 latex bead를 사용 항체 역가를 측정하였다. 즉, *B. abortus*, *E. melitensis*, *Y. enterocolitica*을 80℃에서 90분간 열처리하여 균체를 불활화시킨 후 초음파 분쇄한 후 세척하였고 4000×g/30min, 4℃에서 멸균 PBS(pH 7.2)로 6회 원심분리하여 세척 후 침전물을 단백량 PBS(pH 7.2)를 이용하여 1:5의 농도가 되도록 희석하여 -20℃에 보관하여, 이를 라텍스에 결합시키는 항원으로 사용하였다. 직경 1.07㎛의 polystyrene latex beads(Sigma Co.)에 감작시키기 위하여 서 등(1993 & 1995)의 방법으로 항원 완충액(0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.0)을 이용하였으며, 항원을 latex beads에 감작시킨 후에 bovine serum albumin(BSA, Fraction Ⅴ, Sigma Co.)이 0.5%가 되도록 첨가하여 안정화시켰다. 혈청은 혈청 희석액(BSA 0.5%, 300mM NaCl과 Tween 20을 0.01%되도록 함유한 0.1M Tris-HCl buffer, pH 7.4)을 사용하였다. polystyrene latex bead

부유액을 4,000×g 20분간 원심 세척한 다음, 다시 이 완충액을 이용하여 2%(w/v)의 부유액을 조제하였다. 2.0% 항원과 2.0% latex beads액을 24 : 1이 되게 가한 후 37℃, 60분간 감작킨 후 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 혈청 희석용 완충액을 25㎕씩 microplate에 분주한 다음 가검혈청 원액 50㎕를 가한 후 1:2에서 1:512배까지 각각 25㎕씩 2배수로 단계 희석한 후, 항원이 감작된 latex bead 진단액을 각 well에 25㎕씩 분주하여 가볍게 진탕시킨 후 실온에서 60분간 방치 후 응집역가를 측정하였다.

9. ELISA

Erucella spp와 Y. *enterocolitica* 항원을 접종한 후 항체 형성 정도를 관찰하기 위해 임 등(1995b)의 방법에 준하여 ELISA를 수행하였다. 즉, *Erucella abortus*, *E. melitensis*, Y. *enterocolitica*를 배양한 다음 선택 broth(Difco Co.)를 이용하여 37℃로 72시간 증균시키고 냉아세톤(-20℃)을 이용하여 4℃에서 18시간 처리하였다. 침전된 균체를 회수한 후 생리식염수를 이용하여 10회 세척한 후 균 부유액을 10%(w/v)가 되도록 조정하였다. 이를 얼음수조내에서 초음파 분쇄(120W/20분)한 후 균체 액을 4℃에서 20,000×g로 20분간 원심분리하여 균체 물질을 얻었다. 생리식염수를 이용하여 다시 10회 세척한 후 0.01% sodium dodecyl sulfate에 부유하여 30℃에서 1시간 방치한 다음 60,000×g로 20분간 원심분리하여 세포막성 항원물질인 상청액을 얻었으며, 단백질 정량 kit(Bio Rad Co.)를 이용하여 항원의 단백질량을 4㎍/㎖로 하여 ELISA를 수행하였다(Jagannath *et al*. 1989, 임 등 1993).

결 과

1. Western Blot에 의한 *Brucella* spp 및 *Y. enterocolitica* 항원의 면역반응

Brucella abortus 1119-3, *B. melitensis* biotype 2, *Y. enterocolitica* O:9을 항원으로 하여 SDS-PAGE한 후 각 항원에 대한 항혈청을 이용하여 western blot방법으로 면역반응시킨 후에 관찰하였던 바, *B. abortus* 항원에 대한 각각의 항혈청을 이용한 western blot 결과로 Fig. 1에서와 같이 *B. abortus* 항혈청의 경우에는 2주 이후에 5 42KD 사이의 범위에서 확인할 수 없을 정도로 많은 band가 관찰되었고 3주 이후에는 64KD까지 그 범위가 확대되었다. *B. melitensis* 항혈청의 경우에는 2주 이후에 5 42KD 사이에서 많은 band가 관찰되었고 *Y. enterocolitica* 항혈청의 경우에는 반응이 미약했으나 42KD에서 2주 이후에 새로운 반응대가 출현하였다. Fig. 2는 *B. melitensis* 항원에 대한 각각의 항혈청의 결과이다. *B. abortus* 항혈청에서는 16KD, 64KD에서 *B. melitensis* 항혈청에서는 50KD, 54KD에서 *Y. enterocolitica* 항혈청의 경우는 16KD에서 각각 증가된 반응대가 관찰되었다. Fig. 3은 *Y. enterocolitica* 항원에 대해 *B. abortus* 항혈청의 경우는 2주 이후에 20 74KD에서 많은 수의 반응대가 나타났으나 *B. melitensis* 항혈청의 경우는 64KD 이외에는 반응대의 출현이 없었다. *Y. enterocolitica* 항혈청의 경우에는 반응대 수가 전반적으로 증가되었다(Fig. 1, 2 & 3).

2. TAT에 의한 항체 역가

Brucella abortus 1119-3, *B. melitensis* biotype 2, *Y. enterocolitica* O:9을 항원으로 하여 각각의 혈청에 대한 TAT를 수행하여 보면 Table 1에서와 같다. 즉, *B. abortus* 1119-3 항원에 대한 면역반응은 *B. abortus* 항혈청에서 1주 이후에 1:100, 2주 이후에는 지속적으로 1:200에서 응집반응을 보였다. *B.*

melitensis 항혈청에서도 1주 이후에 1:100, 2주 이후에는 지속적으로 1:200에서 응집반응을 보여 *B. abortus* 1119-3 항원에 대한 반응과 같은 결과가 관찰되었다. *Y. enterocolitica* 항혈청에 대해서는 응집반응이 관찰되지 않았다. *E. melitensis* 항원에 대한 *E. abortus*와 *Y. enterocolitica* 항혈청의 응집반응은 관찰할 수 없었다. 그러나 *E. melitensis* 항혈청의 경우에서는 1:100까지 점차 증가된 응집반응이 관찰되었다. *Y. enterocolitica* 항원에 대한 *E. abortus* 항혈청의 결과는 1:50까지의 응집반응이 관찰되었고, *E. melitensis* 항혈청의 경우에서는 응집 반응이 관찰되지 않았지만, *Y. enterocolitica* 항혈청의 경우에는 1:100까지 증가된 응집반응이 관찰되었다.

Table 1. Reciprocal antibody titer of hyperimmunized bovine sera by *E. abortus* 1119-3, *E. melitensis* and *Y. enterocolitica* by means of TAT, in which the antigens are prepared with *E. abortus* 1119-3, *E. melitensis* and *Y. enterocolitica*

Antigens	Antiserum	Before immunization	1week after 1st injection	1week after 2nd injection	1week after 3rd injection
Br. a	Br. a	-	1:100	1:200	1:200
	Br. m	-	1:100	1:200	1:200
	Ye. e	-	-	-	-
Br. m	Br. a	-	-	-	-
	Br. m	-	1:25	1:50	1:100
	Ye. e	-	-	-	-
Ye. e	Br. a	-	1:25	1:50	1:50
	Br. m	-	-	-	-
	Ye. e	-	1:25	1:50	1:100

abbreviations : Br. a: *Brucella abortus* 1119-3, Br. m: *Brucella melitensis* biotype 2, Ye. e: *Yersinia enterocolitica* 0:9

3. CFT에 의한 항체 역가

각 항원을 이용하여 CFT를 하여보면 Table 2에서 보는 바와 같다. 즉, *E. abortus* 1119-3항원에 대해 *E. abortus* 항혈청에서는 1:80까지 증가된 결합 반응을 관찰할 수 있었다. *B. melitensis* 항혈청에서는 1:80까지의 결합 반응이 관찰되었으나 *Y. enterocolitica* 항혈청에 대해서는 반응을 관찰할 수 없었다. *E. melitensis* 항원에 대해서는 *E. abortus* 항혈청에서 반응을 관찰할 수 없었다. *B. melitensis* 항혈청에서는 1:40까지의 결합반응이 관찰되었으나, *Y. enterocolitica* 항혈청에 대해서는 반응을 관찰할 수 없었다. *Y. enterocolitica* 항원에 대해서는 *E. abortus*와 *B. melitensis*의 항혈청과의 반응을 관찰할 수 없었지만, *Y. enterocolitica* 항혈청에 대해서만 1:80까지의 반응이 관찰되었다.

Table 2. Reciprocal antibody titer of hyperimmunized bovine sera by *E. abortus* 1119-3, *E. melitensis* and *Y. enterocolitica* by means of CFT, in which the antigens are prepared with *E. abortus* 1119-3, *E. melitensis* and *Y. enterocolitica*

Antigens	Antiserum	Before immunization	1week after 1st injection	1week after 2nd injection	1week after 3rd injection
Br. a	Br. a	-	1:20	1:40	1:80
	Br. m	-	1:20	1:40	1:80
	Ye. e	-	-	-	-
Br. m	Br. a	-	-	-	-
	Br. m	-	1:20	1:20	1:40
	Ye. e	-	-	-	-
Ye. e	Br. a	-	-	-	-
	Br. m	-	-	-	-
	Ye. e	-	1:20	1:40	1:80

abbreviations: Br. a: *Brucella abortus* 1119-3, Br. m: *Brucella melitensis* biotype 2, Ye. e: *Yersinia enterocolitica* 0:9

4. LAT에 의한 항체 역가

각 항원 별로 LAT를 이용하여 항체가를 측정하였던 바, Table 3에서 보는 바와 같은 결과를 얻었다. 즉, *E. abortus* 1119-3항원에 대해 *E. abortus* 항혈청에서는 1:128까지 증가된 응집반응을 관찰할 수 있었다. *E. melitensis* 항혈청에서는 2주 이후부터 1:128까지의 응집반응을 보여 *E. abortus* 항혈청보다 빠른 반응을 나타냈다. *Y. enterocolitica* 항혈청에 대해서는 반응을 관찰할 수 없었다. *E. melitensis* 항원에 대해서는 *E. abortus* 항혈청에서는 반응을 관찰할 수 없었으나, *E. melitensis* 항혈청에서는 1:16까지의 응집반응이 관찰되었으며, *Y. enterocolitica* 항혈청에 대해서는 반응을 관찰할 수 없었다. *Y. enterocolitica* 항원에서는 *E. abortus* 항혈청과 *E. melitensis* 항혈청에서는 응집반응을 관찰할 수 없었다. *Y. enterocolitica* 항혈청에 대해서만 1:32까지의 반응이 관찰되었다.

Table 3. Reciprocal antibody titer of hyperimmunized bovine sera by *E. abortus* 1119-3, *E. melitensis* and *Y. enterocolitica* by means of LAT, in which the antigens are prepared with *E. abortus* 1119-3, *E. melitensis* and *Y. enterocolitica*

Antigens	Antiserum	Before immunization	1week after 1st injection	1week after 2nd injection	1week after 3rd injection
Br. a	Br. a	-	1:16	1:64	1:128
	Br. m	-	1:8	1:128	1:128
	Ye. e	-	-	-	-
Br. m	Br. a	-	-	-	-
	Br. m	-	1:8	1:16	1:16
	Ye. e	-	-	-	-
Ye. e	Br. a	-	-	-	-
	Br. m	-	-	-	-
	Ye. e	-	1:8	1:16	1:32

abbreviations: Br. a: *Brucella abortus* 1119-3, Br. m: *Brucella melitensis* biotype 2, Ye. e: *Yersinia enterocolitica* 0:9

5. ELISA에 의한 항체 역가

ELISA 방법을 통하여 각 항원별로 항체 형성 정도를 관찰하였던 바, Table 4와 같았다. 즉, *B. abortus* 항원에 대한 *B. abortus* 항혈청의 경우에는 면역 전의 Optical Density(OD)가 0.248이었으나, 나중에는 OD 0.8까지 증가되었다. *B. melitensis* 항혈청의 경우에는 접종 전 OD가 0.123이었으나 3주이후에로는 OD 0.309에 불과하였다. *Y. enterocolitica* 항혈청의 경우에서는 미약한 반응을 나타내었다. *B. melitensis* 항원에 대한 각 면역 혈청의 ELISA OD는 *B. abortus* 항혈청이 3주 이후에 2.114이었으며, *B. melitensis* 항혈청에서도 1주 이후에는 1.0 이상의 증가된 반응을 보였으나, *Y. enterocolitica* 항혈청의 경우에서는 거의 반응이 관찰되지 않았다. *Y. enterocolitica* 항원에 대해서는 *B. abortus* 항혈청에서 OD가 1.0 이상의 반응을 나타냈다. *B. melitensis* 항혈청은 OD반응값의 증가가 나타나지 않았다. *Y. enterocolitica* 항혈청의 경우에서는 OD가 1.0 이상의 증가된 항원·항체반응을 나타냈다.

Table 4. Optical densimetry titer of hyperimmunized bovine sera by *B. abortus* 1119-3, *B. melitensis* and *Y. enterocolitica* by means of ELISA, in which the antigens are prepared with *B. abortus* 1119-3, *B. melitensis* and *Y. enterocolitica*

Antigens	Antiserum	Before immunization	1week after 1st injection	1week after 2nd injection	1week after 3rd injection
Br. a	Br. a	0.248	0.349	0.695	0.800
	Br. m	0.123	0.150	0.299	0.309
	Ye. e	0.129	0.194	0.184	0.176
Br. m	Br. a	0.323	1.277	2.208	2.114
	Br. m	0.521	0.889	1.494	1.278
	Ye. e	0.656	0.558	0.749	0.944
Ye. e	Br. a	0.214	0.656	1.059	1.116
	Br. m	0.450	0.427	0.469	0.434
	Ye. e	0.439	0.696	0.924	1.392

abbreviations: Br. a: *Brucella abortus* 1119-3, Br. m: *Brucella melitensis* biotype 2, Ye. e: *Yersinia enterocolitica* O:9

고 찰

우리나라에서의 부루셀라병은 1956년 제주도에서 첫 발생이 보고된 이후, 착유우에 대한 검진 후 양성축은 살처분함으로서 근절을 위한 노력을 해왔으나 현재는 전국 각지에서 발생하는 양상을 보이며 1996년에는 600여두, 1997년에는 800여두가 살처분되었다(농림부, 1997). 특히 제주도의 지역적 특성을 감안하여 1992년도 이후 연간 5회에 걸쳐 지속적인 검진으로써 축우 부루셀라병 방역 대책을 실시함에도 불구하고 매년 200여두 이상이 양성 축우로 판정을 받아 단기간에 부루셀라병의 완전 근절이 곤란할 뿐만 아니라, 제주도 이외의 지역에서는 더욱 그 근절이 어려울 거라는 것이 시사되고 있다(임 등, 1995a 백 등 1997a).

우리나라에서 사육되고 있는 소는 3,377천 두로 그중 88%인 2,844천 두가 한우이고, 젖소는 나머지 12%인 551천 두(농림부, 1997)인데도 불구하고 한우에 대한 부루셀라병 검진사업은 이루어진 바 없어 부루셀라병을 완전 근절하기 위해서는 한우에 대한 역학조사와 적절한 검진방법의 모색 등을 통해 착유우와 동일 선상에서 방역대책이 이루어져 경쟁력강화에 일익이 되는 연구가 이루어질 수 있는 대책 마련이 시급하다고 사료된다. 이에 소 부루셀라병의 주된 원인이 되는 *Brucella abortus*와 *B. melitensis*를 한우에 인공 접종시킨 후 면역반응 양상을 파악하고 여러 가지 혈청학적 진단법을 통해 그 변화와 특색을 관찰함은 차후 부루셀라병 검진 대상으로 한우가 포함될 때에 그 기초 자료로써 충분한 활용성이 있다고 생각된다. 또한 *Brucella* spp는 *E. coli*, *Francisella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Camphylobacter*, *Yersinia* 등의 균과 공통 항원물질에서 교차반응을 일으키며, 특히 *Y. enterocolitica* 0:9 균주는 강력한 교차반응으로 인해서 부루셀라병 검진시 위양성 반응을 일으킬 수 있다는 사실(Jagannath et al., 1989; Nielson et al., 1996)은 진단 과정중에 충분히 고려되어야 할 것이다. *Y. enterocolitica* 0:9 균주 역시 *E.*

abortus, *B. melitensis*와 동일하게 한우에 인공 접종시킨 후 면역반응 양상을 파악하여 *Erucella* spp와의 교차반응 관계를 관찰함은 부루셀라병 검진 시 흔히 발생할 수 있는 위양성 반응에 의한 문제점을 방지하기 위한 좋은 자료가 될 것으로 사료된다.

부루셀라병의 공인진단법에 이용되는 *B. abortus* 1119-3 항원에 대해 *B. abortus*, *B. melitensis* 그리고 *Y. enterocolitica* 항혈청의 항원·항체 면역반응을 western blot으로 관찰한 바, Fig. 1에서와 같이 *B. abortus* 항혈청과 *B. melitensis* 항혈청에 대해 15 64KD에서 구분할 수 없는 많은 수의 반응대가 관찰되었고, *Y. enterocolitica* 항혈청은 2주 이후에 42KD에서 새로운 반응대를 형성함으로 미약하지만 약간의 교차반응이 인정되었다. 이는 백 등(1997a)이 보고한 충북 지역의 부루셀라병 양성 혈청에 대한 western blot에 의해 15KD, 18KD에서 67KD에 이르는 범위의 물질에서 강한 반응대를 나타냈고, *Y. enterocolitica*에 대해 20KD, 23KD, 35KD 그리고 43KD에서 항원·항체반응을 관찰한 결과와 거의 비슷했다. 이는 또한 우리나라에서 분리한 부루셀라 균주를 *B. abortus* 및 *B. melitensis* 표준 항혈청과 반응시켰을 때 모두에서 응집반응이 나타난 우 & 서(1986)의 보고와도 일치한다. *B. melitensis* 항원에 대해 *B. abortus* 항혈청은 16KD, 64KD에서 *B. melitensis* 항혈청은 50KD, 54KD에서 *Y. enterocolitica*항혈청은 16KD에서 각각 증가된 반응대가 관찰되었으나 미약하였다. *Y. enterocolitica* 항원에 대해 *B. abortus* 항혈청은 20 74KD에서 많은 수의 반응대가 나타났으나 *B. melitensis* 항혈청에 대해서는 64KD 이외에는 반응대의 출현이 없었다. *Y. enterocolitica* 항혈청에 대해서는 반응대 수가 전반적으로 증가되어 *Y. enterocolitica* 항원에 대해 *B. abortus* 항혈청은 강한 교차반응이 인정되었다. 이 같은 혈청에 대한 western blot에서 구분이 안돼는 항원·항체반응을 없애기 위해서 아마도 혈청은 각종 항원을 미리 흡착 제거한 후 western blot을 위한 혈청으로 사용하면 교차항체가 제거되므로 *Erucella* spp 특이 항원과 반응하는 좀더 명확한 반응대를 관찰할 수 있으리라 생각된다.

본 실험에서 면역혈청에 대한 항체가 측정을 위하여 사용한 TAT는 현재 우리나라에서 Plate agglutination test와 Rose bengal test와 같이 사용되는 공인진단법의 하나로 민감도와 특이도가 낮고 감염 초기나 백신 접종우에서의 IgM에 의한 비특이 반응이 나타나므로서 문제시되고 있다(Allan et al., 1976; Richard et al., 1992). Table 1에서 *B. abortus* 1119-3 항원에 대해 *B. abortus*와 *B. melitensis* 항혈청은 2주 이후에 지속적으로 1:200의 최대 희석배율에서도 응집반응을 나타냈고, *Y. enterocolitica* 항혈청에서는 응집반응을 나타내지 않아 western blot에서의 결과와 동일한 면역반응이 관찰되었다. 또한 *Y. enterocolitica* 0:9 항원에 대해 *B. abortus* 항혈청은 1:100까지의 증가된 응집반응을 보임으로써 western blot에서의 2주 이후에 *B. abortus* 항혈청의 증가된 반응대와 거의 상응하였다. 지속된 응집반응과 western blot 결과와의 일치도를 고려해 볼 때 각 균주의 접종 후 크게 증가되었을 IgM에 의한 비특이 반응은 아니라 생각된다.

Brucellosis 진단에 있어서 CFT는 특이성 및 민감성이 높기 때문에 부루셀라병의 최종 판정시험에 주로 사용되고 있다(Alton *et al.* 1975, Chin *et al.* 1991, 백 등, 1997b). Table 2에서 보는 바와 같이 *B. abortus* 1119-3 항원에 대해 *B. abortus*와 *B. melitensis* 항혈청은 1:80까지 보체결합 양성반응이 나타났으나 *Y. enterocolitica* 항혈청에서는 보체결합반응이 전혀 나타나지 않았고, *B. melitensis* 와 *Y. enterocolitica* 0:9 항원에 대해서는 각각의 동종 항혈청에서 1:40, 1:80의 희석 배율에서 반응이 관찰되었다. 한우의 경우에 *B. abortus*와 *Y. enterocolitica*를 각각 4두씩 인공 감염시킨 후 CFT에 의해 검사한 결과 *B. abortus*를 접종시킨 소는 28일 이후 모두 양성판정을, *Y. enterocolitica*를 접종시킨 소는 15 36일 사이에 2두가 양성판정을 받음으로써 *Y. enterocolitica* 0:9의 부루셀라병에 대한 혈청학적 위양성 반응을 보고한 Vincent 등(1996)의 보고와는 달리 *Y. enterocolitica*에 대한 교차반응이 인정되지 않았다.

Latex beads의 항원 부착 능력을 이용하여 어떤 질병의 감염 초기에 특이 항체를 검색할 수 있는 것으로 알려지고 있는(서 등, 1993) LAT는 다른 혈청학적 진단법보다 술식이 간편하여 본 실험에 적용하였다. 본 실험에서도 Table 3에서 보는 바와 같이 *B. abortus* 1119-3 항원에 대해 *B. abortus* 항혈청은 3주 이후에 1:128 희석 배율에서 응집반응이 일어났으며, *B. melitensis* 항혈청에 대해서도 2주 이후에 1:128의 희석 배율에서 응집반응을 나타냈고, *B. melitensis* 와 *Y. enterocolitica* O:9 항원에 대해서는 각각의 동종 항혈청에서 1:16, 1:32까지의 반응을 나타내어 가장 정확성이 높다는 CFT와 일치되는 결과를 가져옴으로써 LAT의 적용 가능성을 뒷받침할 수 있었다.

최근 들어 다른 혈청학적 진단법에 비해 민감도와 특이도가 높은 ELISA를 통한 부루셀라병 진단연구가 많이 이루어져 초음파 분쇄 후 SDS 처리한 *B. abortus* 1119-3 세포막성 항원에 대한 *Y. enterocolitica* O:9 항원에서 교차반응은 ELISA를 이용한 실험에서 상호관계가 없다는 결과 보고가 있지만(임 등, 1995b) 이는 마우스에 접종한 항혈청을 이용한 실험이며 직접 한우의 항혈청을 이용한 것이 아니기 때문에 본 예와 같이 고유 숙주인 소를 대상으로한 실험 결과가 더욱 적절한 실험이었다고 사료되며 그 실험 결과는 Table 4와 같다. *B. abortus* 1119-3 항원에 대해 *B. abortus*와 *B. melitensis* 항혈청은 면역 전과 비교하여 CD가 1.0 이상의 증가치를 나타냈으나 *Y. enterocolitica* 항혈청은 CD의 증가를 보이지 않아 임 등(1995b)의 결과와 같이 항원의 교차 반응을 보이지 않음을 알 수 있다. 다만 *B. melitensis* 항원에 대해서는 *B. melitensis* 보다도 *B. abortus* 항혈청의 CD가 더욱 큰 폭으로 증가하였으며 *Y. enterocolitica*항원에서 교차 반응이 인정되지 않는 점을 봤을 때, ELISA에 의한 부루셀라병 진단시 *B. melitensis* 항원 사용을 고려해 볼만하다. *Y. enterocolitica*를 항원으로 사용하였을 때는 부루셀라 양성 및 음성 혈청과의 상관관계가 없다는 임 등(1995b)의 결과와는 달리 *B. abortus* 항혈청에 대해 CD가 1.0 이상의 반응을 나타내 서로간의 상관관계가 인정되었다.

Erucella spp를 이용한 한우에 대한 면역원성을 관찰함에 있어서 국내 분리 생균을 인공 감염시키면서 한우내에서 채액성 및 세포성 면역 형태 상태를 관찰할 수 있었다면 보다 더 유용한 자료를 얻을 수 있었겠지만, 젖소를 포함하여 한우에게 *Erucella* spp 생균 접종 실험을 하기 위해서는 농림부 장관의 사전 허가를 받아야 하는 제한적 요소 때문에 실시할 수 없었으나 앞으로 이 같은 한우에 직접 인공 감염시키면서 항체의 형성 상황을 관찰하는 연구 과제 개발이 추진되어야 한다고 사료된다.

결 론

우리나라 젖소에서 부루셀라병이 유행하고 있는 현실에서 대부분의 소가 한우라는 점을 고려하여 보면, 한우에게 *B. abortus*, *B. melitensis*, *Y. enterocolitica*를 인공 면역시켜 형성한 항체를 이용하여 western blot, TAT, CFT, LAT, ELISA 등의 혈청학적 진단법으로 비교 관찰하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Brucella abortus* 1119-3 항원에 대해서 western blot, TAT, CFT, LAT, ELISA에서 모두 *B. abortus*와 *B. melitensis* 항혈청이 면역반응을 일으켰고 western blot에서 *Y. enterocolitica* 항혈청이 42KD에서만 반응대를 형성하여 한우에서의 부루셀라병 검진시 진단법으로서의 가치가 인정되었다.

2. *Brucella melitensis* biotype 2 항원은 *B. melitensis* 항혈청과도 면역반응이 미약하였으며 ELISA를 제외하고는 *B. abortus* 항혈청과의 반응을 관찰할 수 없었다. 그리고 *Y. enterocolitica* 항혈청에 대해서는 면역반응을 나타내지 않았다.

3. *Yersinia enterocolitica* 0:9 항원은 모든 진단법에서 *Y. enterocolitica* 항혈청과 반응을 일으켰으며 특히 western blot, TAT, ELISA에서 *B. abortus* 항혈청과 교차반응이 인정되었다.

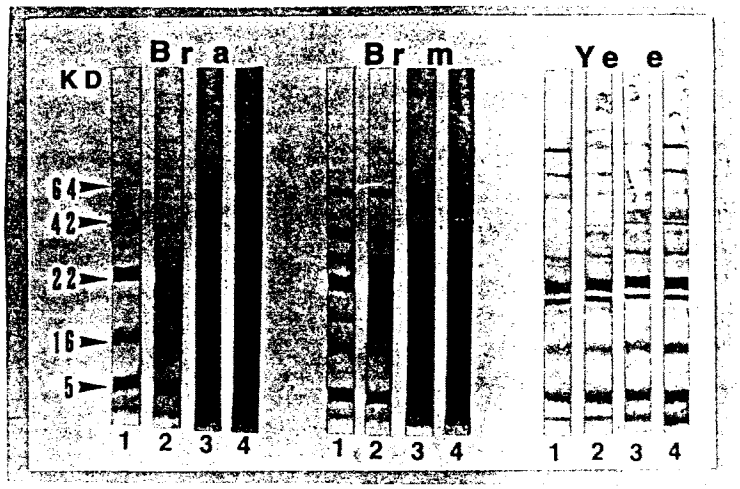

Fig. 1. Western blot of *Brucella abortus* 1119-3 antigen reacted with hyperimmunozing sera of *B. abortus, B. melitensis* biotype II and *Y. eneterocolitica* 0:9. KD: kilodaton Br a: *Brucella abortus* 1119-3 antisera, Br m: *Brucella melitensis* biotype 2. antisera, Ye e: *Yersinia enterocotica* 0:9 antisera. 1: Before immunization, 2: 1 week later after 1st immunization, 3: 1st week later after 2nd immunization, 3: 1st week later after 3rd immunization, 4: 2nd weeks later after 3rd immunization.

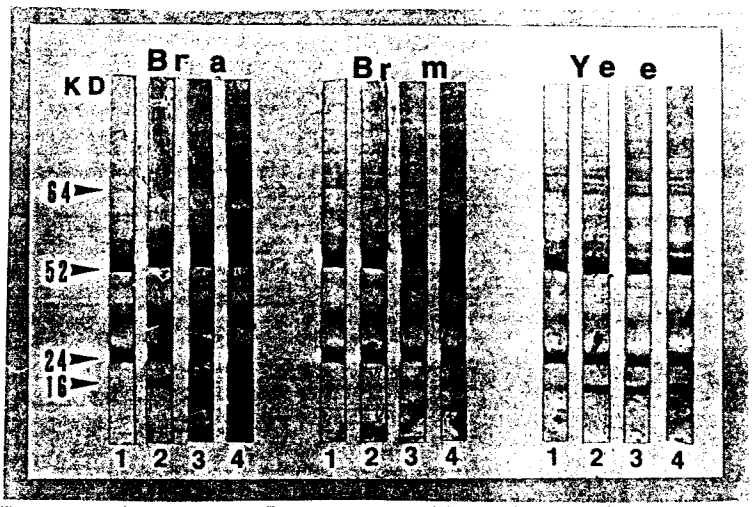

Fig. 2. Western blot of *Brucella melitensis* antigen reacted with hyperimmunozing sera of *B. abortus, B. melitensis* and *Y. eneterocolitica*. KD: kilodaton Br a: *Brucella abortus* 1119-3 antisera, Br m: *Brucella melitensis* biotype 2. antisera, Ye e: *Yersinia enterocotica* 0:9 antisera. 1: Before immunization, 2: 1 week later after 1st immunization, 3: 1st week later after 2nd immunization, 3: 1st week later after 3rd immunization, 4: 2nd weeks later after 3rd immunization.

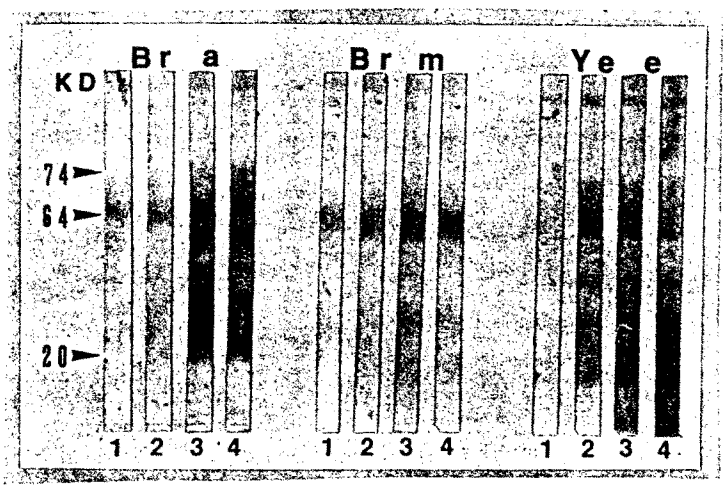

Fig. 3. Western blot of *Yersinia enterocolitica* antigen reacted with hyperimmunozing sera of *B. abortus*, *B. melitensis* and *Y. eneterocolitica*.

KD: kilodaton Br a: *Brucella abortus* 1119-3 antisera, Br m: *Brucella melitensis* biotype 2, antisera, Ye e: *Yersinia enterocotica* 0:9 antisera. 1. Before immunization, 2: 1 week later after 1st immunization, 3: 1st week later after 2nd immunization, 3: 1st week later after 3rd immunization, 4: 2nd weeks later after 3rd immunization.

제 3 장 Brucellosis의 진단 방법 비교 연구

제1절 Compliment Fixation Test를 이용한
Brucellosis 진단

제2절 Latex Agglutination Test 진단 방법 개발

제3절 ELISA을 이용한 Brucellosis 진단

제4절 PCR에 의한 임파조직으로부터의
Brucella DNA 검색

제 3 장: Brucellosis 진단 방법 비교 연구

서 론

최근 우리나라 젖소에 있어서 Brucellosis 발생은 증가 추세를 취하고 있으며, 더욱이 집단적으로 발병하므로서(가축 1996, 임 등 1995a, 정 등 1989) 양축농가에 피해를 끼치고 있는 실정이다. 소, 돼지를 포함한 산양 및 면양 등에 있어 부루셀라병은 유산 및 불임증을 유발함으로서 (Beran 1994; Davis et al 1990; Mayfield et al 1988; Turkson et al 1992) 막대한 경제적 손실을 야기시키므로서 이로 인한 손실의 최소화와 근절을 위한 대책이 시급한 대단히 중요한 인수공통전염병이다(손 등 1986; Ariza et al 1989, Barger et al 1981, Glasgow 1976, Tekko et al 1993, Scully et al 1986). 특히 사람에 감염시 Malta fever 또는 파상열을 유발하므로 공중보건상 매우 주의를 요하는 중요 질병중의 하나이다. 국내에서의 부루셀라병은 주로 젖소를 중심으로 하여 이루어졌다.

소의 Brucellosis는 현재 몇몇 선진국에서만이 성공적으로 퇴치되어 있을 뿐이며(CIE 1992), 세계적으로 많은 나라에서는 여전히 그 피해가 심하여 국가적으로도 위협의 존재로 남아 있다. 부루셀라병의 주된 감염원은 다양하여 자궁, 감염소의 분비물, 정액 등으로부터 원인균을 분리 동정하는 방법 등이 사용되고 있으나, 이는 감염 소로부터 생체 조직의 채취와 같은 제한적 요소 때문에 많은 나라에서는 혈청학적 진단방법이 폭넓게 활용되고 있는 실정이다.
즉, 평판응집반응(PAT), 보체결합반응시험(CFT), TAT, ELISA, rose bangal test 및 Latex Agglutination Test방법등이 사용되지만, 공인진단방법으로 활용되고 있는 MRT나 TAT와 같은 진단방법은 우리나라 Brucellosis 박멸정책을 수행하는데 어떤 문제점 없이 그리고 많은 실험실에서 잘 활용하고 있는 진단방법인 바,

금번에는 비교적 진단술식이 복잡한 보체결합방법과 신속 정확한 ELISA 그리고 특이도 민감도가 빠르면서도, 신속 안전한 LAT를 대상으로하여 적정조건을 확립하여 실험실과 야외에서 직접 활용할 수 있는 기술을 확립하고자 한다. 기존 공인진단방법과의 비교로서 특이성과 감수성을 검사법 별로 비교 분석하였던 바, 그 양성율이 일치하지 않고 있어 이의 정확한 진단을 내리는 것은 어려움이 있어 앞으로 있을 예방접종사업이나, 진단목적의 집단검색시 활용할 수 있는 진단방법을 확립하고자 몇 가지 진단방법은 더욱 연구되어야 할 것이다.

제1절 Compliment Fixation Test를 이용한 Bucellosis 진단

서 론

Brucellosis의 혈청학적 진단방법으로서 Complement Fixation Test(CFT)는 오래전부터 Milk Ring Test, Plate Agglutination Test(PAT), Tube Agglutination Test(TAT), ELISA, rose bangal test, Western blot(백 등 1997a), brucellin 반응와 더불어 폭넓게 사용되어 왔다. 이는 항원 항체 반응에 보체를 이용하여 면양 적혈구의 용혈상태를 관찰하는 방법으로 질병진단에 활용 가치가 높은 방법으로 알려져 있다(OIE 1992).

Brucellosis의 진단을 위하여 특이도 및 민감도가 높은 진단방법으로 알려진 CFT는 부루셀라병이 상재하는 지역에서의 감염율 조사와 예방접종한 소의 항체가 측정목적으로 활용하고 있다(Huber *et al*. 1986, Dohoo *et al*. 1986). 그러나 이 진단방법의 술식수행에는 숙련이 요구되고 있어 보편화되어 있지 못한 실정이지만, 높은 특이성(Quinn 1993)을 갖고 있으므로 우리나라에서 brucellosis진단에 사용되고 있는 각종 진단방법의 적정성을 파악하기 위한 기술확립이 필요한 것으로 사료되는 바이다.

연구자 등은 우리나라에 있어서의 brucellosis의 정확한 진단개발과 이의 박멸을 위한 연구수행의 일환으로 각 지역별 brucellosis의 항혈청 특색을 보고한데 이어서(백 등 1997a), 이번에는 brucellosis의 정확한 진단을 위한 CFT의 적정조건을 확립하고자, 우리나라 여러지역에서 수거한 혈청에 대한 TAT 검사에서 양성, 의양성 및 음성으로 판정된 혈청을 이용하여 다시 CFT를 실시하므로서 두 진단방법사이에서의 특이도와 민감도를 비교하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 항원의 제조: 표준 *Erucella abortus* 1119-3주를 구입하여 Brucella agar(Difco)에서 배양한 후, 이어서 Brucella medium(Difco)으로 37℃에서 72시간 증균시켰다(Ewalt 1989). 배양한 세균을 80℃에서 90분간 불활화 시킨 후 원심분리(3,000g, 75분)하여 침전된 세균을 수거한 후, 생리식염수로 3회 세척한 후 4.5% 부유액으로 제조한 뒤 이를 항원으로 사용하였다.

2. 가검 혈청: 혈청은 Table 1과 같이 TAT에서 brucellosis 감염 양성, 의양성 및 음성으로 판정된 혈청 65건, 19건 그리고 32건을 각각 수집하여 56℃에서 30분간 비동화 시킨 후 CFT에 이용하였다.

3. Veronal buffered diluents 제조: Veronal buffered diluent(VBD)액의 제조는 NaCl 83.0g, Na-5,5-diethyl barbiturate 10.19g을 증류수 1,000㎖에 가하여 녹이고 1N HCl 34.58㎖, Stock $MgCl_2 \cdot 6H_2O$(1 M), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$(0.3M)용액 5.0㎖를 가한 후 증류수를 추가하여 2ℓ를 맞추고 이 용액 1㎖와 증류수 4㎖를 혼합하였을 때 pH가 7.3-7.4인 것을 stock solution으로 사용하였다. 이 stock solution 200㎖에 gelatin 수용액(gelatin 1g을 증류수 100㎖에 넣어 가열 용해하고, 실온까지 냉각한 후 증류수 700㎖를 넣고 4℃에서 냉장보존) 800㎖를 혼합하여 pH 7.3-7.4인 것을 working solution으로하여 시험에 사용하였다.

4. 감작 3% 면양 적혈구의 준비: 면양 적혈구를 무균적으로 채혈하여 동량의 Alsever's solution(114㎜M dextrose, 27㎜M sodium citrate · $2H_2O$, 71㎜M NaCl을 가한 후, 1M citric acid를 이용하여 pH 6.1로 맞춘 후 증류수로 최종량을 1,000㎖로 제조하고 여과 멸균한 후 냉장보관)에 넣고 2-4℃에서 7일간 보존하

여 숙성시킨 후 3% 면양 적혈구 부유액을 조제하여 시험에 사용하였다. 먼저 보관된 혈액을 2겹의 멸균 거즈를 이용하여 50㎖ 원심분리관에 여과 수집, 900×g로 10분간 원심분리한 후 상청액을 제거하고 냉 VBD를 packed RBC와 9:1 의 비율로 섞은 후 900×g로 10분간 원심분리하여 상청액과 buffy coat층을 조심스럽게 제거하였다. 여기에 VBD를 다시 채우고 900×g로 10분간 원심한 후 상청액이 무색인지 확인하여 상청액을 버린 후 다시 상기 방법으로 세척하고 packed RBC량을 3%로 조정하여 본 실험에서의 면양 적혈구로 사용하였다.

5. 용혈소의 제조: 면양 혈액을 채혈하여 900×g로 10분간 원심분리, 상청액을 제거하여 packed cell을 준비하고 여기에 Kolmer saline(NaCl 8.5g, MgSC4 0.1g, 증류수 1,000㎖)을 가하여 900×g로 10분간 원심분리하여 세척한 후 10% 혈구부유액을 조제하여, 토끼의 이정맥에 5㎖ 를 4일 간격으로 5회 접종하고 최종 접종 7일 후 채혈하여 혈청을 분리하고 56℃에서 30분간 비동화 한 후 동량의 glycerin을 첨가하여 냉동보관하였다.

6. 보체의 제조: 4마리의 비임신 guinea pig를 12시간 금식시킨 후 심장천자방법으로 채혈하여 얻은 혈청을 혼합하여 소량씩 분봉하고 -90℃ 냉동고에 냉동 보관 사용하였다.

7. 용혈소의 역가측정: 7개의 시험관에 일정한 비율로 희석한 용혈소 희석액 1㎖와 3% 면양적혈구 1㎖를 혼합하여 조용히 섞고 실온에서 15분간 방치하여 감작시켰다. 다른 7개의 시험관을 1 set로하여 여기에 VBD 0.4㎖와 여기에 100%의 용혈을 나타낼 수 있도록 조절한 보체희석액 0.2㎖ 및 7개의 감작 적혈구액 0.4㎖를 가하여 잘 섞은 다음, 37℃ 수욕조에서 15분간 반응시킨 후 이를 다시 섞어 주고 15분간 재 반응시켰다. 반응이 끝난 후 완전용혈이 이루어진 용혈소의 역가를 1unit로 하고 최종시험에 사용한 역가는 2unit를 사용하였다.

8. 보체의 역가측정: 용혈소의 역가측정에서 결정된 2unit역가의 용혈소 희석액에 동량의 3% 면양 적혈구 부유액을 혼합하여 실온에서 15분간 흔들어 주면서 감작적혈구를 제조하였다. 감작적혈구를 완전 용혈시킬 수 있는 보체의 역가를 측정하기 위하여, 10개의 시험관에 보체를 1:10부터 1:100까지 희석하여 0.2㎖와 냉 VBD 0.4㎖를 각각 가한 후, 37℃ 수욕조에서 30분간 반응시켰다. 여기에 2unit역가로 희석된 용혈소로 감작한 적혈구액 0.4㎖씩 가하고 다시 37℃ 수욕조에서 30분간 반응시킨 후 완전 용혈이 이루어진 최초 희석비를 1unit로 결정하고, 1¼unit를 계산하여 본시험에 사용하였다.

9. 항원의 농도 결정 : TAT결과 1:200의 역가를 보인 양성혈청을 비동화시킨 후 수평열 시험관에 1:4부터 1:128까지 2배 단계 희석하여 0.2㎖씩 가하고, 마지막 2열의 시험관에 양성혈청 대신 VBD 0.2㎖를 가하여 대조시험하였다. 여기에 4.5%로 조제된 항원액(단백질 함량 100㎎ /㎖)을 수직열 시험관에 1:50부터 1:800까지 2배 단계 희석하여 가하고 대조시험으로서 항원액 대신에 VBD 0.2㎖를 가하였다. 모든 시험관에 1¼unit로 제조된 보체액을 가하여 37℃ 수욕조에서 30분간 반응시켰다.

여기에 2unit역가로 희석된 용혈소로 감작한 적혈구액 0.4㎖를 가하고 37℃수욕조에서 30분간 반응시킨 후 적혈구 용혈률을 관찰하여 항원 희석비를 구하였다.

10. 가검혈청의 역가측정: 96 well microplate의 각 well에 가검혈청을 1:10-1:160까지 25㎕씩 단계 희석하고, 각각의 well에 4.5%로 조제된 항원액을 결정된 농도로 희석된 항원액 25㎕와 보체액 25㎕를 가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 여기에 결정된 용혈소액과 동량의 3% 면양 적혈구를 혼합하여 실온에서 15분간 감작시킨 감작적혈구액 50㎕를 가하여 잘 섞은 다음, 37℃에서 15분간 반응시킨 후 이를 다시 섞어 주고 15분간 재 반응시킨 후 용혈여부를 판독하였다.

11. Tube Agglutination Test 술식: brucellosis 양성판정으로 살처분된 혈청 65건, 의양성혈청 19건 그리고 음성혈청 32건을 대상으로 TAT를 다음과 같이 재검하였다. 즉, 4개의 시험관에 가검혈청을 80㎕, 40㎕, 20㎕, 10㎕씩 각각 가하고, 여기에 수의과학연구소로부터 분양받은 부루셀라병 진단용 *B. abortus* 항원액을 멸균된 생리식염수에 0.5% phenol을 가하여 만든 phenol-saline을 이용하여 1:100으로 희석한 후, 각각의 시험관에 2㎖씩 분주, 혼합한 후 37.5℃에서 48시간 정치한 후 결과를 판정하였다. 판정 기준은 혈청희석배수에 따라서 1:50이하의 혈청희석비에서 응집반응이 일어나지 않은 혈청은 음성, 1:50에서 양성 및 의양성의 판정된 혈청과 1:100에서 의양성 판정된 혈청은 의양성, 1:100이상의 혈청 희석비에서 확실한 응집반응을 보인 혈청을 대상으로 양성으로 판정하였다. 이와같이 얻어진 판정기준을 역가별로 분석해 보면 1:25이하가 32건, 1:50에서 의양성 9건, 1:50에서 양성이 6건, 1:100에서 의양성 4건으로 의양성 두수는 19건이었고 양성인 65두중 1:100에서 양성은 17건이었고 1:200에서 양성은 48건이었다(Table 1).

Table 1. Reciprocal of antibody titers against bovine brucellosis diagnosed by Tube Agglutination Test

Results	No. of Cattle	TAT titers			
		Negative	Suspected	Positive	
		≦1:25	1:50	>1:100	1:200
Positive	65			17	48
Suspected	19		19		
Negative	32	32			

±; means a slight agglutination reaction

결 과

1. 용혈소, 보체 및 항원의 적정농도: 시험에 사용된 용혈소는 1:400까지의 희석비에서 용혈이 관찰되어 이를 1 unit로 결정하고 이의 2 unit인 1:200을 본 시험에 사용하였으며, 보체는 1unit가 1:20으로 관찰되어 이의 1¼ unit인 1:16으로 결정하였다. 또한 항원을 1:200으로 희석하였을 때 혈청 희석비에 따른 적절한 응집 결과가 관찰되었다.

2. 양성판정: 부루셀라병의 CFT에 의한 진단을 위한 혈청에 대한 희석 배율은 TAT검진시 음성 및 의양성 판정된 혈청 51건은 1:10이상의 혈청희석배율에서 모두 용혈을 보인 반면 양성혈청 65건중 48건이 1:20이하의 희석배율에서 용혈반응을 보이지 않았으며, 본 실험에서 가장 높은 CFT의 역가를 보인 혈청은 1:160의 희석비에서도 용혈반응이 보이지 않아 손쉽게 양성판정할 수 있었다.

3. TAT에 대한 CFT 결과의 특이도 및 민감도: TAT검진시 부루셀라병 양성판정으로 살처분된 소의 혈청 65건에 대한 CFT의 결과는 이중 48건의 양성과 17건의 음성결과를 보인 반면, 의양성 19건 및 음성혈청 32건 모두가 음성반응을 나타내었다. 따라서 TAT를 기준으로한 민감도는 73.8%이었으나 특이도는 100%이었다(Table 2).

Table 2. Specificity and sensitivity of CFT based on TAT results against 116 cattle sera

Diagnostic Method		TAT ＋ (65)	TAT ± (19)	TAT － (32)	Specificity %	sensitivity %
CFT	＋ (48)	48	0	0	100	73.8
	－ (68)	17	19	32		

＋; Positive reaction, ±; Suspect reaction,
－; Negative reaction Parenthesis; Number of cattle

4. TAT 역가와 CFT 역가의 비교 : TAT에서 양성반응을 일으킨 혈청에 대한 CFT의 혈청희석비율에 따른 역가의 비교는 Table 3과 같다. 즉, TAT에서 1:100이상의 혈청희석비에서 양성판정된 혈청 65건중 CFT의 결과에서 1:10이하의 음성역가를 보인 혈청은 17개이었으며, 48건의 CFT 양성 혈청은 1:20-1:160 이상의 다양한 역가가 관찰되었다.

Table 3. Results of CFT against TAT-positive 65 brucellar sera

CFT	Negative sera (17)	Positive sera (48)					Total
	<1:10	1:10	1:20	1:40	1:80	:160	
No. Cattle	11	6	1	9	11	17	65

고 찰

Brucellosis의 진단방법은 세균학적 그리고 면역학적인 진단방법으로 크게 구분되어 지며(Mayfield et al 1988), 이들 진단방법은 MRT(Alton 1981), 피내반응법(MacDiarmid et al 1987, Cunningham et al 1980, Chukwu 1985), Rose bangal test(Morgan et al 1969), 평판응집반응(Alton et al 1988), 튜부응집반응(Beran et al 1994), CFT(Timoney et al 1988), ELISA(Lamb et al 1979; Magee 1988) 그리고 균체를 직접 가검물로부터 분리하는 방법과 이들 가검물을 guinea pig에 접종 분리 방법(Hausler 1972) 그리고 단크론항체를 이용한 균주의 동정(Vizcaino & Fernandez-Lago 1992) 등이 있다.

국내에서 균체의 분리 동정에 관한 연구로는 박 등(1959)이 소의 유산된

태아로부터 *E. abortus*를 분리하였고, 박(1963)이 돼지의 유산증에서 *B. suis*를 분리한 바 있으며, 우 등(1986)은 유우의 상유방결절에서 *B. abortus*를 분리하였으며, 우리나라에서 분리한 균주를 표준 항혈청 *B. abortus* 및 *B. melitensis*와 반응시키었던 바, 모두에서 응집반응이 나타난다고 하였다. 정 등(1996)은 PCR을 이용하여 종모우의 정액에서 부루셀라균을 검출한 바 있다. 그러나 세균학적인 진단방법은 병원체를 감염조직으로부터 직접 배양하여 검진하는 방법(Ewart 1989)으로, 이 방법은 유산한 송아지의 조직에서 *E. abortus*를 직접 찾는대는 충분한 세균이 존재하여야 하는 단점이 있어, 가검물로부터 배양하여 균체를 증명하기 위하여서는 세균수가 약 10^5이상이 존재하는 농감염의 예가 아니면 진단이 어렵다(Hopper *et al.* 1989). 따라서 신속하게 감염우를 색출할 수 있는 간접적인 방법으로 혈청학적 진단방법의 활용이 보편화되어 있다(CIE 1992).

현재 부루셀라병에 의한 경제적 손실 규모가 크면 클 수록 검진에 사용되어야 할 진단방법은 특이도와 민감도가 높은 방법이 활용되어야 할 것이며 또한 민감도를 높이기 위한 특이 항원의 생산이 필요하다. 따라서 부루셀라 진단에 유용한 각종 항원의 분리를 위하여 그 동안 수많은 연구(Diaz *et al.* 1968, Berman *et al.* 1980, Verstreate *et al.* 1984)가 수행되어 왔고, 특히 *Brucella* 세포외막의 peptidoglycan complex로부터 분리하여 4개의 주요 물질로서 88KD, 40KD, 35.7KD 그리고 26KD가 보고된 바 있고(Sowa *et al.* 1991) 세포막성물질의 polysaccharide에 대한 연구(Schrig *et al.* 1978, Moreno *et al.* 1984, Wong *et al.* 1992)도 상세히 이루어져 있다.

Brucella spp. 항원은 서로 다른 특이성이 있어 혈청학적 진단시 그 응집반응의 결과가 각기 다르게 나타나므로서(Aparicio *et al.* 1993) 비록 어떤 종의 *Brucella* 균주에 감염되어 있을 경우에도 이를 진단하지 못하고 지나는 경우가 있으므로 항원의 선택은 중요할 것이다(Sarvamangala *et al.* 1987). 또한 최근 예방접종 균주로서 발견된 *B. abortus* RB51인 경우에는 C-Chain

polysaccharide의 항원 epitope이 없어서 기존의 진단용 항원으로는 검색되지 않는다.

부루셀라병의 진단에 이용되는 혈청학적 검사방법들 상호간의 일치율은 상당히 차이가 있는 것으로 알려져 있는 바(김 등 1982, Lambert *et al*. 1962), 진단방법에 따라서 감염율이 1%에서 6%까지 차이가 나는 것으로 알려지고 있어 진단방법의 선택에 대한 중요성이 강조되고 있다(Flores-Castro *et al*. 1980). 더욱이 *Brucella* spp. 항원은 *Y. enterocolitica*와 같은 세균들과의 공통항원을 함유하고 있어 교차반응을 나타내므로(임 등 1995b, Weynants *et al*. 1996) 이를 피하기 위하여 *Brucella*의 특이 항원에 대한 단크론항체를 생산하여 신속하면서도 특이성이 높으며, 그리고 저렴한 응집반응 시험법들이 연구되고 있다(정 등 1989, Vizcaino *et al*. 1992, Essenberg 1995, Cellier *et al*. 1992). 이러한 결과는 임 등(1993)이 부루셀라병 진단시 TAT와 ELISA 결과를 비교하였을 때, PAT(plate agglutination test)에서 양성판정된 27건중 ELISA에서 24건이 양성으로 판정된(92.3%) 결과와 유사함을 확인할 수 있었다. 김 등(1988)에 의하면 TAT와 CFT의 일치율 검사에서 TAT역가 100배인 7두중 6두가 CFT에서 음성이었으며, 나머지 1두는 CFT의 역가가 10배를 나타내었다. 그리고 TAT역가가 200배 이상인 경우는 CFT에서 모두 양성반응을 나타내었고 TAT역가가 높을수록 CFT역가도 비례하여 높은 경향을 보였다. 그리고 TAT에서 양성판정된 소의 혈청을 rivanol test(RT)와 CFT로 검사한 바 각 13.2%, 15.8%의 음성반응을 나타내어 부루셀라병 진단에 있어 TAT와의 일치율은 RBT(Rose Bangal Test)가 86.8%, CFT가 84.2%로 보고하였다. 또한 CFT를 이용하여 다른진단방법과 비교시험에서 특이도와 민감도를 비교하였을 때 각각 100%와 92.9%로서 보고(Cohoo *et al*. 1986)된 바 있다. 본 연구에서 TAT에서 양성으로 살처분된 소의 혈청에 대하여 *E. abortus* 항원을 이용하여 CFT역가를 측정하였던 바, 음성으로 판정되는 예가 있었다. 즉, 1:20이상의 희석 배율에서 용혈이 일어나지 않으면 양성으로 판정하였을 때, TAT의 양성두수 65두중 CFT에서 48두가 양성으로 판정되었고 음성

및 의양성 두수 51두 모두는 음성으로 판정되어 특이도 및 민감도가 각각 100%와 73.8%로 나타났다. 따라서 현재 우리나라에서는 착유우에 대한 부루셀라병검색 진단 방법으로 MRT 및 PAT를 수행하여 양성판정시 살처분 시키고 있으나, CFT의 진단방법을 보조적 진단방법으로 활용하기 보다도 민감하고 특이도가 높은 항원을 활용한 진단방법이 개발되어야 할 것이다. 즉, 가능하다면 감염 젖소의 양성판정을 위한 ELISA, LAT 등의 보조적 진단방법의 도입을 고려할 필요가 있는 것으로 생각된다.

결론적으로 우리나라에서 유행되고 있는 부루셀라병은 매년 그 발병 규모가 커지고 있으면서 집단화되고 있는 양상이다. 그러므로 본 연구에서 확인된 항원을 이용하여 혈청학적 진단법중 집단검색에 유용하게 사용할 수 있는 ELISA 및 LAT를 보조방법으로 활용하고, 또한 현재 시행하고 있는 MRT나 TAT검색방법으로 양성우를 색출하는데는 위양성 판정 가능성이 많은 만큼 확인 진단을 위한 진단방법으로서 본 연구결과 밝혀진 CFT가 활용되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

부루셀라병은 인수공통전염의 하나로서 우리나라 양축농가에 막대한 경제적 손실을 야기시키고 있다. 이의 근절을 위하여 착유우를 대상으로한 집단검색법인 MRT를 시행하고 이에 양성인 젖소군에 대하여 개체별로 TAT를 시행하여 최종 양성판정된 젖소를 살처분하고 있으나, 이들 진단방법은 민감성이 낮기 때문에 CFT방법에 의한 확인진단은 brucellosis박멸에 유익하게 활용할 수 있을 것으로 사료되어 TAT에서 양성 혈청(65예), 의양성 및 음성인 혈청에 대하여(51예) CFT를 실시하였던 바, 이들 혈청에 대한 CFT의 민감도는 73.8%이었으며, 특이도는 100%로 나타났다. 이 같은 연구 결과는 부루셀라병 진단에 사용되고 있는 MRT와 TAT방법과 더불어 CFT를 사용하므로서 보다도 정확한 진단을 내릴 수 있음을 알수 있었다.

제 2 절 Latex Agglutination Test 진단 방법 개발

서 론

모든 질병의 신속, 정확한 진단방법은 치료나 예방대책 수립과 더불어, 사람에 있어서는 생명연장 방법의 수단으로서, 가축에 있어서는 소득 증대면에서 대단히 중요하다. 물론 정확한 진단을 위하여서는 원인체를 직접 동정 분리하든가 아니면 혈청학적인 방법으로 항체를 검진하여 감염여부를 진단하고 있지만 흔히 항체 검출 방법이 활용되고 있는 실정이다.

소의 부루셀라병은 주로 *Erucella abortus*에 의해 발생하지만 *E. melitensis*나 *E. suis*에 의해서도 발병되며, 유산을 일으키고 우유나 자궁 분비물 등을 통해 균이 배설된다. 소 부루셀라병은 사람에게 병원성이 매우 높은(CIE 1992) 인수공통전염병(Spink 1969)으로 우리나라에서는 법정가축전염병(농림수산부예규 1988) 중 하나이다.

부루셀라병은 특히 성숙된 동물의 질병으로 암·수의 생식기 계통 특히 임신자궁과 같은 기관에 호발하면서(Quinn *et al*. 1994) 소, 돼지 등 가축이 이 병에 걸리면 주로 불임 또는 유산(30 40%)을 일으키며, 사람에서는 유산을 일으키지는 않지만 파상열, 권태감, 근육·관절통, 오한 등을 일으킬 뿐만 아니라 골수염과 같은 합병증을 일으킨다(Meyer 1990, Quinn *et al*. 1994, Timoney *et al*. 1988).

우리나라에서 소 부루셀라병의 공인진단법으로는 MRT(Milk Ring Test), TAT(Tube Agglutination Test), PAT(Plate Agglutination Test) 그리고 CFT(Complement Fixation Test) 반응 등이 이용되고 있다. 특히 이들 방법 중 PAT와 TAT는 항원과 혈청내 항체의 응집반응을 이용한 진단방법으로 사용되고 있다.

그런데 부루셀라병의 만성적인 경우에 있어서는 그들 자체적으로도 응집력이 약할 뿐만 아니라, 응집반응에 중요한 역할을 하는 IgM의 응집력을 방해하는 IgG1의 양이 많아져(Quinn *et al*. 1994), 현재 실시되고 있는 PAT와 TAT와 같은 공정진단법에서 검출율이 낮게 나타날 수 있다(CIE 1992). 이 같은 이유로 응집반응을 이용한 진단방법은 부정확하게 진단 될 수 있어 정확한 응집반응을 잘 나타내는 것으로 알려진 라텍스 beads를 이용한 응집반응을 부루셀라병 진단에 활용하고자 한다.

라텍스는 고무나무의 유액으로 그 성분은 대부분 물로써 20 40%의 고무를 함유하고 있으며 개미산을 가해 생고무를 만드는 재료로 사용되고 있다. 이 라텍스는 항원과 같은 단백질과 강하게 결합하는 물성을 가지고 있기 때문에 항원 항체 반응에서 항원의 운반체로서 일찍이 활용되고 있으며(Fair *et al*. 1980), 이 같은 항원과의 응집력 때문에 라텍스를 이용한 응집반응은 신속 정확한 진단방법으로 다른 방법에 비하여 간단하고 용이하며 교차반응이 거의 일어나지 않는 방법으로 알려져 있다 (Lu *et al*. 1995).

LAT(Latex Agglutination Test)는 passive agglutination(Christian *et al*. 1958, Robert *et al*. 1990)과 reverse passive agglutination (Sugiyama *et al*. 1987) 그리고 rapid agglutination (Turgeon 1996)에 활용할 수 있는 운반체로서 그 진단술식은 표준화된 진단 적정조건에 의해서만 수행되어야 하며, 항원·항체의 결합력은 사용되는 완충액의 pH, 삼투압, 이온 농도와 라텍스 beads 표면에 결합하게 되는 항원 또는 항체의 농도, 진단액과 가검물 반응시의 온도 조건 및 반응 시간 등 많은 요인들이 상호 작용하여 LAT에 영향을 줌으로서 이의 적정조건 확립은 대단히 중요한 요소이다(Turgeon 1996).

우리나라에서는 부루셀라병 진단에 있어서 LAT를 이용한 연구 예는 접할 수 없었지만, 중국, 벨기에 등 외국에서는 사람의 부루셀라병 진단을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Axel *et al*. 1992a, Bowden *et al*. 1993, Cloeckaert A. *et al*. 1992, Lu CF. *et al*. 1995, Cpaleichuk *et al*. 1991).

라텍스 beads를 이용한 진단에는 *Toxoplasma*(Kobayashi *et al*. 1977), 대장균(March *et al*. 1989), *Aeromonas*(Quinn *et al*. 1993), *Bordetella avium*(Suresh *et al*. 1993)등이 있으며, 소의 유방염 진단을 위한 lactoferrin 검색(Yamamoto *et al*. 1992)과 개의 Rockey Mountain spotted fever(Greene *et al*. 1993) 등 여러 가지 질병에서 연구가 이루어 진 바 있으며, 사람에서는 이의 이용이 보다 활발하여 ASO Quicktest kit(antistreptolysin O 검출용 kit, Stanbio Laboratory, Inc, San Antonio, Texas), CMV Scan kit(Cytomegalovirus 에 대한 항체 검사용, Becton Dickinson) 그리고 Rubrascan kit(Rubella virus 에 대한 항체 검출용, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland) 등이 제품화되어 있다(Turgeon 1996).

이처럼 라텍스 beads가 많은 질병에서 활용되고 있는 이유는 어떤 원인균의 감염에 따른 각종 항체(IgG와 IgM)를 동시에 검출할 수 있고, 진단 술식이 간단하며, 고가의 시약이나 장비를 준비하지 않아도 응집반응의 결과를 쉽고 신속하게 판독할 수 있는 이점이 있으며(Lu *et al*. 1995), 야외에서도 판독이 가능한 장점이 있기 때문이라고 하겠다. 이에 본 연구자는 라텍스 응집반응을 이용한 혈청학적 진단법으로 부루셀라병을 보다 간편하고 신속하게 진단할 수 있는 라텍스 beads 응집반응을 이용한 적정조건과 진단 술식을 확립하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. **공시 균주 및 항원 생산** : 시험에 사용할 항원 생산을 위한 균주는 수의과학연구소로부터 분양 받은 *Brucella abortus* 1119-3 균주를 부루셀라 고형배지(Difco Co.)에 48시간 배양 후 부루셀라 선택 액체배지(Difco Co.)에 37℃, 72시간 증균시킨 후 80℃ 수조에서 90분간 균체를 불활화시켰으며(CIE 1992), 4

℃에서 3,000g/75분 조건으로 원심분리하여 얻은 침전물을 멸균 PBS(pH 7.2)로 6회 세척 후 침전물을 다시 멸균 PBS(pH 7.2)를 이용하여 1:5의 농도가 되도록 희석하여 -20℃에 보관하였으며, 이를 라텍스에 결합시키는 항원으로 사용하였다.

2. **표준 양성 및 음성 혈청** : 부루셀라병 검진에서 양성으로 판정되어 살처분 된 축우의 양성 혈청(TAT ≥ 1:200, CFT ≥1:160)과 음성(TAT ＜1:25, CFT ＜1:10)으로 판정된 혈청 각 3예를 표준 양성 및 음성 혈청으로 사용하였다.

3. **라텍스** beads**의 크기** : 직경이 1.07㎛인 polystyrene 라텍스 beads(Sigma Co.)가 10% 함유된 용액 1㎖를 구입하여 항원을 감작시키기 위하여 사용하였으며, 이의 감작을 위하여 항원감작용 완충액을 준비하여 적당한 농도가 되도록 희석한 후 4℃에 보관하여 사용하였다.

4. **항원감작용 완충액** : 부루셀라 항원의 감작용 완충액으로는 sodium phosphate buffer, Tris-HCl buffer를 다양한 농도(Morality)와 pH를 각기 달리하여 실험에 사용하였으며, 부루셀라 항원이 결합된 라텍스 beads를 안정화시키기 위한 차단 완충액(blocking buffer)은 bovine serum albumin(BSA, fraction Ⅴ, Sigma Co.)과 HS(horse serum, Gifco Co.)을 항원감작용 완충액에 각기 다른 농도(%)로 각각 첨가하여 최적 조건을 결정하였다.

5. **혈청희석용 완충액의 조건** : 혈청희석용 완충액으로 sodium phosphate buffer와 Tris-HCl buffer내의 pH와 NaCl의 농도(mM)를 다양하게 하여 실험에 사용하였으며, 다양한 농도(w/v, %)의 BSA (Fraction Ⅴ, Sigma Co.)와 Tween 20을 각기 달리하여 혈청희석용 완충액에 첨가되는 최적 농도를 결정하였다.

6. **라텍스 응집반응용 진단액의 제조** : Polystyrene 라텍스 beads 부유액을 다양한 조건의 항원감작용 완충액으로 4,000g/20분간 원심 세척한 다음, 같은 완충액으로 다양한 농도가(w/v)되도록 부유시키고 PBS(pH 7.2)로 희석된 항원과 라텍스 beads의 배합비율을 다양하게 가한 다음, 감작 온도와 시간을 각기 달리하여 라텍스 beads의 표면에 부루셀라 항원을 감작시킨다. 감작이 끝난 후 4,000g/20분간 원심한 다음, 같은 완충액으로 원심 세척하였다. 침전된 감작 항원(부루셀라 항원으로 감작된 라텍스 beads)은 다양한 농도의 BSA가 함유되어 있는 완충액(blocking buffer)으로 동량을 가하여 진단액으로 결정하여 4℃에 보관하면서 항원과 라텍스 beads의 농도 그리고 항원과 라텍스 beads의 최적배합비율을 결정하였다.

7. **라텍스 응집반응의 온도와 시간** : "V"자형 microplate(녹십자)의 각 well에 혈청 희석용 완충액을 25㎕씩 분주한 다음, 표준 양성 및 음성혈청을 혈청 희석배수 1:2에서 1:512배까지 2배수로 단계 희석하였다. 여기에 제조한 진단액(부루셀라 항원으로 감작된 라텍스 beads 액)을 각 well에 25㎕씩 분주하여 가볍게 진탕시킨 후 실온에서 60분간 방치 후 응집정도를 육안으로 판독하여 최적 조건을 결정하였다.

8. **응집정도 표시** : 부루셀라 항원으로 감작된 라텍스 beads 액과 표준 혈청을 첨가하여 응집 정도를 표시함에 있어서 응집상태에 따라서 5단계로 나누었다. 즉, 응집괴가 형성되지 않아서 well내의 진단액과 혈청이 불투명한 균질액인 상태를 음성으로 판정하여 "—"으로하고, 항원·항체 반응인 응집상태가 미약하여 약간의 응집괴가 존재하고 상층액이 흐릿한 경우를 "±"로, 약한 응집괴가 존재하고 상층액이 약간 흐릿한 경우는 "+"로, 약한 응집괴가 존재하고 상층액이 투명한 경우를 "++"로, 응집괴가 존재하고 상층액이 투명한 경우를 "+++"으로 하였으며, 가장 강한 경우를 "++++"로 하였다. 음성 판정은

1:4이내의 희석배율에서 “±” 이하의 반응을 나타내는 것을 표준 음성으로 판정하였다.

9. LAT의 특이도와 민감도 판정 : LAT의 부루셀라병 진단 결과에 대한 진단 방법간의 차이를 비교하고자 TAT에서 양성으로 판정된 77예와 의양성으로 판정된 11예 그리고 음성으로 판정된 42예 총 130예의 혈청을 가지고 LAT 반응과의 특이도와 민감도를 비교하였다(수의공중보건학 1996). 그리고 LAT 실험 결과에 대하여 CFT 결과와의 일치율을 비교하였다.

10. CFT의 수행 : 백 등(1997)b의 방법에 준하여 수행하였다. 이를 간단히 요약하면 우선 veronal buffered diluent 액과 용혈소 그리고 보체를 제조하고 감작 3% 면양 적혈구를 준비한 다음 용혈소와 보체의 역가를 측정한 후 항원의 농도를 결정한다. 가검혈청의 역가를 측정하기 위하여 96 well microplate의 각 well에 가검혈청을 1:5 1:160까지 25㎕씩 배수 희석하고, 각각의 well에 4.5%로 조제된 항원액을 결정된 농도로 희석된 항원액 25㎕와 보체액 25㎕를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 결정된 용혈소액과 동량의 3% 면양 적혈구를 혼합하여 실온에서 15분 감작시킨 감작 적혈구액 50㎕씩 가하여 잘 섞은 다음, 37℃에서 15분간 반응시킨 후 이를 다시 섞어주고 15분간 재반응시킨 다음 용혈 여부를 판독 하였다.

결 과

1. **항원감작용 완충액** : 항원감작용 완충액의 적정조건을 결정하기 위하여 항원농도와 라텍스 beads 농도를 각각 2.0%로, 차단완충액(blocking buffer)은 0.5% BSA를 함유한 0.1M Tris-HCl pH 8.0으로, 300mM NaCl과 0.5% BSA 그리고 0.01% Tween 20을 함유한 0.1M Tris-HCl pH 7.4 완충액으로 혈청을 1:2에서 1:512까지 배수 희석하고, 항원이 라텍스 beads 표면에 감작되는 시간을 37℃에서 60분간 고정시킨 후, 항원감작용 완충액으로 0.5M sodium phosphate buffer (SPB) pH 7.4와 0.1M Tris-HCl pH 7.0 그리고 0.1M Tris-HCl pH 8.0을 준비하여 실온에서 60분간 방치 한 후 응집상을 관찰하였던 바, Table 1에서 보는 바와 같이 항원감작용 완충액으로 0.5M sodium phospate buffer pH 7.4와 0.1M Tris-HCl pH 7.0을 사용한 경우에 있어서는 양성혈청을 1:8까지 희석하였을 때 응집상(++)이 관찰되었으나 1:32의 혈청 희석에서 약한 응집반응(+)이 관찰되었다.

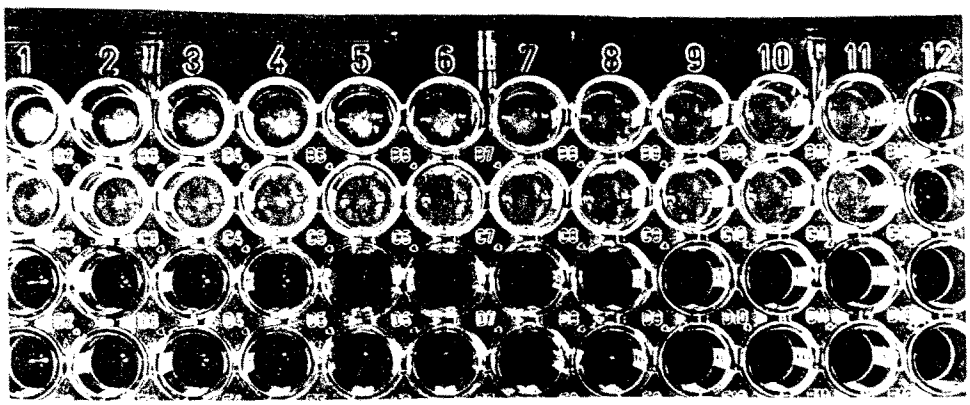

Fig. 1. Latex bead agglutinatipon test shown a specific agglutination with brucellosis positive serum(upper raw) and non agglutination with brucellosis negative serm(lower raw).

그러나 항원감작용 완충액으로 0.1M Tris-HCl pH 8.0을 사용한 경우에 있어서는 양성 혈청을 1:32까지 희석하여도 응집상을 명확하게(++) 관찰되었으며 1:256까지 희석시에도 응집반응을 Fig. 1.에서 보는 바와 같이 육안적으로 관찰할 수 있었다. 한편, 음성혈청에 대하여서는 이들 완충액의 어떤 조건에서도 응집반응을 나타내지 않았다(Table 1).

Table 1. Determination of optimal antigen coating buffer with serial double dilution of positive and negative sera using 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20, 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA, and agglutination time at 37℃/60min.

Antigen coating buffer	Serum	Reciprocal serum dilution								
		2	4	8	16	32	64	128	256	512
0.5M SPB pH 7.4	P	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1M Tris-HCl pH 7.0	P	++++	++++	++	+	+	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1M Tris-HCl pH 8.0	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

under predisposed conditions

abbreviations: "SPB": sodium phosphate buffer
antigen concentration: 2.0%, latex beads concentration : 2.0%
blocking buffer: 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA
serum dilution buffer: 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20
incubation time: 37℃, 60 min.

"-": no positive, "±": very weak positive
"+": weak positive, "++": general positive
"+++": strong positive, "++++": very strong positive
"P": positive sera, "N": negative sera

2. **차단 완충액**(Blocking Buffer) : **항원으로 감작된 라텍스 beads를 안정화시키기 위한 차단 완충액**(blocking buffer)**을 결정하기 위해 항원과 라텍스 beads 농도를 각각 2.0%로, 항원감작용 완충액은 0.1M Tris-HCl pH 8.0으로, 혈청희석용 완충액은 300mM NaCl과 0.5% BSA 그리고 0.01% Tween 20을 함유한 0.1M Tris-HCl pH 7.4으로, 라텍스 beads에 항원을 감작시킬 시간은 37℃, 60분으로 고정한 후, 항원감작용 완충액에 각각 0.5% bovine serum albumin(BSA)과 0.5% 말 혈청을 가하여 차단 완충액으로 제조하여 실험에 사용한 후 응집상을 상호 비교하였던 바, Table 2에서 보는 바와 같이 0.5% BSA를 첨가한 차단 완충액을 사용한 경우에 있어서는 양성 혈청 희석배율이 1:32까지는 "++" 정도의 응집상을 보였으며 1:128에서는 "+"의 양성반응을 나타내었으나, 0.5% 말 혈청을 사용하였을 경우에는 양성혈청을 1:16까지 희석하면 "++"의 반응을 나타내었고 1:32까지 반응을 나타내었을 뿐이다. 그렇지만 음성 혈청에 대하여서는 0.5% BSA와 0.5% 말 혈청을 가한 차단 완충액 모두에서 응집반응을 나타내지 않았다**(Table 2).

Table 2. Determination of optimal blocking buffer with antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0, serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20, and incubation time : 37℃/60min.

Blocking buffer	Serum	Reciprocal serum dilution								
		2	4	8	16	32	64	128	256	512
antigen coating buffer	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
containing 0.5% BSA	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
antigen coating buffer	P	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
containing 0.5% Horse serum	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

under predisposed conditions

abbreviation : "BSA" : bovine serum albumin
antigen concentration : 2.0%, latex beads concentration : 2.0%
antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0
serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20
incubation time : 37℃, 60 min

3. **혈청희석용 완충액** : 혈청희석용 완충액을 결정하기 위하여 항원과 라텍스 beads 농도를 각각 2.0%로, 항원감작용 완충액은 0.1M Tris-HCl pH 8.0으로, 차단 완충액은 0.5% BSA 함유 0.1M Tris-HCl pH 8.0으로, 라텍스 beads 표면에 항원이 감작되는 시간은 37℃, 60분으로 고정한 다음, 혈청을 0.5M SPB pH 7.4 그리고 0.5% BSA와 0.01% Tween 20을 함유한 0.1M Tris-HCl pH 7.4 완충액 내에 NaCl이 함유되지 않은 경우와 150㎜M, 300㎜M이 함유되도록 각각 제조하여 혈청을 각각 1:2에서 1:512까지 배수 희석한 후, 각각의 응집상을 관찰하였던 바, Table 3에서 관찰되는 바와 같이 혈청희석용 완충액으로 0.5M SPB pH 7.4를 사용하여 혈청을 희석한 경우에 있어서는 양성 혈청을 1:64배까지 희석하였을 때 "＋" 정도의 응집상을 관찰할 수 있었으며, NaCl이 함유되지 않은 0.1M Tris-HCl pH 7.4 혈청희석용 완충액을 사용하여 양성 혈청을 단계 희석하였을 때에는 혈청 희석배율이 1:32에서 "＋"의 응집상이 관찰되었고 150㎜M NaCl을 함유한 0.1M Tris-HCl pH 7.4 혈청희석용 완충액을 사용하여 혈청을 1:64배까지 희석하였을 때에는 "＋" 정도의 응집상이 관찰되었지만 NaCl을 300㎜M 함유한 0.1M Tris-HCl pH 7.4 혈청희석용 완충액을 사용하였을 경우에 있어서는 혈청을 1:256배 희석하여도 "±"의 응집상을 관찰 할 수 있어 혈청희석용 완충액으로는 300㎜M NaCl과 0.5% BSA 그리고 Tween 20 함유한 0.1M Tris-HCl pH 7.4를 사용하여 양성 혈청을 단계 희석하였을 경우에 가장 적합한 응집상이 관찰되었다(Table 3).

Table 3. Determination of optimal serum dilution buffer under antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0, blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA, and incubation time : 37℃/60min.

Serum dilution buffer	Serum	Reciprocal serum dilution								
		2	4	8	16	32	64	128	256	512
0.5M SPB pH 7.4	P	++++	++	+	+	+	+	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1M Tris-HCl pH 7.4	P	++++	++++	+++	++	+	±	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*0.1M Tris-HCl pH 7.4	P	++++	++++	+++	++	++	+	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
**0.1M Tris-HCl pH 7.4	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

under predisposed conditions

abbreviations : "*" containing 150mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20, "**" containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20
antigen concentration : 2.0%, latex beads concentration : 2.0%
antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0
blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA
serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 0.5% BSA and 0.01% Tween 20
incubation time : 37℃, 60 min

4. **혈청희석용 완충액내의** NaCl **적정 농도** : **혈청희석용 완충액에 첨가되는 적정** NaCl **농도를 결정하기 위해 항원과 라텍스** beads **농도를 각각** 2.0% **로, 항원감작용 완충액을** 0.1M Tris-HCl pH 8.0**으로, 라텍스** beads**에 항원이 감작되는 시간을** 37℃, 60**분으로 고정한 다음, 혈청을** 0.1M Tris-HCl pH 7.4 **완충**

액에 NaCl 이 첨가되지 않은 경우, 50mM, 100mM, 150mM, 300mM 그리고 450mM이 첨가되도록 각각 제조하여 양성 혈청과 음성 혈청을 1:2에서 1:512까지 2배수로 희석하여 응집상을 상호 비교하였던 바 Table 4에서 보는 바와 같이, NaCl 농도가 높을 수록 응집상이 잘 관찰되어 300mM과 450mM NaCl 첨가시 가장 강한 응집정도를 나타내고 있었다. 그러나 음성 혈청에서는 전혀 응집반응을 나타내지 않았다(Table 4).

Table 4. Determination of optimal NaCl concentration for serum dilution buffer under antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0, blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA, serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 and incubation time : 37℃, 60 min.

NaCl concentration (mM)	Serum	Reciprocal serum dilution								
		2	4	8	16	32	64	128	256	512
Nile NaCl	P	++++	+++	+	+	±	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	P	++++	+++	+	+	+	±	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	P	++++	+++	+	+	+	±	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	P	++++	+++	++	+	±	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	P	++++	+++	+++	++	+	±	±	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
450	P	++++	+++	+++	++	+	±	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

under predisposed conditions

antigen concentration : 2.0%, latex beads concentration : 2.0%
antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0
blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA
serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4
incubation time : 37℃, 60 min

5. **혈청희석용 완충액내의** BSA**와** Tween 20**의 적정 농도** : 300㎜M NaCl**을 함유한** 0.1M Tris-HCl pH 7.4 **완충액에 첨가될** BSA**와** Tween 20**의 농도를 결정하기 위하여 항원과 라텍스** beads **농도를 각각** 2.0%**로, 항원감작용 완충액은** 0.1M Tris-HCl pH 8.0**으로, 차단 완충액은** 0.5% BSA**를 함유한** 0.1M Tris-HCl pH 8.0**으로, 라텍스** beads**에 항원이 감작되는 시간은** 37℃, 60**분으로 고정한 다음, 혈청을** 300㎜M NaCl**을 함유한** 0.1M Tris-HCl pH 7.4 **완충액에** 0.5% BSA**와 다양한 농도(%)의** Tween 20**이 첨가 되도록 제조한 후, 각각의 완충액을 사용하여 혈청을** 1:2**에서** 1:512**까지 배수 희석하여 응집상을 상호 비교하여 보면,** 0.5% BSA**와** Tween 20**을 함유하지 않은 완충액보다** 0.5% BSA**와 다양한 농도(%)의** Tween 20**을 함유한 완충액을 사용하였을 경우에는 혈청을 희석함에 따라 적합한 응집상이 관찰되었다. 즉, 혈청희석용 완충액에** BSA**나** Tween 20**을 첨가하지 않은 경우에는 양성 혈청에 대하여** 1:32 **혈청희석배율에서 "**＋**"의 응집반응을 보였지만,** 0.5% BSA**를 첨가한 예에서는** 1:1**에서 다소 약한 반응(**＋＋＋**)으로 시작하였으며 양성 혈청을** 1:64**배까지 희석하였을 때 "**＋**"의 응집반응을 보였으며, 혈청희석용 완충액에** 0.5% BSA**가 첨가되고** Tween 20**이** 0.01%, 0.03% **그리고** 0.05%**로 첨가되었을 경우에는 양성 혈청에 대하여** 1:128**에서 "**＋**"의 응집반응을 보여,** Tween 20**의 농도가** 0.01% **이상으로 하여도 응집반응에 영향을 끼치지 않아** Tween 20**의 농도는** 0.01%**로 결정하였으며, 음성 혈청에 대하여서는 전혀 응집반응이 나타나지 않았다(**Table 5).

Table 5. Determination of additional concentration of BSA and Tween 20 in serum dilution buffer under the conditions follow antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0, blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA, serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl and incubation time : 37℃, 60 min.

BSA and Tween 20 concentration	Serum	Reciprocal serum dilution								
		2	4	8	16	32	64	128	256	512
not added	P	++++	+++	+++	++	+	±	±	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5% BSA	P	+++	+++	+++	++	++	+	±	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5% BSA, 0.01% Tween 20	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5% BSA, 0.03% Tween 20	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5% BSA, 0.05% Tween 20	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

under predisposed conditions

antigen concentration : 2.0%, latex beads concentration : 2.0%
antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0
blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 0.5% BSA
serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl
incubation time : 37℃, 60 min

6. Latex beads**와 결합하는 항원 농도** : latex beads**와 결합하는 항원 농도를 결정하기 위해 라텍스** beads **농도를** 2.0%**로, 항원감작용 완충액은** 0.1M Tris-HCl pH 8.0**으로, 차단 완충액은** 0.5% BSA**를 함유한** 0.1M Tris-HCl pH 8.0 **으로, 혈청희석용 완충액은** 300mM NaCl **과** 0.5% BSA **그리고** 0.01% Tween 20**을 함유한** 0.1M Tris-HCl pH 7.4**로, 라텍스** beads**와 항원의 결합을 위한 감작 시간**

은 37℃, 60분으로 고정한 후, 침전된 항원을 PBS(pH 7.2)를 사용하여 w/v으로서 1.0%, 2.0%, 5.0%, 10.0%로 하여 라텍스 beads에 감작시켜 각각의 응집상을 관찰하였던 바, Table 6에서 보는 바와 같이 항원 농도가 1.0%에서 2.0%로 증가할 때 각각 1:256 배로 혈청을 희석하여도 응집상태를 관찰 할 수 있었지만 항원농도가 5.0%와 10.0%로 증가하면 오히려 응집에 방해를 받아 혈청을 1:2에서 1:64배로 희석하면 응집상이 관찰되지만 그 이상의 희석 배율에서는 응집상이 관찰되지 않아 2.0%의 항원을 라텍스 beads에 감작시켰을 때 가장 적합한 응집상을 관찰 할 수 있었다. 그러나 음성 혈청에 대하여서는 전혀 응집반응이 나타나지 않았다(Table 6).

Table 6. Determination of antigen concentration of binding latex beads under antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0, blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA, serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20 and incubation time: 37℃, 60 min.

Ag concentration (%)	Serum	Reciprocal serum dilution								
		2	4	8	16	32	64	128	256	512
1.0	P	++++	++++	+++	++	++	+	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.0	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	P	++++	+++	+++	++	+	±	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.0	P	++++	+++	+++	++	+	±	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

under predisposed conditions

latex beads concentration : 2.0%
antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0
blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA
serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20
incubation time : 37℃, 60 min

7. Latex beads **농도** : **항원과 결합하는 라텍스** beads **농도를 결정하기 위해 항원의 희석비율을** 2.0%**로, 항원감작용 완충액을** 0.1M Tris-HCl pH 8.0**으로, 차단 완충액은** 0.5% BSA**를 함유한** 0.1M Tris-HCl pH 8.0**으로, 혈청희석용 완충액은** 300mM NaCl, 0.5% BSA **그리고** 0.01% Tween 20**을 함유한** 0.1M Tris-HCl pH 7.4**로, 라텍스** beads**에 항원이 감작되는 시간은** 37℃, 60**분으로 고정한 다음, 라텍스** beads **농도를 항원 감작용 완충액을 사용하여** 1.0%, 1.5%, 2.0% **그리고** 2.5%**로 하여 항원과 결합시켜 각각의 응집상을 상호 비교하여 보면, 라텍스** beads **농도가 증가될수록 강한 응집상이 관찰되었으며, 혈청희석 배율도 증가됨이 관찰되었다. 특히, 라텍스** beads **농도가** 2.0%**와** 2.5% **일 때는 혈청을 각각** 1:256**과** 1:128 **배수로 혈청을 희석하였을 때에도 "＋"의 응집상이 관찰되었다. 그러나 라텍스** beads**는 유백색이므로** 2.5% **이상을 첨가하면 육안적 판단에 장애를 미치므로** 2.0% **정도의 희석 비율로 희석함이 적정하였다. 그러나 음성 혈청에 대하여서는 전혀 응집반응을 관찰할 수 없었다**(Table 7).

Table 7. Determination of latex beads concentration binding antigen under antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0, blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA, serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20, and incubation time : 37℃, 60 min.

Latex concentration (w/v, %)	Serum	Reciprocal serum dilution								
		2	4	8	16	32	64	128	256	512
1.0	P	++++	+++	++	+	±	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5	P	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.0	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	P	++++	+++	+++	++	++	+	±	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

under predisposed conditions

antigen concentration : 2.0%
antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0
blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA
serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20
incubation time : 37℃, 60 min

8. Latex beads와 항원의 적정 감작시간 : 라텍스 beads에 항원이 감작되는 감작시간을 결정하기 위해 항원과 라텍스 beads 농도를 각각 2.0%로, 항원감작용 완충액은 0.1M Tris-HCl pH 8.0으로, 차단 완충액은 0.5% BSA를 함유한 0.1M Tris-HCl pH 8.0으로, 혈청희석용 완충액은 300mM NaCl과 0.5% BSA 그리고 0.01% Tween 20을 함유한 0.1M Tris-HCl pH 7.4로 고정한 후, 라텍스 beads에 항원을 4℃/일주야, 37℃/30분, 37℃/60분, 37℃/120분, 37℃/일주야 씩 각각 감작시켜 각각의 응집상을 상호 비교하여 보면, Table 8에서 보는 바와 같이 4℃/일주야 그리고 37℃/30분씩 라텍스 beads에 항원을 감작시킨 경우에 있어서는 응집상이 혈청 희석배율에 상관없이 불규칙한 응집상을 관찰할 수 있었으며, 37℃/120분과 37℃/일주야씩 감작시킨 경우에 있어서는 1:32배로 혈청을 희석하였을 때 "+" 정도의 응집상을 관찰할 수 있었지만 라텍스 beads에 항원을 37℃에서 60분간 감작시켰을 경우에 있어서 1:256배까지 혈청을 희석하였을 때 "±" 정도의 응집상이 관찰되었다. 그러나 음성 혈청에 대하여서는 전혀 응집반응을 관찰할 수 없었다(Table 8).

Table 8. Determination of incubation time for combination of antigen and latex beads under antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0, blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA, and serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20.

Incubation time	Serum	Reciprocal serum dilution								
		2	4	8	16	32	64	128	256	512
4℃, overnight	P	++	+	++	+	-	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37℃, 30 Min	P	++++	++++	+++	++	+++	+	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37℃, 60 Min	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37℃, 120 Min	P	++++	++++	++	+	+	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37℃, overnight	P	++++	++	++	+	+	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

under predisposed conditions

antigen concentration : 2.0%, latex beads concentration : 2.0%
antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0
blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA
serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20

9. **진단액의 보존기간** : 항원이 감작된 라텍스 beads를 4℃ 냉장고에 각기 1개월에서 12개월간 보관하면서 응집반응 정도를 관찰하였던 바 Table 9에서 보는 바와 같이 1개월에서 6개월 보관한 진단액은 양성혈청과의 반응시 응집상태가 변화되지 않고 일정한 응집반응이 나타났지만 12개월 보존하였을 경우에는 1:32에서 "+"의 응집반응을 나타내었으며 7개월부터는 점차적으로 반응이 낮게 나타났다. 그러나 음성 혈청에서는 응집반응이 나타나지 않았다(Table 9).

Table 9. Determination of optimal preservation term for diagnostic antigen solution under at 4℃

preservation period (month)	Serum	Reciprocal serum dilution								
		2	4	8	16	32	64	128	256	512
1	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	±	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	P	++++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	P	++++	+++	+++	++	+	+	±	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	P	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	P	++++	+++	++	+	+	+	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	P	++++	+++	++	+	+	±	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	P	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-

under predisposed conditions

antigen concentration : 2.0%, latex beads concentration : 2.0%
antigen coating buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0
blocking buffer : 0.1M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5% BSA
serum dilution buffer : 0.1M Tris-HCl pH 7.4 containing 300mM NaCl, 0.5% BSA and 0.01% Tween 20
incubation time : 37℃/60min

고 찰

우리나라에서의 소 부루셀라병 발생은 1956년 미국에서 도입된 젖소에서 최초로 보고된 이래 근절되지 않고 매년 계속적으로 발생되고 있으며, 최근 1990년대 이후에는 매년 약 300 500여두의 젖소가 부루셀라 양성으로 판정되어 살처분되고 있어 농가뿐만 아니라 국가 예산면에서도 커다란 손실을 끼치고 있는 심각한 전염병 중의 하나이다(농림부 1995, 박 등 1959, 문 등b 1996, 손 등 1986, 정 등 1988).

우리나라 소에서 크게 유행하고 있는 부루셀라병의 원인균은 그람 음성의 작은 간균(0.5 0.7×0.6 1.5㎛)으로 비운동성이며, 아포를 형성하지 않는 세균으로 유제류의 자궁, 태아의 체액 그리고 황소, 양, 돼지, 개 등의 고환 등의 감염을 선호하며, *Brucella abortus*의 경우에 있어서는 우유로 배출되어 우유, 물 그리고 습기있는 토양에 4개월까지도 생존 가능한 균주(Quinn *et al*. 1994)이기 때문에 이의 근절에 환경적 조건이 영향을 미치는 것으로 사료된다.

부루셀라병의 전염은 직·간접 접촉과 섭식 등에 의해 일어나며, 부루셀라는 병원성과 관련된 세포내 독소와 B-lymphocyte와 결합할 수 있는 표면 세포벽 탄수화물을 함유하고 있어 부루셀라가 숙주세포에 감염되면 숙주세포의 탐식세포들에 의해 탐식된다. 그곳에서 부루셀라 균주는 생존, 증식하면서 국소 림프절로 이동한 후, 혈류를 통해 실질장기 및 관절과 같은 다른 조직으로 이동하게 된다. 부루셀라 균은 본래 성숙된 동물의 생식기 질병으로 암·수 생식기, 특히 자궁을 좋아하며, 동물 세포내의 erythritol을 포함한 allantonic factors는 부루셀라 균의 성장을 촉진한다. 이 erythritol은 태반과 소, 양, 염소 그리고 돼지의 수컷 생식기에 존재하지만 사람에서는 존재하지 않는다. 소에 있어서 화농성 육아종이 감염된 태반에서 발생하며, 유산(30 40%)은 임신 중기 이후에 발생한다. 암컷은 감염되면 보통 한번 유산을 한 후 다음 출산 때부터는 많은 양의 부루셀라 균을 배출(CIE 1992, Quinn et al. 1994)하므로 한 무리의 소에게

강한 전염성을 나타내게 된다.

부루셀라 균은 병원성이 없는 것으로 알려진 *B. neotomae*와 *B. ovis* 그리고 *B. abortus* RB51을 제외한 모든 균주가 사람에 감염되어 파상열, 권태감, 피로, 발한, 근육·관절통 등을 일으키며 합병증으로 골수염을 일으키지만 유산을 일으키지는 않는 것으로 알려져 있다(Mayer 1990, Quinn *et al*. 1994, Schrig *et al*. 1991, Timoney *et al*. 1988)

부루셀라병의 진단은 주로 소 부루셀라병 균의 분리를 유산태아, 유산 분비물, 유방 분비액 또는 사후에 적출한 조직으로부터 이루어 진다. 일반적인 분리 방법으로는 부루셀라 균 집락에 대한 특이성 또는 혈청학적 반응으로 동정 확인할 수 있다(OIE 1994). 그리고 혈청학적인 진단법으로는 milk ring test(MRT), 로즈벵갈응집반응(RBPT), 튜부 응집반응(TAT), 표준평판응집반응(SPT), 보체결합반응(CFT) 등의 방법으로 진단이 가능한 실정이며 최근에는 ELISA와 PCR 등의 분자생물학적 방법이 활용되고 있다(OIE 1992, Quinn *et al*. 1994, 정 등 1996).

우리나라에서는 부루셀라병에 대한 공인진단법으로 MRT와 표준평판응집반응 그리고 튜부 응집반응을 실시하고 있다. 착유우를 대상으로 실시하고 있는 MRT는 집단 또는 농장별로 부루셀라 검색을 위해 1차 스크리닝하는데 사용되는 진단법으로 착유우가 1,000여두 이상의 대규모 농장에서는 민감도가 다소 떨어지는 단점이 있다. 표준평판응집반응도 스크리닝하는데 사용되어지는 진단방법으로 양성 판정된 개체는 CFT나 IgG1-특이 절차로 재검 받아야하며, 위음성이 발생할 수 있으며, 적어도 3개월이 지난 후에 재검사하여야 한다. 튜부응집반응(혈청응집반응)은 다른 진단법보다 특이성과 민감성이 떨어지지만 이 진단법은 지금까지 소 부루셀라병 진단에 가장 흔히 사용되어지고 있다(OIE 1992). 이에 반하여 보체결합반응은 가장 정확한 확증방법으로 microtitration 방법이 가장 일반적으로 사용되어지고 있으나 진단 술식이 복잡한 것이 하나의 단점이라 하겠지만(백 등 1997b), 위음성 반응도 감염된 동물에서 나타날 수 있으나 응집반

응을 기초로한 다른 진단법보다 훨씬 낮게 나타나므로서 훌륭한 진단 방법으로 활용되고 있다(OIE 1992).

소에서 *Erucella abortus*에 자연적으로 감염되면 IgM과 IgG 두 종류의 항체가 모두 증가하게 된다. 그러나 IgM역가는 점차 감소되어 결국에는 IgG의 역가가 우세하게 된다. 부루셀라병 만성의 경우에 있어 IgG1이 높은 수준으로 존재하게 될 수도 있는데, 이는 그 스스로도 응집력이 약하며, 또한 본래 응집력이 뛰어난 IgM의 능력을 방해하므로 응집반응을 이용한 부루셀라병 감염 진단시에 유의하여야 할 사항 중에 하나이다(Quinn *et al*. 1994).

우리나라에서 부루셀라병 감염 개체로 확인 시험하는데 사용되어지는 TAT는 항원과 항체의 응집 상태를 갖고서 양성과 음성을 구분하는 진단법이지만 만성형에서는 IgG1의 량이 많아 응집반응을 방해하여 만성형의 개체를 검출할 수 없을 경우가 있다. 또한 잠복기 직전의 개체를 검출할 수 없다. 그리고 집단검색시 유효하게 사용되는 방법인 MRT는 우유중에 존재하는 IgM, IgG1 그리고 IgA의 항체를 검출할 수 있지만 대규모의 농장에서는 민감성이 다소 떨어지며 이 검사에서 양성으로 판정된 혈청은 보체결합반응 검사로 재검사를 통하여 확진함이 타당할 것이다. 그리고 확증 검사로 사용되는 CFT는 IgG1과 IgM의 검출에 특이도가 높은 방법으로 세계적으로 널리 사용되어지고 있다(OIE 1992, Quinn *et al*. 1994). 하지만 그 진단 술식이 복잡하고 고도의 숙련이 필요해 우리나라에서는 아직 일반적으로 활용되지 못하고 있는 실정이다. 그러므로 연자는 라텍스 beads를 항원의 운반체로 하여 항체와의 응집력을 이용한 진단방법을 개발하였다.

최근, 부루셀라진단에 있어서 라텍스 beads를 사용하여 연구가 수행되고 있는데(Axel *et al*. 1992, Bowden *et al*. 1993, Cloeckaert *et al*. 1992, Lu *et al*. 1995), Lu 등(1995)에 의하면, 라텍스에 부착된 항원의 안전성, 반복성 그리고 정확성 등이 높은 것으로 알려지고 있는 라텍스 응집반응(LAT)은 부루셀라 항원에 대한 항체 중 IgM과 IgG 항체를 동시에 검출할 수 있으며 로즈벵갈응집

반응의 결과와 비교하여 보면 LAT는 로즈벵갈응집반응보다 더 안정하고 특이도가 높다고 하였으며, 표준평판 응집반응 및 ELISA의 결과와 같다고 하였으나, 본 연구에서는 부루셀라 양성과 음성 혈청 130예를 이용한 TAT와 비교시 민감도는 75.3%이었고, 특이도는 100%였으며, CFT의 결과와의 비교시에서는 민감도 및 특이도 모두에서 일치하였으며, Axel 등(1992a)에 있어서는 항원감작용 완충액으로 glycine-buffered saline(GBS:0.17M NaCl, 0.1M glycine and 6mM NaN_3, pH 9.2)을 사용하였고 항원으로 감작된 라텍스를 안정시키기 위해 BSA를 함유한 완충액을 사용하였고, 혈청희석용 완충액으로는 Tween 20을 0.05% 함유한 같은 완충액을 사용하였으나, 본 연구에서는 항원감작용 완충액으로 0.1M Tris-HCl pH 8.0을, 감작된 라텍스를 안정시킬 완충액으로는 BSA를 함유한 같은 완충액을, 혈청 희석용 완충액으로는 300mM NaCl, 0.5% BSA 그리고 0.01% Tween 20을 함유한 0.1M Tris-HCl pH 7.4를 사용하였다. 라텍스 beads는 적혈구와 세균 등과 더불어 수용성 항원을 라텍스 beads의 표면에 강하게 부착, 결합시키어 가검혈청에 특이 항원에 대한 항체가 함유되어 있으면 곧 강하게 결합, 응집되어 침전한다(Tizard 1995). 즉, 수용성 항원들은 라텍스 beads의 표면을 이용하고 있어 항체와 반응할 부위를 증가시키는 효과를 가져오므로 혈청 중에 항체가 존재하면 서로 응집반응을 일으켜 가시적으로 확인할 수 있게 된다(Turgeon 1996).

우리나라에서는 부루셀라병 진단에 라텍스 beads를 이용한 진단 시도 예는 접할 수 없었지만, 가축의 질병 진단에서 LAT는 개의 톡소플라즈마병 진단에 활용(이 등 1992, 서 등 1993 & 1995)되었는데 부루셀라병 진단에 있어 진단액을 준비하면 그 진단술식이 간단하고 고가의 진단장비를 준비하지 않아도 실험실뿐만 아니라 야외에서도 활용이 가능하지만 진단액 제조와 진단술식의 표준화로서 정확한 진단을 수행하여야 한다(Turgeon 1996). 본 연구를 통하여 얻어진 각종 시료를 준비하여 적정 조건을 결정한 후 야외에서 얻은 부루셀라병에 감염된 양성과 음성으로 판정된 130여두의 예로 CFT의 결과와 비교하여 보면 그 결과는 CFT와 일치하여 부루셀라 검출에 유용하게 사용할 수 있는 것으로 사료되었다.

본 연구에 의해 수행된 진단액 제조 조건과 진단술식을 최종적으로 파악하여 보면, LAT의 적정조건을 확립하는데 있어서 가장 중요한 조건은 항원과 라텍스 beads의 감작에 사용한 각종 완충액이었다. 즉, 항원 감작용 완충액으로 0.1M Tris-HCl pH 8.0을 사용하여 항원을 감작시켰을 때 가장 명확한 응집반응을 나타내었으며, 교차반응을 막기 위해 차단 완충액내에 같은 농도의 BSA(fraction V)와 말 혈청을 첨가하였던 바 0.5% BSA를 첨가한 차단 완충액을 사용한 경우에 있어서는 양성 혈청 희석배율이 1:32까지는 "++" 정도의 응집상을 보였으며 1:128에서는 "+"의 양성반응을 나타내었으나, 0.5% 말 혈청을 사용하였을 경우에는 양성혈청을 1:16까지 희석하면 "++"의 반응을 나타내었고 1:32에서 "+"의 반응을 나타내었다. 한편 혈청희석용 완충액 내에 첨가되는 NaCl과 BSA 그리고 Tween 20도 영향을 끼쳐 NaCl 농도가 높을수록 응집이 잘 관찰되었지만 특히, NaCl을 300㎜M과 450㎜M 첨가시 가장 강한 응집반응을 나타내었으며, 혈청희석용 완충액내의 BSA와 Tween 20의 농도는 각기 0.5%와 0.01%였다. 그리고 항원과 라텍스 beads의 농도도 감작조건에 중요한 요소로 작용한다. 즉, 항원 농도가 1.0%에서 2.0%로 증가 할 때 각각 1:64에서 1:256 배로 혈청을 희석하여도 응집상태를 관찰 할 수 있었지만 항원농도가 5.0%와 10.0%로 증가하면 오히려 응집이 방해를 받아 혈청을 1:2에서 1:64배로 희석하면 응집상이 관찰되지만 그 이상의 희석 배율에서는 응집상이 관찰되지 않았고, 항원과 결합하는 라텍스 beads 농도는 농도가 증가될수록 강한 응집상이 관찰되어 혈청희석 배율도 증가됨이 관찰되었고 특히, 라텍스 beads 농도가 2.0%와 2.5% 일 때는 혈청을 각각 1:256과 1:128 배수로 혈청을 희석하였을 때에도 "+"의 응집상이 관찰되었다. 그러나 라텍스 beads의 색깔이 유백색이므로 2.5% 이상을 첨가하면 육안적 판단에 장애를 미치므로 2.0% 정도의 희석 비율로 희석함이 적정하였다. 마지막으로 항원을 라텍스 beads에 감작시킬 감작시간은 37℃에서 60분이면 충분히 적합한 응집상을 나타내고 있음을 관찰할 수 있었다.

특이도와 민감도가 높은 실험법으로 알려진 LAT을 이용하여 부루셀라병 검진의 실용화를 위해 본 연구에 의해 제조된 LAT 진단법에 의한 혈청 역가를 1:2 이하는 음성으로 하고 1:4이상은 양성으로 하여 130여두의 소 혈청을 이용하여 현재 우리나라에서 부루셀라병 공인진단방법으로 활용되고 있는 TAT와 brucellosis 확정진단법으로 사용되고 있는 CFT와 그 결과를 비교하여 보았던 바, 그 결과 LAT의 우수성이 확인 되었다.

우선 TAT 양성혈청에 대한 LAT결과의 특이도와 민감도를 비교하고자 Table 10의 술식에 따라서 TAT에서 양성으로 판정되어 살처분된 77두 중 LAT에서 58건의 양성과 19건이 음성으로 판정되었고, TAT에서 의양성으로 판정된 11건 중 LAT에선 1건의 양성과 10건이 음성으로 판정되었으며, TAT에서 음성으로 판정된 42건은 LAT에서도 모두 음성으로 판정되어 TAT를 기준으로한 LAT에서의 민감도와 특이도는 각각 75.3%와 100%였다(Table 11).

Table 10. Determination of specificity and sensitivity of ELISA based on TAT results

Standard test / LAT	TAT	
	Positive No	Negative No
Positive No.	A	C
Negative No.	B	D

$$\text{Sensitivity}(\%) : \frac{A}{A + B} \times 100$$

$$\text{Specificity}(\%) : \frac{D}{C + D} \times 100$$

Table 11. Comparison of specificity and sensitivity between MRT/TAT and LAT of 130 bovine sera.

Diagnostic Methods		MRT/TAT (Brucellosis)			Specificity (%)	Sensitivity (%)
		＋ (77)	± (11)	- (42)		
LAT	＋	58	1	0	100	75.3
	-	19	10	42		

CFT진단 결과와 LAT 결과와의 일치율을 비교하여 보면 Table 12에서 보는 바와 같이CFT에서 양성으로 판정된 64두 모두 LAT에서도 양성으로 판정되었고 CFT에서 음성으로 판정된 66두 모두 LAT에서도 음성으로 판정되어 그 결과는 100% 일치하였다(Table 12). 본 연구에 의해 제조된 진단액과 진단법을 사용하여 시험하여 본 결과 LAT의 결과는 CFT의 결과와 일치함을 확인할 수 있었으며, 소 부루셀라병에 있어 가장 정확한 확증 시험법으로 알려진 CFT는 진단술식이 복잡하며(백 등 1997b), 고도의 숙련이 요구되고 있는 있는 실정이다. 결국 LAT의 진단효과는 CFT 방법을 이용한 진단 결과와 일치하면서도 그 진단 술식이 간편, 안전하며 결과 판정에 소요되는 시간도 짧고 누구나 쉽게 활용할 수 있는 진단법으로서 관찰되므로서 앞으로 LAT를 이용한 부루셀라병의 진단법은 보다 정확하고 신속하게 소 부루셀라병 검출에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 12. Comparison of specificity and sensitivity between CFT and LAT of 130 bovine sera.

Diagnostic Methods		CFT		Specificity (%)	Sensitivity (%)
		＋ (64)	- (66)		
LAT	＋	64	0	100	75.3
	-	0	66		

결 론

부루셀라병은 우리나라에서 매년 발생하고 있는 가축 법정전염병으로 사람에게도 감염되는 인수공통전염병이다. 부루셀라병은 주로 불임, 유산을 일으키며 사람에서는 파상열, 근육·관절통, 오한 등을 일으킨다.

이를 근절하기 위해 정부에서는 매년 수백 두의 양성으로 진단된 소를 살처분하고 있지만 이 질병은 아직까지 근절되지 않고 오히려 발병 두수가 증가추세에 있어 해마다 양축 농가뿐만 아니라 국가 예산면에서도 막대한 경제적 손실을 주고 있는 전염병이기도 하다.

본 연구는 부루셀라병 검출에 있어 민감도와 특이도가 높으며 진단 술식이 간단한 방법인 라텍스 응집반응을 microtiter plate에서 수행하기 위하여 진단액 제조시의 항원농도, 완충액 등을 결정하고, 공인진단법인 TAT와 CFT의 진단소견과 비교하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 항원감작용 완충액으로는 0.1M Tris-HCl pH 8.0을, 라텍스 beads에 감작된 항원을 안정화시킬 차단 완충액으로는 0.5% BSA을 함유한 0.1M Tris-HCl pH 8.0을, 그리고 혈청희석용 완충액으로는 300mM NaCl와 0.5% BSA 그리고 0.01% Tween 20을 함유한 0.1M Tris-HCl pH 7.4를 사용하였으며,

2. Latex beads에 항원을 감작시킬 감작 조건은 37℃, 60분이었으며, 감작될 라텍스 beads와 항원의 최적 농도는 각각 2.0%였다.

3. Polystyrene 라텍스 beads 부유액을 항원 감작용 완충액으로 원심 세척한 다음, 농도를 2.0%(w/v)로 조정한 후, PBS(pH 7.2)로 희석된 항원[2.0%(w/v)]과 latex beads의 배합비율이 24:1이 되도록 배합한 다음, 37℃에서 60분간 감작 시켰다. 이를 다시 원심(4,000g/20)한 다음, 침전된 감작 항원을

차단 완충액으로 동량 가하여 진단액을 제조하여 4℃에 보관하였으며, 4℃에 보관된 진단액은 6개월까지 혈청 희석 배율에 따른 응집상의 변화 없이 사용 가능하였다.

4. 진단액을 이용하여 130여두의 소 혈청에 대하여 LAT 혈청 역가 1:2 이하를 음성으로, 1:4 이상은 양성으로 하여 얻은 결과를 TAT 그리고 CFT와의 결과를 비교하였던 바, TAT진단 결과와 LAT의 결과와의 일치율에서는 민감도는 75.3%였으며, 특이도는 100%였으며, CFT 진단 결과와 LAT의 진단 결과는 일치하였다.

이 같은 LAT의 진단방법은 정확한 부루셀라병 진단에 폭넓게 활용할 수 있을 것이며 TAT나 CFT방법에 비교하여 보면 응집반응 정도나 진단 시간이 짧게 소요되어 앞으로 부루셀라병 진단에 활용가치가 높을 것으로 사료된다.

제 3 절 ELISA법을 이용한 Brucellosis 진단

서 론

가축이나 사람의 질병인 Brucellosis 진단을 위하여 ELISA는 수 없이 활용되어 오고 있다. Brucellosis 진단을 위한 ELISA는 주로 항원을 검색하기 위한 것과(Baldi et al 1994, Cloeckaert et al 1992, Araj et al 1989, Lamb et al 1979, Magee 1980), 예방용 항원과 진단용 항원을 구분하기 위하여 immunoblot과 더불어 사용되어온 것이 있다(Chin et al 1991). 이 방법은 Brucellosis를 효율적 그리고 신속히 진단하기 위하여 활용되고 있으며, 특히 많은 수의 가검물을 일시에 검색하기 위한 특이성이 높고 감수성이 높은 진단방법으로서 ELISA 방법은 많은 질병에서 활용되어 왔으나(Nielson et al 1992), 감염시기에 따라서 IgM과 IgG 등의 출현 시기가 다르게 나타나므로서 진단결과가 다를 수 있을 것이다(Parma et al 1984). 물론, ELISA에 사용되는 항원은 가능한 Vibrio cholerae, Y. entericotica, Smalnella 등의 세균이 함유하고 있는 LPS의 epitope이 교차반응을 일으킬 수 있어 혈청학적 진단을 수행하는데 있어서는 위양성을 가져 오는 바 항원의 선택과 준비는 대단히 중요하다(Corbel 1985, Perrry and Bundle 1990). 종류는 여러 가지이다. 즉, 세포막성물질(임 등 1995a), 새포질성 물질(Baldi et al 1994) 그리고 LPS 등이 있다.

우리나라에서의 Brucellosis 진단은 주로 우유로부터의 MRT와 혈청으로부터의 TAT방법이 활용되어 왔으며(김 등 1982), 이의 판정결과 양성으로 나타나면 축우를 도축시키므로서 Brucellosis를 근절시키고자 많은 노력을 기하여 왔다. 그러나 이런 노력에도 불구하고 Brucellosis 발병 두수가 계속적으로 증가되므로서, 이를 정확하고 신속하게 진단하기 위한 방법이 절실하게 필요한 시점에 이르렀다.

따라서 Brucellosis를 진단하기 위하여 가능한 여러가지 진단법 즉, plate agglutination test, tube agglutination test, latex agglutination test, Rose bengal test, Complement fixation test, ELISA 등의 각종 혈청학적 진단방법 사이에 있어서 질병에 따라서는 진단 결과가 달라질 수 있을 것이다(김 등 1982, Chin et al 1991).

우리나라에서도 brucellosis의 정확한 진단을 위한 여러가지 진단방법에 대한 연구의 일환으로 최근에 임 등(1993)은 현재의 공인진단법으로 사용되는 응집반응법과 비교하여 우수한 성적을 얻었는 바, 이의 진단용 Kit를 제조하기 위한 연구를 수행한 바 있다. 특히 의양성 우와 조기진단의 목적으로 개발 시도한 임 등(1993)은 의양성 우의 확정판정을 위하여 특히 유용하게 활용 할 수 있었다고 보고하였다. 본 예에서도 1994 - 1996년 사이에 살처분된 소의 혈청과 음성인 혈청을 수거, ELISA방법으로 관찰하여 양성으로 판정된 소의 혈청과 의양성으로 판정된 소의 혈청에 대한 시험성적을 타 진단방법과 비교 분석하였다.

본 연구에서는 1994 -1996년 사이에 수거한 소의 혈청(Table 1)을 ELISA방법으로 관찰하여 MRT와 TAT에서 진단결과와 특이성 및 감수성을 비교 분석하던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

재 료 및 방 법

1. *Brucella* **항원의 준비**: 본 시험에 사용한 균주는 *Brucella abortus* 1119-3 균주를 배양하여 항원을 준비하였다. 즉, 균주를 Brucella agar(Difco Co.)에 48시간 배양한 다음 선택배지(Difco Co.)에서 37℃로 72시간 증균시키고 4℃에서 냉 아세톤으로 18시간 처리한 다음 침전된 균체를 생리식염수로 10회 세척하여 10%(w/v)부유액으로 만든 후 Ice bath내에서 초음파 분쇄(120w, 20분)

하였다. 초음파 처리한 균체액은 원심분리(20,000g, 20분, 4℃)하여 침전된 균체 분쇄물을 생리식염수로 10회 세척한 후 sodium dodecyl sulfate를 0.01% 되게 용해하여 30℃에서 1시간 방치한 다음 원심분리(60,000g, 20분)하였다. 상층액을 수거하여 Lowry(1951)의 방법으로 단백질을 정량한 후 -20℃에 보관하면서 세포막성 항원으로서 ELISA에 사용하였다(Jagannath & Sehga 1989, 임 등 1993).

2. **공시혈청** : 유우의 정기검사에서 양성으로 판정된 소 65 예와, 의양성으로 판정된 축우 19예 그리고 음성로 판정된 축우 혈청 32예를 대상으로 실험을 실시하였다(Table 1. 참조).

3. **항원의 흡착** : 준비한 항원을 흡착용 완충액(50㎜M Carbonate buffer, pH 9.6, 0.02% sodium azide)으로 단백질량이 4㎍/㎖ 되게 희석하여 ELISA plate의 각 well에 희석한 항원을 50㎕씩 분주하고 plastic wrap으로 plate를 밀폐한 다음 실온에서 약 16시간 정치시킨 후 증류수로 3회 세척하였다. Blocking buffer(0.25% BSA와 0.05% Tween 20이 함유된 PBS, 이하 동일함)를 50㎕씩 분주하여 실온에서 30분간 방치한 후 증류수로 3회 세척하고 마지막 세척 후 잔여분의 물기를 제거하였다.

4. **효소 면역 측정법** : Blocking buffer로 가검혈청을 희석하여 50㎕씩 각 well에 가하고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 3회 세척, 물기를 제거한 후 horseradish peroxidase가 표지된 conjugate를 blocking buffer를 이용, 희석(1:1,000)하여 50㎕씩 분주한 다음 plastic wrap으로 밀폐시킨 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 3회 세척, 물기를 제거하고 substrate(GENEDIA® HIV 1/2 ELISA 30, 주식회사 녹십자)를 50㎕씩 분주한 다음 실온에서 30분간 반응시키고 발색반응이 끝나면 25㎕의 1M 황산을 가하여 반응을 정지시키고 즉시 reader를 이용하여 파장 450㎚의 대조 파장으로 흡광도를 측정하였다.

Brucellosis 진단을 위한 양성판정 기준을 정하기 위하여 CD값의 결정은 다음과 같이 하였다. 즉, TAT진단 방법으로 음성으로 판정된 32예의 혈청의 ELISA 흡광도의 평균값에 2배 표준오차 값(Mean±2SD)을 기준으로 하여 이보다 높은 흡광도를 나타낼 때 양성 값의 Cut off으로 결정하였다(수의공중보건학 1996).

5. ELISA와 TAT의 양성 판정 혈청과의 일치율 : brucellosis 양성판정된 소의 혈청 65예를 대상으로한 진단결과를 비교하여 양성판정을 위한 일치율을 상호 비교 하였다.

결 과

1. 양성 판정을 위한 cut off 값 결정

Brucellosis 양성판정과 음성판정을 위한 ELISA값의 결정은 음성으로 판정되었던 혈청의 평균 CD값(NCχ)은 0.161이었고 이에 대한 평균편차는 0.087으로서 cut off값은 0.161+(2x0.087), 즉 0.335으로 결정하였고, 이를 기준으로 음성과 양성으로 각각 판정하였다. 한편, 검사 때마다 음성대조 평균치가 0.5배 내지 1.5배의 범위를 벗어났을 경우는 재검사를 실시하였다.

2. 양성, 의양성 및 음성 혈청에 대한 ELISA값

Brucellosis 양성 판정된 소 혈청 ELISA CD값은 평균 0.621이었으며, TAT 및 CF 등의 혈청 검사에서 의양성으로 판정되었던 혈청은 평균 0.215로서 관찰되었다. 그리고 음성으로 판정되었던 혈청은 평균 0.161이었다.

3. ELISA와 TAT 의양성 판정 혈청과의 일치율

Brucellosis 양성으로 판정되어 살처분된 소의 혈청 65예를 ELISA값과의 비교시험에서 53두가 양성으로 나타나므로서 그 일치율은 81.5%이었지만, 의양성으로 판정된 19두중 18두가 음성으로 나타났으며, 음성의 경우는 32두 중 30두만이 음성으로 그 일치율이 93.8%를 나타내었다.

4. CFT검색에서 나타난 ELISA와의 관계:

1995년도와 1996년도에 충남, 전북 그리고 제주도 지역에서 살처분된 소의 혈청의 ELISA값은 양성 평균값이 0.621±0.209였고, 음성평균값은 0.161±0.087 이었다.

이들 혈청을 각각 CFT 방법으로 그 양·음성 판정을 위한 시험을 실시한 결과 ELISA에서 양성으로 판정되었던 혈청은 양성판정 역가인 1:20 이상의 희석배율에서 양성으로 판정되었으며 음성이었던 32예에서는 ELISA 판정결과와 CFT 판정결과와 일치하였다. CFT 반응에서 적혈구가 용혈되지 않는 희석배율별 ELISA와의 관계를 비교하였던 바, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 그리고 1:160에서 각 각 0.233±0.074, 0.680 ±0.161, 0.598±0.196, 0.676 ±0.376 그리고 0.650±0.155로서 관찰되었다. 즉, CFT에서 양성으로 판정된 혈청은 혈청을 2단계 희석하여도 모두 음성판정 CD인 0.542를 넘는 CD값을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

고 찰

부루셀라병의 진단방법에는 Milk Ring Test(이하 MRT)(Alton 1981), 피내반응법(MacDiarmid et al 1987, Cunningham et al 1980, Chukwa 1985), Rose Bangal test(Morgan et al 1969), Tube agglutination test(Alton et al 1975), Complement Fixation test(Timoney et al 1988), ELISA(Lamb et al 1979, Magee

1980,)우유나 그 침전물에서 균체를 분리 배양하는 방법과 이들 물질을 직접 Guinea pig에 접종하는 방법(Hausler 1972, Smith et al 1964) 등이 있다.

이 같은 진단방법에 있어서 완전한 정확성을 나타낼 수는 없다. 심지어 *Erucella* 균체가 검출됨에도 불구하고 Card test에서는 모두 양성으로 나타나지 않는 예가 있다(Huber et al 1986). 물론 Card test에서 양성인 경우, 세균의 분리를 위한 Card test의 특이성은 30.8%에 달할 뿐이다. 비록 우유에서 세균이 검출되는 306예에서 Milk ring test에서 양성으로 판정되는 예는 302로서 98.7%의 진단 결과를 얻을 수 있었다. 세균 배양에서 양성으로 판정된 49예 중에서 44예가 MRI있어서는 양성으로 진단되는 등과 같은 진단방법에 따른 차이점이 보고되고 있어 brucellosis 양성우의 살처분은 각별한 주의가 필요한 것으로 믿어지고 있다 (Huber et al 1986). 또한 우리나라에서도 Erucellosis의 진단을 위하여 사용한 TAT에서 양성으로 판정된 43예에서 ELISA방법에서는 40예가 양성으로 판정되었으며, 의양성의 12예에서는 양성으로 판정된 예는 11예 음성으로 판정된 예는 1예로 보고하므로서 진단방법에 따른 차이가 보고되고 있다 (임 등 1993)

소의 부루셀라병은 현재 몇몇 선진국에서만이 성공적으로 퇴치되어 있을 뿐이며(CIE 1992), 세계적으로 많은 나라에서는 여전히 그 피해가 심하여 국가적으로도 위협의 존제로 남아 있다(McLean et al 1992). 아시아지역의 저개발국가 등지에서의 가축의 주요 질병이며, 사람에게도 큰 문제점을 야기시키고 있다(Beran 1994).

우리나라에서의 부루셀라병은 1956년에 미국에서 도입한 젖소군에서 처음 발생보고(박 등 1959)가 있은 이래 지속적으로 발생하여 최근에는 국내 축산업 농가에 막대한 경제적 손실주고 있으며, 60년대 1%의 발생을 보이다가 70년대에는 거의 발생보고가 없었으나, 80년대에 이르러 전면적 검진사업에 의한 추적조사의 결과 0.2% 수준에 감염사실이 밝혀지게 되었으며, 1990년대 이후에는 매년 약 500여두의 젖소가 Brucellosis에 기인되어 살처분되므로서 실제적인 손실액

만도 매년 수십억원에 달할 것으로 추정되며 정부의 이에 대한 보상액만도 매년 10억원 이상을 사용하고 있는 실정이다(가축전염병발생현황 1996). 우리정부의 Brucellosis에 대한 철저한 방역사업의 수행으로 매년 500여두의 살처분에도 불구하고 점차 증가추세에 있는 점에 대하여서는 전염원, 병원성 및 숙주의 저항성등에 관한 보다 구체적인 역학조사의 필요성이 강조되고 있다.

현재까지 우리나라에서 이루어진 Brucellosis에 대한 역학적 조사연구는 주로 균체의 동정 분리(박 등 1959, 우 등 1986, 정 등 1988), 혈청학적 조사연구(김 등 1963, 김 등 1968, 김 1959, 김 등 1988), 우유로부터의 진단방법(정 1969), 혈청학적 진단방법에 대한 비교 연구(김 등 1982), 그리고 단크론성 항체의 생산(정 등 1989), ELISA 방법을 이용한 집단검색 방법에 관한 연구(임 등 1993) 및 타 세균(*Yershinia enterocolitica*)과의 교차면역 관계 등(안 등 1982)이 이루어진 바 있다. 그러나 아직 젖소에서의 감염율이 0.01%에 불과하여 예방을 위한 대책 program의 개발이나 첨단기술을 이용한 진단방법에 관한 연구는 아직 활발히 이루어지지 않고 있다. 최근 계속적으로 검출되는 추세를 감안하여 보면 우리나라에서는 미국처럼 부루셀라병의 검진사업을 1년에 4회 이상 그리고 4회중 3회 이상을 꼭 검색(Beran 1994)하여야 하지 않을까 생각되고, 매년 4회의 검진사업이 이루어진다면 아마도 우리나라에서의 검색율이 상승될 가능성이 높지만 이를 위해서는 수반되어야 할 여러 문제점이 있을 것이다.

제 4 절: PCR에 의한 정액과 임파조직으로부터의 *Brucella* DNA 검색

서 론

사람이나 가축 질병의 진단방법으로 PCR(polymerase chain Reaction)은 광법위하게 활용되고 있다. 특히 Brucellosis처럼 균이 세포내 존재하는 경우에는 더욱 미생물학적 동정진단이 어려운 실정이다. 그러나 조직이나 제액으로부터의 균체의 증명은 최근 Polymerase Chain Reaction이 크게 활용되고 있는 바, brucellosis에 감염된 소의 유방 임파조직과 인공수정용 정액을 수집하여 PCR을 수행하였던 바, 모두 *Brucella* DNA을 확인하였기에 보고하는 바이며, 특히 인공수정 정액에서의 *Brucella* DNA의 증명은 생식기를 통하여 이 질병의 전파가 가속화시킬 위험이 있어 더욱 방역차원의 대책수립이 절실하게 사료되는 바이다.

재 료 및 방 법

1. **가검물**: 자연감염된 소의 상유방 임파조직과 제주지역의 인공수정 채취용 숫소(6두)의 정액으로부터의 균체의 입증을 위하여 PCR을 수행한다. 그 PCR의 술식은 다음과 같다.

2. PCR **조건**: 자연감염된 임파조직과 숫소의 정액으로부터의 *Erucella* DNA를 추출하기 위하여 *Brucella abortus* 1119-3주의 DNA를 추출하여 이를 Template로서 사용한다. 조직으로부터의 *Brucella* DNA 확인을 위한 PCR을 Fekete et al(1992)의 방법에 준하여 primer의 염기서열을 결정하여 합성한 후(

P1 ; 5'-GGACTGCATAAAATTGGCAC-3', P2 ; 5'-CAGCAGCAGCAAGACCTTCA-3', P3 ; 5'-CGGCCACTGT-3', P4 ; 5'-CGGCCCCTGT-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℃, 72℃, 55℃에서 각각 1분씩 denature, extension, annealing를 32회 반복하여 실시한 후 특이 DNA 절편 형성 유무를 1% Agarose gel에서 전기영동하여 검사한다.

Erucella spp에 대한 DNA를 검출하기 위하여 PCR혼합액 100ul에 대하여 primer를 각각 1uM, deoxynucleotide triphosphate를 각각 20um, 1X PCR buffer(10mM Tris-HCl(ph 8.3), 50mM KCl, 0.001%(wt/vol) gelatin, 1.5mM $MgCl_2$)에 *Taq* polymerase 1U와 *Brucella* spp DNA를 각각 500ng씩 template로 추가하여 자동 DNA thermal cycle(MJ Research Inc.)에서 34cycle를 수행하였다. 각 cycle의 구성은 다음과 같다. Denaturation은 95℃에서 2분(첫번째는 3분), annealing은 55℃에서 2분 그리고 extention은 72℃에서 2분(마지막은 4분)를 실시하였다.

3. DNA 추출: 자연감염된 젖소의 상유방 임파조직과 정액의 DNA를 추출하기 위하여 Sambrook (1989) 등의 방법을 수정하여 사용하였다.

임파결절: 임파결절을 무균적으로 실험실에 옮겨와 가검물 1gm를 파쇄하고자 PBS(0.137M NaCl, 10mM Na_2HPo_4, 3.2mM KH_2Po4 ; pH 7.4)를 넣어 homogenizing 한다. 파쇄물질을 proteinase K(0.3mg/ml)과 1% SDS로 37℃에서 1시간 동안 소화시킨 후 phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25:24:1)과 동량 혼합하여 단백질을 제거하여 DNA를 추출하였다. DNA가 포함된 수용성층을 -20℃의 99.5% ethyl alcohol 2배의 용량과 혼합하여 -70℃ deepfreezer에서 10분 동안 방치시킨 후 10,000 X g로 10분 동안 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 멸균된 증류수에 재부유시켜 냉동보관하여 실험에 사용하였다.

정액: 인공수정용 정액 10㎖을 원심분리하여 침전액을 증류수로 10회 세척한 후, Sambrook(1989)의 방법에 준하여 DNA를 추출하여 Template로서 사용하였다.

4. **대조군** template: 대조 DNA template로서 정상 임파조직을 취하여 DNA를 추출하여 PCR(polymerase chain reaction)에 사용하였다.

5. **전기영동**: DNA 증폭의 확인은 PCR 산물 10ul를 TAE(40mM Tris-acetate, 2mM EDTA; pH 8.1) 완충액 중의 1% agarose gel에서 100V로 1시간 동안 전기영동시킨 후 자외선 조사하여 875bp의 표적 DNA의 증폭여부를 확인하였다.

결 과

1. **숫소의 정액** *Brucella* DNA**의 증폭**: 인공수정용 숫소 6두중에서 2두의 정액에서 추출한 template DNA를 이용하여 PCR을 수행하였던 바 Fig. 1에서 보는 바와 같이 875 bp에서 *Brucella* DNA의 증폭을 확인하였다.

2. 인공수정용 숫소의 정액의 PCR검색에서 DNA의 증폭을 가져왔던 소의 혈청은 CFT(1: ≥ 200) 와 LAT(1: ≥ 128) 에서도 높은 항체역가를 나타내었다. 이들 숫소 2두는 살처분하므로서 생식기를 통한 인공감염 기회를 차단할 수 있었다.

3. Brucellosis **감염 임파조직내** *Brucella* DNA**의 증폭**: 자연감염된 젖소의 상유방내 template DNA를 PCR하였던 바, Fig 1 의 왼쪽 열에서 보는 바와 같이 *Erucella* DNA의 증폭을 입증할 수 있었다.

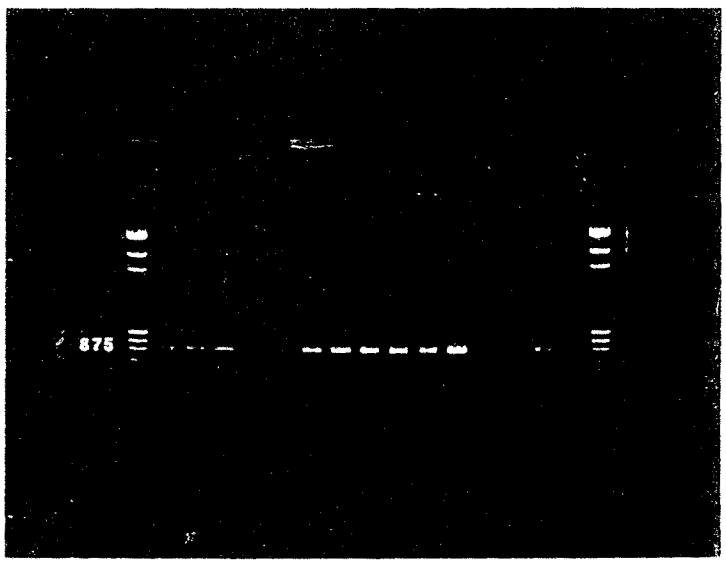

Fig. 1. Amplified Brucella DNA from sperm and supura mammarian lymphanode in diary cattle by PCR.

1 lane is Ladder DNA 2, 3, 4 lanes are DNA from sperm 6, 7, 8, 9, 10, 11 lanes are DNAfrom lxyphanode

결 론

우리나라에서 사육되고 있는 젖소나 한우의 번식용 인공수정액을 생산함에 있어서 숫소의 brucellosis 감염유무를 검색하므로서 정액을 통한 감염 경로를 차단 하여야 한다는 새로운 사실을 확인하고 인공수정을 위한 정액 채취용 숫소에 대한 brucellosis검색의 필요성을 중간보고에서 밝힌 바 있으니, 이를 시책으로 택해지길 바라마지 않읍니다. 감염젖소의 상유방 임파결절에서의 *Brucella* DNA의 입증은 식육의 조리불량이나 식육위생상에 철저를 기하지 않는다면 인체 감염기회가 확대될 수 있는 바, 앞으로 brucellosis의 식육을 통한 감염기회가 증가된다면 공중위생상 큰 문제를 일으킬 것으로 사료된다.

제 4 장 우리나라 Brucellosis 방제를 위한 Brucella abortus RB51의 예방효과시험

제1절 Brucellosis 예방접종 계획안
(대정부 건의안)

제2절 Brucellosis 예방접종시험 결과보고서

제3절 국내 분리균주의 도전에 대한 예방효과

제4절 예방접종시험의 활용 및 기대효과

제 4 장: 우리나라 Brucellosis 방제를 위한 *Brucella abortus* RB51의 예방효과 시험

제 1 절 Brucellosis 예방접종 계획안(대정부 건의안)

(전북대 연구 81510-409호, '97. 3. 6)

(전북대 연구 81510-410호, '97. 3. 6)

(농림부 위생 51583-311호, '97. 4. 1) 등의 관련입니다.

서 론

우리나라에서의 brucellosis 발병추세는 매년 증가하여 1996년 한 해만에도 약 600여두의 착유우가 양성으로 진단되어 살처분되므로서, 우리나라 양축농가에 막대한 경제적 손실을 끼치고 있으면서도(전염병 발생보고, 1997), 제주도를 비롯한 많은 도에서 발병하는(임 등 1995a) 인수공통전염의 하나이다(Scully et al 1986, Ariza et al 1989).

이 같은 brucellosis를 예방하기 위한 연구 사업의 일환으로 *Brucella abortus* RB51주를 이용한 예방약을 생산하여 예방접종하였던 바, 예방효과를 인정하여 국가시책으로 활용했는데, 그렇다면 왜(?) 미국은 Brucellosis를 예방접종방법을 택하여 이 질병의 발병을 예방하기 위하여 그 동안 수행하여 온 정책(진단하여 살처분 정책)을 예방정책으로 변환시킬 수 있었던 이유는, 바로 자연감염에 의한 유산을 예방할 수 있는 *Brucella abortus* RB51균주가 발견되었기 때문이다(Bricker et al 1995, Tobias et al 1992). 이 균주에 대하여서는 이미 쥐, 사슴 그리고 소를 이용한 각종 시험에서 *Brucella abortus*에 대하여 방어능력이 있음이 증명된 바 있다(Jensen et al 1996, Jimenez et al 1994,

Cheville et al 1992, Stevens et al 1995). 또한 이 균주에 의하여 형성된 항체는 지금 우리나라에서 Brucellosis 감염젖소를 색출함에 있어서 사용되는 Milk Ring Test 나 Tube Agglutination Test에서 음성으로 판정되는 장점들이 있어(Cheville et al 1993), 국가방역사업을 유지하여 나아가는데 지장을 받지 않는 이점들이 있다 .

결론적으로 우리나라에서 Brucellosis의 검진 및 살처분 보상비 지급에 의한 국가예산을 많이 사용하여 왔음에도 불구하고 계속적으로 brucellosis의 발병이 지난 수십 년간 이루어졌던 점을 현실 문제로 받아들여 이제는 이 질병으로 낙농을 포기하는 젖소사육 농가 수를 더 이상 늘이지 않토록, 미국이 예방정책을 변경한 처럼 우리도 이 질병에 의하여 경제적 손실을 입지 않토록 예방접종정책으로 전환할 수 있기 위한 기초적 연구와 정책의 변환이 절실히 요청되기에 본 대정부 정책수립을 위한 건의안으로 제출하는 바입니다.

2. 예방접종 사업의 필요성

가. 1995년과 1996년 사이에 걸쳐서 경기, 충남•북, 전북 그리고 제주지역에서의 Brucellosis 집단발병 낙농장이 증가하므로서 낙농을 포기하고 타 업종으로 전업하는 양축농가가 늘어나므로서 불안한 농촌 구조가 형성되고 있기 때문이다.

나. 만약 이 질병으로 포기하는 농가가 계속 증가되면 국민이 즐겨 마시는 우유의 공급에 어려움이 발생하여, 축산물의 수입 자유화가 이루어진 시점에서 축산 기반이 완전히 흔들리게 될 것으로 예견된다.

다. 최근 우리나라에서의 원유 소비량은 점차적으로 증가추세를 취하고 있지만 원유의 생산량이 부족하게 될 경우에는 인접국들로부터의 원유수입을 위하여 국고(외화)를 소비하게 될 것이 명확하여 지고 있다.

라. 매년 Brucellosis로 인하여 착유를 하고 있는 젖소를 매년 400-600두 살처분하므로서 국고예산(20억원/1997년 예상)의 부담액이 커지고 있으며, 착유우에서의 양성우를 색출하기 위하여 집유소에서 검진할 뿐만 아니라, 양성반응 목장에 대한 개체별 검색은 또 다른 방역비의 소비 원인이기도 할 것이다.

마. 지난 2년간에 걸쳐서 이 질병이 발병하면, 인접 낙농가는 이 질병의 전파 공포로 사육 소의 수를 줄이면서 타 업종으로 전업하고 있는 경향이 발생하고 있다.

바. 현재까지 우리나라는 brucellosis의 진단업무는 오직 젖소 중 착유우만을 대상으로 하여 검색하여 왔지만, 만약 한우에 대하여서도 검진사업을 펼칠 경우에는 년간 살처분 두수는 지금의 몇 배가 될 것으로 추정되어, 더욱 이 질병에 대한 예방접종의 필요성이 국가적인 차원에서 강조되어야 할 것이다.

사. 하루 속히 우리정부에서는 지금까지 수행하여 온 이 질병에 대한 방역정책의 적절성 여부에 대한 분석을 통하여, 1996년부터 미국의 방역정책의 대전환 배경을 신속히 우리정부도 파악하여야 한다. 즉, 낙농가의 보호와 국가 예산의 절약, 그리고 국민보건 향상을 위하여, 국가방역정책을 수정 할 수 있는 적극적인 국가정책수립 필요성이 절실하다.

아. 국가정책이 예방접종으로 변경된다면 진단약 생산과 그 검진사업에 소요되는 예산의 일부로도 충분히 전 젖소에 대하여 예방접종을 수행할 수 있는 경제적 이점을 기대할 수 있을 것이다.

3. 예방접종사업 실시

가. 예방접종균주: 미국 농림부로부터 *Brucella abortus* RB51를 구입 또는 수입하여 냉동 건조항원을 생산함.

나. 균주의 특색 요약: 이 균주는 과거 예방접종균주로 활용되어 온 *Erucella abortus* 19주와는 다르게 인체에 전염 능력이 없으면서 예방접종에 의하여 형성되는 항체는 Erucellosis진단을 위하여 사용되고 있는 공인 MRT, TAT 검사방법으로 검색되지 않음으로서 자연감염된 항체와 면역에 의하여 형성된 항체가 구분되므로 자연감염된 소를 색출하여 살처분할 수 있다.

다. 예방약 생산: 미국에서 구입한 *Erucella abortus* RB51을 이용하여 연구용 항원을 생산하고자 함.

라. 연구사업 추진경비: 97년도 농림수산관리센타 지원 농촌 현장애로사업(소의 부르셀라병에 의한 양축농가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책 연구, 연구 책임자: 백병걸)의 일환으로 추진되고 있는 연구 사업인 바, 금번의 연구용 예방약 생산비를 포함하여 제반 연구 용역비가 필요하지 않음.

마. 관련 연구 기관 및 인적 사항: 연구사업에 관련된 연구기관과 그 인적 사항은 표 1과 같다.

표 1. 연구 관련 기관 및 인적 사항

구 분	역 활	소 속	직 위	성 명
주관연구기관	총괄책임	전북대학교 수의과대학	교 수	백 병 걸
협력연구기관	면역능력 평가	서울대학교 수의과대학	교 수	박 용 호
협력연구기관	면역능력 평가	농촌진흥청 수의과학연구소	연구관	정 석 찬
협력연구기관	실험목장 관리	경기도 가축위생시험소 남부지소	소 장	김 창 수
예방약생산업체	예방약 생산	파천연구소	소 장	김 동 성 (윤인중)

4. 예방접종 대상 장소 및 시기

가. 장 소: 경기도 가축위생시험소 남부지소 관내 젖소목장으로서 표 2에서 보는 바와 같이 Brucellosis의 양성판정으로 약 100여두가 이미 살처분되어 있으며, 이들 소는 이미 brucellosis 양성우와 동거하였는 바, 차후에 양성으로 전환될 가능성이 높아 결국에는 모든 소를 살처분하게 되는 경우의 목장이 될 것으로 예견되어 금번 예방접종 대상 목장으로 적절하다고 사료되었다.

표 2. Brucellosis 예방접종 연구사업 목장의 역학적 특성

255두 규모의 젖소 목장으로서 이미 1996년부터 Brucellosis가 발병하여 살처분된 소가 약 100여두이므로, 이들 동거우(同居牛)를 대상으로한 예방약의 방어능력을 시험하고자 함.

나. 시기: 1997년 3월부터 1997년 12월까지

다. 방어능력시험: 예방약을 접종한 후 국내 분리 *Erucella abortus*를 접종하여 항체의 형성과 조직내에서의 균체의 증식상태를 관찰한다.

라. 관찰 항목: Brucellosis 예방을 위하여 예방 접종한 후, 국내 분리 균주를 접종한 후의 혈청학적 반응과 이들에서의 brucellosis 발병 증후를 표3과 같은 항목의 사항을 관찰하여 방어능력 및 차후에 있어서의 예방접종사업 추진 여부를 결정할 수 있는 자료를 얻고자 한다.

표 3. Brucellosis에 대한 방어능력 관찰항목

항 목	관 찰 내 용	방법
항체 검색	유(乳)로부터의 항체 이행	MRT, TAT
	항체 역가 측정	Latex agglutination test
	항체 특성	Western blot
항원 검색	예방접종 소의 조직에서 항원 검출	균의 분리(배지)
		PCR법으로의 균체 증식 여부 확인
방어능력	국내 분리균주의 도전시험	PCR을 이용한 균체 확인
안전성 시험	예방접종 소를 대상으로한 일반적인 검색	혈액소견, 임상적 소견

5. 연구사업의 기대 효과

가. 예방약 생산 확보: 예방약 생산기술을 국내에 확립되므로서 예방약 생산에 필요한 연구비를 절약할 수 있음.

나. 국가 보상비 절약 효과: 전국의 젖소에게 예방접종하므로서 자연감염되는 젖소의 숫자를 격감시킬 수 있어 년 10억원 이상의 국가 보상비를 절약할 수 있음.

다. 국가 위상 재고 : 1995년과 1996년도에 걸쳐서 대단위 젖소사육농가가 이 질병에 의하여 축산을 포기한 사례가 발생하였던 것처럼, Brucellosis 때문에 낙농을 포기하는 농가가 속출하고는 있는 농촌 현실 문제점을 적극적으로 대처할 수 있는 산•학•연 연구를 통한 농민을 위하여 연구하고 봉사하는 정부로서 부각될 수 있을 것으로 기대 됨.

1) **예방접종균주**: *Brucella abortus* RB51을 이용한 냉동건조 예방약.

2) **예방접종 대상 동물**: 평택 "L" 목장의 젖소

3) **균주의 특색 요약**: 이 균주는 과거 예방접종균주로 활용되어 온 *Brucella abortus* 19주와는 다르게 인체에 전염능력이 없으면서 예방접종에 의하여 형성되는 항체는 Brucellosis진단을 위하여 사용되고 있는 공인 MRT, TAT 검사방법으로 검색되지 않음으로서 자연감염된 항체와 면역에 의하여 형성된 항체가 구분되므로 자연감염된 소를 색출하여 살처분할 수 있다.

4) **예방약 생산**: 연구용 vaccine을 생산함.

5) **연구사업 추진경비**: 97년도 농촌 현장애로사업(소의 부르셀라병에 의한 양축농가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책 연구, 연구 책임자: 백병걸)의 일환으로 추진되고 있는 연구 사업인 바, 금번의 연구용 예방약 생산비를 포함

하여 제반 연구 용역비는 전북대학교측에서 부담함.

6) **관찰 항목**: Brucellosis 예방을 위하여 예방접종한 후, 국내 분리균주의 접종한 후의 혈청학적 반응과 이들에서의 brucellosis 발병 증후를 표 2와 같은 항목의 사항을 관찰하여 방어능력 및 차후에 있어서의 예방접종사업 추진여부를 결정할 수 있는 자료를 얻고자 한다.

표 2. Brucellosis에 대한 방어 능력 관찰 항목

항 목	관 찰 내 용	방법
항체 검색	유(乳)로부터의 항체 이행	MRI, TAT
	항체 역가 측정	Latex agglutination test
	항체 특성	Western blot
항원 검색	예방접종 소의 조직에서 항원 검출	균의 분리(배지)
		PCR법으로의 균체 증식 여부 확인
방어능력	국내 분리균주의 도전시험	PCR을 이용한 균체 확인
안전성 시험	예방접종 소를 대상으로한 일반적인 검색	혈액소견, 임상적 소견

제 2 절 Brucellosis 예방접종시험 결과보고서

(전북대 연구 81510-2148호, '97.10.30)

서 론

< 연구 배경 > 우리나라에서의 brucellosis 발병 추세는 매년 증가하여 1996년 한해만에도 약 600여두의 착유우가 양성으로 진단되어 살처분되므로써, 우리나라 양축농가에 최소 150억 규모의 막대한 경제적 손실을 끼치고 있으면서도(농림부, 전염병 발생보고, 1997) 이의 근절을 위한 대책이 마련되지 못하고 있었다. 이 질병은 지난 십여년동안 제주도를 비롯한 경기도, 충청남•북도 그리고 전라북도에서 발병하고 있었으며, 정부의 끈질긴 착유우로부터 Brucellosis 근절을 위한 정기검사정책(가축전염병법 제10조 제1항)을 펼쳐 왔음에도 불구하고 이 질병은 박멸되지 않은 실정이었다.

특히 1995년와 1996년에는 20 - 60여두 규모의 중대형 낙농장에서 발병하므로서 발병 목장내의 젖소를 살처분하므로서 낙농을 포기하고 다른 업종으로 전업하므로써, 양축농가 뿐만 아니라 농촌 경제에 큰 피해를 끼치고 있었다. 더욱이 이같은 추세로 간다면 젖소의 사육 두수가 감소되므로서 원유생산량이 감소되어 매일 식탁에 오르는 생유의 공급에도 점차적으로 문제를 야기할 수 밖에 없는 국면이 다가오게될 것 같았다.

< 목 적 > 이 같은 막대한 경제적 손실을 최소화하기 위하여 1997년 3월 농림부로부터 brucellosis 예방을 위한 시험사업을 허락받아서 경기도 평택시의 한 젖소목장과 전북대학교의 시험 사육장에서 예방접종사업을 수행하였던 바, brucellosis 상재 목장에서 재발 또는 양성 전환을 막을 수 있는 시험결과를 얻을 수 있었으며, 전북대학교 시험 목장에서는 예방접종 한 소에게 국내

분리균주를 대상으로한 도전시험에서 방어력을 확인할 수 있었다. 정부는 Brucellosis 발병 소의 보상액만도 십여억원씩 배상하여 왔으나, 본 시험 사업에서 예방접종으로 양성 전환을 막으므로서 차차 막대한 보상비 성격 예산소비를 막을 수 있는 생산적이면서 경제적으로 이익이 되는 정책수립에 필요한 각종 시험연구결과를 가져왔다.

< **연구 성과**> 결론적으로 우리나라도 Brucellosis의 검진 및 살처분 보상비 지급에 의한 국가예산을 약 20억 정도를 매년 지급하여 왔고 양축농가는 이로 인한 최소한 약 150억 규모의 경제적으로 국가와 양축농가 모두 손실을 격고 있었던 현실로부터 빠져 나오기 위한 연구 필요성이 지대하였다. 본 시험연구는 brucellosis의 발병이 지난 수십 년간 이루어졌던 점을 현실 문제로 받아들여 이 질병에 의하여 타의적으로 낙농을 포기하는 젖소사육농가 수를 더 이상 늘이지 않을 수 있는 brucellosis의 예방접종정책으로 전환할 수 있는 시험 연구를 수행하게 되었으며(1996년도 농촌현장애로사업 총괄 연구책임자 백병걸), 이로부터 얻어진 연구결과는 국가가축질병방역정책을 전환할 수 있는 실험실 및 야외 시험결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재 료 및 방 법

1. *Brucella abortus* RB51의 예방접종시험

(1) 예방약의 제조 및 효과시험

1) 미국에서 구입한 *Erucella abortus* RB51를 구입하여 formenter에서 증균하여 두당 4X10⁹CFU가 되도록 조정하여, 냉동 건조한 예방약을 생산하였음. 백신희석액으로 2㎖가 되도록 희석하여 사용하였다.

2) 국내에 분포하고 있는 균주(*Erucella abortus* biotype I)에 대한 방어능력검정을 위한 각종 혈청학적 진단방법과 면역학적 기술을 이용하여 평가시험

3) 예방접종 시험 : 1997년 3월 1일부터 1997년 10월 20일까지

4) 예방접종 시험 장소:

① 야외 시험: 경기도 평택시 현덕면 황산리 산 23번지 평택 농장 (이재한)

② 전북대학교 수의과대학 공중보건학교실 및 목장

5) 예방접종 동물: 예방접종 대상 목장과 동물은 표 1에 표시한 바와 같다. 즉, 총 255두의 젖소를 대상으로 하여 예방약의 효능시험을 수행하였다.

표 1. 예방접종 시험 목장과 대상 동물(1997년 5월 6일 현재)

시험 목장 주소		경기도 평택시 현덕면 황산리 산 23번지
총 젖소 두수		255 두
분포	송아지	29 두
	암소	65 두
	착유우	156 두
	숫소	5 두
소 유 주		이재한

2. 활용한 진단방법의 종류

가. Standard Tube Agglutination Test(STT):

수의과학연구소로부터 분양받은 부루셀라병 진단용 *E. abortus*(1119-3)항원액을 시험관에 2㎖씩 분주하고 혼합한 후 37.5℃에서 48시간 정치한 후 응집정도를 관찰하였다. 즉, 양성판정 기준은 혈청희석 배율을 1:50이하에서 응집반응이 일어나지 않은 혈청은 음성, 1:50에서 양성 및 의양성의 판정된 혈청과 1:100에서 의양성 판정된 혈청은 의양성, 1:100이상의 혈청 희석비에서 확실한 응집반응을 보인 혈청을 양성으로 판정하였다.

나. Complement Fixation Test(CFT):

표준 *E. abortus* 1119-3를 배양하여 증균된 세균을 80℃에서 30분간 불활화시키고, 멸균 PBS(pH 7.2)로 3회 세척한 후 4.5% 부유액으로 제조한 뒤 이를 항원으로 사용하였다. 혈청은 예방접종한 혈청을 대상으로 채혈하여 56℃에서 30분간 비동화시켜 보체를 불활화 시킨 후 CFT에 이용하였다. Veronal buffered diluent(VBD)액을 준비하여, 면양적혈구를 Alsever's solution에 동량 가한 후, 2-4℃에서 7일간 보존하여 숙성시킨 후 사용하였다. 용혈소 제조를 위하여 면양적혈구를Kolmer saline(NaCl 8.5g, MgSC4 0.1g, 증류수 1,000㎖)에 가하여 900×g로 10분간 원심분리하여 세척한 후 10% 혈구부유액을 조제하여, 토끼의 이정맥에 5㎖ 접종을 4일 간격으로 5회 접종하고 최종 접종 7일 후 채혈하여 혈청을 분리하고 56℃에서 30분간 비동화 한 후 동량의 glycerin을 첨가하여 냉동보관하였다. 용혈소의 역가측정를 측정한 후에 보체의 역가에 따라서 항원과 혈청을 넣고 여기에 결정된 용혈소액과 동량의 3% 면양적혈구를 혼합하여 실온에서 15분간 감작시킨 감작적혈구액 50㎕를 가하여 잘 섞은 다음, 37℃에서 15분간 반응시킨 후 이를 다시 섞어주고 15분간 재 반응시킨 후 용혈여부를 판독하였다.

양성판정: 혈청의 희석배율 1:20 이상에서 용혈 현상이 나타나면 양성으로 판정하였다.

3) DOT-ELISA :

예방접종한 소로부터 채혈한 혈청을 이용한 ELISA blot을 수행하였다. 즉, *Erucella abortus* 1119-3와 *Erucella abortus* RB51항원을 준비하여 단백질량이 2㎎/㎖가 되도록 항원을 PBS로 800배로 희석하여 20 Kilo cycle에서 40㎖/분의 유속으로 파쇄한 후, 96 Well Dot - blot appartus(Bio-Rad)를 준비한 후, 항원 50㎕를 nitrocellulose막에 점적하여 흡착, 건조시키였다. 이에 50㎕의 2% skim milk를 이용하여 blocking 한 후, 실온에서 10분가량 건조시키였다. *Erucella abortus* RB51을 면역시키 전·후의 혈청과 자연감염된 혈청을 각각 PBS로 1:100 1:800배로 희석하여, 50㎕넣고 30분간 반응시키였다. PBS로 5회 세척한 다음, Phosphatase-Labeled affinity purified antibody to bovine IgG(H&L) Goat(KPL)을 1:2,000으로 희석하여 50㎕씩 넣고 실온에서 1시간 반응시키었다. BCIP/NBT Phosphate substrate(KPL)로 발색시키여 관찰하였다.

4) SDS-PAGE 및 Western blot에 의한 항원항체 반응

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE): Laemmli(1970)의 방법에 준하여 전기영동을 실시한 후, Western Blot을 수행하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하여 얻은 gel에서 전개된 단백질을 TAT로 검진된 부루셀라병 양성 항혈청(CFT titer ;≥ 1:160)과 반응시켜 면역학적인 특이 항원물질을 규명하기 위하여 Tsang et al.(1983)과 Towbin et al.(1979)의 방법에 준하여 Western blot을 실시하였다. TAT과 CFT에서 양성반응을 나타내는 혈청을 단계희석하여 접촉시킨 뒤 purified affinity goat phosphatase anti-bovine IgG(1:1000)를 부착시킨 후 BCIP/NBT(KPL Co.)를 이용하여 발색시켜 *Erucella* 균주들간의 항원 특성을 비교하였다.

5) **면역활성 세포**:

본 시험에서 예방약의 면역세포에 대한 활성 능력을 평가하기 위하여 Davis *et al.*(1987)**의 방법에 준하여 실시하였다.** *E. abotus* RB51**을 예방접종한 젖소 중 생후 1년 정도의 암소 10마리를 무작위로 선별하여 림프구 아집단 검사용 단크론항체는 표 2와 같은 단크론항체를 이용하였다.** 즉, anti-T cell, anti-B cell, anti-N cell**에 대한 단크론항체와** MHC class Ⅰ **및** Ⅱ**에 대한 단크론항체인** anti-MHC class Ⅰ**및** Ⅱ **등 총 7종을 실험에 사용하였다. 이를 형광세포 유출장치를 이용하여 림프구 아군별 분포율을 분석하였다.**

표 2. Monoclonal antibodies specifically reactive with bovine leukocytes differentiation antigens

Specificity of monoclonal antibodies*	Monoclonal antibodies**	Cell types***
MHC-class Ⅰ	PT85A	All nucleated cell
MHC-class Ⅱ	H42A	Antigen presenting cell
BoCD2	BAQ95A	T cell
BoCD4	CACT138A	T helper, inducer
BoCD8	CACT80C	T cytotoxic, suppressor

* Bovine leukocyte differentiation molecules.
** Monoclonal antibodies that specifically react with leukocyte differentiation antigen (Davis et al. 1990).
*** Cells expressing molecules.

6) **세포성 면역**(Cellular mediated Immunity): **예방접종한 소로부터 체혈하여 백혈구층을 분리**(1000/rpm)**하여** 1.8㎖ RPPMI **배지에 가검혈청** 25㎕**를 넣어 밀봉한 후,** 24**시간** 37℃**에서 배양한 후, 백혈구의 증식정도를 관찰하므로서 예방접종한 소의 항혈청 유지정도와 세포의 면역형성정도를 관찰하였다.**

Result of Antibody Detection† by Dot-blotting System

Serum \ Ag※	*B. abortus* 1119-3	*B. abortus* RB51
Positive Cattle	○	—
Negative Cattle	—	—
RB51 vaccinated cattle	—	—

※ Ag : Whole Cell ; † IgG(H+L)

Dot-blotting No. 1

Fig. 2. Pattern of immunorelative cells profile in dairy cattle vaccinated by Brucella abortus RB51.

(3) **국내 분리균주의 도전시험**: *Brucella abortus* RB51을 예방접종한 Holstain 2두와 한우 2두에게 국내 분리균주를 1차에 한하여 표 3과 같이 접종한 후 항체의 변화를 관찰하였다.

표 3. *Brucella abortus* RB 51 예방접종 젖소에 대한 국내 분리 *Brucella abortus*균주의 도전 시험

항 목	내 용	비 고
장 소	전북대학교 수의과대학	
기 간	1996년 12월 -1997년 10월	
실 험 동 물	Hostein(2두) 및 한우(2두)	6개월령
도전 균주명	*Brucella abortus* Biotype I	제주 분리균주
도전 균주량	4 X 10¹⁰CFU	
접종 부위	안 점 막	
항체 형성 정도 관찰 방법	TAT, CFT, LAT, Dot-Elisa	양성전환 항체 관찰

(4) **유·사산율 조사**: 예방접종 전과 후에 있어서의 유·사산율을 조사하기 위하여 시험기간에 걸쳐서 임신이 확인된 수와 유·사산되는 태아 숫자를 직접 관찰 하였다.

제 3 절 국내 분리균주의 도전에 대한 예방효과

1. **국내 분리균주로부터의 선발**: 예방접종용 균주의 준비는 *Erucella abortus* RB 51 그리고 국내에서 분리한 *Erucella abortus* biotype I(변이종)으로부터 변이종을 색출하고자 표 4와 같은 균주를 사용하였다.

표 4. 예방용 균주 색출을 위한 국내 분리한 균주

No	주 소
1	제주 동명 목장 (1) 상유방에서 분리
2	제주 동명 목장 (3) 상유방에서 분리
3	제주 한림 목장 (7063) 상유방에서 분리
4	제주 목장 (184) 상유방에서 분리

변이종의 생산 : 우리나라에서 분리한 표 4와 같은 균주 중에서 제주도에서 분리한 균주를 대상으로 colony의 외형을 관찰한 다음, "R"형을 선발하여 Tryptose agar에서 배양하여 얻은 것을 다시 배양하여 예방용 균주생산을 위한 연구를 표 5와 같이 수행하였다.

표 5. 국내 분리균주로부터의 변이종 개발 및 예방약 생산 추진 사항

책 임 자		백 병 걸	비 고
장 소		파 천 연 구 소	
시 험 기 간		1996년 2월 - 1997년 9월	
사용한 균주		국내 분리 균주	각종 항생물질 활용
예 방 접 종 시 험	수행자	전북대학교 백 병 걸	연구 총괄책임자
	실험동물	Hostein 2두 (6개월령)	항체 형성 정도
	방어 능력 시험	국내 분리 균주의 도전 시험	방어 효과 시험

즉, 각각 Brucella agar(Difco)에서 배양한 후, 이어서 Brucella medium(Difco)으로 37℃에서 72시간 증균시켰다(Ewalt 1989). 배양한 세균을 80℃에서 30분간 불활화시킨 후 원심분리하여(3,200rpm) 침전된 세균을 수거한 후, Ice bath내에서 120w, 20분간 초음파 분쇄하였으며, 분쇄된 균체액을 원심분리(20,000×g, 20분, 4℃)하여 침전된 균체 분쇄물을 생리식염수로 10회 세척한 후 sodium dodecyl sulfate를 0.01% 되게 용해하여 30℃에서 1시간 방치한 다음 원심분리(60,000×g, 20분)하였다. 얻어진 상청액을 전기영동에 사용하였으며 이의 단백질량은 protein assay kit(Bio Rad Co.)를 이용하여 100μg/ml의 농도가 되도록 PBS(pH 7.2)로 희석하여 활용하였다(Cloeckaert et al. 1992).

2. **연구사업 추진경비**: 농림부 지원 " 97년도 농림수산관리센타의 현장애로지원연구사업"(소의 부르셀라병에 의한 양축농가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책 연구, 총괄 연구 책임자: 백병걸)의 일환으로 추진되고 있는 연구사업의 연구비를 예방약 생산비를 포함하여 제반 연구 용역비로 사용하였음.

결 과

1. 야외 목장에서의 예방약 효과시험결과

가. 평택 시험 목장의 Brucellosis 역학적 분석

1) 발병 현황 : 평택 목장은 1995년부터 brucellosis가 발병하기 시작하여 표 1에서 보는 바와 같이 Brucellosis의 양성 판정으로 약 100여두가 이미 살처분되어 있으며, 1997년에는 333두이었다. 예방접종 한 후의 혈청 전환율을 관찰하였던 바, 예방접종 2개월째에는 모두 음성을 나타났으며, 의양성의 예가 2두이었으나, 이는 3개월째에 양성으로 전환되었다.

표 1. 평택 목장의 Brucellosis 발생 현황(역학조사)

일 자			검사 두수	발병 두수 (살처분)	양 성 율 (%)	비 고
연도	월	일				
96	3	27	206	4	1.94	
	4	26	181	3	1.66	
	6	26	203	15	7.39	
	7	16	185	18	9.73	
	8	7	167	12	7.19	
	11	4	200	7	3.50	
	12	20	174	14	8.05	
97	1	17	135	25	18.52	
	3	12	333	63	18.92	
	5	6	278	29	10.43	예방접종함
	6	5	258	28	10.85	
	7	5	148	0	0	
	8	5	119	2	0.17	
합 계						

나. 예방접종에 따른 동거우 양성 전환율 :

유행목장에서의 예방접종시험결과 : brucellosis 양성우와 동거한 소에서의 예방효과를 관찰하였는 바, 표 2와 Fig. 1에서 보는 바와 같이 나타났다. 즉, 예방접종 한 후 1개월 후에는 10.85%의 양성 소가 나타났지만 2개월 후부터는 전혀 나타나지 않다가 3개월째에 2두의 소에서 양성반응을 나타내었는데 이들 소는 2개월째에 의양성반응을 나타내던 소이었다. 예방접종으로서 강한 면역 효과가 나타나고 있을 입증할 수 있었다.

표 2. 동거우에 대한 양성 전환율

일 시		동거 두수	양성두수	양성율 (%)	예 방 접 종 후
월	일				
6	5	258	28	10.85	1개월
7	5	149	0	0	2개월
8	5	119	2	1.7	3개월
10	5	검사두수 30두에 전혀 검색되지않았음		0	5개월

3) 유•사산율 조사

예방접종 전과 접종 후에 있어서의 유산율을 조사하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다. 즉, 일반적으로 이 목장의 시험기간에 걸쳐서 임신율은 약 30%를 유지하고 있었으며, 유산율은 10% 전후에 이었으나(매월 3-5두) 예방접종한 2개월 후부터는 전혀 유산하는 예를 접할 수 없었다.

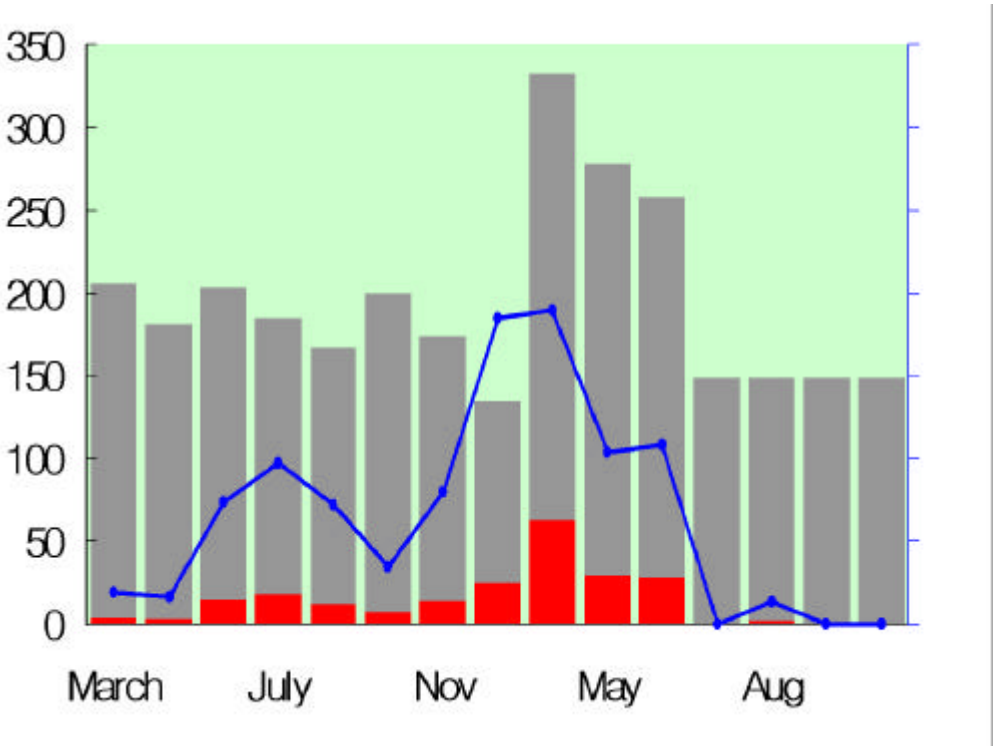

Fig. 1. The Pattern of seroconversion in dairy cattle vaccinated by *Brucella abortus* RB51 in sporadenic injection in Kyeongkido

2. **예방접종균의 항체 형성 증명**

(1) DOT-ELISA :

예방접종 소로부터 채혈한 혈청을 이용한 DOT-ELISA blot**을 수행하였던 바,** Fig. 2**에서 보는 바와 같이 나타났다. 즉,** *Brucella abortus* RB15**의 항원은 예방접종 전에는 전혀 검색되지 않았지만 예방접종** 1**개월 후부터 관찰되기 시작하였다. 그러나** *Brucella abortus* 1119-3**항원에서는 자연감염된 예와 예방접종한 예에서 모두 관찰되므로서 예방접종에 따른 항체를 구분할 수 있었지만 자연감염된 예과는 구별되지 않았다.**

Fig. 2. Result of antibody detection by Do-blotting system for diary cattle vaccinated using *Erucella abortus* RB51 strain.

(2) SDS-PAGE 와 Western blot 방법에 의한 항원 항체 면역 반응

예방접종에 따른 항체는 *E. abortus* 1119-3 항원에서는 잘 구분되지 않았지만 예방접종 한 예에서는 2KD에서 특이 band물질이 희미하게 관찰되었다.

(3) TAT를 이용한 예방효과판정

예방접종한 소와 전북대학교 실험목장에서 사육되었던 소의 혈청을 이용한 공인진단방법인 TAT를 이용하여 항체형성정도를 관찰하였던 바 표 3 에서 보는 바와 같다. 즉, 예방접종에 따른 TAT방법에 의한 항체는 전혀 관찰되지 않았으며, 한국 분리균주를 도전시키면 2주 후부터 1:50이하의 희석 배율에서 응집반응이 나타나기 시작하여 4주 후에는 1:50이상의 희석 배율에서 응집반응이 나타났으나, 곧 항체가가 사라졌다.

그러나 예방접종을 하지 않은 소에게 국내 분리균주를 도전시킨 후에 항체형성정도를 관찰하였던 바, 표 4에서 보는 바와 같이 *B. abortus* 1119-3의 항원에서는 3주부터 ≥ 1:100이상에서 응집반응을 나타내었으며, *B. abortus* RB 51의 항원으로는 모두 음성으로 판정되었다.

표3. *Erucella abortus* RB51 예방접종한 젖소에 있어서의 TAT 변화

일 자 / 항원	*Brucella abortus* 51예방 접종 후					한국 분리균주의 도전 후 (*Brucella abortus* Biotype I)			
	1 주	2주	3주	4주	5주	1주	2주	4주	6주
Brucella abortus 1119-3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<1:25	≥1:50	<1:25
Brucella abortus RB-51	Neg	Neg	Neg	<1:25	<1:25	<1:25	<1:25	<1:25	<1:25

표 4. 한국형 분리균주의 도전에 따른 TAT방법에 의한 항체형성정도

일 자 / 항원	한국 분리균주의 도전 후(*Erucella abortus* Biotype I)						
	1 주	2주	3주	4주	5주	8주	12주
Brucella abortus 1119-3	Neg	1:25	≥ 1:100	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
Brucella abortus RB-51	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

(4) CFT에 의한 항체 역가 : 예방접종한 소의 혈청(10예)에 대한 항체가는 진단항원의 종류에 따라서 차이가 있었으나, 표준진단방법에 의하여서는 모두 음성의 결과를 가져왔다. 즉, CFT에 의한 예방접종군의 항체는 공인진단방법에는 모두 1:20이하의 희석배율에서도 용혈이 일어나지 않았지만 *Bricella abortus* RB15을 항원으로 하였을 경우는 1:25의 비율에서 약한 용혈을 나타내었다. 그러나 이 방법은 면역항체를 측정하는데 적합치 않았다(표5).

표 5. *Brucella abortus* RB51 예방접종한 젖소에 있어서의 CFT 변화

일 자 / 항원	*Brucella abortus* 51예방 접종 후				
	1 개월	2개월	3개월	4개월	5개월
Brucella abortus 1119-3	Neg	Neg.	Neg	Neg	Neg
Brucella abortus RB-51	Neg	<1:10	Neg	Neg	Neg

< 비고 > Neg: 음성반응을 나타냄.

(5) LAT를 이용한 부루셀라병의 진단 결과 :

부루셀라병 양성으로 판정된 혈청을 다단계 희석하여 관찰하였던 바, 표 6에서 보는 바와 같이 예방접종 혈청은 *Erucella abortus* 1119-3 항원으로는 전혀 응집반응을 나타내지 않았지만 *Erucella aborus* RB51항원에 대하여 예방접종 1개월부터 1:20의 희석배율에서 양성 반응을 나타내기 시작하였다.

표 6. Latex Agglutination Test에 의한 예방접종 소의 항혈청가

일 자 / 항원	*Erucella abortus* 51예방 접종 후				
	1 개월	2개월	3개월	4개월	5개월
Erucella abortus 1119-3	Neg	Neg.	Neg	Neg	Neg
Erucella abortus RB-51	Neg	<1:20	<1:20	1:20	1:20

< 비고 > Neg: 음성 반응을 나타냄.

7) 예방접종에 다른 면역관련세포의 분포율 비교

젖소에 예방접종한 후, 면역관련세포의 분포율을 비교하였을 때 표 7에서 보는 바와 같이 B세포와 T세포의 분포율에 큰 변화가 있었다(Fig 3-1, 3-2, 3-3).

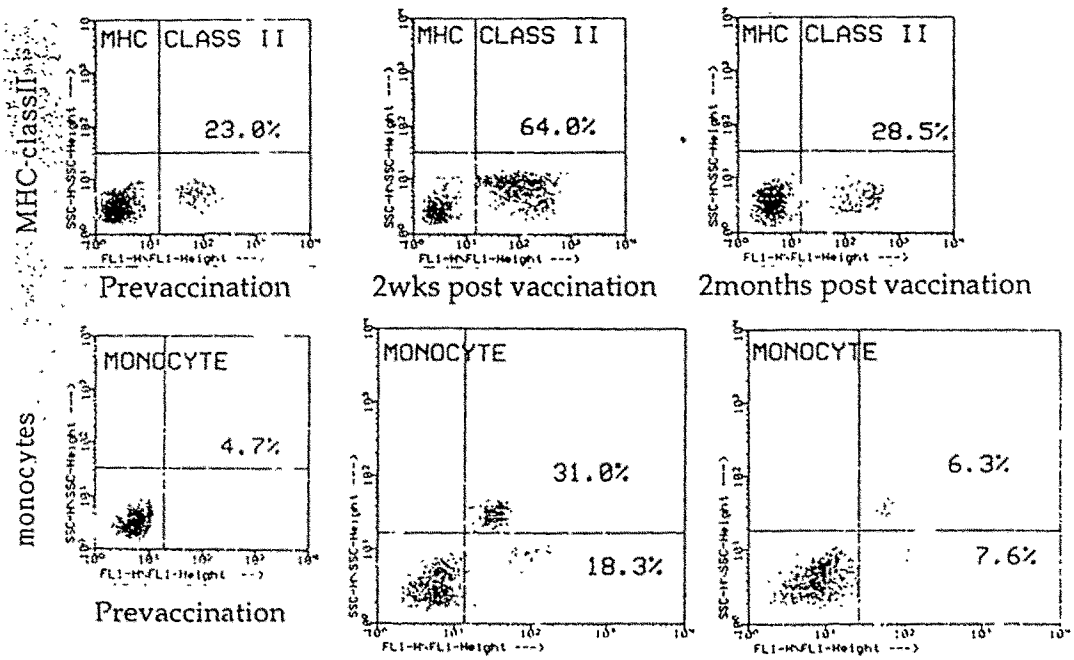

Fig. 3-1. Dot Plot Profiles Bovine Leukocyte Subpopulations specifically reactive with leukocyte differention molecules of MHC-class II expressing cells and monocytes at prevaccination, 2wks and 2months post vaccination with *Brucella abortus* RB51

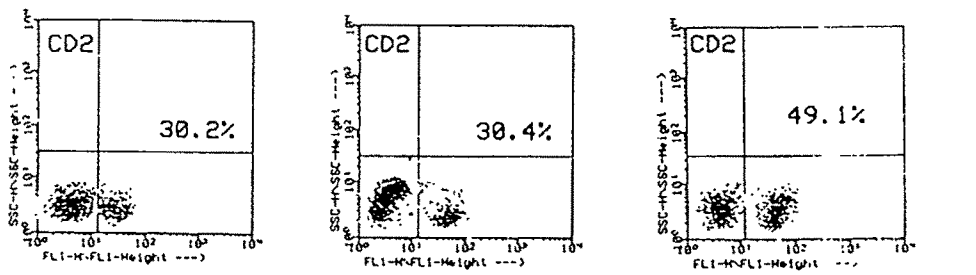

Fig. 3-2. Dot Plot Profiles Bovine Leukocyte Subpopulations specifically reactive with leukocyte differention molecules of T cells at prevaccination, 2wks and 2months post vaccination with *Brucella abortus* RB51

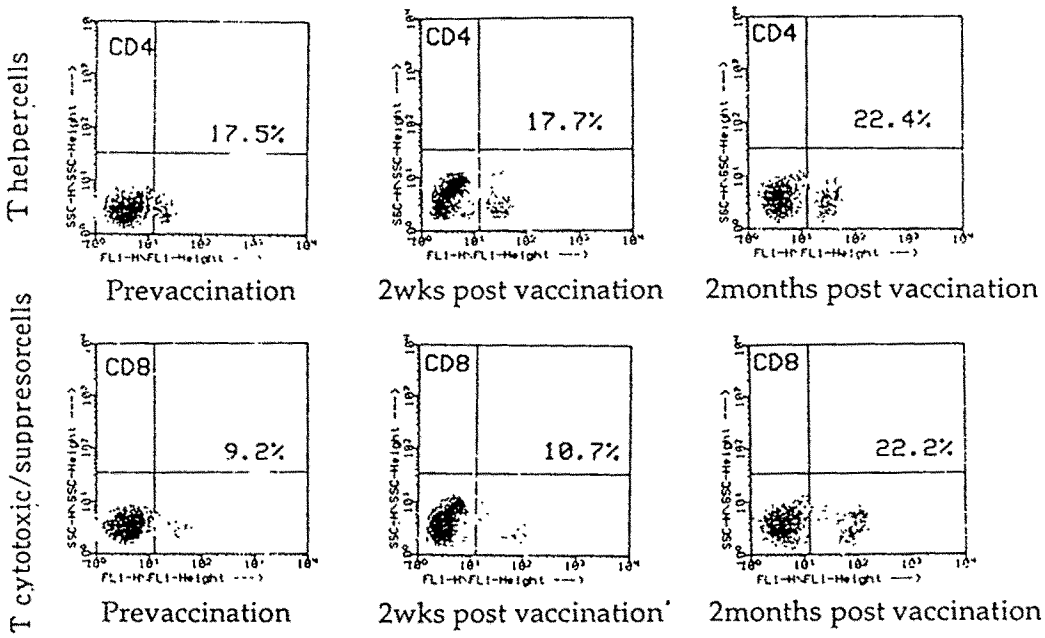

Fig. 3-3. Dot Plot Profiles Bovine Leukocyte Subpopulations specifically reactive with leukocyte differention molecules of T helper cells and T cytotoxic/suppresor cells at prevaccination, 2wks and 2months post vaccination with *Brucella abortus* RB51

표 7. 백혈구 아집단 세포의 변화

세 포	예방 접종 전	예방 접종 2주후	예방접종 2개월후
MHC-Class II Expressing Cells	23.0± 7.5	64.0±11.0*	31.2±12.1
Monocytes	4.7±1.1	31.0±10.5**	7.6±2.4
T Cell	32.5±9.4	31.7±11.1	49.5±10.0*
T helper	17.5±7.7	17.7±6.0	24.1±7.1*
T cytotoxic Suppressor	9.7±4.3	10.7±6.2	25.0±7.0*

Significance rate: **; <0.01 *;,0.05

즉 Brucella abortus RB51을 예방접종 전에는 MHC-Clacc II expressing cell은 23.0∓7.5%이었으나 예방접종 2주 후에나 04.0∓11.0%로 증가하였다가 2개월 후에는 31.2∓12.1%로 감소되는 소견을 나타내어 체액성 세포의 활성이 강했음을 알 수 있었다(Fig 3-1). 특히 monocytes는 4.7∓1.1%에서 31.0∓10.5%로 유의적 차이로 증가되었다. T. cell 은 예방접종 전에는 32.5∓9.4이었으나 예방접종 2개월 후에 49.5∓10.0%로 증가되어 강한 세포성 면역을 유발시키고 있음을 알 수 있었으며 T. cytotoxic suppressor도 역시 9.7∓4.3%에서 25.0∓7.0%로 증가되는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig 3-2, 3-3).

3. 전북대학교 시험 목장에서의 도전시험 결과

(1) 도전균주 및 균체량: *Erucella abortus* RB15을 예방접종한 후, 수의과학연구소로부터 제주도에서 자연발생한 부르셀라병으로 살처분된 소의 상유방 임파절로부터 분리한 *B. abortus* biotype I을 분양받아 10 X 10⁸를 냉동건조하여 예방접종한 2개월 후에 피하접종한 후에 혈청학적 변화를 관찰하였던 바 다음과 같은 결과를 가져 왔다.

(2) 관찰 항목 :

1) 혈청학적 관찰소견: *Erucella abortus* 1119-3을 진단용 항원으로 ① TAT ② CFT ③ Latex Agglutination Test를 관찰하였던 바, *B. abortus* 1119-3 항원을 이용한 진단방법으로는 예방접종한 소에 있어서 전 시험기간에 걸쳐서 양성 반응을 관찰할 수 없었지만, Dot- Elisa에서만 양성반응을 관찰할 수 있었다.

2) 세포성 면역검사: 예방접종한 소의 백혈구를 이용한 CMI에서는 예방접종 후의 혈청을 주입하여을 경우 2주부터 세포의 증식이 관찰되어 예방접종 2개월에는 강한 항체형성에 다른 세포 증식을 억제함을 관찰하였지만 자연감염 혈청에서는 전혀 관찰 할 수 없었다.

3) 방어능력시험 분석 : 소에게 예방을 접종한 후 국내 분리 *Erucella abortus* Biotype I을 공격 감염시켜 항체의 형성 상태를 관찰하였던 바, TAT, CFT에서 양성으로 판정될 수 있는 정도의 항체를 나타내고 있지 않았다.

4. 국내 분리균주의 가치 평가

가. 국내 분리균주에 대한 SDS-PAGE과 western blot방법에 의한 분석:

미국 ATCC에서 분양받은 *Brucella abortus* 균주를 포함한 국내 분리 *Brucella* spp.에 대한 SDS-PAGE를 수행하였던 바, Fig. 4.에서 보는 바와 같이 *B. abortus*의 주요 단백물질로는 6KD, 10KD, 14KD, 16KD, 18KD, 19KD, 20KD, 21.6KD, 23KD, 26.8KD, 33KD 50KD, 60KD, 70KD, 76KD, 80KD 그리고 116KD가 관찰되었으며, 각 지역간에 약간의 차이가 있음이 관찰되었다.

나. Western Blot 분석 : *Brucella abortus* 1119-3와 국내 분리균주 그리고 *B. abortus* RB 51을 SDS-PAGE하였던 바, 국내 분리균주의 항원 조성은 약간씩 다르게 나타났으며, 특히 *B. abortus* RB51와 Fig. 5와 Fig. 6에서 보는 큰 차이를 나타내고 있었다.

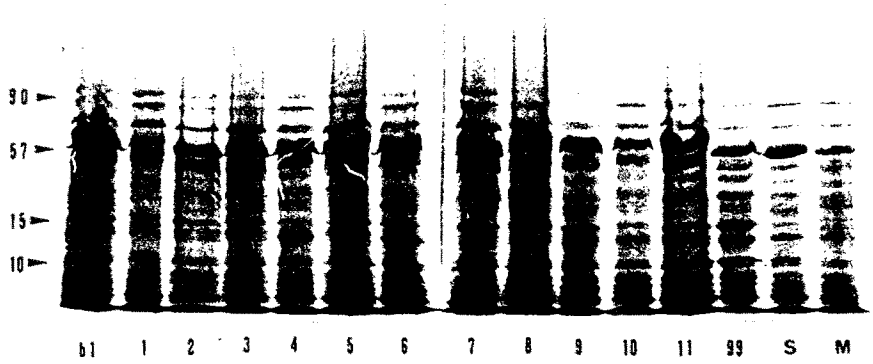

Fig. 4. SDS-PAGE for the isolated *Brucella* sp strains in Korea
b1: biotype I strain
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 are strains isolated grow dairy cattle.
S : smooth colong type *Brucella*.
m : mutant *B. abortus* strain

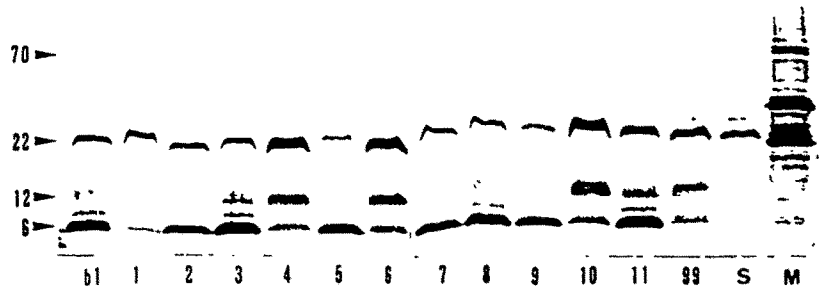

Fig. 5. Western blot for the Korean strain and mutant strain using brucellosis negative serum.

bl: biotype I strain

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 are strains isolated grow dairy cattle.

S : smooth colony type *Brucella.*

m : mutant *B. abortus* strain

Fig. 6. Western blot for the Korean strain and mutant strain using brucellosis positive serum

bl: biotype I strain

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 are strains isolated grow dairy cattle.

S : smooth colony type *Brucella.*

m : mutant *B. abortus* strain

이처럼 SDS-PAGE한 gel을 Western blot방법(백 등 1997a)으로 관찰하였던 바, 항원과의 반응은 15KD, 26KD-60KD 그리고 67KD에서 강한 반응대를 나타내었고 그밖에도 94KD에서 116KD 등의 물질에서도 강한 반응대가 관찰되었으며, 음성 혈청과의 반응에서는 15KD, 17KD, 25KD 등의 반응대가 미약하게 나타났다.

5. 예방약의 안전성 및 보존성 시험

가. 예방약의 독성시험

1) Mouse에 대한 독성 시험: 예방약에 대한 실험동물에서의 안전성을 확인하기 위하여 25g 전후의 mouse 50두를 4개군으로 구분하여 이용하여 피하접종한 후 2개월간 관찰하였던 바, 표 8에서 보는 바와 같이 5x 10¹¹를 접종한 시험군에서 1두가 감염 5일째에 폐사한 예를 제외하고는 전혀 다른 군에서 폐사한 예가 없었다.

표 8. *Brucella abortus* RB51의 병원성 시험

균 체 수	Mouse 두수 (25g/체충)	폐사두수	균체 확인 (PCR)
5 X10⁵	10	-	
5 X10⁶	10	-	
5 X10⁸	10	-	
5 X10¹¹	10	1	

2) Vaccine의 보존성 시험 : 냉동건조 생산한 예방약을 냉암소 4℃에 보관 매번 5개씩 무균적으로 개봉하여, *Brucella* 배지(Difco)에 접종하여 증식

상태를 관찰하였던 바, 1개월간 보존하였던 예방약부터 10개월간 보존하였던 예방약까지 모두 그 증식성이 표 9와 같이 나타나므로서 *B. abortus* RB51의 보존기간은 10개월 이상 보존 가능함을 알 수 있었다.

표 9. 보존성 시험

보존 기간	예방약 외형	증 식 성
1 개월	Cake상태 유지	100%
3 개월	Cake상태 유지	100%
6 개월	Cake상태 유지	100%
10 개월	Cake상태 유지	100%

6. **실험동물에서의 항체형성 능력시험** : 8개월간 보존하였던 예방약을 mouse에게 접종한 후에 항체형성정도를 확인하기 위하여 Dot- ELISA를 실시하였던 바, 항체형성을 확인할 수 있었다.

7. **예방접종 균주의 진단학적 특색** : 이 균주는 과거 예방접종 균주로 활용되어온 *Erucella abortus strain* 19주와는 다르게 예방접종에 의하여 형성되는 항체는 Brucellosis진단을 위하여 사용되고 있는 *B. abortus* 1119-3주로 제조한 항원으로 생산한 공인진단방법인 MRT과 TAT 검사방법으로 검색되지 않음으로서 예방접종한 항체와 자연감염된 항체의 면역형성은 구분이 되므로서 현재 우리나라에서 수행하고 있는 brucellosis박멸정책을 수행하는데 있어서의 자연감염된 소를 색출하는데 어떤 어려움이 없음을 알 수 있었다.

8. **예방약 생산에 대한 의견**: 금번에 본 연구에서 활용한 *Erucella abortus* RB51주는 미국에서 구입한 연구용 그리고 시판되고 있는 균주를 Colorado state에서 구입한 것으로서 우리나라 *Erucella abortus* 의 자연감염을 충분히 방어할 수 있는 결과를 얻었으며, 전북대학교와 야외 목장에서 면역효과 역시 탁월하였다.

또한 국내(제주도)에서 분리하여 활용할 수 있도록 개발자로부터 연구용으로 무상으로 공급받았으며, 이는 국제법상의 분쟁 발생 요인이 없는 바, 우리나라 농촌 현장애로사업의 애로를 해결하기 위한 연구사업을 수행하였으며, 협약서 내용에 따라서 기술개발비를 생산업체로부터 받고 1997년 9월부터 대량 생산체제로 예방약을 생산할 수 있었다. 물론 국내 분리균주를 대상으로한 각종 실험적 면역형성능력을 시험하였던 바, 국내 분리균주를 이용한 예방균주의 활용에서도 강한 예방효과를 얻을 수 있었다.

결 론

전 세계적으로 매년 발생하고 있는 동물의 중요 질병중의 하나인 부루셀라병은 우리나라의 양축농가에 경제적 손실을 끼치고 있다. 이의 근절 방안을 마련하기 위하여 예방균주로서 알려진 *Brucella abortus* RB51을 연구목적으로 구입하여 이의 특색을 분석한데 이어서 우리나라 제주지역에서 분리된 균를 이용하여 얻어진 예방균주를 생산하여 각공 면역원성 및 항원성 그리고 방어능력을 비교 관찰하였기에 보고하는 바이다.

1. *Brucella abortus* RB51를 이용한 예방접종시험을 하였던 바, 예방효과가 인정되어 예방접종 전 약 18%의 양성전환을 보이던 것을 예방접종 2개월 후에는 전혀 양성전환되지 않았다.

2. 야외목장에서의 예방효과는 표준 균주의 세포막성 항원과 각 지역의 젖소로부터 수집된 부루셀라 양성혈청에 대하여 SDS-PAGE와 Western blot하였던 바, *B. abortus* 1119-3의 경우 26-60KD에 이르는 광범위한 부위에서 강한 항원성이 관찰되었으며, *B. abortus* Biotype I과는 강한 교차면역이 형성되고 있음을 확인하였다.

3. *Brucella abortus* RB51 예방접종 소에 대한 국내 분리균주의 접종에서 TAT와 CFT시험에서 항체의 상승이 있었으며, 곧 도전주에 의하여 형성된 항체가 소실되고 있음을 관찰하였다.

4. 국내 *Brucella abortus* RB51 유사균주에 대한 예방효과를 관찰하였던 바, 예방효과가 인정되었으며, TAT, CFT, Dot-ELISA 그리고 Latex Agglutination Test에서 모두 음성으로 나타났지만, 항체를 입증할 수 있는 방법의 개발연구가 시급한 실정이다.

제 4 절 예방접종 시험의 활용 및 기대효과

< 국가적인 방역정책의 입장에서의 기대효과 >

(1) 야외 감염목장에 대한 예방효과 확인으로 실용화 사업 추진 가능성 확인 : Brucellosis가 지속적으로 발병되다가 1996년부터 대단위로 발병했던 이 목장에서 brucellosis 발병을 완전히 완전히 막을 수 있었다. 이 같은 결과를 최근 우리나라 전역에 걸쳐서 집단발병하고 있는 목장을 대상으로한 예방접종 사업 실시는 동거우의 발병 예방을 근본적으로 예방할 수 있는 효과가 기대된다.

< 기술 개발면에서의 기대효과>

(1) 예방약 생산기술 확보: 우리나라에 상존하는 Brucellosis의 예방을 위한 예방약 생산기술을 국내에 확립하므로서 예방약 생산, 활용에 필요한 개발, 연구비를 절약할 수 있는 효과를 가져 왔음.

(2) 예방접종 실시요령 확립: 금번에 실시한 예방접종사업은 젖소 300두 규모의 목장에서 3개의 수의관련 정부기관과 민간연구소에서 공동으로 예방접종 시험을 수행하였으며, 각 임무도 분담하여 실시하므로서 예방효과에 대한 허위조작의 가능성을 완전히 배제한 연구시험으로서 모든 시험결과에 대한 신빙성이 아주 높았던 정부 주도하에 수행된 연구시험으로 간주될 수 있을 것인 바, 완전한 예방효과 판정을 위한 연구사업으로 판정된다.

(3) 예방약 접종에 따른 항체와 자연감염된 소의 항혈청을 구분할 수 있는 특색을 입증할 수 있었던 것은 자연감염된 소를 색출, 살처분하는 정책에 어떤 악영향을 끼치지 않은 연구결과로서 인정되었다.

제 5 장 참 고 문 헌

가축전염병 발생상황(1996) 가축전염병 발생 상황. 농림부.

강호조, 김현주, 박재학, 백병걸, 신광순, 이영순, 이원석, 이재일, 임윤규, 탁연빈, 허강준, 홍종해(1996) 수의공중보건학. 수의공중보건학교육협의회 편. 문운당. 42-43.

김금화, 안수환, 박용호, 김동성(1982) 브루셀라병 검색에 사용되는 여러가지 혈청진단법의 비교 연구. 대한수의학회. 22(2):149-153.

김두희, 정병탁, 문재봉(1968) 부루셀라 감염 한우에 대한 혈청학적 연구. 농사시험연구보고서. 11(15):1-18.

김병구, 안병균, 이택주(1959). Brusellosis에 관한 연구 제2보 가축 Brucellosis에 대한 면역학적 조사보고. 가축위생연구보고. 6:9-23.

김병구, 정병택, 차연호.(1963) Brucellosis에 대한 혈청학적 검사 (1) (특히 인공 감염 한우를 중심으로 한 관찰) 가축위생연구보고. 9:40-50.

김종만, 유종찬, 박정문, 현관종, 마점술(1988). 브루셀라 양성우에서 분리한 브루셀라균의 성상과 혈청학적 진단법 비교. 농시논문집(가축위생). 30(2):1-6. 농림수산부(1988-1992) 농림수산통계연보.

농림부(1995) 농림수산부통계연부. 농림부. 1995.

농림부(1997) 가축 전염병 발생월보. 농림부(1997) 가축통계.

농림수산부예규. 제142호 제10조 - 제15조 1988.1.11.

문진산, 박용호, 정석찬, 구복경, 강병규(1996a) 백혈구 표면 항원 특이 단크론 항체를 이용한 한우의 말초혈액 백혈구 아군에 관한 연구. 대한수의학회지. 36(2):337-348.

문진산, 박용호, 정석찬, 구복경, 장금찬, 이성일, 백병걸(1996b) 소 브루셀라 감염우의 혈청학적 진단법 비교와 세포성 면역반응에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지. 20(3): 185-194.

박동권, 이창희(1959) 우리나라에 발생한 축우 *Brucella*증에 대하여. 수의계. 3:392-195.

박동권 (1963) 축산시험장에서 발생한 돈의 유산증에 대한 병원학적 조사연구. 가축위생연구보고. 9:34-39.

백병걸, 이존화, 진찬문(1997a) Western blot 방법에 의한 소 brucellosis의 특성 분석. 한국수의공중보건학회지. 21(2): 107-115.

백병걸, 허진, Matsuda Kiku(1997b) Complement Fixation Test 이용한 Brucellosis 진단. 한국수의공중보건학학회지. 21(4): 395-402.

서명득, 이응구(1993) Latex 응집반응을 이용한 동물의 동물의 톡소플라스마병 진단액 개발에 관한 연구. 대한수의학회지. 33(4):623-632.

서명득, 주후돈, 데이빗 마스(1995) Latex 응집반응을 이용한 동물의 톡소플라즈마병 진단용 kit 개발에 관한 연구. 대한수의학회지. 35(3):583-593.

손준용, 이길웅, 유재창, 박만석(1986) Zoonosis 부루셀라증에 관한 연구. 국립보건원보. 23:281-295.

안수환, 김금화, 박용호, 김동성(1982) 부루셀라병과 *Yersinia enterocolitica* 감염의 혈청학적 감별진단에 관한 연구. 농사시험연구보고(축산가축). 24:106-111.

우종태, 서익수(1986) 홀스타인 유우로부터 *Brucella abortus*의 분리와 분리균의 성상에 관한 연구. 서울대학교 수의대논문집. 11(1): 103-118.

이병훈, 이응구, 서명득(1992) Latex응집 반응과간접형광체법을 이용한 개 톡소플라즈마병의 혈청학적 진단. 대한수의학회지. 32(4): 641-647.

임윤규, 양기천, 이경갑, 박전홍, 신태균, 김옥녀, 서문현, 김종성, 김우택, 이병임(1995a) 제주지역의 축우 브루셀라병 발병 특성 조사. 한국수의공중보건학회지. 19(3): 249-256.

임윤규, 양기천, 이경갑, 박전홍, 이두식, 박용호, 강승원, 목지원, 이영순(1995b) SDS-처리한 브루셀라 항원과 *Yersinia enterocotica* O:9주의 혈청학적 교차 반응 연구. 대한수의학회지. 35(1):143-148.

임윤규, 이두식, 박전홍, 양기천, 김승호, 김공식, 현광종, 김우택, 이영순(1993) 축우 부루셀라병의 ELISA진단법에 관한 연구. 대한수의학회지. 33(1): 131-135.

정병탁(1969) 유우 부루셀라병 진단을 위한 Milk Ring Test의 이용가치. 대한수의학회지. 9(2):55-59.

정석찬, 김종만, 박정문, 안수환(1989) 부루셀라균에 대한 단크론성 항체 생산. 농시논문집. 31(4):19-23.

정석찬, 이정미, 우승룡, 조윤상, 정병열, 이경기, 문진산, 구복경, 김종염, 박용호, 백병걸, 이존화(1996) polymerase chain reaction을 이용한 종모우 정액중 부루셀라균 신속검출기법 개발. 대한수의학회지(부록). 36(3):39.

정종식, 조용준, 박정규(1988) 경북지방 젖소로부터 *Erucella abortus*의 분리 및 균 형별. 수의학회지. 28(2):339-343.

허 진(1997) latex 응집반응을 이용한 소의 Brucellosis진단법 개발에 관한 연구. 전북대학교 학위논문.

Allan G.S., Chappel R.J., Williamson P., McNaught D.J.(1976) A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J Hyg*. 76 : 287-295.

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.

Alton G.G., Maw J., Rogerson B.A. and McPherson G.G.(1975) The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination test and Rose Bengal tests. *Australian Veterinary Journal*. 51 : 57-62.

Alton G.G.(1981) The control of bovine brucellosis, recent developments. *World Animal Review*. 29:17-24.

Aparicio E.D., Aragon V., Marin C., Alonso B., Font M., Moreno E., Ortiz S.P., Blasco J.M., Diaz R. and Moriyon I(1993) Comparative analysis of *Erucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9

Polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *J Clin Microbiol*. 31(12): 3136-3141.

Araj G.F. & Kaufmann A.F.(1989) Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G(IgG), IgM, and IgA to *Erucella melitensis* major outer membrane proteins and whole-cell heat-killed antigens in sera of patients with brucellosis. *J Clin Microbiol*. 27:1909-1912.

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

Axel Cloeckaert, Michel S. Zygmunt, Philippe de Wergifosse, Gerard Dubray and Joseph N. Limet(1992a) Demonstration of Peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J General Microbiology*. 138:1543-1550.

Axel Cloeckaert, Pierre Kerkhofs, Joseph N. Limet(1992b) Antibody Response to Brucella Cuter Membrane Proteins in Bovine Brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Clini Microbio*. 30(12):3168-3174.

Bagus M.P.J., Elzer P.H., Jones S.M., Balsco J.M., Enright F.M., Schurig G.H., Winter A.J. (1994) Vaccination with *Brucella abortus* Rough Mutant RB51 protects BALB/c Mice against virulent strains of *Erucella abortus, Erucella melitensis, and Erucella ovis*. *Infect Immun*. 62: 4990-4996.

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 Hygience*. 95(4):271-275.

Baldi P.C., Wanke M.M., Loza M.E., Fossati C.A.(1994) *Brucella abortus*

cytoplasmic protein used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Veterinary Microbiology*. 41:127-134.

Banai, M.B., Mayer, I.& Cohen, A.(1990) Isolation, identification and characterization in Israel of *Erucella melitensis* bivor 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. *J Clin Microbiol*. 28:1057-1059.

Beran G.W., Steele J.H.(1994) Hand book of zoonoses. Section A. CRC. 9-39.

Berger T.G, Guill M.A., Goette D.K(1981) Cutaneous lesions in brucellosis. *Arch Dermatol*. 117:40-42.

Berman D.T., Wilson B.L., Moreno E., Angus R.D., Jones L.M. (1980) Characterization of Brucella abortus soluble antigen employed in immunoassay. *J Clin Microbiol*. 11:335-362.

Bowden R.A., Verger J.M., Maggy Grayon, Limet J.N. and Dubray G.(1993) Simultaneous expression of smooth and roug phase properties related to lipopolysacchride in a strain of *Erucella melitensis*. *J Med Microbiol*. 39:363-370.

Bricker BJ and Halling S.M(1995) Enhancement of the *Brucella* AMCS PCR Assent for DIfferentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *AME Soci Microbiol*. 33;1640-1642.

Cellier M.F.M., Teyssier J., Nicolas N., Liautard J.P., Marti J. and Sriwidada J.(1992) Cloning and Characterization of the *Brucella ovis* heat shock protein dnaK functionally expressed in *Escherichia coli*. *J Eacteriol*. 174(24): 8036-8042.

Chappel, R.J., McNaught, D.J., Bourke, J.A. and Allan, G.S.(1978) Comparison of the results of some serological tests for bovine brucellosis. *J Hyg Camb*. 80 : 365-371.

Cheers C., Pagram F.(1979) Macrophage activation during experimental murine Brucellosis: a basis for chronic infection. *Infec Immun*. 23(2): 197-205.

Cheville N.F., Jensen A.E., Halling S.M., Tatum F.M., Morffit D.C., Hennager S.G., Frerichs W.M., Schurig G. (1992) Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strain of *Erucella abortus*. *Am J Vet Res*. 53(10): 1881-1888.

Cheville N.F., Stevens M.G., Jensen A.E., Tatum F.M., Halling S.M.(1993) Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Erucella abortus*. *Am J Vet Res*. 54(10):1591-1597.

Chin J.C., Pang B., Carrigan M. (1991) Comparison of seroreactitivity of rams with brucellosis in a complement fixation test, whole cell ELISA and by immunoblotting. *Veterinary Microbiology*. 26:291-299.

Chin J.C., Plant J.W.(1989) Temporal ELISA response of rams to *Brucella ovis* following experimental infection or vaccination. *Res Vet Sci*. 46:73-78.

Christian C.L., Mendes-Bryran R., Larson D.L.(1958) Latex agglutination test for disseminated lipus erythematosus. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 98:820-823.

Chukwu C.C.(1985) Evaluation of brucellin skin test for bovine brucellosis. *Int J Zoon*, 12:6-13.

Cloeckaert A., Kerkhofs P. & Limet, J.N.(1992) Antibody response to *Erucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: Immunoblotanalysis and competitive enzyme-linked lmmunosorbent using monoclonal antibodies. *J Clin Microb*. 30(12):3168-3174.

Confer A.W., Hall S.M., Faulkner C.B., Espe B.H., Deyoe B.L., Norton R.J., Smith R.A.(1985) Effects of Challenge Dose on the Clinical and Immune Responses of Cattle Vaccinated with Reduced Doses of *Brucella abortus* strain 19. *vet Microbiol*. 10: 561-575.

Corbel M.J.(1985) Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Vet Bull*. 55(12):927-942.

Corner L.A., Alton G.G.(1981) Persistance of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Research in Veterinary Science*. 31: 342-344.

Cunninggham E., Miller J.J., Doran L., McKeon F., and O'Meara M.(1980) Immunological characteristics in cattle of allergen derived from smooth *Brucella abortus* S 99. *Vet Rec*. 107:369-375.

Davis D.S., Templeton J.W., Ficht T.A., Williams J.D., Kopec J.D., Adams L.G.(1990) *Brucella abortus* in captive bison. I. Serology, bacteriology, pathogenesis, and transmission to cattle. *J Wildlife Disease*. 26(3):360-371.

Davis W.C., Marusic S., Lewin H.A., Splitter G.A., Perryman L.E., McGuire T.C., Gorhan J.R.(1987) The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocytes differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune sysytem in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol*. 15:337-376.

Detilleus P.G., Deyoe B.L., Cheville N.F. (1990) Penetration and Intracellular Growth of *Brucella abortus* in Nonphagocytic Cells in Vitro. *Infect Immun*. 58(7): 2320-2328.

Diaz R., Jones L.M., Leong D., Wilson J.B. (1968) Surface antigens of smooth *Brucellae*. *J Bacteriol*. 96:893-901.

Dohoo I.R., Wright P.F., Ruckerbauer G.M., Samagh B.S., Robertson F.J. and Forbes L.B.(1986) A comparison of five serological tests for brucellosis. *Can J Vet Res*. 50:485-493.

Essenberg R.C.(1995) Clonig and Characterization of the Glucokinase Gene of *Erucella abortus* 19 and identification of three dther Genes. *J Eacteriol*. 177:6297-6300.

Ewalt D.R.(1989) Comparison of three culture techniques fo the isolation of *Brucella abortus* from bovine supramammary lymph nodes. *J Vet Diagn Invest*. 1:227-230.

Fair B.D., & Jamieson A.M.(1980) Studies of protein adsorption on polystryrene latex surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 77:525-535.

Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M. and Stich, R.W.(1992) Amplification fragment length polymorphism in Brucella starins by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *Journal of Eacteriology*. 174(23): 7778-7783.

Flores-Castro R. and Carmichael L.E.(1980) Canine brucellosis. *Curr Vet Ther*. 7:1303-1305.

Fowles R.E., Fajara I.M., Lebowitch J.L., David J.E.(1973) The enhancement of macrophage bacteostasis by products of activated lymphocytes. *J Exp Med* . 138:952-964.

Greene C.G., Marks M.A., Raffin M.R., Breitschwerdt E.B., Wolskey N.A., Burgdorfer W.(1993) Comparison of latex agglutination, indirect immunofluorescent antibody, and enzyme immunoassay methods for serodiagnosis of Rocky Mountain Spotted Fever in dogs. *Am J Vet Res*. 54(1):20-28.

Hausler(1972) Standard methods for examination of dairy products. American Public Health Association. 12-13.

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

Hopper, B.R., Sanborn, M.R. and Bantle, J.A.(1989) Detection of *E. abortus* in mammalian tissue using biotinylated whole genomic DNA as a molecular probe. *J Am Vet Medi Associ*. 50: 2064-2070.

Huber J.D., Nicoletti P. (1986) Comparison of the results of card, rivanol, completemnt fixation, and milk ring tests with the isolation rate of Brucella abortus from cattle, *Am J Vet res*. 47(7):1529-1532.

Jagannath C., Sehgal S.(1989) Enhancement of the antigen-binding capacity of incomplete IgG antibodies to *Erucella melitensis* through Fe region interactions with staphyloccocal protein. *A J Immunol Methods*. 124:251-259.

Jensen A.E., Ewalt D.R., cheville. N.F., Thoen C.O. and Pateur J.B.(1996) Determination of Stability of *Erucella abortus* KB51 by Use of Genomic fingerprint, dxidative metabolism, and colonial morphology and differentation of strnin RB51 from *E.aborths* isolates from Bison and ELK. *J Clini Microbiol*. 34(3)628-633.

Jiang X., Baldwin C.L.(1993) Effects of cytokines on intracellular growth of *Erucella abortus* *Infect Immun*. 61(1):124-134.

Simenez M.P., Bagues D.E., Elzer P.H., Jones, S.M., Blasco J.M., Enright F.M., Schurig G.G., and Winter AJ(1994) Vaccination with *Erucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/C Mice against virulent strains of *Erucella aborths*, *Erucella melifensis*, and *Brucella ovis*. *Infec Immun*. 62;4990-4996.

Kerr W.R., Coghlan J.D., Payne D.J.H., Robertson L.(1966) Chronic brucellosis in the practicing veterinary surgeon. *Vet Rec* 79:602-606.

Kobayashi A., Hirai N., Suzuki Y.(1977) Evaluation of a commercial toxoplasma latex agglutination test. *Jpn J Parasitol*. 26: 175-180.

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

Lambert G. & Amerault(1962) Comparative study of three serological tests for detecting the response in cattle to virulent *Erucella abortus*. *Am J Vet Res*. 23:529-537.

Lamb V.L., Jone L.M., Schurig G.G., Berman D.T.(1979) Enzyme-linked immunosorbent assay for bovine immunopolysaccharides. *Infect Immun*. 26:240-247.

Last L.M.(1986) Public health and preventive medicine. Brucellosis (Kaufman A F). *Appleton -Century-Crofts*. 400-403.

Lowry C., Rosenbrough N., and Farr A.(1951) Protein measurements with the Folin-phenol reagent. *J Eio Chem*. 193:253.

Lu Q.F., Wang X.Y., Hao Z.Y.(1995) Study on carboxylated latex agglutination test for the serodiagnosis of human and animal brucellosis. *Chinese J Epidemiol*. 13(5):291-293.

MacDiarmid S.C., Hellstrom J.S.(1987) An intradermal test for the diagnosis of brucellosis in extensively managed cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 4:361-369.

Magee J.T.(1980) An enzyme-labelled immunosorbent assay for *Brucella abortus* antibodies. *J Med Microbiol*. 13:167-172.

Mahajian N.K., Kulshresstha R.C., Vasudevan B.(1986) Brucellosis-cause of a abortion in sheep and its public health significance. *Int J Zoon*. 13:174-179.

March S.B., Ratnam S.(1989) Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O:157. *J Clin Microbiol*. 27: 1675-1677.

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.

McLean D.R., Russell N., Khan M.Y.(1992) Neurobrucellosis: Clinical and therapeutic features. *Clinical Infectious Diseases*. 15:582-590.

Meyer M.E.(1990) *Brucella* in 'Review of Veterinary Microbiology'. Blackwell Scientific Publication Inc. 250-258.

Moreno E., Jones L.M., Berman D.T.(1984) Immunochemical Characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infection Immun*. 43(3):779-782.

Morgan W.J.B., Mackinnon D.J., Cullen G.A.(1996) The rose bengal plate agglutination test in diagnosis of brucellosis. *Vet Res*. 85:636-646.

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.

Nielsen K.H., Kelly L., Gall D., Balsevicius S., Bosse J., Nicoletti P., Kelly W.(1996) Comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of bovine brucellosis. *Prevent Vet Med*. 26:17-32.

North R.J.(1971) The action of cortisone acetate on cell-mediated immunity to infection. *J E X P Med*. 134:1485-1500.

CIE (1992) Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for list A and B diseases of mammals, birds, bees. *Office International Des Epizooties*. 260-276.

Cpaleichuk I.S., Umnova N.S., Zheludkov M.M., Pavlova I.P.(1991) The use of the latex agglutination reaction for the diagnosis of a *Brucella*

infection. *Microbiol Epidemiol Immunobiol*. 7:61-63.

Parma A.E., Santisteban G., Margini R.A.(1984) Analysis and *in vivo* assay of *Erucella abortus* agglutination and nonagglutinating antibodies. *Vet Microbiol*. 9:391-398.

Perry M. and Bundle D.(1990) Liopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Erucella*. In : Garry Adams(Editor). Advances in Brucellosis Research. *Texas A & M University Press*, Texas. 76-88.

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

Quinn D.M., Wong C.Y., Atkinson H.M., Flower R.L.(1983) Isolation of carbohydrate-reactive outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*. 61(2):371-377.

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R.(1994) Clinical Veterinary microbiology. *Wolfe Press*. 261-267.

Richard E.B., David W.H., Tim E.C.(1992) Serological and bacteriologic test results after adult vaccination with strain 19 in three dairy herds infected with brucellosis. *J A V M A*. 200(6):806-811.

Robbert R., Mahaza P.L., Bernard C., Buffard C., Senet J.M.(1990) Evaluation of new bicolored latex agglutination test for immunological diagnosis of hepatic amoebiasis. *J Clin Microbiol*. 28:1422-1424.

Sambrode J., Fritsch E.F. and Maniatist.(1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY. pp. 13-958.

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.

Schrig G.G., Jones L.M., Speth S.L., Berman D.T. (1978) Antibody response to antigens distinct from smooth lipopolysaccharide complex in *Erucella* infection. *Infect Immun*. 21(3): 994-1002.

Schrig G.G., Roop R.M., Bagchi T., Boyle S., Buhrman D., Sriranganathan N. (1991) Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Erucella abortus*. *Veterinary Microbiology*. 28: 171-188.

Schurig G.G., Roop R.M., Bagchi T., Boyle S., Buhrman D., Sriranganathan N.(1991) Biological properties of RB51; A stable rough strain of *Erucella abortus*. *Vet Microbiol*. 28: 171-188.

Scully R., Mark E.J., McNeely B.U.(1986) Case records of the Massachusetts general hospital. *The New England Journal of Medicine*. 18:746-754.

Smeak D.D., Olmstead M.L., Hohn R.B.(1987) *Erucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements. *J A V M A*. 191(8):986-989.

Smith H. & Fitzgeorge(1964) The chemichal basic of the virulence of Brucella abortus. *Eri J Exp Path*. 45:174-79.

Sowa B.A., Kelly K.A., Ficht T.A., Frey M., Adams L.G.(1991) SDS-soluable and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidogycan complex of *Erucella abortus*. *Veterinary Microbiology*. 27(3-4):351-369.

Spink, W.W.(1969) Present status of brucellosis in man : Clinical and diagnostic problems. *J A V M A*. 155-2091.

Steven. Mark G., Olsen. Steven C., Cheville. Norman F.(1995) Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with Brucella abortus strain 19 or strain RB51. *Veterinary Analysis of Immunology and Immunopathology*. 44:223-235.

Stevens M.G., Hennager R.M., Olsen S.C. and Cheville N.F.(1994) Serologic responses in diagostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Erucella abortus* 19 or RB 51. *J Clin Microbiol*. 32: 1065-1066.

Stuart F.A. and Corbel M.J.(1982) Identification of a serological cross reaction between *Brucella abortus* and *Escherichia coli* C:157. *Vet Rec*. 110:202-203.

Sugiyama J., Gondaira F., Matsuda J., Soga M., Terada Y.(1987) New method for serological typing of *Vibrio cholerae* 1:0 using a monoclonal antibody-sensitized latex agglutination test. *Microbiol Immunol*. 31:387-391.

Sulitzeanu D.(1965) Mechanism of immunity against *Brucella*. *Nature*. 205:1086-1088.

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

Timoney J.F., Gillespie J.H., Scott F.W., Barlough J.E.(1988) Hagan and Bruner's Microbiology and infectious disease of domestic animals. *Comstock Publishing Associate*. 135-152.

Tizard I.(1982) An intoduction to Veterinary Immunology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 74-118.

Tizard(1995) Immunology. *Saunders College Fublishing*. 264.

Tobias L.G., Schurig G. and Cores D.C.(1992) Comparative behaviour of *brucella abortus* strains 19 and RB51 in the pregnant mouse. *Reso vet*. 53: 179-183.

Turgeon ML(1996) Immunology and serology in laboratory medicine. A Times Mirror Company. 53-55, 191-192, 123-125, 232-235, 280-282.

Turkson P.K., Boadu D.Q.(1992) Epidemiology of bovine brucellosis in the coastal Savanna zone of Ghana. *Acta Tropica*. 52:39-43.

USDA(1986) Department of agriculture animal and plant health inspection service national veterinary services laboratories. Ames, Iowa. *Microtitration Complement Fixation Techniques*. 35-52.

Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.(1979) Electrophoretic transfer of

proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natt. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.

Tsang V.C.W., Peralta J.M. and Simons A.R.(1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot tecniques(EITB) for studying the specification of antigens and antibodies seperated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 92:337-391.

Verstreate D.R., Winter A.J. (1984) Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Erucella abortus* strains. *Infection and Immunity.* 46(1):182-187.

Vincent W., Anne T., Philippe A.D., Claude S., Jacques G., Pierre T., Jean-Jacques L.(1996) Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* 0:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *Vet Microbiol.* 48:101-112.

Vizcaino. N., Chordi. A. and Fernandez-Lagi. L.(1991) Characterization of smooth *Erucella* lipopolysaccharides and polysaccharides by monoclonal antibodies.

Weynants V., Tibor A., Denoel P.A., Seagerman C., Godfroid J., Thiange P., Letesson J.J.(1996) Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* C:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. Veterinary Microbiology. 48: 101-112

Wong J.P., Cherwonogrodzky J.W., DiMinno V.L., Stadnyk L.L., Nodel M.H.(1992) Liposome potentiation of humoral immune response to lipopolysaccharide and C-polysaccharide antigens of *Brucella abortus*. Immunology. 77: 123-128.

Yamamoto S., Tagata K., Ishikawa Y., Fujise H., Nagahata H., Yamada M.,

Sakano T., Morimmatsu M., Naiki M.(1992) Preparation of latex sensitized with rabbit IgG antibody for slide reversed passive agglutination. *Vet Res*. 16:265-272.

Yinnon, A. M., Morali, G. A., Coren, 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 Clin Microb*. 28(9):2139-2141.

제 6 장 신 문 보 도 자 료

주간 한국농어민신문

한국농어민신문 1997년 6월30일 월요일

소 부르셀라병 예방백신 접종 검토

농림부 내륙지방 발병 확산 따라

그동안 완전 박멸정책의 일환으로 일단 발생시 살처분을 위해 예방백신 접종을 금지시켜 왔던 소 부르셀라병도 따르면 내년부터 예방백신 접종이 가능해질 전망이다.

농림부 가축 — 위생과에 따르면 제주도에서는 그동안의 박멸추진 정책에 따라 부르셀라병이 감소추세를 보이고 있는데 반해 육지의 경우 계속 확산추세를 보이고 있음에 따라 내년부터 예방백신 사용을 긍정적으로 검토하고 있다고 설명했다.

농림부가 육지 소에 대해서 접종을 검토하고 있는 예방백신은 미국에서 개발돼 작년에 등록을 마친 것으로 야외감염(자연감염)과 인공감염(백신접종에 의한 항체형성)이 구분되는 일종의 유전자 재조합 백신 형태이다.

이를 위해 이미 예방백신을 구입, 전북대 수의과대학과 농촌진흥청 수의과학연구소에 의뢰해 현재 경기도 광덕지역과 충북 청주지역의 모 농가에서 각각 시험접종을 실시중에 있으며 중간시험 결과 효과가 매우 높은 것으로 확인됐다.

이에따라 농림부는 시험사업이 끝나는 올 연말 시험결과가 좋을 경우 내년부터 전국에 걸쳐 이를 확대 실시하겠다고 밝혔다.

1997年 12月22日(月曜日) (陰 11月23日) [週 2回刊]

農水畜産新聞

부루세라병 감염·동거축 정부서 도태장려금 지급

농림부, 예방접종도 실시

부루세라병의 확산방지 및 양축농가의 피해를 최소화하기 위해 예방접종이 실시되고, 감염축 및 동거축에 대한 도태장려금이 지급된다.

농림부는 17일 가축방역대책위원회를 열어 부루세라병 예방접종 및 도태장려금 지급방안 등을 심의, 이같이 의결하고 관련규정을 개정키로 했다.

또 구제역 유입에 대비한 긴급방역용으로 구제역 백신비축물량을 현재 10만두분에서 30만두분으로 확대하고, 외국백신제조사와 계약해 백신제조용 항원으로 비축하는 방안도 함께 검토·추진키로 했다.

이날 위원회는 이와 함께 칠레산 쇠고기, 스페인산 돼지고기, 브라질·멕시코산 가금육에 대한 수입제한 해제건을 심의하고 가축위생상황 파악 및 가축위생실태 조사등을 종합적으로 판단해 수입제한을 재심의키로 했다.

제15493호

한국일보

1998年 1月13日 火曜日

젖소 브루셀라병 백신 국내 첫 개발

전북대 수의과대학 白雲杰(시진)교수팀이 국내 최초로 젖소의 법정전염병인 브루셀라(Brucellosis)병 예방백신 개발에 성공했다.

白교수팀은 서울대 수의대 朴龍浩교수와 농촌진흥청 수의과학연구소 鄭錫貿박사, 파천연구소 尹仁重박사 등과 공동으로 지난 3년간 1억여원의 연구개발비를 들여 젖소의 브루셀라병 예방백신 진단시약을 개발, 생산하는데 성공했다고 12일 밝혔다.

브루셀라병은 소, 돼지, 개 등에 발병해 사람의 호흡기나 생식기, 피부 등을 통해 전염되는 인수(人獸)공통전염병으로 사람이 이 병에 감염된 젖소의 생고기와 우유를 먹을 경우 유산, 불임, 골수염, 관절염, 고환염, 피부염 등을 일으킨다. 국내에서는 매년 400~800두의 젖소가 감염되고 있지만 치료약은 물론 진단시약 등 특별한 방제 방법이 없어 젖소가 브루셀라병에 감염되면 즉여서 처분해왔다.

•전주=최수학기자

중앙일보

1998년
1월13일
화요일

브루셀라 예방약 개발

전북대 수의과대

젖소의 법정 전염병인 브루셀라병 예방백신이 국내 처음으로 전북대에서 개발됐다.

전북대 수의과대학 백병걸(白秉杰 공중보건학)교수팀은 12일 서울대 박용호(朴庸浩)교수·농촌진흥청 정석찬(鄭錫燦)박사·과천연구소 윤인중(尹仁重)박사 등과 함께 3년간 공동연구 끝에 브루셀라병의 예방약을 개발하는 데 성공했다고 발표했다.

白교수팀은 또 브루셀라병 검사용 진단키트도 개발했다고 밝혔다.

전주=장덕석 기자

주 의

1. **이 보고서는 농림부에서 시행한 농림수산특정 연구사업의 연구보고서 입니다.**

2. **이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.**

3. **국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.**