

乳牛브루셀라病 診斷을 爲한 Milk Ring Test 의 利用價値

農村振興廳 家畜衛生研究所
丁 炳 鐸

I. 緒 論

Brucella 病은 人獸共通傳染病으로서 酪農業의 發展과 牛乳의 攝取人口의 增加에 따라 公衆衛生上 重要한 位置에 있다.

1887年 Bruce가 Malta fever의 agent로서 Bacillus melitensis를 發見하였고 1896年 Bang는 소의 傳染性 流産에 關聯性이 있는 菌으로서 Bacillus abortus를 分離하였다. 本病은 家畜防疫뿐만 아니라 一般公衆 衛生上으로도 重要視 해야 할 疾病의 하나로서 世界各國에서 사람과 家畜에 發生例가 많으며 이로 因한 經濟的인 損失이 또한 莫大하다. 世界各國에 있어서의 사람의 Brucellosis의 最初患者 發生報告¹⁾를 보면 美國에서는 1924年 Keefer, 소련에서는 1921年 Beven, 伊太利에서는 1924年 Micheli, 獨逸에서는 1926年 Kreuter와 Steimert, 佛蘭西에서는 1926年 Giraud, 英國에서는 1927年 Philip, 瑞西에서는 1927年 Grand, Yugoslavia에서는 1927年 Giugni, 瑞典에서는 1929年 Kling, Czechoslovakia에서는 1929年 Zach, 日本에서는 1933年 西川等に 依해서 患者가 報告되었고 또 菌을 分離하였다.

우리나라에서는 1956年 봄까지는 畜牛의 Brucella 病의 存在가 確實히 認定되지 않았으나 朴, 李等(1956)²⁾이 京畿道 種畜場에서 飼育하는 乳牛로부터 Brucella abortus를 分離하였고 同年 慶尙南道를 除外한 各道에 分布되어 있는 乳牛 및 韓牛에 對하여 血清學的 檢査를 實施한 結果 乳牛에서는 33頭가 陽性이었고 韓牛에서는 2頭가 陽性이었다. 金等(1957)³⁾은 國內에서 飼養하고 있는 役牛 3,408頭(80倍에서 13%) 돼지 1,334頭(80倍에서 7%) 緬羊 181頭(80倍에서 3%) 美國에서 導入된 乳牛 124頭(80倍에서 44%)에 對한 血清學的 檢査에서 높은 陽性率을 나타냈다고 報告하였다.

또 金等(1959)⁴⁾은 1956年 導入乳牛 76頭中 陽性牛 5頭를 摘發하였고 國立濟州牧場에서 飼育되고 있는 肉牛群에서 1959年에 血清學的으로 陽性牛 111頭를 摘

發 其他 돼지(11頭) 山羊(11頭) 등에서 血清學的으로 陽性을 摘發하였으나 사람에서는 發生報告가 없다.

Brucella Milk Ring Test 用 診斷液은 1937年에 Fleischauer²⁾가 創始하여 그後 各國의 研究者 Roepke, Bryan, Bruhan, Christiansen, King, Morse, Winter, Bendtsen, Wood 등에 依하여 發展되었다.

川島等(1955)⁴⁾은 汚染牧場에 있어서 單 1回 檢査에서 脫脂乳 凝集反應과 Brucella Milk Ring Test 와의 一致率은 77.9% 2回 反復 檢査에서는 91.8%였고 非汚染地區에서는 82.5%가 一致하였다고 하였으며 Brucella Milk Ring Test 와 血清凝集反應과의 比較에서 汚染牧場에서는 1回때 一致率이 65.5% 2回때는 75.1%였다고 한다. Jenney等(1958)⁵⁾은 年 2回 Milk Ring Test 의 實施는 소 Brucellosis의 根絶을 爲해서 가장 效果있는 方法이라고 하였으며 美農林省¹⁾ Milk Ring Test 用 診斷液 製造 規準에서는 Brucella 病에 感染된 1頭가 있으면 陰性牛 5~12頭에서 採유한 牛乳를 混合하였을 때도 Milk Ring Test 에서 좋은 效果를 얻는다고 하였으며 Stiles等(1958)⁶⁾, Blake等(1952)⁶⁾은 Blood, Whey, Whole Milk Test 의 效率를 比較하였다. 그리고 川島等(1955)⁷⁾은 크림의 含量과 溫度, 感作 時間이 Milk Ring Test 에 영향이 있다고 하였다.

著者는 지금까지 우리나라에서 Brucella 病 檢査에 實施하고 있는 個體別 血清凝集反應에서 오는 複雜性과 經濟的 損失을 除去할 目的으로 Milk Ring Test 用 診斷液을 試驗 製造하여 52個 牧場을 對象으로 하여 Brucella 病을 檢査하였던바 그 成績을 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1) 使用菌株은 美農林省으로 부터 分讓받은 Brucella abortus 1119-3 株로서 감자 寒天培地에서 培養하여 Smooth colony 만 抗原製造에 使用하였다.

2) 供試抗原은 美農林省의 BRT(Brucella Ring Test) 用 抗原과 美農林省 製造方法에 準하여 Hematoxiline (National Aniline Co.) Aluminum ammonium sulfate

($AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), Sodium iodate($Na IO_3$), Lactic acid, Citric acid, Sodium phosphate dibasic 등을 사용하여 만든 染色液을 PH 3.0으로 調節하여 45~90日間 어두운 곳에 貯藏하였다. 위의 染色液을 使用前에 濾過하여 染色液 1,000ml當 Brucella 菌 45gm를 넣고 Magnetic stirrer에서 48時間 混合하여 染色된 Brucella 菌은 12,000 r.p.m에서 3回 洗滌하여 4.0%로 濃度を 調節하여 本 試驗에 使用하였다.

3) 牛乳은 서울 近郊에 있는 52個 牧場에서 採取하여 牧場別로 一次 Milk Ring Test를 實施하고 反應이 나타난 牧場만 個體別로 牛乳를 採取하여 二次 Milk Ring Test를 實施하였다.

4) 血清은 Brucella 菌으로 人工接種한 韓牛의 陽性血清과 Milk Ring Test에서 陽性反應을 나타낸 糞소로부터 採取한 血清을 凝集反應에 使用하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1) 診斷液의 力價를 比較하기 爲하여 美農林省 生物

學的 製造方法에 準하여 試驗製造한 Milk Ring Test用 診斷液과 美農林省의 BRT用 診斷液을 가지고 感度試驗을 하였던바 表 1과 같이 試製한 診斷液은 美農林省의 BRT用 診斷液에 比하여 Lot No. 3만 약간 強한 反應을 보였고 Lot No. 1, 2는 反應上 差異가 없었다(表 1).

2) Milk Ring Test의 反應感度를 測定하기 爲하여 Brucella 病 陽性牛에서 採取한 二頭分의 陽性 牛乳에 다 陰性乳牛에서 搾乳한 牛乳를 1頭分, 3頭分, 6頭分, 8頭分, 10頭分, 12頭分, 15頭分, 18頭分, 20頭分, 25頭分을 各各 混合하여 Milk Ring Test를 한 結果 1次 2次 檢査에서 強한 反應을 한 H 牧場과 G 牧場은 1:10으로 混合하여도 陽性反應을 나타냈고 弱한 反應을 한 A 牧場은 1:6에서 역시 陽性反應을 일으켰다(表 2).

3) 試驗製造한 診斷液 Lot No. 1, 2, 3의 保存溫度 및 期間을 測定하기 爲하여 各種 溫度에 保存하고 月 1回 Milk Rieng Test를 實施하였다. 5°C의 냉장고에 保存

Table 1. Comparison of Ring Test Titer Between Experimentally Prepared BRT and U.S.D.A. Antigen

Antigen	Serum Dilution						
	1:10*	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Lot No. 1	卅	卅	卅	卄	卄	+	-
Lot No. 2	卅	卅	卅	卄	卄	+	-
Lot No. 3	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
U.S.D.A.	卅	卅	卄	卄	卄	+	-

* 1 ml. of positive serum was added to 9 ml. of normal milk and the mixture was substituted milk.

Table 2. Results of Ring Test on Positive Milk Samples Diluted to Various Concentrations

Herd	Cattle No.	Undiluted	Dilution							
			1:1	1:3	1:6	1:8	1:10	1:12	1:15	1:18
H.	294*	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卄	+	-
G.	5*	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卄	卄	-
A.	1*	卅	卅	卅	卄	卄	+	-	-	-

* Infected cattle from which positive milk samples were obtained.

한 診斷液은 13個月까지 力價에 變動이 없었다. 그러나 22°C와 37°C에 保存한 診斷液은 3個月까지는 力價의 變化를 볼 수 없었으나 2個月부터는 診斷液 自體의 變色으로 困하여 判定하기가 困難하였다(表 3).

4) Milk Ring Test와 血清凝集反應을 比較하기 爲하여 서울 近郊에 있는 52個 牧場에서 牧場別로 搾乳後 混

合貯藏한 牛乳를 採取하여 一次 檢査後 三週日만에 陽性反應을 나타낸 5個 牧場을 個體別로 MRT를 實施하고 陽性反應을 나타낸 個體는 다시 血清凝集反應을 하여 그 結果를 比較하였다(表 4).

兩試驗法에 依한 力價는 完全 一致하지 못했지만 陽性反應 檢出率은 同一하였다.

Table 3. Preservation Test of Experimentally Prepared BRT Antigen

Temp.	Atigen Lot	Period of Preservation (Month)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	13	14
5°C	No.1	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄
	No.2	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄
	No.3	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄
22°C	No.1	卄	卄*	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄
	No.2	卄	卄*	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄
	No.3	卄	卄*	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄
37°C	No.1	卄	卄*	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄
	No.2	卄	卄*	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄
	No.3	卄	卄*	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄	卄

* Accurate reading was unable because of the decolorization of the antigen.

Table 4. Results of Field Test on Experimentally Prepared BRT Antigen

Herd	Herd MRT Titer	Individual Titer		
		Cattle No.	MRT	Serum Agg. Test
G.	卄	1	—	100*
		2	—	
		4	—	
		5	卄	
		6	—	
		7	—	
		8	—	
		9	—	
		H.	卄	
6	—			
142	—			
294	卄			
K.	卄	507	—	
		1	—	
		3	—	
		157	—	
S.	卄	589	—	
		2	—	
		3	—	
A.	卄	4	—	50**
		5	—	
		1	卄	
		2	—	

* Incomplete agglutination.

** Complete agglutination.

IV. 考 察

現在 우리나라에서 飼養하고 있는 젖소의 總數는 約 16,000 頭에 達하며 앞으로 酪農業의 發展에 따른 國內 生産과 外國으로 부터 導入되는 젖소로 因하여 急增되고 있는 實情이다. 젖소의 急增은 同時에 모든 疾病의 發生과 比例하리라고 본다. 特히 Brucella 病은 國內 發生狀態로 봐서 外國으로 부터의 乳牛 導入에 더 욱더 注意하여야 할 問題가 아닌가 生覺된다. 지금까지 우리나라에서는 Brucella 病을 診斷하기 爲하여 個體別로 血清凝集反應만 年 2 回以上 實施하였다. 이와같은 檢査方法은 畜主의 檢査 忌避, 患牛의 賣買로 因해서 本病索出에 混雜과 困難을 招來하였다. 또한 個體別 血清凝集反應은 實施하는데 復雜할뿐만 아니라 人力과 時間의 낭비가 많기 때문에 이를 조금이라도 除去하기 爲해서 本試驗을 試圖 하였다.

美農林省 製造方法에 準하여 試製한 Brucella Milk Ring Test 用 診斷液은 美農林省의 BRT 用 診斷液에 比하여 診斷液의 染色狀態에 약간 差異가 있었으나 이것은 使用된 試藥으로 因한 것으로 試驗成績自體에는 別影響이 없었다.

Brucella Milk Ring Test 를 實施하는데 乳汁中の Brucella 抗體, 脂肪率 及 그 性狀, 溫度, 時間等의 影響이 크다는 川島²⁾ 等の 成績과 같은 結果를 本試驗에서 經驗하였으며 Brucella Milk Ring Test 를 實施하는데 陽性牛와 陰性牛에서 搾乳한 牛乳의 比率는 1:5 내지 1:12 까지 混合되었을때 比較的 좋은 結果를 얻는다는 美農林省¹⁾의 보고가 있지만 著者의 實驗(表 2 참조)에서도 대체로 1:6 에서 1:10 까지 混合되었을 때에는 좋은 結果를 얻었다.

診斷液의 保存은 外國의 어느 나라에서나 3~5°C의 冷藏庫에 保存하는것이 常例로 되어 있지만 冷藏庫 施設이 未備된 우리의 實情에서는 적용할 수 없기 때문에 保存試驗을 하였던바 本試驗에서도 마찬가지로 5°C의 冷藏庫에 保存한 診斷液은 13個月까지는 力價에 變動이 없었으나 22°C, 37°C에 保存한 것은 力價가 빨리 떨어지고 診斷液 自體가 變色하여 檢査할때 判定上 困難한 것으로 미루어 보아서 亦是 診斷液의 保存은 철저히 하는 것이 좋을 것으로 思料되었다.

Jenney等(1958)³⁾은 年 2回 Milk Ring Test의 實施는 소 Brucella 病의 根絶을 爲해서 가장 效果가 있다고 하였다. 그러나 서울 近郊에 있는 52個 牧場을 對象으로 實施한 一次 檢査에서 反應을 보인것이 二次 檢査에서 全히 反應을 나타내지 않았다는 것은 一次 檢査때는 泌乳期였든 것이 二次 檢査때는 乾乳期에 들어갔기 때문이라고 본다. 이런 點에서 Milk Ring Test는 수시로 實施하여 陽性牛를 적발하는 것이 Brucella 病 根絶에 가장 效果의인 方法이라고 思料된다.

Brucella 病을 索出하기 위해서 여러가지 方法을 使用하고 있으나 이들 方法間에는 상당한 不一致率이 있다는 것은 川島⁴⁾, 등 Blake⁵⁾ 등에 依해서 이미 밝혀진 事實이다. 1961¹⁶⁾ 日本에서의 報告에 依하면 Milk Ring Test 陽性牛乳로부터의 菌分離는 55.7%라고 하였는데 本試驗에서 分離 못한 것을 애석하게 생각한다.

V. 結 論

젖소의 Brucella 病 診斷에 있어서 좀더 쉽고 簡便한 方法을 確立하기 爲하여 Brucella Milk Ring Test 用 診斷液을 美農林省 生物學的 製造方法에 準하여 試驗 製造한 診斷液으로 몇가지 試驗을 하였던바 다음과 같은 成績을 얻었다.

- 1) 서울 近郊에 있는 52個 牧場中 5個牧場이(9.6%) Milk Ring Test에서 陽性反應을 보였다.
- 2) 陽性乳牛 1頭에서 搾乳한 牛乳와 陰性乳牛 5~10頭에서 搾乳한 牛乳와 混合하여도 反應上 差異가 없었다.
- 3) Milk Ring Test 用 診斷液의 保存에 依한 力價의 變動은 5°C에서 13個月, 22°C 및 37°C에서 3個月까지는 力價의 變動이 없었다.
- 4) Milk Ring Test에서 陽性인 3頭는 血清凝集反應에서도 疑陽性反應을 나타냈다.

VI. 參考文獻

1. U.S.D.A. Agricultural Research Service Animal Disease Eradication Division Laboratory Services:

Brucella Abortus Antigen (Ring Test Method).

2. 川島秀雄, 中原達夫, 圓山八十一: ABR Antigen에 관한 研究. 家畜衛生試驗場 研究報告, 第29號: 183-190, 1956.
3. Jenney, G.C., Berman, D.T., Erdmann, A.A.: The Relative Efficiency of the Milk Ring Test and Blood. Tests for Bovine Brucellosis. J. Am. Vet. Med. Asso., 133: 586-589, 1958.
4. 川島秀雄, 中原達夫, 圓山八十一: 牛 Brucella 病 診斷에 對한 ABR Test의 應用價値에 관한 檢討, 家畜衛生試驗場 研究報告, 第29號: 195-206, 1956.
5. Blake, G.E., and Manthei, C.A.: The Efficiency of the Blood, Whey, and Whole Milk Test in Ascertaining the Brucellosis Status of Cattle. Am. Vet. Med. Asso., 23-26: 98-104, 1952.
6. Stiles, F.C., Roepke, M.H., Driver, F.C., Anderson, R.K.: Further Studies on the Whey Plate Test for Brucellosis. J. Am. Vet. Med. Asso., 132: 4-9, 1958.
7. Blake, G.E., Manthei, C.A., Goode, E.R.: A Milk Plate Test for the Detection of Brucellosis. J. Am. Vet. Med. Asso., 898: 1-6, 1952.
8. Roepke, M.H., Stiles, F.C., White, T.G., Driver, F.C.: A Study of the Whey Plate Agglutination Test for Brucellosis. J. Am. Vet. Med. Asso., 131: 170-173, 1957.
9. Morse, E.V., Edith Smith, R.N. and Eleanor Schidt, B.S.: A Comparison of the ABR, Capillary Tube, Milk Whey and Blood Serum Agglutination Tests. Vet. Med. XLVII: 48-51, 1952.
10. Cameron, H.S.: A Comparison of Blood and Whey Brucellosis Tests on 20,000 Cows. J. Am. Vet. Med. Asso., 131: 130-134, 1957.
11. Cameron, H.S.: Experiences in California with the Whey Test Brucellosis. J. Am. Vet. Med. Asso. 132: 10-12, 1958.
12. U.S.D.A. Agricultural Research Service Animal Health Division National Animal Disease Laboratory: The Production of Brucella Abortus Standard Agglutination Test Antigen (Tube, Plate and BRT Antigen).
13. 朴東權, 李昌熙: 우리나라에 發生한 畜牛 Brucella 病에 對하여. 獸醫界, 第三卷, 第二號: 1959.
14. 金丙九, 金東成, 李澤柱: Brucellosis의 免疫學的 調查報告. 中央家畜衛生研究所 研究報告, 第五卷:

79-89, 1957.

15. 金丙九, 宋炳均, 李澤柱: 家畜 Brucellosis 에 對한 免疫學的 調查報告. 家畜衛生研究所 研究報告, 第 6 卷: 9-21, 1959.
16. FAO/WHO Brucellosis Center National Institute of

Animal Health. Distribution of Organisms in the Animal Body and Their Vicissitude. Brucellosis in Japan. 10-16, 1961.

17. Spink, W.W.: The Nature of Brucellosis. The University of Minnesota Press, Minneapolis. 1956.

Usefulness of the Milk Ring Test for the Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle

Veterinary Research Laboratory, Office of Rural Development

Byung Tack Chung, D.V.M.

ABSTRACT

For the establishment of simpler and more reliable methods for the diagnosis of Brucellosis, diagnostic antigen for Milk Ring Test (M.R.T.) was prepared according to working document recommended by Ministry of Agriculture U.S.A., and applied in the field for the test of its applicability.

The results are summarized as follows.

1. Of fifty two dairy cattle ranches in the vicinity of Seoul, five ranges were shown positive reaction to M.R.T.
2. Even though one volume of positive milk was mixed with five to ten volumes of negative milk, the positive reactions were also observed.
3. Antigenicity of the antigen was maintained without deterioration for 13 months at 5°C and three months at both 22°C and 37°C.
4. Three positive cows to M.R.T. were also shown suspect reaction by Serum Agglutination Test.