

전남지방의 소형견 번식장으로부터 발생한 canine brucellosis

문진산 · 오기석* · 박인철* · 강병규* · 이채용* · 정석찬 · 박용호** · 신쌍재***

국립수의과학검역원 · 전남대학교 수의과대학*
서울대학교 수의과대학** · 코넬대학교 수의과대학***
(1999년 10월 1일 접수)

Occurance of canine brucellosis in a large kennel in Chonnam area

Jin-san Moon, Gi-suk Oh* , In-cheol Park* , Byong-kyu Kang* , Chai-yong Lee* ,
Suk-chan Jung, Yong-ho Park** , Ssang-jae Shin***

National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF Korea
*College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Korea**
*College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Korea***
*College of Veterinary Medicine, Cornell University U.S.A****

(Received Oct 1, 1999)

Abstract : Reproductive failures, such as abortions were occurred among dogs in a large kennel in Chonnam area April in 1994. After an initial positive result by the 2 mercaptoethyl rapid slide agglutination test(2ME-RSAT) to *Brucella canis* on five sera, additional specimens from all dogs in the population were tested. The blood cultures and 3 following serological tests (2ME-RSAT, TAT, AGID) performed on all samples on the basis of surveys, the following results were obtained.

1. Thirty three of 62 dogs were seropositive.
2. Twenty blood samples from 33 dogs were cultured, all of the isolates were identified as *B canis* .
3. Although there was not significant difference in sex, age and breed of the cause brucellosis detected, abortions was occurred late in gestation stage.

Key words : abortion, canine brucellosis, *Brucella canis* .

서 론

Brucella canis 는 암캐에서 유산, 숫캐에서 고환염, 전립선염 등 번식장애를 일으키는 원인체로서 1966년 미국과 영국의 Carmichael과 Brunner에 의해서 개의 유산태아에서 최초 보고한 이래¹ 유럽, 캐나다, 멕시코, 호주, 일본 등 세계적으로 발생 및 피해가 보고되고 있으며, 사람에게도 전염되어 파상열, 관절염, 오한 등을 일으키는 것으로 알려져 있지만 대체적으로 사람은 *B canis* 에 대해서 저항성을 나타낸다고 보고하고 있다²⁻⁶.

Brucella 속균은 배양성, 생화학적, 혈청학적 성상 차이에 따라 6균종이 알려져 있고 이들 균종에는 수개의 균형이 있어 야외에서 분리된 부루셀라균에 대한 균종과 균형의 결정은 역학적 연구수단에 크게 도움이 되고 있다. 개의 부루셀라병은 주로 *B canis* 에 의해서 야기되지만 이 균 외에 *B abortus*, *B suis*, *B melitensis* 에 의한 감염도 보고된 바 있다^{7,8}.

B canis 는 그람음성의 비운동성 작은 간균으로 세포내 기생함으로써 외형상 별다른 임상증상의 진전없이 일시적인 균혈증(Bacteremia)을 일으키며 늘 보건동물로 존재함으로써 진단상 매우 어려움이 많다. 또한 유산후 감염견의 질분비물을 흡입, 섭취 등을 통하여 집단적으로 발생될 수 있는 중요한 전염병이다⁹⁻¹³.

이 질병의 최종 진단법으로는 균분리이지만 균분리 자체가 쉽지 않고 특히 만성, 불현성인 경우에는 거의 불가능하기 때문에 보통 항체 수준을 측정하는 혈청학적 진단법이 널리 이용되고 있다^{10,14,15}. 혈청학적 진단법에는 신속평판응집반응(Rapid slide agglutination test; RSAT), 시험관응집반응(Tube agglutination Test; TAT), 면역확산반응(Agar gel Immunodiffusion Test; AGID), 효소면역학적반응(Enzyme-linked immuno sorbent assay; ELISA) 등이 이용되고 있다^{4,15,16}.

우리나라에서는 1972년 탁과 김¹⁷에 의해서 German shepherd의 유산한 55일 견태에서 *B suis* 를 분리하였으며, 박 등¹⁸에 의해서 시험관응집반응에 의한 항체보유율을 조사한 바 있다. 한편 최근 애완동물의 급증과 대규모 사육농가의 증가로 인하여 본 질병의 발생 및 확산 우려가 높아지고 있다.

본 연구에서는 1994년 4월에 보유견 60여두중 35두가 임신 45~55일경에 유사산을 보인 소형견 번식장으로부터

더 전남대학교 수의과대학 동물병원에 내원한 소형견에서 미생물학적, 혈청학적 검사를 실시하였던 결과 *B canis* 로 확인되어 이 질병의 발생을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

대상 환견 및 재료채취 : 1994년 4월 29일부터 17개월 전 Poodle, Yorkshireterrier, Maltese 등 소형 애완견 60여두중 35두가 임신 45~55일경에 유사산을 발생했던 소형견 번식장으로 부터 6마리의 소형견이 전남대학교 수의과대학 동물병원에 내원하여 가검혈청을 분리한 뒤 신속평판응집반응으로 검사한 결과 5마리가 양성반응을 보여 그 번식장 62두 전두수를 대상으로 부터 혈액을 채취하였다. 1차 검사후 40여일 뒤에 음성견에 대한 2차 검사를 실시하였다.

샘플채취는 경정맥 및 요추과정맥을 통하여 4ml의 혈액을 채취하였으며 균분리를 시도하기 위하여 5ml의 Tryptic soy broth(TSB, BBL)에 1 ml의 혈액을 접종하였으며 나머지는 혈청으로 사용하였다. 이와같이 채취한 가검물은 실험실로 즉시 운반하여 균분리 및 혈청학적 검사를 실시하였다.

균분리 및 생화학적 성상검사 : TSB에 접종한 혈액은 3~5일간 37℃ 항온실에서 증균시킨 다음, 백금으로 취하여 5% 면양혈액한천배지에 접종된 뒤 원인균 분리를 시도하였다. 분리된 균은 직립형태 및 그람염색한 뒤 *B canis* 를 동정하기 위한 생화학적 성상시험을 Forbes & Pantekoe의 방법⁵에 따라 수행하였다.

혈청학적 검사 :

1) 신속평판응집반응(2ME-RSAT) : 2ME-RSAT 진단액은 미국의 Cornell 대학으로 부터 분양받은 *B canis* 변이균주(M-)를 Carmichael & Joubert¹⁹의 방법에 따라 생산하였다. 진단방법은 평판에 검사하고자 하는 혈청과 진단액을 각각 40 μ l 떨어뜨린 다음 2-mercaptoethanol 동량을 혼합하고 손이나 Rotator로 혼합액을 조심스럽게 돌리면서 육안으로 응집유무를 확인하여 양성 및 음성을 판독하였다.

2) 시험관응집반응(TAT) : 시험관응집반응은 Serikawa et al¹⁴의 방법에 의해서 실시하였다. 즉, *B canis* RM6/66 표준균주를 Tryptic soy agar에 37℃ 48~72시간 배양한 균체 항원을 100℃에서 1시간 불활화한 다음, 0.15M PBS로 2회 정도 세척하였다. 그 부유액을 Spectrophotometer

450nm에서 흡광도가 0.8이 되도록 0.15M PBS로 조정하여 시험관응집반응 항원으로 사용하였다. 혈청 희석방법은 0.5ml 혈청을 생리식염수로 연속적으로 2배 희석한 후 진단액 동량을 첨가한 뒤 50℃에서 48시간동안 반응시킨 후 50% 응집시 응집항체가로 결정하였다.

3) 면역확산 반응(AGID) : 면역확산반응용 겔은 일반적인 방법에 준하여 만들었으며 AGID 항원으로는 Carmichael *et al*¹⁵의 방법에 의해 생산된 Cytoplasmic antigen을 사용하였다. 항원은 Center well에, 가검혈청은 Outer well에 가하여 moist chamber에 옮겨 실온에서 24,

48, 78시간 배양후 침강선을 확인하여 판독하였다.

결 과

*B canis*에 대한 혈청학적 검사와 균분리 : 소형견 번식장 총 62두에 대한 2ME-RSAT, TAT, AGID의 3가지 혈청학적 검사결과는 Table 1과 같다. 3가지 혈청학적 성적을 종합적으로 고려해 볼 때 총 62두중 33두(53.2%)가 혈청학적으로 개 부루셀라병에 대한 양성반응을 보였으며 그중 20두(32.2%)가 균분리되었다. 1차검사시 부루셀

Table 1. Serological and bacteriological examination of samples for brucellosis from dogs in chonnam area

Sex	No. of dogs	No. of positive(%)			
		TAT	2ME-RSAT	AGID	Blood culture
Male	6	3(50.0)	3(50.0)	3(50.0)	3(50.0)
Female	56	27(48.2)	30(53.5)	27(48.2)	17(30.3)
Total	62	30(48.3)	33(53.2)	30(48.3)	20(32.2)

Table 2. Characteristics *Brucella* spp isolated from aborted dogs in chonnam area

Characteristics	Species			
	<i>B abortus</i> biotype 1	<i>B suis</i> biotype 2	<i>B canis</i> RM6/66	<i>Brucella</i> spp isolated (n = 28)
CO ₂ requirement	+	-	-	-
Urea hydrolysis	+	+	+	+
H ₂ S Production	+	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
*Growth on dye				
Thionin 20	-	-	+	+
50	-	-	+	+
Fuchsin 10	+	-	+	-
20	+	-	-	-
**Agglutination by monospecific sera				
A	+	-	-	-
M	-	+	-	-
R	-	-	+	+

* Micrograms of dye per milliliter of medium.

** A = anti abortus serum, M = anti melitensis serum, R = anti rough serum.

Table 3. Clinical signs of seropositive cases to *B canis* among dogs in a large kennel in Chonnam area 1994

Sex	No. of dogs	No. of positive (%)			
		Abortion	Infertility	A+I*	Normal
Male	3		3(100)		
Female	30	13(44.9)	12(40.0)	3(9.0)	2(6.0)

* A+I: Abortion+Infertility.

라병에 대한 음성반응을 보인 전두수에 대해서 40일 뒤에 2차 검사를 실시한 결과 1두가 양성반응을 나타내었다. 또한 3가지 혈청학적 반응에 불일치한 경우는 6/62 (9.6%)이었다. 한편 혈청양성예에서 균분리가 음성인 경우는 13/33(39.0%)로 나타났다.

분리된 *Brucella* 균의 생화학적 특성 : 분리된 *Brucella* 20주의 형태학적, 생물학적 성상 등을 조사하였던 결과는 Table 2와 같다. 즉, TSB에 접종한 혈액은 접종 2~3일 후에 점조성을 띄며 회색의 부유액을 형성하는 것을 확인할 수 있었으며, 이것을 백금으로 취하여 혈액배지에 접종한 후 2~3일 뒤 집락형태 및 그람염색을 실시한 결과 그람음성의 짧은 간균을 확인하였다. 분리균의 생화학적 성상은 호기성 및 CO₂ 배양시 모두 발육하였으며, H₂S 산생시험에서는 음성, catalase, oxidase, urease 시험에서는 모두 양성반응을 나타내었다. 또한 thionin과 fuchsin 색소를 첨가한 감별배지에서의 성장유무 등으로 판독한 결과 *B canis*로 동정되었다.

역학적 관찰소견 :

1) 성별 발생분포와 임상증상 : 총 62두중 항체양성두수는 33두였으며, 이중 숫개는 6두중 3두(50.0%), 암개는 56두중 30두(53.5%)였다(Table 1). 부루셀라 양성반응을 나타낸 전두수에 대해서 과거 청취력을 통해 유산과 불임의 경력을 조사한 결과 Table 3과 같다. 즉, 부루셀라에 양성반응을 보인 3마리의 숫개의 경우 암개와 교배를 시켰을 때 그 암개는 모두 불임이나 유산을 나타냈다. 한편 부루셀라 양성반응을 보인 암개에 있어서 유산을 했던 경우는 13두(43.3%), 불임을 보인 경우는 12두(40.0%), 두 가지 증상을 모두 나타낸 경우도 3마리나 있었다. 유산 시기는 대부분 임신 45~55일에 관찰할 수 있었다(Fig 1). 한편 유산과 불임 등의 번식장애를 일으키지 않고 정상 분만하는 경우도 2마리(0.6%)가 있었다.

2) 연령별 분포율 : 소형견 번식장 총 62두중 연령별 발생분포율은 Table 4와 같다. 발병율은 1세 이상의 모든

Fig 1. Aborted fetus at 50 days gestation due to *B canis* infection in a large kennel in Chonnam area.

연령에서 나타났으며, 4세 이상에서 가장 높은 발병율을 나타내었으며, 3~4세의 번식력이 왕성한 시기에도 60%의 발병율을 보였다. 한편 1~2세의 경우 대부분이 초산 보다는 2산 이후에 높은 발병율을 보였다.

Table 4. Age distribution of seropositive cases to *B canis* among dogs in a large kennel in Chonnam area

Age	No. of dogs (%)	No. of positive (%)
1~2 year	9	5(62.5)
2~3 year	11	3(27.2)
3~4 year	30	18(60.0)
>4 year	5	4(80.0)
N.I*	8	3(37.5)
Total	62	33(53.2)

* N.I : Not Identified.

3) 품종별 발생율 : 소형견 번식장 총 62두중 품종별 발생분포율은 Table 5와 같다. 한마리의 미니취를 제외하고 푸들, 말티스, 퍼그, 슈나우저 등 모든 품종에서

Table 5. Breed distribution of seropositive cases to *B canis* among dogs in a large kennel in Chonnam area

Breed	No. of dogs	No. of positive (%)
Yokshir terrier	4	2(50.0)
Pomeranion	3	2(66.6)
Tshizu	2	1(50.0)
Maltese	17	8(47.0)
Pug	2	2(100.0)
Miniature pinscher	1	0(0.0)
Chin	2	1(50.0)
Schunauzer	2	1(50.0)
Chihnahua	5	3(60.0)
Brus grefon	1	1(100.0)
Poodle	23	12(52.0)
Total	62	33(53.2)

발병했음을 관찰할 수 있었다. 기타 환경적 요인이나 영양학적인 면은 큰 문제가 없었으며, 운동장식 사육관리를 하고 있었으며, 교배는 주로 자연교배를 실시하였으며, 유사산은 부루셀라병으로 확진하기전 17개월전부터 계속해서 산발적으로 발생하였다.

고 찰

개 부루셀라병의 주요 감염경로는 유산태아, 태액, 후산물질, 우유, 숯개 정액 등의 오염된 균을 섭취함으로써 발생하고, 한번 이 질병에 감염되면 일생 보균동물이 되어 근절되지 않고 지속적으로 다른 동물에 전염시킴으로써 반복적으로 발생한다^{11,20}.

본 조사에서도 정확한 원인은 모르지만 발병 확인 17개월에 이르는 동안 보유견 62두중 31두가 불임 또는 유·사산을 보였으며 최근 임신한 10두는 모두 조산하였다. 그리고 대부분 임신 45~55일경에 유·사산을 보였으며 이것은 Johnson & Walker¹³가 보고한 임신 45~59일경에 유·사산을 했다는 결과와 비슷하였다.

한편 총사육두수 62두중 33두(53.5%)가 혈청학적으로 개 부루셀라병에 양성반응을 나타내었는데 이것은 Nicoletti²¹가 4개 농장 총 446두중 105두(23%), Nicoletti &

Chase¹⁰가 보고한 foxhounds의 48두중 19두(40%)에 비해서 높은 발생율을 보였다. 이와같은 높은 발생율은 개체별로 격리시키지 않고 운동장에서 사육시킨 사육관리와 최초 감염된 이래 발병 확인까지의 시간 또한 새로 구입한 개의 입식시기 등 여러가지 요인에 의한 것으로 사료된다.

또한 본 조사에서 관찰된 역학적 소견중 연령별 발생 분포에 있어서 특별한 유의성을 확인하지는 못했지만 1세 이상의 모든 연령에서 발생할 수 있었음을 알 수 있었다. Carmichael & Joubert¹¹의 2~4세, Johnson & Walker¹³가 1.5~4.5세 연령의 개에서 높은 발병율을 보인 성적과 매우 비슷한 양상을 나타내었으며 성별, 품종별에 관계없이 모두 발병한 것을 알 수 있었다.

부루셀라병의 검색을 위한 진단법으로는 2ME-RSAT, TAT, AGID, ELISA 등 많은 방법들이 개발되어 있으나 아직 단일 진단법으로 완벽한 것이 없어 나라마다 2~4종의 방법을 병행하여 실시하고 있다. 최근 가장 널리 사용되는 진단법으로는 일차 스크린검사법으로 2ME-RSAT법을, 확진을 위한 보조진단법으로 정제항원을 이용한 AGID법을 이용하고 있다^{13,15}. 본 조사에서도 개 부루셀라병의 혈청학적 진단법들과의 진단효율을 비교 조사해본 결과, 33두의 부루셀라 양성견은 2ME-RSAT에 모두 양성을 보였으나 TAT에 있어서는 양성견이면서도 혈중항체가 80배의 음성으로 나온 것이 3마리가 있었다. 그중 1두는 균분리되었으며 나머지는 AGID에 양성을 나타내었다. 이와같은 결과는 Johnson & Walker¹³가 부루셀라 감염초기 및 만성형의 경우 혈중항체가 100배 이하의 결과가 나올 수 있다는 경우로 사료된다. AGID의 경우도 양성견중 3마리가 음성으로 나타났는데 그중 2마리는 균분리가 되었으며 나머지 한마리는 신속평판응집반응과 시험관응집반응에서 양성을 보였다. 이와같은 결과는 Zoha & Carmichael¹⁵의 AGID 진단법의 단점중 감염초기 즉, 감염후 6~12주 사이에 검출되지 않는다는 보고와 Johnson & Walker¹³의 감염 12주 이전에는 검출율이 낮다고 보고한 성적에 비추어 볼 때 감염초기인 것으로 사료된다. 또한 1차 검사후 40여일 뒤에 음성견 30마리에 대한 2차 검사를 실시한 결과 한마리가 3가지의 혈청학적 진단법에 모두 양성으로 나타났다. 이와같은 결과는 Johnson & Walker¹³의 부루셀라병에 감염되었을 경우 2~4주의 잠복기를 갖는다는 보고에 비추어 볼 때 1차 검사시 감염초기 즉, 잠복기였을 것으로 사료된다.

혈청학적으로 양성인 33두중 20두(61%)가 말초혈액으로 부터 *Brucella* 균이 분리되었는데 이것은 Johnson & Walker(1992)가 보고한 감염 5~30주에 100%, 6~12개월에 80%, 28~48개월에 50~80%, 48~58개월에 25~50%, 58개월 이후에는 25%의 검출율을 보인 결과에 비추어 볼 때 이와같은 결과는 감염시기에 따른 차이로 사료된다.

또한 혈청응집가와 균분리 사이에는 밀접한 관련성이 인정되어 대체로 높은 혈청응집가를 보인 개체의 혈액에서 균분리가 쉽게 되었으나 다른 한편으로 시험관 응집반응시 80배의 낮은 혈중항체가에서도 균분리가 될 수 있었음을 알 수 있었다.

혈액으로 부터 분리한 총 20두 *Brucella* 균에 대해서 Forbes & Pantekoek⁵의 방법에 따른 생화학적 성상 검사 결과 *B canis* 로 동정되었으며 각 균의 성상은 여러 연구자들의 성적과 일치하였다.

이상의 결과, 전남지역의 유사산을 보인 소형견 번식장의 원인은 *B canis* 에 의한 개 부루셀라병으로 확인되었으므로 앞으로 이 지역에 대한 세균학적, 혈청학적, 역학적 조사를 통하여 감염실태 파악 및 이에 관한 방역대책이 수립되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

1994년 4월 전남지역의 소형견 번식장에서 발생한 유사산 등 번식장애의 원인을 조사한 결과 다음과 같은 성적을 나타내었다.

1. 총 62두중 33두(53.2%)가 혈청학적으로 개 부루셀라병에 양성반응을 나타내었다.
2. 혈청학적으로 양성반응을 보인 33두중 20두(61%)가 균분리되었으며 분리균의 생물학적 성상검사 결과 *Brucella canis* 로 동정되었다.
3. 역학적 관찰소견중 연령별 발생분포율에 있어서는 특별한 유의성은 확인하지 못했지만 1세 이상의 연령에서 모두 발생하였으며 유사시기는 대부분 45~55일경으로 조사되었다.

참 고 문 헌

1. Carmichael LE. canine brucellosis. Isolation, diagnosis, transmission, Proc. U.S. Livestock sanit. Assoc, 71:517-528, 1968.

2. Zoha SI, Carmichael LE. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Vet Microbiol*, 35:50, 1982.
3. Medveczky NE, Crichton R. The application of a serological test to screen dogs entering Australia for antibody to *Brucella canis*. *Australian Vet J*, 63:375-377, 1986.
4. Carmichael LE, Joubert JC. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet*, 77:3-12, 1987.
5. Forbes LB, Pantekoek JF. *Brucella canis* isolates from Canadian dogs. *Canadian Vet J*, 29:149-152, 1988.
6. Vendrell JP, Conge AM, Segondy M, et al. In vitro antibody secretion by peripheral blood mononuclear cell as an expression of the immune response to *brucella* spp. in human. *J Clin Microbiol*, 30:2200-2203, 1992.
7. Harrington R, Brown GM. Laboratory summary of *Brucella* isolation and typing. *Am J Vet Res*, 37:1241-1242, 1976.
8. Thanappa PM, Nedunchelliyar S, Raghavan N, et al. Brucellosis in a dog caused by *Brucella suis* biovar I in Madras. *Cheiron*, 19:97-98, 1990.
9. Nicoletti P, Chase A. An evaluation of methods to diagnose *Brucella canis* infection in dogs. *The Compendium*, 9:1071-1073, 1987.
10. Nicoletti P, Chase A. The use of antibiotics to control canine brucellosis. *The Compendium*, 9:1063-1066, 1987.
11. Carmichael LE, Joubert JC. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet*, 78:63-73, 1988.
12. Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. *Vet Pathology*, 27:317-328, 1990.
13. Johnson CA, Walker RD. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *The Compendium*, 14:763-773, 1992.
14. Serikawa T, Muraguchi T, Nakao N. A survey of dogs from Gifu and Shiga areas for *Brucella canis*. *Jpn J Vet Sci*, 39:635-642, 1977.
15. Camichael LE, Joubert JC, Jones L. Characterization

- of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. *Vet Microbiology*, 19:373-387, 1989.
16. Serikawa T, Iwaki S, Mori M, *et al*. Purification of *Brucella canis* cell wall antigen by using ELISA for specific diagnosis of canine brucellosis. *J Clin Microbiol*, 27:837-842, 1989.
 17. 탁연빈, 김훈기. 유산견 태아로부터 *Brucella suis* 의 분리. *대한미생물학회지*, 7:17-20, 1972.
 18. 박용호, 강승원, 주이석 등. 개 부루셀라 진단액 생산 기초시험 및 항체조사. 가축위생연구소 시험보고연구소, 94-98, 1984.
 19. Camichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro. Biological properties and dog response to a variant(M-) strain of *Brucella canis*. *Develop Biol Standard*, 56:649-656, 1983.
 20. Freshman JL, Amann RP, Soderberg SF, *et al*. Clinical evaluation of infertility in dogs. *The Compendium*, 10:443-460, 1988.
 21. Nicoletti P. Further studies on the use of antibiotics in canine brucellosis. *The Compendium*, 13:944-947, 1991.
-