

부루세라백신(RB51)의 안전성에 관한 연구

I. *Brucella abortus* RB51 백신균주의 생화학적 및 유전학적 성상비교

김종만 · 우승룡 · 이지연 · 정석찬 · 강승원 · 김종엽 · 윤용덕 ·
조상래* · 유한상** · Steven C. Olsen***

국립수의과학검역원 · 연세대학교 의과대학*
서울대학교 수의과대학** · 미국 국립동물질병연구센터***
(2000년 8월 11일 게재승인)

Studies on the safety of *Brucella abortus* RB51 vaccine

I. Comparisons of the biochemical and genetic characteristics of *Brucella abortus* RB51 vaccine strains

Jong-man Kim, Sung-ryong Woo, Ji-youn Lee, Suk-chan Jung, Seung-won Kang, Jong-yeom
Kim, Yong-dhuk Yoon, Sang-nae Cho*, Han-sang Yoo**, Steven C. Olsen***

National Veterinary Research and Quarantine Service
College of Medicine, Yonsei University*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University**

National Animal Disease Center, United States Department Agriculture, United States of America***

(Accepted by Aug 11, 2000)

Abstract : Biochemical and genetic analysis were carried out to investigate the potential recovery of pathogenicity or related mutations of *Brucella abortus* RB51 vaccine strains. RB51 strains were recovered from commercial vaccines, including related seed stocks from private companies in Republic of Korea, strain from USA, a reference strain from C university and a field isolate (Daehungjin) from aborted dairy cow after RB51 vaccination were compared with two identified virulent wild strains (S2308 and a field strain isolated from dairy cow in Korea) at the same conditions.

All the strains examined, except identified pathogenic strains, revealed the identical characteristics to the original RB51 in biochemical properties, antigen and bacteriophage typing. Outer membrane protein (OMP) profiles from strains of RB51 showed the same patterns with standard RB51 in SDS-PAGE. In addition, Western blotting with the brucella specific monoclonal antibody also indicated that all the vaccine strains were completely deficient in their LPS compared to the pathogenic *Br abortus* strains. The differences in DNA structures among strains were also possible to detect after PCR. All vaccine strains, except S19, S1119-3, S1075, S544 and *Br suis*, were amplified a 178bp DNA fragment of eri-gene, and 364bp of IS711 elements. In contrast, 498bp

DNA product was only found with *Br abortus* .

Overall evidences in the present study confirmed that the RB51 strains for vaccine production in Korea did not originated from the phenomena of possible recovery of pathogenicity or related to any potential mutation event at all.

Key words : *Brucella abortus* , RB51 vaccine, biochemical/genetic properties.

서 론

1955년 미국에서 도입한 젖소에서 국내 처음으로 소 부루세라병이 제주도에서 발생한 이후 산발적인 소수의 발생을 보여왔으나 1984년 제주도에서 다시 집단적인 발생이 시작되면서 1997년에는 전국적으로 912두의 양성우가 발생하였다¹.

지금까지 우리나라에서는 소수 발생에 따른 test and slaughter 정책을 실시하여 왔으나 발생두수가 급증함에 따라 '97. 11월 가축방역대책위원회에서 vaccination과 test and slaughter 정책을 병행키로 결정하였고, 이를 효율적으로 수행하기 위하여 야외감염 부루세라균과 항체검사 에서 감염이 가능한 부루세라 약독화 생균백신인 RB 51백신을 채택하게 되었다². 이 백신은 미국에서 1991년에 개발하여 1996년에 공인된 백신으로 야외 병원성 부루세라균인 S2308주를 Rifampin이 첨가된 배지에서 연속계대하여 약독화한 균주로 균의 지당체(LPS)가 결손 되어 있어 일반적으로 사용하는 부루세라 진단액과는 반응을 하지 않는 특징이 있다³.

1998년 3월부터 제주도의 한우와 육지의 젖소에 백신을 접종하면서 임신소에서 유산이 다수 발생하여 축산업계에 커다란 물의를 야기한 바 있으며², 이의 원인이 국내 백신균주가 변이되어 병원성이 복귀한 때문일 것이라는 의문이 제기된 바도 있다. 본 연구에서는 국내 2개 동물약품제조사의 백신과 종균주, 미국백신, 백신접종한 후에 유산한 젖소에서 분리한 RB51 균주 및 RB51 표준균주 등을 공시하여 각종 생화학적 성상, 균체 구조 성분 및 유전자분석 비교시험을 실시하여 균주의 변이 여부를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주 : *Br abortus* RB51 균주로는 국내 A 및 B 제조회사의 종균주와 백신주, C대학교 보유균주, 백신접종한 후에 유산한 젖소에서 분리한 균주(대흥진), 미국의 표준균주 및 백신주(Professional Biological Company)를 공시하였고, 대조균주로 미국 국립동물질병연구소(National Animal Disease Center)에서 보유하고 있는 *Br abortus* S19, S1075, S544 및 *Br suis*를 이용하였다.

심상조사 : 생화학적성상으로 그람염색, oxidase, catalase, urease, nitrate reduction, citrate, indole, H₂S(lead strip), litmus milk, gelatinase, bile, acetyl-methylcarbinol, 집락형태 및 용혈성(5% 소혈액배지), 운동성(semisolid agar), 혈청 및 CO₂ 요구성, MacConkey agar에서 발육상, 색소 감수성(1 : 100,000 thionin blue, basic fuchsin), erythritol(0.5%) 첨가배지에서의 발육성, 항생제 첨가배지에서의 발육성(benzylpenicillin 3μg/ml, rifampin 50μg/ml), 당 분해능(lactose, glucose), acriflavin(0.1%) 용액에서의 자가응집성, crystal violet 염색성 등의 일반성상을 Schurig *et al*³과 OIE Manual⁴에 따라 A, M, R 항원형은 형별 인자혈청을 이용하여 응집반응으로, phage typing은 Tbilisi (Tb), R, R/O bacteriophage를 이용하여 용균성으로 시험하였다.

항균물질 감수성 시험 : 공시균주를 *Brucella* broth에서 37℃, 48시간 배양한 후 균 탁도를 MacFarland scale 0.5 되게 조절하고, Muller Hinton agar 평판의 두께를 4mm로 하여 Ampicillin(AM, 10μg), Cephalothin(CF, 30μg), Cefazolin (CZ, 30μg), Chloramphenicol(CM, 30μg), Clindamycin(CC, 2μg), Erythromycin(EM, 15μg), Gentamicin(GM, 10μg), Kanamycin (KM, 30μg), Nalidixic acid(NA, 30μg), Neomycin(NM, 30μg), Nitrofurantoin(F/M, 300μg), Streptomycin(SM, 10μg), Trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT, 1.25/23.75μg), Vancomycin(Va, 30μg) 등 14종의 항균제디스크(BBL)를 이용하여, WHO 표준법⁵에 따라 시험하였다.

균체의막단백(OMP) 분리정제 : 공시균체로부터 지

당체 및 외막단백 추출은 Schurig *et al*³의 방법에 따랐다. 즉, OMP를 추출하기 위하여 Trypticase soy agar(TSA)에서 균을 37℃, 48시간 배양하여 멸균증류수에 수집한 후 121℃, 15분간 autoclave 하였다. 여기에 초자구(0.11 mm)를 넣고 cell homogenizer(Braun Instrument)에서 4분간 균체를 파쇄하였다. 이것을 4℃에서 9.500×g로 20분간 원심하여 상층액을 버리고 침전물을 증류수에 부유시켜 3회 원심세척하였다. 마지막으로 4℃에서 300×g로 10분간 원심하고 상층액을 수집하여 동결건조하여 crude cell wall로 사용하였다. 이것의 일부를 투과율이 5%(525mm) 되게 식염수에 부유하고 sonic dismembrator(Fisher scientific)로 35% power에서 30초간 2회 sonication하여 동결건조하였다. 2.5mg의 crude cell wall과 1.5mg의 sonicates를 0.95ml Tris buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0)에 부유시켜 50μl의 lysozyme(1mg/ml, Sigma)을 넣어 37℃, 2시간 반응시키고 각 50μl의 DNase(1mg/ml)와 RNase(1mg/ml, Sigma)를 넣어 37℃, 1시간 추가반응시켜 SDS-PAGE용 항원으로 사용하였다.

지당체(LPS) 분리 및 정제 : LPS는 TSA에서 배양한 균을 25ml Tris buffer(10mM, pH 8.0)에 수집하고 동량의 acetone을 섞어 하루밤동안 교반하여 살균하였다. 균체는 4℃, 13,000×g로 5분간 원심한 후에 증류수로 1회 더 세척하고 다시 45ml 증류수에 부유시켰다. 여기에 55ml의 95% phenol을 가하고 68℃, 40분간 세포를 처리하고 4℃, 17,000×g로 10분간 원심하여 phenol 층을 수집하고 50ml의 phenol을 세포부유액에 가하여 반복추출하였다. 반복수집한 phenol층을 합하여 66℃ 증류수로 5회 세척한 후에 LPS는 phenol층 5배량의 찬 methanol 시약(99 : 1, methanol : sodium acetate로 포화시킨 methanol)을 가하여 4℃, 1시간동안 저으면서 phenol 층으로부터 추출하였다. 여기서 생긴 추출물을 원심수집하고 10ml 증류수에 녹여 하루밤 투석하여 동결건조하였다. 2mg의 동결건조한 LPS를 1ml의 Tris buffer에 부유시켜, 각 50μl의 DNase와 RNase(Sigma)를 넣고 37℃, 1시간반응시켰다. 이어서 50μl의 proteinase K(1mg/ml, Sigma)를 가하고 56℃, 3시간 처리하여 LPS 항원으로 사용하였다.

SDS-PAGE 및 Western blot 분석 : OMP 및 LPS 항원에 각각 동량의 2× Laemmli sample buffer를 넣어 혼합하고 100℃, 5분간 처리하였으며, 전기영동은 Hoefer Mighty Small II unit를 이용하여 12.5% acrylamide gel에서 실시하였다. 항원전개가 끝난 후 OMP는 silver stain

하였고, LPS는 nitrocellulose membrane에 전사시켜 *Br abortus* LPS O-chain 특이 단클론항체로 하루밤 처리하고, 세척후 horseradish peroxidase anti-IgG conjugate와 1시간 반응시켜 세척한 다음 4-chloro-1-naphthol로 발색시켰다.

유전자 분석 : RB51 특이유전자 분석은 Bricker와 Halling⁶, Bricker와 Halling⁷의 PCR 방법을 modify 하여 수행하였다. 즉, 부루세라균을 *Brucella* agar에서 37℃, 48시간 배양하고 methanol-saline에 수집, 부유시켜 살균하였다. Methanol을 제거하기 위하여 증류수로 1회 원심세척후 균탁도를 600nm에서 0.15~0.20(약 10⁹/ml)로 조절하였다. 여기에 10μl의 lysis buffer(10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0.1% Tween 20)를 가하고 100℃, 5분간 boiling한 후에 20,000×g, 2분간 원심하여 상층액을 분리하여 PCR에 사용하였다. 제조한 oligonucleotide primer의 sequences는 *Br abortus* specific primer; 5'-GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC-3', RB51/2308 primer; 5'-CCC CGG AAG ATA TGC TTC GAT CC-3', *eri-gene* primer 1; 5'-GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA-3', *eri-gene* primer 2; 5'-CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA-3', IS711 specific primer; 5'-TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT-3'이다. PCR 반응용액은 60mM Tris-HCl(pH 9.0), 15mM (NH₄)₂SO₄, 1.5mM MgCl₂, 250μM 4-deoxynucleoside triphosphates, 5 primer cocktail(각 0.2μM *Br abortus* specific, RB51/2308, 2 *eri-gene*, 1μM IS711-specific primer)로 조성하였다. PCR 반응용액 45μl당 1unit의 *Taq* polymerase를 첨가하고 PCR tube에 분주한 후 PCR 반응용액 25μl당 2.5μl의 균체추출 DNA를 가하고 thermocycler(Perkin Elmer)에서 95℃, 5분간 반응시킨 후 95℃에서 1.12분, 55.5℃에서 2분, 72℃에서 2분간 35회 반복하여 증폭시켰다. 72℃에서 5분간 final extension 후 증폭된 DNA 10μl를 2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 다음 DNA band를 자외선 조사하여 확인 및 사진촬영하였다.

결 과

균주별 생화학적 성상비교 : 국내 백신제조 A, B사의 종균주와 백신균주, 미국백신주, C대학 보유균주 그리고 백신접종후 유산한 젖소에서 분리한 균주(대홍진)에 대하여 그람염색상 등 28종의 형태학적, 생화학적 성상과 항원형, 파지형을 비교한 결과 모든 성상이 *Br abortus*

Table 1. Biochemical characteristics of *Brucella abortus* RB51 strains from various sources

Item	Characteristics and reactions of strain tested						
	A vaccine seed strain	strain from A vaccine	B vaccine seed strain	strain from B vaccine	strain from C university	vaccine strain from USA	strain from dairy cow aborted after vaccination
Gram strain	-ve, coccobacilli	-ve, coccobacilli	-ve, coccobacilli	-ve, coccobacilli	-ve, coccobacilli	-ve, coccobacilli	-ve, coccobacilli
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Colonial morphology	rough	rough	rough	rough	rough	rough	rough
Hemolysis	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-
CO ₂ requirement	-	-	-	-	-	-	-
Serum requirement	-	-	-	-	-	-	-
Acriflavin	+	+	+	+	+	+	+
Thionin	-	-	-	-	-	-	-
Basic fuchsin	+	+	+	+	+	+	+
Erythritol	+	+	+	+	+	+	+
Penicillin (3µg)	+	+	+	+	+	+	+
Thionin blue	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S(lead strip)	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduct	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-
Acetylmethyl-carbinol	-	-	-	-	-	-	-
Bile	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless	colorless
Rifampin (50µg)	+	+	+	+	+	+	+
Crystal violet staining	+	+	+	+	+	+	+

+ : positive, - : negative.

Table 2. Antigen and phage types of *Brucella abortus* RB51 strains tested

Item	Antigen and phage types of strains tested						
	A vaccine seed strain	strain from A vaccine	B vaccine seed strain	strain from B vaccine	strain from C university	vaccine strain from USA	strain from dairy cow aborted after vaccination
Antigen*							
R	+	+	+	+	+	+	+
A	-	-	-	-	-	-	-
M	-	-	-	-	-	-	-
Phage lysis							
Tb	-	-	-	-	-	-	-
R	+	+	+	+	+	+	+
R/O	-	-	-	-	-	-	-

* Monospecific agglutination.

Table 3. Antibiotic susceptibility of *Brucella abortus* RB51 strains

Antimicrobial drugs tested	Disk concentrations	Inhibition diameter(mm) of strains			
		strain from A vaccine	strain from B vaccine	vaccine strain from U.S.A.	strain from C university
Ampicillin	10µg	36(S)*	32(S)	30(S)	28(S)
Cephalothin	30µg	40(S)	36(S)	32(S)	36(S)
Cefazolin	30µg	36(S)	32(S)	30(S)	30(S)
Chloramphenicol	30µg	30(S)	23(S)	26(S)	26(S)
Clindamycin	2µg	24(S)	18(I)	18(I)	16(I)
Erythromycin	15µg	28(S)	25(S)	28(S)	30(S)
Gentamicin	10µg	30(S)	30(S)	30(S)	30(S)
Kanamycin	30µg	30(S)	26(S)	30(S)	30(S)
Nalidixic acid	30µg	16(I)	12(R)	13(R)	12(R)
Neomycin	30µg	26(S)	25(S)	25(S)	26(S)
Nitrofurantoin	300µg	28(S)	28(S)	25(S)	26(S)
Streptomycin	10µg	20(S)	20(S)	20(S)	23(S)
Trimethoprim/sulfamethoxazole	1.25/23.75µg	30(S)	30(S)	30(S)	30(S)
Vancomycin	30µg	24(S)	20(S)	20(S)	20(S)

* S; susceptible, I; intermediate, R; resistant.

RB51 표준균주의 성장과 일치하였고 시험한 균주간에도 차이가 없었다(Table 1, 2).

항균제에 대한 감수성 : AM 등 14종의 항균제에 대한 감수성을 시험한 결과는 Table 3과 같다. NA에는 A사 백신주가 중등도의 감수성을 나타내었고 이외의 나머지 균주는 내성을 나타내었으며, CC에는 A사의 백신주만이 감수성을 보였으며 B사 백신주, C대학 보유균주 그리고 미국백신주는 중등도의 감수성을 나타내었다. 이외의 CF 등 12종의 항균제에는 모두 감수성을 나타내었으나 AM, CF, CZ, NA, Va의 경우 A사 백신주의 억제환이 다른 균주에 비하여 크게 나타났다.

균체 구조성분 분석 : 균체구조의 변이를 조사하기 위하여 균으로부터 추출한 외막단백질(OMP)의 전기영동 양상을 silver stain하여 비교분석한 결과는 Fig 1 및 2와 같다. Fig 1의 A사 백신주, 미국백신주, 분리주 대홍진,

Fig 1. SDS-PAGE profiles of outer membrane protein extracted from *Brucella abortus* strains after silver staining.

Lane 1, standard RB51; lane 2, molecular weight marker (Sigma, USA); lane 3, A vaccine strain; lane 4 RB51 vaccine strain from USA; lane 5, virulent field isolates; lane 6, RB51 isolated from dairy cow aborted after vaccination; lane 7, B vaccine strain; lane 8, A vaccine seed; lane 9, RB51 from C university; lane 10, S2308, respectively.

B사 종균주, A사 종균주, C대학 보유균주의 세포외막 단백질 양상이 RB51 표준주와 유사하였고 국내분리 병원성 부루세라 균주와 S2308주와는 부분적인 차이를 나타내었다. Fig 2의 A사 종균주, B사 종균주, B사 백신주

Fig 2. SDS-PAGE patterns of *Brucella abortus* strains.

M, prestained molecular weight marker(Sigma, USA); lane 1, S1119-3; lane 2, RB51; lane 3, A vaccine seed; lane 4, B vaccine seed; lane 5-6, B vaccine strain; lane 7, A vaccine strain, respectively.

및 A사 백신주의 OMP 양상이 RB51 표준주와 동일하였으나 S1119-3과는 다소 다른 양상을 보였다.

지당체(lipopolysaccharide, LPS)가 결손된 백신균주의 변이에 따른 LPS 재생성 유무를 조사하기 위하여 균으로부터 지당체(LPS)를 추출하고 LPS O-side chain 특이 단크론항체를 이용하여 western blotting 법으로 시험한 결과는 Fig 3과 같다. RB51 표준균주와 A사 백신주, 미

Fig 3. Western blotting of LPS from *Brucella abortus* strains.

Lane 1, standard RB51; lane 2, molecular weight marker (Sigma, USA); lane 3, A vaccine strain; lane 4, vaccine strain from USA; lane 5, virulent field isolates; lane 6, RB51 isolated from dairy cow aborted after vaccination; lane 7, B vaccine seed; lane 8, A vaccine seed; lane 9, RB51 from C university, lane 10, S2308, respectively.

국 백신주, 분리주 대홍진, B사 종균주, A사 종균주, C대학 보유균주 등의 RB51 균주에서는 지당체를 확인할 수 없었으나 국내분리 야의 병원성균주와 S2308에서는 뚜렷하게 지당체를 확인할 수 있었다.

유전자 양성 : *Brucella* 균주의 동일성 여부를 확인하기 위하여 *Br abortus* 특이유전자 primer, RB51 특이유전자 primer 및 *eri-gene* 특이유전자 primer를 혼합한 multiplex PCR을 실시한 결과는 Fig 4 및 5와 같다. S19에서

Fig 4. PCR amplification of *Brucella abortus* strains and *Brucella suis*.

Primer for *Br abortus*, RB51, *eri-gene* and IS711(Bricker BJ and Halling SM, 1995) were used for PCR as described in materials and methods. Lane 7, 1Kb ladder(Gibco-BRL, USA); lane 2, molecular weight marker; lane 3, S19; lane 4, *Br suis*; lane 5, S1075; lane 6, S544; lane 7, standard RB51; lanes 8-10, A vaccine strains; lanes 11-13, B vaccine strains; lane 14, molecular weight marker.

는 *Br abortus* 특이유전자만이 검출되었고 RB51과 *eri* 유전자는 검출되지 않았으며, *Br abortus* 1075주와 544주에서는 *Br abortus* 특이유전자와 *eri* 특이유전자는 검출되었으나 RB51 유전자는 검출되지 않았다. 그리고 *Br suis*에서는 *Br abortus*와 RB51 유전자가 검출되지 않았으며 *eri* 유전자만을 검출할 수 있었다(Fig 4). 반면에 RB51 표준균주와 A사 백신주, B사 백신주에서는 *Br abortus*, RB51, *eri* 특이유전자 모두가 검출되었다. RB51 표준주, B사 백신주, A사 백신주, B사 종균주, C대학 보유주, A

Fig 5. PCR amplification from *Brucella abortus* strains.

Primer for *Br abortus*, RB51, *eri-gene* and IS711(Bricker BJ and Halling SM, 1995) were used for PCR as described in materials and methods. Lane 1-2, virulent field isolates; lane 3, S1119-3; lane 4, standard RB51; lane 5, B vaccine strain; lane 6, A vaccine strain; lane 7, B vaccine seed; lane 8, RB51 from C university; lane 9, A vaccine seed; lane 10, vaccine strain from USA; lane 11, RB51 isolated from dairy cow aborted after vaccination.

사 종균주, 미국 백신주, 대홍진에서는 498bp의 *Br abortus* 특이유전자, 364bp의 RB51 특이유전자 그리고 178bp의 *eri-gene* 특이유전자가 모두 검출되었으나 야외분리 병원성 균주에서는 364bp의 RB51 특이유전자가 검출되지 않았고, 1119-3주에서는 RB51 및 *eri* 특이유전자가 검출되지 않았다.

고 찰

부루세라균속에는 숙주특이성에 따라 *Br abortus*, *Br suis*, *Br melitensis*, *Br ovis*, *Br canis*, *Br neotomae*의 6종이 있으며 이들은 생리적, 생물학적 특성이 매우 유사하여 파지 용균성, 색소에 대한 감수성 등 약 25종의 특성을 시험하여야 균종과 함께 19종의 생물형으로 분류할 수 있다고 하였다⁸. 소 부루세라 RB51 백신균주는 병원성 균주인 S2308을 다양한 농도의 penicillin 또는 rifampin을 첨가한 TSA에서 연속계대하여 만들어진 약독화균주이다. 이 약독화균주가 origin S2308과 뚜렷하게 다른 것은 LPS의 O-chain이 결손되어 rough type으로 나타나며 이외의 특이성상으로 crystal violet에 염색, acriflavin과 생리식염수에서 자가응집, 발육하는데 CO₂와 혈액성분을 요구하지 않는 것 등이다³.

본 연구에서 A, B사의 RB51 백신주와 종균주, C대학 보유 RB51 균주, 미국 RB51 백신주 그리고 백신접종후 유산한 젖소에서 분리한 RB51 균주(대홍진) 등에 대한

urease의 27종의 각종 성상을 시험한 결과 RB51 특이성 상인 R type 집락, 발육조건으로 CO₂와 혈액성분 불요구, 0.1% acriflavin 용액에서 용집, R 항원형, Tb- 파지형 등 모든 성상이 일치하여 이들 모든 균주는 RB51 균주임을 확인할 수 있었다.

RB51 개발자인 Schurig *et al*³은 RB51은 AM, CM, GM, KM, NM, OTC, CB, CF, SM, F/M, TC, SXT, EM에 감수성이 있고 triple sulfa, penicillin, furazolidon에 내성을 나타내며 rifampin에 S2308, S19 및 45/20주는 직경 12~22mm의 억제환을 형성하지만 RB51은 완전한 내성을 나타내는 등 균주에 따라 감수성 양상에 차이가 있다고 하였다. AM 등 14종의 항균제에 대한 감수성 시험결과 대부분의 감수성 양상이 RB51 표준균주와 일치하였으나 A사 백신균주의 경우 NA와 CC에 대한 감수성에 다소 차이가 있었으며 AM 등 5종의 항균제에 대한 발육억제환 직경이 다른 균주보다 크게 나타나 약제에 대한 감수성에 차이를 보였으며 이에 대한 원인규명 차원에서 균주의 유래 등 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Sowa¹⁴는 부루세라 S19, S2308, RB51균은 비슷한 OMP 구조를 갖고 있으며 총 세포단백에서 86~91%의 유사성이 있다고 하였다. Adamus *et al*⁹, Caldwell과 Perry¹⁰ 그리고 Craven과 Frasch¹¹는 균체의막단백의 양상에 의하여 소 부루세라균종간의 차이를 구별할 수 있다고 하였으며, 부루세라균과 같은 그람음성균의 혈청형 및 아군 분류에도 유용하다고 하였다. Verstrete과 Winter¹², Verstrete¹³ 등은 모든 부루세라균에는 3종류 즉, 1군(M.W 88,000-94,000), 2군(M.W35,000-40,000), 3군(M.W25,000-30,000)의 주요 단백질이 있으며 지당체가 없는 R type 부루세라균은 2, 3군을 공통으로 보유하고 있고 OMP의 변이는 배양조건이 다른 상태에서 배양시 발생한다고 하였다. 본 연구에서 국내 A, B사의 백신주 및 종균주, C대학 보유균주, 대흥진주 그리고 미국백신주의 세포외막단백질을 추출하여 silver stain으로 염색하여 단백질 양상을 비교한 바, 단백질 양상이 S2308과는 다소 차이를 보인 반면, RB51 표준균주와는 모두 일치하였고 R type 공통단백인 2, 3군의 단백질성분을 보유하고 있음이 확인되어 균체의 주요 구성분에 변이가 없었음을 확인할 수 있었다.

Kreutzer *et al*¹⁵은 부루세라균의 LPS는 병원성 발현에 주요 인자라고 하였고, Moreno *et al*¹⁶은 smooth type *Br*

*abortus*의 O-chain 성분은 전기영동상에서 30~100kDa 이상 넓게 확산되어 나타난다고 하였다. Schurig *et al*³은 RB51은 LPS O-side chain이 없는 변이주로 SDS-PAGE 후 silver stain으로 염색하여도 LPS가 확인되지 않는다고 하였다. 백신을 접종한 임신소에서 유산이 발생하므로써 야기된 가장 큰 관심의 초점은 백신균주가 연속계대되어 변이가 일어나 LPS가 생성되므로써 병원성이 복귀되지 않았나 하는 것이었다. 공시균주에서 LPS를 추출하고 western blotting으로 LPS 유무를 조사한 결과 표준 RB51을 포함하여 국내 A, B사 백신주 및 종균주, C대학 보유균주 그리고 대흥진주에서는 LPS를 확인할 수 없었던 반면에 국내분리 부루세라 야외 병원성 균주와 S2308에서는 전기영동상에서 넓게 확산되어 전개된 LPS를 명확하게 확인할 수 있었다. 이에 따라 국내사용 백신 및 종균주는 변이에 의한 LPS 형성으로 병원성이 복귀한 것이 아니었음을 증명할 수 있었다.

Bricker와 Halling⁷은 AMOS(*Br abortus*, *Br melitensis*, *Br ovis*, *Br suis*)-PCR은 5종의 oligonucleotide primer로 구성된 유전자진단법으로 신속하면서도 100%의 특이성과 민감성으로 부루세라 균종을 동정할 수 있다고 하였으며, Bricker와 Halling⁶은 *Br abortus* 특이primer, RB51 특이유전자 및 *eri-gene* 특이 primer로서 부루세라 균종간은 물론 *eri-gene*이 없는 S19와도 감별이 가능하다고 하였다. *Br abortus*, RB51 및 *eri-gene* 특이primer를 이용한 PCR 시험결과 국내 A, B사의 백신주에서는 498bp의 *Br abortus* 특이유전자, 364bp의 RB51 특이유전자 및 178bp의 *eri-gene* 특이유전자를 RB51 표준균주에서와 동일하게 검출할 수 있었으며, 다른 부루세라균종과도 명확하게 구별할 수 있었다. 이에 따라 국내사용 RB51 백신균주는 유전자 구조면에서도 정상적임이 확인되었으며, 이 multiplex-PCR은 앞으로 각종 가검물에서 분리되는 부루세라균의 신속, 정확한 동정에 유용하게 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

부루세라 백신(RB51) 균주의 변이 및 병원성 복귀여부 규명에 의한 안전성평가 시험의 일환으로 RB51 균주별(국내 A, B사 백신 및 종균주, C대학 보유균주, 미국 백신주와 백신접종후에 유산한 젖소에서 분리한 균주) 생화학적 성상과 균체 구조성분 및 유전자분석 시험을

실시하였다.

그람염색상 등 28종의 생화학적성상, 항원형 및 파지형시험 결과 전반적인 성상이 표준균주의 성상과 일치하였고 균주간에도 동일하여 공식균주들은 RB51임을 확인할 수 있었다. 백신의 변이유무를 확인하기 위한 세포외막단백(OMP) 분석시험 결과 단백구조 양상이 유사하였고, 지당체(LPS)는 병원성 부루세라균주 외에는 백신 및 종균주에서는 확인되지 않았다. Multiplex-PCR에 의한 유전자 분석결과 국내생산 백신 및 종균주에서 소 부루세라균 특이유전자(498bp), *eri* 유전자(178bp) 및 RB 51 특이유전자(364bp)를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 국내의 소 부루세라백신 생산용 종균주와 백신주는 *Brucella abortus* RB51이며 유전적으로 정상이고 균체 구조성분(OMP, LPS)의 변이는 없는 것으로 확인되었다.

참고 문헌

1. 농림통계연보. 농림부, 124, 1998.
2. 부루세라백신(RB51)과동 보고서. 농림부, 1-21, 1999.
3. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, *et al.* Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*, 28:171-188, 1991.
4. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International Des Epizooties. 242-254, 1996.
5. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. 3rd ed. *Williams & Wilkins Co.* 17-48, 1991.
6. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the brucella AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains s19 and RB51. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1640-1642, 1995.
7. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:2660-2666, 1994.
8. Jones LM. Report to the international committee on

nomenclature of bacteria by the subcommittee on taxonomy of brucellae; minutes of meeting July 1966. *Int J Syst Bacteriol*, 17:371-375, 1967.

9. Adamus G, Mulczyk M, Witkowska D, *et al.* Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* spp. *Infect Immun*, 30:321-324, 1980.
10. Caldwell HD, Perry LJ. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infect Immun*, 38:745-754, 1982.
11. Craven DE, Frasch CE. Protection against group B meningococcal disease; evaluation of serotype 2 protein vaccines in a mouse bacteremia model. *Infect Immun*, 26:110-117, 1979.
12. Verstrete DR, Winter AJ. Comparison of sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. *Infect Immun*, 46: 182-187, 1984.
13. Verstrete DR, Creasy MT, Caveney NT, *et al.* Outer membrane proteins of *Brucella abortus*; isolation and characterization. *Infect Immun*, 35:979-989, 1982.
14. Sowa BA, Kelly KA, Ficht TA, *et al.* Virulence associated proteins of *Brucella abortus* identified by paired two-dimensional gel electrophoretic comparisons of virulent, vaccine, and LPS deficient strains. *Appl Theor Electrophor*, 3:33-40, 1992.
15. Kreutzer DL, Buller CS, Robertson DC. Chemical characterization and biological properties of lipopolysaccharides isolated from smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect Immun*, 23:811-818, 1979.
16. Moreno E, Pitt MW, Jones LM, *et al.* Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. *J Bacteriol*, 138:361-369, 1979.