

## 경북지역 애견 번식장에서 분리한 *Brucella canis*의 생화학적특성 및 PFGE 양상

김성국, 김영환\*, 홍현표, 엄현정, 장성준, 조민희, 이양수

경상북도 가축위생시험소  
(접수 2007. 6. 25, 게재승인 2007. 9. 13.)

## Biochemical characterization and PFGE pattern of *Brucella canis* isolated from kennels in Gyeongbuk province

Seong-Guk Kim, Young-Hoan Kim\*, Hyon-Pyo Hong, Hyun-Jung Eom,  
Seong-Jun Jang, Min-Hee Jo, Yang-Soo Lee

Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Daegu, 702-701, Korea  
(Received 25 June 2007, accepted in revised from 13 September, 2007)

### Abstract

A biochemical characterization and antimicrobial drugs susceptibility study was conducted in four breeding kennel which was canine abortion caused by *Brucella canis* in Gyeongbuk province in 2003-2006. Total of 267 dogs domesticated in the four kennel were examination. Among them, 143 (53.6%) dogs were sero-positive and 25 of blood samples were isolated to *Brucella canis*. At amplification of 35KDa-BCSP gene using PCR, 711 bp DNA fragment was same visible in 25 isolates and *B canis* RM6/66. Biochemical characterization of *B canis* isolated was non-hemolytic, no production of H<sub>2</sub>S, no fermentation of carbohydrates, catalase-positive, oxidase-positive, indol-negative, hydrolyzation of urea, reduction of nitrate and development of thionin dye medium. Using disk-diffusion method, all of 25 strains tested were found to be highly susceptible to tetracycline, aminoglycoside, quinolone, macrolide antibiotics, rifampin and ampicillin *in vitro*. Using PFGE with restriction enzyme *Smi I*, 25 isolates tested were typed to 2 pattern, S1 and S2.

Key words : *Brucella canis*, Biochemical, Antimicrobial drugs susceptibility, PFGE

---

\*Corresponding author

Phone : +82-53-326-0013, FAX : +82-54-326-0014

E-mail : younghoan@hanmail.net

## 서 론

*Brucella canis*는 1966년 Carmichael과 Kenny가 미국의 비글견 번식장에서 발생한 유산증의 원인을 조사하던 중 유산태아에서 그람 음성의 작은 구간균을 처음 분리하였고, 그 후 1968년 Brunner와 함께 균의 생화학적 특성을 조사 보고하여 *B. canis*라고 명명하였다<sup>1-4)</sup>.

*B. canis*는 그람 음성의 작은 구간균으로 세포내 기생하며  $0.5 \times 0.5 \sim 2 \mu\text{m}$  크기이며, 협막과 운동성이 없고 호기 상태에서 잘 자라며 다른 브루셀라균과는 달리 10% CO<sub>2</sub> 조건하에서는 성장이 억제된다. 37°C에서 3~4일간 호기 상태에서 배양하면 반투명성의 점조성을 띤 작은 집락을 형성하고 면양혈액 5%첨가배지에서 용혈성이 없고, catalase와 oxidase 검사에서 양성을 나타내고, urease 분해능이 빠르며, citrate 및 nitrate 환원성을 대부분 가지고, indole 및 MR-VP 검사에는 음성을 나타내고 H<sub>2</sub>S 산생능은 없으며, Thionin 색소를 첨가한 발육배지에서는 성장하여 집락을 형성하나 fuchsin 색소 첨가배지에서는 성장하지 않는다<sup>3-5)</sup>.

개 브루셀라병은 모견에서 임신 말기인 45~60일령 사이에 유산을 일으키고, 수캐에서는 전립선염, 고환의 위축을 일으키며, 특히 감염 3개월 후 정액에는 많은 수의 비정상적인 정충과 염증세포가 존재하며 만성형으로 진행되어 무정자증과 정자생성의 저하로 재발 및 불임을 일으킨다<sup>6-12)</sup>. 개 브루셀라병은 미국에서 Carmichael과 Kenny에 의해 처음 보고된 이래 캐나다, 유럽, 특히 중남미 국가에서 잇따라 발생보고가 있고 최근 일본과 중국에서도 발생이 보고된 바 있다<sup>13)</sup>. 우리나라에서는 Tak과 Chun<sup>14)</sup>이 1972년 독일 셰퍼드의 유산태아에서 *B. suis*의 분리를 보고한 바 있으나, *B. canis*에 대한 분리보고는 1984년 박 등<sup>15)</sup>이 야외견에서 *B. canis*의 분리를 보고한 이래, 문 등<sup>16)</sup>이 1994년 전남지역 집단유산이

발생한 애완견 번식장에서 62두를 검사한 결과 혈청검사에서 양성반응 30두, 혈액배양검사를 실시하여 20두에서 균분리를 보고한 바 있고, 박과 오<sup>17)</sup>는 대구지역 애완견 번식장과 가정 사육견을 대상으로 혈청학적 및 균분리 성적을 보고한 바 있으며, Chang 등<sup>18)</sup>은 전남 진도군 사육 진돗개를 대상으로 혈청검사를 실시한 결과 25%의 항체양성률과 양성견에서의 균분리 성적을 보고하였고, 김과 이<sup>19)</sup>는 집단 애견번식장을 대상으로 혈청학적 검사 및 균분리를 시도한 바 있다.

*B. canis*는 품종간의 차이는 인정되나 주로 개에서 숙주특이성을 나타내나 실험적인 감염에서 guinea pig, mice, rabbit 및 비영장류 실험동물에서도 감염이 인정되며, 고양이에서도 경구로 인공감염 실험한 후 9주 후에 균혈증을 나타내어 분리되었으나, 돼지, 양 등은 높은 내성을 나타내어 증상은 발현되지 않는 것으로 조사되었으나 인공 감염 후 4~6주경에 부검을 실시하여 실질장에서 균분리를 시도한 결과 분리가 인정되었다<sup>7)</sup>.

*B. canis*는 구강, 질, 결막 등 모든 점막조직을 통해 감염될 수 있고, 또한 수컷의 오줌을 통해 배출되는 양이 많은 것으로 알려져 있다. 다른 브루셀라균과는 달리 *B. canis*는 실험적으로 경구감염을 시킨 후 2~4주 후에 혈액에서 균이 검출되며 균혈증이 1년 이상 길게는 5년간 지속되는 것으로 보고되고 있으며<sup>20)</sup>, 평균적으로 감염 후 6~18개월간 균혈증 상태를 유지하고 감염견의 질루, 정액, 오줌으로 배출된다. *B. canis*에 의한 사람 감염은 극히 드물지만 실험실 또는 감염견과의 접촉에 의한 감염이 보고된 바 있으며<sup>21)</sup>, 증상은 다른 브루셀라감염증 보다는 다소 경미하나 만성 피로와 지속적인 발열, 림프절의 종대 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다<sup>6)</sup>.

최근 들어 애완견 산업이 급속히 발전하고 외국에서의 종견 수입이 증가하고 애완견 번식장의 규모가 커짐에 따라 브루셀라균의 오염에 따른 유사산 질병 발생시 농장에 막대한

경제적 피해를 초래하게 되는 것은 물론, 공중보건학적인 측면에서도 문제시 될 수 있다. 또한 반려동물로서의 역할이 증대됨에 따라 안락사 등의 도태를 실시하는 근절대책만으로는 사회적인 측면에서도 많은 부작용이 우려되는 바이다. 이에 경북지역에서 유산 및 불임 등의 번식장애가 발생한 애견농장에서 병성감정 의뢰된 개의 혈액에서 혈청을 분리하여 항체검사 및 분리한 *B. canis*의 생화학적 특성 및 항균제 감수성 시험을 실시하고 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)법을 이용하여 유전학적 상관관계를 분석하였기 그 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

국립수의과학검역원에서 분양받은 개 브루셀라 표준균주인 *B. canis* RM6/66주와 2003년에서 2006년 사이에 유산 및 불임 등의 번식장애가 발생한 애견번식장으로부터 병성감정 의뢰된 4개 애견 번식장의 사육견에서 혈액을 채취하여 *B. canis* 25주를 분리하여 생화학, 약제감수성 및 유전자 분석을 실시하였다.

### *Brucella canis*의 분리 및 동정

혈액은 요측피정맥을 통해 5ml를 채취한 다음

균분리를 위해 heparin 첨가 진공채혈튜브에 3ml의 혈액을 분주하여 냉장상태로 보관하였고, 나머지 혈액은 혈청분리를 위해 사용하였다. 항응고 처리한 혈액 3ml을 tryptic soy broth(Difco, TSB) 10ml과 혼합하여 37°C에서 진탕 배양하였다. 세계보건기구(WHO) 기준<sup>20)</sup>에 따라 30일간 broth에 배양하면서 3일 간격으로 배양액 0.1ml을 채취하여 5% 면양혈액첨가 한천배지와 tryptic soy agar(Difco, TSA)에 도말하여 37°C 호기상태에서 3~4일간 배양하면서 집락의 생성유무를 관찰하였다. 혈액배지에서 비용혈성이며 회백색의 직경 1~2 mm 내외의 집락을 선택하여 TSA에 계대한다음 발육한 집락에 대하여 그람염색을 실시하고 oxidase, catalase 시험 및 PCR을 실시하여 개 브루셀라균임을 확인하고 기타 생화학적 성상 검사를 실시하였다.

### 혈청학적 검사

분리한 혈청을 56°C, 30분간 비등화 처리한 다음 (주)에니젠(Suwon, Korea)의 Rapid C. *Brucella* Ab Test kit를 이용하여 다음과 같은 방법으로 항체형성 유무를 확인하였다. 혈청 30µl를 검사용 디바이스에 점적하고 20초 후 혈청희석액 120µl를 검사용 디바이스에 다시 점적한 후 25분간 실온에 정치시킨 후 대조선과 검사선의 발색유무를 확인하였다.

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this study

Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')	Size of products (bp)
BCSP(F)	GTA-TCG-TTC-TTG-AAG-CCT-AC	711
BCSP(R)	GTG-CAT-TTC-AAT-AGG-CTA-GAG	

### PCR에 의한 유전자 분석

표준균주 및 사육견의 혈액에서 분리한 야외 균주를 TSA에 계대하여 2~3일간 배양한 후 집락을 채취하여 RNA-free water (Qiagen®) 300µl가 첨가된 microcentrifuge tube에 부유시키고 10분간 끓는 물에 중탕한 후 12,000×g에서

10분간 원심한 다음 상층액을 새로운 microcentrifuge tube에 취하여 template DNA로 사용하였다. 정 등의 방법<sup>21)</sup>에 따라 브루셀라균의 특이적인 유전자부위인 31KDa-BCSP (*Brucella* 31-KDa cell surface protein)에 기초하여 primer를 설계한 다음 전문제조회사 (Bioneer®, Korea)에 의뢰하여 제조하였다 (Table 1). PCR

은 AccuPower<sup>®</sup> HL PCR premix [1U Taq DNA polymerase, 250  $\mu$ M each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, stabilizer and tracking dye, Bioneer<sup>®</sup>]에 template DNA 5 $\mu$ l와 설계 제작한 primer 1 $\mu$ l를 첨가하여 T-gradient thermoblock (Germany, Biometra Co.)내에서 실시하였다. PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C, 5분간 predenaturation시킨 다음, denaturation (94 $^{\circ}$ C, 1분), annealing (55 $^{\circ}$ C, 1분) 및 extension (72 $^{\circ}$ C, 1분)의 과정을 30회 반복 수행시키고 최종적으로 DNA extension을 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하였다. PCR이 끝난 후 증폭된 유전자 부위의 확인을 위해 ethium bromide가 함유된 1.5% agar gel (Sigma<sup>®</sup>)에 각 반응이 끝난 시료를 10 $\mu$ l씩 취하여 한천 사이에 점적한 후 110V, 30분간 전기영동을 실시하고 자외선 조사(ultraviolet luminater) 하에서 특정 위치의 DNA band를 확인하고 사진촬영을 실시하였다. Molecular size marker는 1 kb 100 bp DNA ladder (Bioneer<sup>®</sup>)를 사용하였다<sup>20)</sup>.

#### 항균제 감수성시험 검사

항균제 감수성 시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 기준에 따라 디스크 확산법 (disc diffusion method)을 이용하여 *B. ccanis*의 항균제 감수성 시험을 실시하였다<sup>22)</sup>. 먼저 공시균주를 TSB 5 ml에 1 loop 접종한 다음 37 $^{\circ}$ C, 16~24시간 배양하였다. 이 균액을 100배로 희석한 후 멸균면봉을 사용하여 미리 준비한 TSA 평판배지에 균등하게 획선 도말한 다음 sensi-disc 8-phase self-tamping dispenser (BD<sup>®</sup>, USA)를 사용하여 평판배지당 4종의 약제 disc를 적용한 후 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 disc 주위에 나타난 발육저지대를 caliper를 이용하여 측정하였고, 공시균주의 해당 항균제에 대한 감수성 또는 내성 판정은 disc 제조사에서 제시한 기준에 따랐다. 공시한 항균제

는 BBL sensi-disc (BD<sup>®</sup>)제품인 amikacin (AN, 30 $\mu$ g), ampicillin (AM, 10 $\mu$ g), cefazolin (CZ, 30 $\mu$ g), cefoperazone (CFP, 75 $\mu$ g), cephalothin (CF, 30 $\mu$ g), ciprofloxacin (CIP, 5 $\mu$ g), doxycycline (D, 30 $\mu$ g), erythromycin (E, 15 $\mu$ g), gentamicin (GM, 10 $\mu$ g), kanamycin (K, 30 $\mu$ g), mezlocillin (MZ, 75 $\mu$ g), nalidixic acid (NA, 30 $\mu$ g), norfloxacin (NOR, 10 $\mu$ g), oxacillin (OX, 1 $\mu$ g), penicillin (P, 10U), polymyxin B (PB, 300 U), rifampin (RA, 5 $\mu$ g), streptomycin (S, 10 $\mu$ g), tetracycline (Te, 30 $\mu$ g), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1.25 $\mu$ g), vancomycin (Va, 30 $\mu$ g)과 Oxoid<sup>®</sup> (UK)제품인 enrofloxacin (ENR, 5 $\mu$ g)과 Rosco<sup>®</sup> (Denmark) 제품인 lincospectin (LINS, 5 $\mu$ g), tylosin (TYLO, 5 $\mu$ g), ceftiofur (XNL, 10 $\mu$ g) 등 25종을 사용하였다.

#### Pulsed-Field gel electrophoresis (PFGE)

분리주의 molecular typing을 위해 다음과 같이 PFGE를 실시하였다. agarose plug의 준비, agarose plug의 처리, 전기영동의 세 단계로 나누어 수행하였으며, 미국 질병통제센터 (CDC)에서 운영중인 PFGE network인 'Pulse-Net'에서 사용되는 표준 실험법<sup>23)</sup>과 Ridler 등<sup>24)</sup>의 방법을 응용하여 실시하였다.

먼저 분리주와 DNA 크기를 측정하기 위해 marker는 국립보건연구원에서 분양받은 *Salmonella breanderup* ATCC BAA-664주를 TSA에 접종하여 분리주 25주는 37 $^{\circ}$ C, 48시간 배양하였고, *S. breanderup* ATCC BAA-664주는 37 $^{\circ}$ C, 18~24시간 배양한 다음 미리 준비한 2~3 ml의 cell suspension TE buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.5)에 OD<sub>610</sub> = 1.35의 탁도로 조정하여 균을 희석시켰다. 균현탁액 200  $\mu$ l를 취하여 1.5 ml microcentrifuge tubes에 옮긴 다음, proteinase K (20 mg/ml) 10  $\mu$ l를 넣고 잘 섞은 후 동량의 1.2% Seakem gold agarose (Cambrex, USA)를 첨가하여 disposable plug mold (BIO-RAD, USA)에 분주하여 plug를 제조하였다. 제조된

plug를 1.5 ml ES buffer (0.5M EDTA, pH 9.0; 1% sodium-lauroyl-sarcosine)과 40 µl proteinase K (20 mg/ml)가 첨가된 tube에 넣어 55 °C 진탕항온수조에서 2 시간 동안 반응시킨 후 plug wash TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5)를 이용하여 55 °C 진탕항온수조에서 20분간 4회 세척한 후 plug wash TE buffer가 담긴 microtube에 보관하였다. 보관 중인 plug를 1-2 mm 두께로 절단하여 *S. breanderup* ATCC BAA-664주는 30U의 *Xba I* 제한효소로 처리하였고 분리한 *B. canis* 25주는 균주당 30U의 *Xha I*, *Xho I* 및 *Smi I* (Takara, Japan) 제한효소를 제조사의 사용지침에 따라 각각 처리하였다. 제한효소 처리한 절편을 comb holder에 부착하여 gel casting stand에 올려놓은 후 준비한 1.0% 전기영동용 Seakem gold agarose (Cambrex, USA)를 분주하여 굳힌 다음 comb을 제거하였다. 전기영동용 용액은 0.5× TBE buffer (Tris base 5.4 g, boric acid 2.75 g, 0.05 M EDTA, pH 8.0)를 이용하였으며, CHEF Mapper XA PFGE system (Bio-Rad, USA)의 chamber에 채운 후 casting stand에서 30분간 실온에서 굳힌 gel을 고정시키고 6 V/cm, 120°, 14 °C, switch time 7.76~35.35초의 반응조건으로 20시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동 완료 후 gel은 ethidium bromide (1 µg/ml)로 30분간 염색하고 UV transilluminator상에서 분절을 확인한 후 멸균증류수로 2회 세척하고 사진촬영을 위해 화상장치 (Gel Doc XR, Bio-Rad, USA)를 이용하여 촬영한 후 분석에 이용하였다.

촬영한 gel 사진은 TIFF 그림화일로 전환하여 분석프로그램인 Fingerprinter II Informatix software (Bio-Rad, USA)를 이용하여 유전자수준에서의 상동성을 분석하는 절차를 따랐다. DNA 분절의 위치는 5% 허용범위 (tolerance)를 적용하였고 개별 DNA 분절의 분자량은 marker의 lane에 기초하여 normalization하였다. 균주간의 clustering은 unweighted pair group method of average linkage (UP-GMA)에 의해 dendrogram을 작성하였다.

## 결 과

### 혈청학적 검사와 균 분리 결과

2003년에서 2006년 사이에 유산 및 불임의 번식장애가 발생한 애견번식장 4곳의 사육견 중 267두를 대상으로 실시한 *B. canis*의 항체 유무 및 균분리 성적은 Table 2와 같다. 검사 두수 267두에 대하여 양성반응이 143두(53.6%)였으며, 혈액배양 결과 25두(9.6%)에서 균분리가 되었다. 한편 균분리가 이루어진 25두 중 1두는 항체 음성견이었으나 균이 분리되었으며, 나머지 24두는 항체 양성반응을 나타내었고 브루셀라균도 분리되었다.

### 분리주의 생화학적 특성

국립수의과학검역원에서 분양받은 표준균주 *B. canis* RM6/66과 분리주 25주에 대한 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

### Dendrogram에 의한 상관관계 분석

Table 2. Serological and bacteriological examinations of samples for diagnosis of canine brucellosis

Farms (region)	No of test	No of isolates	Serum Examination	
			Positive (%)	Negative
A (Pohang)	63	15	46 (73.0)	17
B (Gyeongju)	8	3	3 (37.5)	5
C (Gunwi)	135	2	65 (48.1)	70
D (Mungyung)	61	5	29 (47.5)	32
Total	267	25	143 (53.5)	124

Table 3. Biochemical characterization of *B. canis* isolates (n=25)

Test or substrates	<i>B. canis</i> RM6/66	No.(%) of positive
Oxidase	+	25(100)
Catalase	+	25(100)
Indole	-	- (0)
Citrate	-	- (0)
Growth on MacConkey's agar	-	- (0)
production of hydrogen sulfide (lead acetate paper)	-	- (0)
Urease(Christensen's medium)	+	25(100)
Lysine decarboxylase	+	25(100)
Arginine decarboxylase	+	25(100)
Ornithine decarboxylase	+	25(100)
CO <sub>2</sub> requirement	-	- (0)
Nitrate reduction	+	25(100)
Growth on Thionine(1:50,000)	+	25(100)
Fuchsin(1:50,000)	+	- (0)
Fermentation of lactose	-	- (0)
sucrose	-	- (0)
mannitol	-	- (0)
dulcitol	-	- (0)
adonitol	-	- (0)
inositol	-	- (0)
sorbitol	-	- (0)
raffinose	-	- (0)
rhamnose	-	- (0)
maltose	-	- (0)
cellobiose	-	- (0)
arabitol	-	- (0)

야외분리주 25주는 CO<sub>2</sub> 요구성이 없고, H<sub>2</sub>S를 산생하지 않으며, catalase, oxidase, urease에 양성반응을 보였고, 당 분해능이 관찰되지 않았으며, decarboxylase 양성, thionin 첨가배지에서 발육이 확인되었으나 fuchsin 첨가배지에서는 발육이 인정되지 않은 반면, 표준균주 *B. canis* RM6/66은 야외분리주와 동일한 생화학적 성상을 나타내었으나 fuchsin 첨가배지에서 일부 발육이 확인되었다.

### 31kDa-BCSP 유전자에 대한 PCR분석

분리주 25주와 표준균주 *B. canis* RM6/66을 대상으로 균체외막 단백질 합성에 관여하는 31kDa-BCSP 유전자에 대하여 PCR기법을 이용하여 조사한 성적은 Fig 1과 같다. 특히 유전자 부위를 증폭하여 평판한천상에서 전기영동을 실

시하여 자외선 조사하에서 관찰한 결과 야외 분리주와 표준균주는 동일한 크기의 증폭대 (711 bp)를 나타내었다.

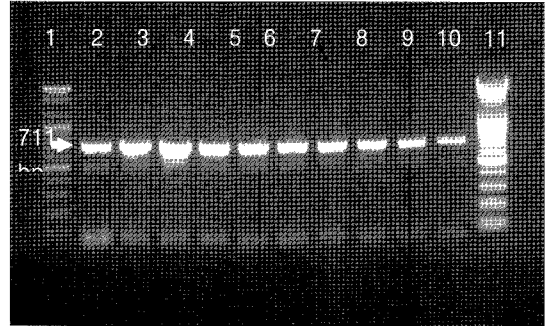


Fig 1. Amplification of the DNA from field isolates and *B. canis* RM6/66 by PCR assay using 31kDa-BCSP gene primer. lane 1, 12 ; 100bp DNA ladder(Bioneer), lane 2 ; *B. abortus*, lane 3 : *B. canis* RM6/66 lane 3-11 : *B. canis* isolates from canine blood

### 항균제 감수성 시험 결과

분리주 25주를 대상으로 항균제 감수성 시험 성적은 Table 4와 같다. 공시약제 25종 중 AN, AM, CIP, D, E, GM, K, N, NOR, RA, S, Te, ENR, LINS, TYLO 등 15종에 대하여 야외분리주 25주 및 표준균주 모두 감수성이 있는 것으로 조사되었고, CZ, CFP, CF, NA, OX, P, PB, SXT, Va, XNL 등 10종에 대해서는 중등도 또는 저항성을 가지는 것으로 조사되었다.

### Pulsed-Field gel electrophoresis(PFGE) pattern

야외분리 25주를 대상으로 제한효소 *Xba I*, *Xho I* 및 *Smi I*를 각각 처리하여 PFGE를 실시하여 유전자 양상을 분석한 결과 *Xba I* 과 *Xho I* 을 처리한 경우에는 유전적인 차이점을 발견할 수 없었으나, *Smi I* 을 처리하여 전기영동을 실시한 바 2개 유형의 유전양상을 확인할 수 있었다 (Fig 2, 3, 4). 분석프로그램을 이용하여 유전자수준에서의 상동성을 분석한

결과 균주간의 clustering은 unweighted pair group method of average linkage (UPGMA)에 의해 Fig 5와 같은 dendrogram이 작성되었다. 2003년도에 포항 소재농장에서 분리한 13주를 대상으로 PFGE 양상을 분석한 바 2개 유전자 유형(S1과 S2로 분류)으로 분석되었으며, S1의 경우 2004년에 군위 소재 애견 번식장의 분리주와 동일한 유전자 양상을 나타내었으며, 포항 일부 분리주와 경주 및 문경 애견번식장에서의 분리주는 S2형으로 동일한 유전양상을 나타내었다.

Table 4. Antimicrobial drugs susceptibility of *B. canis* isolates (n=25)

Antimicrobial drugs	Susceptibility		
	Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin	-	-	25
Ampicillin	-	-	25
Cefazolin	24	1	-
Cefoperazone	-	25	-
Cephalothin	24	1	-
Ciprofloxacin	-	-	25
Doxycycline	-	-	25
Erythromycin	-	1	24
Gentamicin	-	-	25
Kanamycin	-	-	25
Mezlocillin	-	-	25
Nalidixic acid	25	-	-
Neomycin	-	-	25
Norfloxacin	-	-	25
Oxacillin	25	-	-
Penicillin	25	-	-
Polymyxin B	25	-	-
Streptomycin	-	-	25
Tetracycline	-	-	25
Trimethoprim/sulfamethoxazole	25	-	-
Vancomycin	25	-	-
Enrofloxacin	-	-	25
Linco-spectin	-	-	25
Tylosin	-	1	24
Ceftiofur	-	25	-

고찰



Fig 2. PFGE of *Xba I* restriction fragments of *B. canis* isolates  
lane 1, 12, 23 : PFGE marker(*S. breanderup*),  
lane 2-11 : isolates, lane 13-22 : isolates

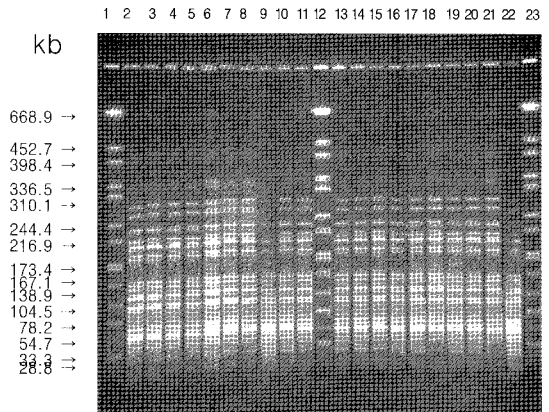


Fig 3. PFGE of *Xho I* restriction fragments of *B. canis* isolates  
lane 1, 12, 23 : PFGE marker(*S. breanderup*),  
lane 2-11 : isolates, lane 13-22 : isolates

*B. canis*는 1966년 미국 남부와 중서부 지역의 비글견 번식장에서 발생한 집단 유산증의 원인을 조사하던 중 유산태아에서 분리하여 처음 보고된 후 전 세계적으로 발생보고가 되고 있다<sup>5,6,12</sup>.

우리나라에서는 탁과 진<sup>14</sup>)이 셰퍼드의 유산태아에서 *B. suis*의 분리를 보고한 바 있으며, 박 등<sup>15</sup>)이 야외견 612두를 대상으로 혈청항체 역가 및 균분리를 시도하여 7두(1.1%)에서 항체 양성 반응을 나타내었고 1두에서 균을 분리하여 보고한 바 있고, 문 등<sup>16</sup>)과 김 등<sup>19</sup>)은 집단 유산증이 발생한 애견 번식장을 대상으

로 유산견 및 동거견의 혈액을 채취하여 항체 및 균분리를 실시하였으며, 장 등<sup>18)</sup>은 진도군내 사육하는 진돗개를 대상으로 혈청검사 및 균분리 성적을 보고하였고, 박과 오<sup>17)</sup>는 대구 지역 사육견의 *B. canis* 감염에 대한 세균학적 및 혈청학적 조사를 보고한 바 있다.

본 연구자는 경북지역에 위치한 애견 번식장에서 유산 및 불임증이 발생하여 원인규명을 위해 병성감정 의뢰된 개에서 혈액을 채취하여 혈청학적 검사 및 원인균 분리를 시도한 바 *B. canis* 감염에 의한 개 브루셀라병으로 진단되어 이들 농장에서의 감염상황을 파악코

자 전 사육두수에 대한 혈청학적 및 세균학적 검사를 실시한 결과, 검사두수 267두 중 143두(53.5%)에서 항체 양성반응을 보였으며, 사육견의 혈액을 채취하여 배양을 실시한 결과 26두(9.6%)에서 브루셀라균이 분리되었다. 이러한 성적은 문 등<sup>16)</sup>이 전남지역 유산발생 애견 번식장에서 사육견 62두를 대상으로 조사한 결과인 33두(53.2%) 항체 양성반응 및 20두(32.2%)에서의 균분리 성적과 김 등<sup>19)</sup>이 전국의 유산발생 애견사육장 6개소의 126두를 대상으로 실시한 결과인 63두(50.0%)의 항체 양성율과 47두(37.3%)의 균분리율 및 박과 오<sup>17)</sup>가 보고한 유산 발생농장 사육견 195두 중 81두(41.5%)의 항체양성률 및 50두(25.6%)에서의 균분리율과 비교해 볼 때 항체양성율은 유사하게 조사되었으나 균분리율이 낮은 것으로 나타났다. 이러한 차이점은 *B. canis*에 의한 유산이 발생한 후 감염지속기간 및 농장내 사육환경, 감염경로의 접촉 빈도에 따라 동거견들의 발생빈도가 차이가 있는 것으로 생각되며, 혈액을 채취하여 배양하는 방식에 따라 균분리율이 다소 차이가 있는 것으로 사료된다.

본 실험에서는 혈액을 채취하여 TSB에서 증균을 하면서 일정 간격을 두고 지속적으로 균분리를 시도하였으나 채혈과정 또는 실험 중의 오염에 의해 진균 및 오염균의 증식으로 개 브루셀라균이 억제되어 원인균 분리가 곤란하였다.

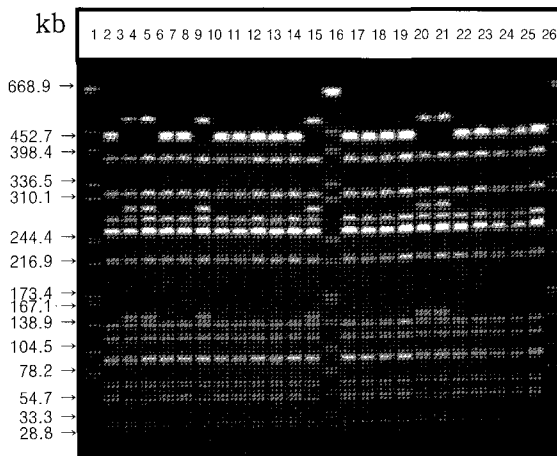


Fig 4. PFGE of *Smi I* restriction fragments of *B. canis* isolates.  
lane 1, 14, 26 : PFGE marker(*S. breanderup*),  
lane 1-13 : isolates, lane 15-26 : isolates

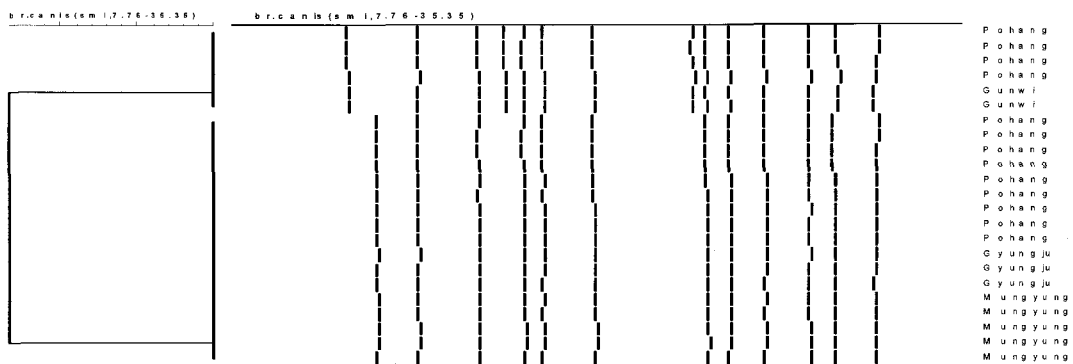


Fig 5. Dendrogram of *B. canis* isolates by PFGE pattern (*Smi I*)



본 조사에서 항체검사에서는 음성인 개체가 균분리된 경우가 1두가 있었으며, 이는 혈청학적 검사와 세균학적 검사를 병행하여 실시하는 것이 바람직하다는 것을 시사하는 바이다. 따라서 신속하게 원인균을 검출할 수 있는 PCR 등의 기법을 이용하여 양성견의 조기색출만이 본 병의 근절에 도움이 되리라 사료된다.

개 브루셀라병은 오염된 유산태아, 태액, 후산물, 우유, 정액, 뇨 등을 통해 주로 경구감염을 통해 발생하고, 접촉에 의한 결막 및 교미를 통해 감염되기도 한다. 체내에 침입한 균은 백혈구에 탐식되어 파괴되지 않고, 림프조직으로 이동한 후 혈관으로 유입되어 평균 24개월간(최장 60개월간) 균혈증 상태를 일으키며, 비장, 간 등의 세망내피조직과 생식기관으로 이동하여 정착하고, 면역반응에 의한 항체를 형성하게 된다<sup>7)</sup>.

야외분리주 25주의 생화학적 성상은 표준균주와 일치하는 것으로 조사되었고, 색소 첨가 배지의 발육양상에서 다소 차이가 인정되었으며, 이러한 성적은 문 등<sup>16)</sup>, 김 등<sup>19)</sup>과 Carmichael 등<sup>5)</sup>이 조사한 성적과 일치하는 것으로 나타났다.

PCR기법을 이용한 표준균주와 야외분리주의 유전적 일치성을 조사한 결과 동일한 711bp에서 특이 유전자 분획을 확인할 수 있었으며, 김 등<sup>19)</sup>과 Vizcaino 등<sup>25)</sup>은 *omp*-31 유전자의 PCR-RFLP를 실시하여 *B. canis*가 다른 브루셀라균과 구별됨을 보고한 바 있으며, 생화학적 성상을 검사하여 6종의 브루셀라균을 동정하는데 많은 시간이 소요되는 반면 PCR 기법을 이용하여 간편하고 신속하게 동정할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 균의 동정 이외에 혈액 시료를 이용하여 개 브루셀라 감염견의 조기 검출을 위한 보다 간편하고 신속한 PCR기법의 도입이 필요하다고 사료된다. 최근 애완견의 사육이 증가하고 반려자로서의 기능이 커짐에 따라 감염견은 방역상 안락사에 의한 도태가 바람직하나 불임시술 및 항균제 치료를 실시하는 생명존중의 사회적 분위기가 증가되고 있는 실정이다. 본 실험에

서는 브루셀라 감염견에 대한 효과적인 치료 선택을 위해 25종의 항균제를 선택하여 약제 감수성 실험을 실시한 결과 공시균주 25주 모두 aminoglycoside계열, tetracycline계열, fluoroquinolone계열, macrolide계열 및 rifampin에 대하여는 감수성이 높았으며, cephalosporin계열, peptide계열, ampicillin을 제외한 penicillin계열 항균제에 대해서는 중등도 및 저항성을 가지는 것으로 조사되어 김 등<sup>26)</sup>과 Terakato 등<sup>27)</sup>이 보고한 성적과 일치하는 것으로 나타났다. 그러나 브루셀라균은 림프조직, 간, 비장, 전립선 등의 약제의 침습이 어려운 장기에 정착하고 세포내 기생세균이므로 *in vitro*에서 항균제 감수성 시험 성적을 *in vivo*에 직접 적용하기는 어려울 것으로 사료되나 임상적으로 침투력이 뛰어난 fluoroquinolone계열 항균제와 조직내 지속력이 우수한 rifampin 및 tetracycline계열 항균제를 병용함으로써 치료효과를 높일 수 있을 것으로 사료되며<sup>27)</sup> 감염견에 대한 감수성 약제의 투여시험을 실시하여 치료 경과를 지속적으로 관찰하는 시험이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

근래 분자유전학의 발전과 함께 DNA-DNA hybridization 분석기법에 의한 세균의 유전학적 분석기법이 개발되어 여러 가지 방법으로 molecular typing이 실시되어 역학적인 상관관계를 밝히는데 많은 도움이 되고 있다<sup>28)</sup>. 브루셀라균속은 종래의 생화학적 특성에 따른 분류가 이루어지고 있으나, DNA-DNA hybridization에 의한 분석결과 유전적 동일성이 매우 유사한 것으로 나타나고 있다<sup>29)</sup>. Jensen 등<sup>30)</sup>은 소와 야생들소에서 분리한 *B. abortus* 야외주와 백신주인 RB51의 유전적인 차이를 조사하여 발표한 바 있으며, Ridler 등<sup>24)</sup>은 야외에서 분리한 *B. ovis*를 대상으로 PFGE를 이용하여 유전적 상관관계를 분석하여 보고한 바 있다. 본 조사에서는 경북지역 애견 번식장에서 분리한 *B. canis*를 대상으로 유전학적 상관관계를 조사하기 위해 *Xba I*, *Xho I* 및 *Smi I* 등의 제한효소를 처리하여 유전학적인 차이점을 조사한 결과 *Smi I*을 처리한 분리

주에서 크게 2종류의 유전적인 양상을 밝혀낼 수 있었고, 앞으로 보다 많은 지역별 균주를 확보하여 분석함으로써 역학적인 상관관계를 분석하는데 도움이 되리라 사료된다.

### 결 론

2003년에서 2006년 사이 경북지역 유산 및 불임 등의 번식장애가 발생한 애완견 번식농장에서 혈액을 채취하여 혈청검사, 균분리 동정 및 유전학적 상관관계를 조사하였다.

1. 공시두수 267두 중 항체양성은 143두(53.5%)이었고 26두(9.4%)에서 균이 분리되었다.
2. 분리주 25주의 생화학적 성상은 면양혈액 첨가배지에서 비용혈성, CO<sub>2</sub> 비요구성, 당분해능이 없으며, decarboxylase 양성, catalase, oxidase, urease 양성, citrate, nitrate, indol, H<sub>2</sub>S 산생 음성, thionin색소 첨가배지에서 발육이 인정되었다.
3. PCR 기법을 이용한 31kDa-BCSP 유전자 부위의 증폭을 통한 표준균주와의 비교 실험에서 야외분리주는 전기영동상에서 711bp에서 동일한 증폭대를 나타내었다.
4. 항균제 감수성 시험 결과 aminoglycoside 계열 (amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, lincospectin), quinolone 계열 (ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin), macrolide 계열 (erythromycin, tylosin), tetracycline 계열 (tetracycline, doxycycline) 및 rifampin, ampicillin, mezlocillin에 감수성이 높았고, cephalosporin 계열 (cefazolin, cefoperazone, cephalothin, ceftifur), peptide 계열 (colistin, polymixin B), nalidixic acid, sulfa제, vancomycin에 대해서 저항성을 가지는 것으로 나타났다.
5. PFGE를 이용한 분리주의 유전적 상관관계를 분석한 결과, 4곳의 애견 번식장에서 분리한 *B. canis*는 2개의 유전자형으로 분류가 되었으며, 균위주와 포항의 일부주가 동일한 유전자양상을 나타내었고, 경주, 문경 및 기타 포항주가 동일한 유전자형을 가진 것으로 조사되었다.

### 참고문헌

1. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 1988. *Hagan and Brunner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animals*. 8 eds. Comstock Pub Ass, Ithaca and London: 148-152.
2. Beran GW. 1994. *Handbook of Zoonosis*. 2 eds. CRC Press, London: 9-39.
3. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ. 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Krieg NR, Holt JG, Murray RGE, et al. Eds, Williams & Wilkins, Baltimore and London: 377-388.
4. Carter GR, Chengappa MM, Roberts AW, et al. 1995. *Essential of Veterinary Microbiology*. 5 eds. Williams & Willkins, Baltimore: 199-204.
5. Carmichael LE, Bruner DW. 1968. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet* 48(4): 579-592.
6. Carmichael LE, Shin SJ. 1996. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 11(3): 161-165.
7. Carmichael LE, Kenney RM. 1970. Canine brucellosis: The clinical disease, pathogenesis, and immune response. *JAVMA* 156(12): 1726-1734.
8. Spink WW. 1970. Comments on canine brucellosis due to *Brucella canis*. *JAVMA* 156(12): 1734-1736.
9. Morisset R, Spink WW. 1969. Epidemic canine brucellosis due to a new species, *Brucella canis*. *Lancet* 2(7628): 1000-

- 1002.
10. Moore JA, Gupta BN. 1970, Epizootiology, diagnosis, and control of *Brucella canis*. *JAVMA* 156(12) : 1737-1740
  11. Pickerill PA. 1970. Comments on epizootiology and control of canine brucellosis. *JAVMA* 156(12) : 1741-1742.
  12. Carmichael LE, Kenney RM. 1968. Canine abortion caused by *Brucella canis*. *JAVMA* 152(6) : 605-616.
  13. Jian H. 1992. Identification and characterization of 200 strains of *Brucella canis* under test from China. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 32(5) : 370-375.
  14. Tak RB, Chun DK. 1972. Isolation of *Brucella suis* from aborted fetus of a dog. *J Kor Soc Microbiol* 7(1) : 17-20.
  15. 박용호, 강승원, 주이석 등. 1984. 개 브루셀라 진단액 생산 기초시험 및 항체조사. 가축위생연구소 시험보고 : 94-98.
  16. 문진산, 오기석, 박인철 등. 1999. 전남지방의 소형견 번식장으로부터 발생한 canine brucellosis. *대한수의학회지* 39 (6) : 1099-1105.
  17. 박청규, 오지연. 2001. 대구지역 개의 *Brucella canis* 감염에 대한 세균학적 및 혈청학적 조사. *대한수의학회지* 41 (1) : 67-71.
  18. Chang CH, Lee JC, Lee CY, et al. 2000. Canine brucellosis in the Jindo. *Korean J Vet Clin Med* 17(2) : 321-326.
  19. 김종완, 이영주. 2003. 집단 개사육농장에서의 canine brucellosis 발생 및 PCR-RFLP를 이용한 분리주의 특성조사. *대한수의학회지* 43(1) : 67-75.
  20. Alton GG, Jones LM, 1975. *Laboratory Techniques in brucellosis*. 2 eds. Geneva. WHO : 149-156.
  21. 정석찬, 정병열, 우승룡 등. 1998. 종모우 정액중 *Brucella*균 신속 검출을 위한 PCR기법 개발. *대한수의학회지* 38(2) : 345-352.
  22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test: approved standards*. 7 eds. NCCL, Wayne, USA : M100-S10.
  23. CDC, Pulsenet. 2004. Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherchia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by PFGE. [http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli\\_salmonella\\_shigella\\_protocols.pdf](http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf)
  24. Ridler AL, Leyland MJ, Fenwick SG, et al. 2005. Demonstration of polymorphism among *Brucella ovis* field isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 108(1-2) : 69-74.
  25. Vizcaino N, Verger JM, Grayon M, et al. 1997. DNA polymorphism at the *omp-31* locus of *Brucella* spp: evidence for a large deletion in *Brucella abortus* and other species-specific marker. *Microbiology* 143(Pt 9) : 2913-2921.
  26. 김종완, 이영주, 탁연빈. 2003. 국내분리 *Brucella canis*의 항균제 감수성, 한국임상수의학회지 20(1) : 86-90.
  27. Terakado N, Ueda H, Sugawara H, et al. 1978. Drug susceptibility of *Brucella canis* isolated from dogs. *Nippon Juigaku Zasshi* 40(3) : 291-295.
  28. Olive DM, Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Micbiol* 37(6) : 1661-1669.
  29. Verger JM, Grimont F, Grimont PA, et al. 1985. Taxonomy of genus *Brucella*. *Ann Ins Pasteur Microbio*. 138(2) : 292-295.

30. Jensen AE, Cheville NF, Ewalt DR, et al. 1995. Application of pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of vaccine strain RB51 from field

isolates of *Brucella abortus* from cattle, bison, and elk. *Am J Vet Res* 56(3) : 308-312.