大韓獸醫學會誌(2008) 第48卷 第4號
Korean J Vet Res(2008) 48(4) : 431~440

Brucella abortus 국내 분리주의 세포외막 단백질 분석 및 혈청학적 비교

차승빈[1] · 강미란[1] · 이원정[1] · 신민경[1] · 조동희[2] · 정석찬[2] · 유한상[1,*]

[1]서울대학교 수의과대학, BK21 수의과학인력양성 사업단, 인수공통질병연구소
[2]국립수의과학검역원 동물위생연구소
(게재승인: 2008년 12월 15일)

Comparative serological analysis of outer membrane proteins extracted from *Brucella abortus* Korean isolates and 1119-3 strains

Seung-bin Cha[1], Mi-lan Kang[1], Won-jung Lee[1], Min-kyoung Shin[1], Dong-hee Cho[2], Suk-chan Jung[2], Han-sang Yoo[1,*]

[1]*College of Veterinary Medicine, BK 21 Program for Veterinary Science and KRF Zoonotic Diseases Institute, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*
[2]*National Veterinary Reasearch Institute, National Veterinary Reasearch & Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea*
(Accepted: December 15, 2008)

Abstract : Brucellosis is one of the most important zoonosis in worldwide. As one of the control measures, attempts have been made to develop new diagnostic methods using filed isolates as a national policy in many countries. Currently, bovine brucellosis in Korea have been received attention in both public health and economical aspects due to sudden increase of outbreak. Based on the situation, we compared standard strain (*B. abortus* 1119-3) with field isolates to reveal the differences among them. Biological and biochemical charateristics, antibiotic resistance profiles, outer membrane proteins (OMPs) and lipopolysaccharide analysis of the strains were included in this study. For the diagnostic purpose, an attempt was made to find out a novel antigen from the Korean isolates by serological analysis. There were differences about 55 kDa, 36-38 kDa and 20 kDa in analysis of OMPs by SDS-PAGE and Western blot with positive sera (≥1:400 in SAT titer). Also, a serological diagnostic method, ELISA was conducted using OMPs of the strains as novel antigen. Relationships between O.D. and SAT titer were analyzed using field sera showing different SAT titer. High correlation coefficient was observed between SAT titer and ELISA. Results from this study suggested that a new diagnsotic method should be developed using their own field isolates in each country.

Keywords : *Brucella abortus*, ELISA, Korean isolates, OMPs

서 론

브루셀라증은 브루셀라속균에 의한 대표적인 인수공통 전염병의 하나로, 국내는 물론 전 세계적으로 공중보건학적, 경제적으로 심각한 문제를 야기하는 질병이다 [26, 29, 36]. 최근 국내에서 본 감염증이 인체와 가축에서도 폭발적인 증가를 보이고 있어 국민적 관심사는 물론 이에 대한 대책이 시급한 실정이다 [9, 10]. 특히 국내에서는 소에서 혈청학적 양성으로 판정되는 경우 양성축 도살(test and slaughter) 정책에 따라서 살처분에 따른 막대한 경제적인 피해를 유발하는 질병이다. 브루셀라균의 주요한 병원성인자로는 lipopolysaccharide(LPS),

*Corresponding author: Han Sang Yoo
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: +82-2-880-1263, Fax: +82-2-874-2738, E-mail: yoohs@snu.ac.kr]

Outer membrane proteins(OMPs), Type IV secretion system 등 다양한 병원성 인자를 가지고 있다 [2, 8, 27]. *Brucella* 균은 세포내 기생함으로써 질병을 유발하는 세균으로 그 종류는 다양하며 각각 숙주 특이성을 가지는 균이다. 이러한 브루셀라증의 진단은 현재까지 주로 혈청학적진단에 의존하고 있어서 감염동물을 정확하게 진단하는데 많은 문제점을 내포하고 있다 [1, 4, 6, 15, 17, 31, 33]. 또한 현재 세계 각국에서 혈청학적 진단을 위하여 사용되고 있는 브루셀라 표준균주는 세계적으로 동일하나 세계 각국에서 현재 발생하고 있는 브루셀라증의 원인균의 항원적 변이 가능성이 제시되고 있다 [34]. 또한 국내에서 현재 소에서 많은 문제를 유발하고 있는 브루셀라 균종은 *Brucella abortus*(*B. abortus*)로서 이를 진단하기 위하여 *B. abortus* 1119 strain을 이용하여 국가적으로 공인하는 혈청학적 진단법인 평판 및 시험관 응집반응의 진단액으로 사용하고 있다. 이외에도 다양한 혈청학적 진단법이 사용되기는 하지만 각각의 혈청학적 진단기법의 민감도와 특이도가 다양하고 또한 각각의 시험법들이 장, 단점을 가지고 있기 때문에, 하나의 시험법으로 정확한 브루셀라의 진단이 매우 어려운 상태이다. 또한 현재까지의 브루셀라 진단법은 LPS, whole cell preparation, cell sonication extracts등을 사용하여 왔기 때문에 혈청학적 진단에 여러 가지 문제점을 유발하였다. 특히 smooth *B. abortus* 로부터 얻을 수 있는 LPS는 강한 면역반응을 유도한다 [14]. 하지만 이에 따른 많은 문제점을 가지고 있다 [5, 7, 13]. 첫째, *B. abortus*의 O-polysaccharide의 immunodominant epitope가 여러 종류의 세균, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella urbana* group, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O;157 및 *Stenotrophomonas maltophilia*의 immunodominant epitope과 유사하여 교차반응(Cross-reaction)을 유발할 수 있다 [21]. 둘째, anti-LPS 에 대한 항체가 acute brucellosis 이후에 오랫동안 존재할 수 있어 진단의 특이도가 떨어질 수 있다 [16, 20]. 셋째로 *B. canis, B. ovis*와 같은 rough strain 에 감염의 경우 진단을 할 수가 없고, 마지막으로 브루셀라 S19 백신균주를 접종하는 나라에서는 LPS를 이용한 진단법으로는 감염개체와 백신개체를 구별 할 수 없을 수 있다. 이러한 문제점을 극복하고자 동물과 사람의 브루셀라병에서는 새로운 혈청학적 진단기법의 개발이 계속적으로 요구되어 오고 있다. 이러한 요구를 충족시키기 위하여 LPS-free 한 단백질을 이용한 진단 기법을 개발하고자 하는 많은 노력들이 계속적으로 진행되고 있다 [11, 12]. 특히 이러한 단백항원은 지역적 또는 균의 성장 환경에 따라서 발현양상이 다를 수 있음으로 현재 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다 [22-24, 29, 30, 32]. 특히 국제적으로 소 *Brucella*의 효율적인 방역을 위하여 진단방법 개선을 위해 진행되는 많은 연구 중, 특히 자국에서 분리된 야외균주를 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있어서 [3], 이러한 측면에서 우리나라에서도 현재 사용되고 있는 국제 표준균주와 국내 분리균주간의 균주의 일반적인 생화학적 특성뿐만 아니라 LPS, OMPs 등을 비교 분석하였고, 이를 이용한 ELISA 기법을 확립한 후 기존의 진단기법과 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 가검혈청

본 연구에 사용한 공시균주는 국립수의과학검역원에 보관중인 *B. abortus* 국내 분리주(4주), *B. abortus* 1119-3 및 *B. abortus* RB51을 사용하였다. 양성 가검혈청은 표준 시험관 응집반응에 의해서 국내에서 브루셀라 양성우로 판정된 소의 혈청으로, 50배, 100배, 200배, 400배 항체가의 양성혈청들을 실험에 사용하였다. 음성 가검혈청은 국내에서 2000년도 발생 후 재발생하지 않은 제주도의 소 혈청을 사용하였다.

성상조사

생화학적 성상으로 oxidase, catalase, urease, nitrate reduction, citrate, indole, H_2S 등의 검사를 실시한 후 자동검사 기기인 Vitek II(Biomerieux, USA)를 이용해서 수행하였으며, lactose, glucose, sucrose, cellobiose, arabitol, mannitol, dulcitol, sorbitol, inositol, maltose, raffinose의 당분해능은 의 EASY 24E plus kit(Hanil Komed, Korea)를 사용하여 검사하였다. 또한 항생제에 대한 감수성은 Clinical and Laboratory Standards Institute의 지침에 따라서 penicillin, vancomycin, colistin, streptomycin, tetracyclin, bacitracin, erythromycin, amikacin, ampicillin, neomycin, kanamycin, chloramphenicol, sulfamethoxazole trimethoprime, nalidixic acid, oxacillin, cefezolin에 대하여 하였다.

유전자 분석

국내 분리균주와 백신주로의 유전적 특성을 확증하기 위하여, Bricker와 Halling의 PCR 방법을 변형하여 수행하였다 [19, 24]. 유전자 분석을 위하여 브루셀라균을 *Brucella* agar에서 37°C 48시간 배양하고 methanol-saline을 이용하여 수집한후 부유시켜 살균하였다. Methanol을 제거하기 위하여 증류수로 1회 원심세척 후 균탁도를 600 nm에서 0.15~0.20으로 조절하였다. 여기에 10 μl의 lysis buffer(10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Tween 20)를 가하고 100°C, 5 분간 boiling한 후에 13,000 rpm,

2분간 원심하여 상층액을 분리한 후 template로 사용하였다. 본 실험에 사용한 oligonucleotide primer의 sequence는 *B. 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 반응은 60 mM Tris-HCl(pH 9.0), 15 mM$(NH_4)_2SO_4$, 1.5 mM $MgCl_2$, 250 μM 4-deoxynucleoside triphosphates, 5 primer cocktail(각 0.2 μM *B. abortus* specific, RB51/2308, 2 *eri*-gene, 1 μM IS711-specific primer)로 조성하였다. PCR 반응용액 45 μl당 1 unit의 *Taq* polymerase를 첨가하고 PCR tube에 분주한 후 PCR 반응용액 25 μl당 2.5 μl의 균체추출 DNA를 가하고 Thermocycler(Perkin Elmer, USA)에서 95°C, 5분간 반응시킨 후 95°C에서 1분 12초, 55.5°C에서 2분, 72°C에서 2분간 35회 반복하여 증폭시켰다. 72°C에서 5분간 final extension 후 증폭된 DNA 10 μl를 2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 다음 DNA band를 최종 반응 후 UV transilluminator에서 확인 후 사진촬영 하였다.

OMPs 분리

공시균주로부터 균 외막단백의 추출은 Barenkamp 등[18]의 방법에 따라 실시하였다. 즉, Tryptic soy broth 1 L에 배양한 균을 4,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 균을 수집하였다. 수집된 균을 PBS로 2회 원심세척 후, 10 mM HEPES buffer 30 ml에 부유시켜 한 tube에 모아 희석시켰다. 이것을 ice bath에서 Sonic Dismembrator (Bandelin Electronic, Germany)로 60% power에서 투명해질 때까지 sonication 시킨 후, 이것을 4,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 회수하였다. 이 상층액을 다시 20,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리한 후 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 1 ml의 mixing buffer(2% SDS, 10 mM HEPES)에 완전히 부유시켜 실온에 1시간 방치하였다. 그 후, 다시 20,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리한 후 침전물을 회수하여, 멸균 증균수 1 ml에 부유시켰다. 완전히 부유시킨 후, 13,000 rpm에 3분간 원심분리 시켜 soluble한 상층액을 OMP 항원으로 하였고, SDS-PAGE 분석에 사용하였다.

LPS의 분리

공시균주로부터 LPS의 분리는 LPS extraction kit (Intron, Korea)를 이용하여 추출하였다. 즉, 균을 tryptic soy agar에서 배양한 후 균을 수확하여 제공된 lysis buffer를 넣어 부유시킨 후, chloroform을 섞어서 실온에 5분간 방치시켰다. 그 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 수집하였다. 이 상층액에 제공된 purification buffer로 재부유한 후, –20°C에서 10분간 방치시켰다. 그리고 13,000 rpm으로 15분간 원심분리를 한 후 pellet을 에탄올로 washing하고 10 mM Tris-HCl buffer로 부유시켜 1분간 boiling하여 LPS 항원으로 하였고, SDS-PAGE 분석에 사용하였다.

SDS-PAGE 및 Western blot 분석

OMP 및 LPS 항원에 각각 동량의 2 × Laemmli sample buffer(50 mM Tris-Cl, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, 100 mM mercaptoethanol)를 넣어 혼합하고 100°C, 10분간 처리하였고, 전기영동은 PROTEIN Ⅱ xi Cell(Bio-rad, USA)을 이용하여 15% acrylamide gel에서 실시하였다. 항원 전개가 끝난 후 LPS는 하루동안 fixation solution(25% isopropanol, 7% acetic acid)에서 fixation 시킨 후, oxidation solution(25% isopropanol, 7% acetic acid, 1.05 g periodic acid)에 5분간 반응시키고, DW로 30분씩 8번 washing 하였다. 그리고, silver staining solution(0.1 N NaOH, 29.4% ammonium hydroxide, 20% silver nitrate)으로 10분간 staining을 하고, DW로 10분씩 4번 washing하고, developer solution(50 mg citric acid, 37% formaldehyde)에서 10분간 develop 시켜서 항원 양상을 분석하였다.

그리고 OMP는 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액을 이용하여 염색하여 비교 분석하였다. 또 이처럼 전개한 OMP와 LPS는 nitrocellulose membrane에 전사한 후 국내 브루셀라 양성우(SAT 응집가 1 : 400)의 혈청을 이용하여 Western blot을 실시하였다.

OMP를 항원으로 이용한 ELISA 확립 및 기존의 시험법과 비교 분석

추출한 각 균주의 OMP 항원을 coating buffer(0.01 M PBS : 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl)에 0.2 μg/well로 희석 후 4°C에서 overnight하여 ELISA plate에 부착시켰다. 항원이 부착된 plate를 0.05% PBST로 3회 세척한 후, 1% skim milk 용액으로 37°C에서 1시간 blocking시켰다. 가검 혈청으로는 표준 시험관 응집반응을 통해 항체가를 측정한 것으로서 각각 50배(32개), 100배(60개), 200배(151개)를 1 : 400으로 희석하여 사용하였으며, 양성대조군으로는 표준 시험관 응집반응 항체가 400배의 혈청을, 음성대조군으로는 지난 7년간 브루셀라 발생이 없던 제주도 혈청을 같은 비율로 희석하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후, HRP-conjugated bovine IgG(Bethyl Laboratories, USA)를 1 :

10,000으로 희석하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 3회 washing 후 ABTS를 이용하여 30분간 발색반응 시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ELISA와 표준 시험관 응집반응의 상관관계 분석

표준 시험관 응집반응과 확립된 ELISA의 상관관계는 Microsoft사의 Excel 2003(version 11.8211.8202; Microsoft, USA)을 이용하여 상관계수를 측정하여 분석하였다. 표준 시험관 응집반응 각 역가의 흡광도의 평균값을 이용하여 선형회귀 방정식을 구하여 관계를 분석하였다.

결 과

생화학적 성상 및 당 분해능

*B. abortus*의 표준주, 백신주 및 국내 분리주간에 생화학적 특성을 비교한 결과, 대부분의 생화학적 성상은 모든 균주에서 유사하게 나타났으나, NO_2 생성능에 있어서 RB51은 표준주(*B. abortus* 1119-3) 및 기타 분리주와 달리 NO_2 를 생성하지 못하였다. 한편, 당 분해능에 대하여 조사한 결과 RB51, 표준주(*B. abortus* 1119-3), 국내 분리주 모두에서 실험에 사용된 당들을 분해하지 못하였다(Table 1).

항생제 감수성

*Brucella abortus*의 RB51, 표준주(*B. abortus* 1119-3) 및 국내 분리주간에 대하여 penicillin등 16 종의 항생제에 대한 감수성을 시험한 결과는 다음과 같다(Table 2). 공시한 대부분의 균주가 AP, VA, B, E, SXT, OX, CF에서는 내성을 나타내었으며, S, Te, AN, N, K, C에서는 감수성을 나타내었으며, 나머지 항생제에 대해서는 중등도의 감수성을 나타내었으며, 균주들 간에 주목할 만한 차이는 보이지 않았다.

유전자 분석

백신주, 표준주, 균체외막 및 지당체 추출실험을 위해 선발한 4개의 야외분리주의 유전자 분석 결과, 백신주에서는 364 bp의 RB51 특이 유전자가 검출되었으며, 표준주와 다른 균주에서는 RB51 특이 유전자는 검출되지 않았으며, 498 bp의 *B. abortus* 특이유전자와, 178 bp의 *eri* 특이유전자만이 검출되었다(Fig. 1). 이를 통하여 야외분리주가 백신주로부터 유래되지 않은 것임을 확인하였다.

OMP 및 LPS의 분석

B. abortus 1119-3, RB51 및 국내분리주(1-7, 1-81, 2-55, 3-60) 에 대한 OMP의 양상을 분석한 결과 36~38 kDa 크기의 단백질에 1-81, 2-55 및 3-60에서 발현량의 차이를 나타내었고, 각 균주들 간에 약 10 kDa band의 발현량의 차이, 또한 1-81, 2-55 균주에서, 약 20 kDa band, 55 kDa band의 발현량의 차이 등을 볼 수 있었다

Table 1. Biochemical characteristics of *Brucella* (*B.*) *abortus* strains

Strains	Oxidase	Catalase	NO_2 produce	H_2S	Urease	Phenylalanine deaminase	Citrate	Phosphatase	Coumarate	Lipase
RB51	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–
1119-3	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–
1-7	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–
1-81	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–
2-55	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–
3-60	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–

Strains	Arabitol	Lactose	Sucrose	Mannitol	Dulcitol	Sorbitol	Inositol	β-Glucose	Glucose	Maltose	Raffinose
RB51	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1119-3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1-7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1-81	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2-55	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3-60	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

+: Positive –: Negative, RB51: *B. abortus* RB51, 1119-3: *B. abortus* 1119-3, 1-7, 1-81, 2-55, 3-60: *B. abortus* field isolates in Korea.

Table 2. Antimicrobial susceptibility of *Brucella* (*B.*) *abortus* strains

Strains	P	VA	CL	S	Te	B	E	AN	AM	N	K	C	SXT	NA	OX	CF
RB51	R	R	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	R	I	R	R
1119-3	R	R	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	I	R	R
1-7	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	I	R	R
1-81	R	R	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R
2-55	R	R	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	I	R	R
3-60	R	R	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	I	R	R

R: Resistance I: Intermediate S: Susceptable.
P: Penicillin 10 μg, VA: Vancomycin 30 μg, CL: Colistin 10 μg, S: Streptomycin 10 μg, Te: Tetracyclin 30 μg, B: Bacitracin 10 μg, E: Erythromycin 15 μg, AN: Amikacin 30 μg, AM: Ampicillin 10 μg, N: Neomycin 30 μg, K: Kanamycin 30 μg, C: Chloramphenicol 30 μg, SXT: Sulfamethoxazole trimethoprime 30 μg, NA: Nalidixic acid 30 μg, OX: Oxacillin 1 μg, CF: Cefazolin 30 μg.
RB51: *B. abortus* RB51, 1119-3: *B. abortus* 1119-3, 1-7, 1-81, 2-55, 3-60: *B. abortus* field isolates in Korea.

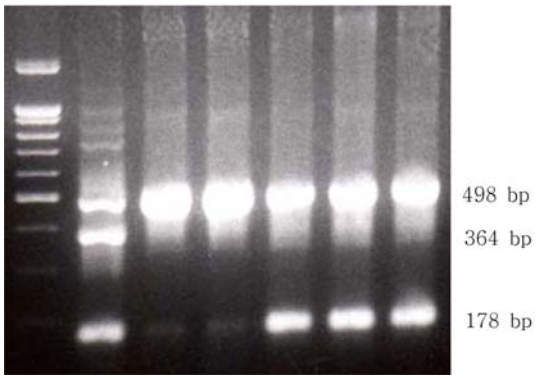

Fig. 1. Detection of *Brucella* species-specific genes and *eri*- gene in *Brucella* (*B.*) *abortus* by PCR. Lane 1, 100 bp ladder; lane 2, *B. abortus* RB51; lane 3, *B. abortus* 1119; lane 4, *B. abortus* 1-7; lane 5, *B. abortus* 1-81; lane 6, *B. abortus* 2-55; lane 7, *B. abortus* 3-60.

(Fig. 2A). 브루셀라 표준혈청반응에서 양성을(1 : 400) 보인 야외 가검혈청을 이용하여 Western blot 결과, SDS-PAGE 결과와 유사한 양상을 보였으나, 주로 major band 들(36~38 kDa)이 양성혈청과 강하게 반응 하였다. 일반적으로 표준주와 백신주 및 야외 분리주간에 혈청학적 반응에 차이를 나타내었다. 1-81 균주와 2-55 균주는 매우 유사한 패턴을 보였으며, 이들 균주의 36~38 kDa 부위에서 강한 반응을 나타내었다. 20 kDa 부위에서 표준주를 비롯하여 1-81, 2-55 균주에서만 반응을 볼 수 있었으며, 특이한 점은 백신주를 항원으로 한 부분에서는 반응이 매우 약함을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

LPS를 silver staining한 결과 표준주와 국내주 간에 비슷한 양상을 나타내었다. 다만 백신주인 RB51 에서는 O-side chain 부분이 결손 되어있는 것을 관찰할 수 있었으며, LPS의 lipid A 부분은 모든 균주에서 작은 size 부분에서 볼 수 있었다. Silver staining을 통한 분석으로

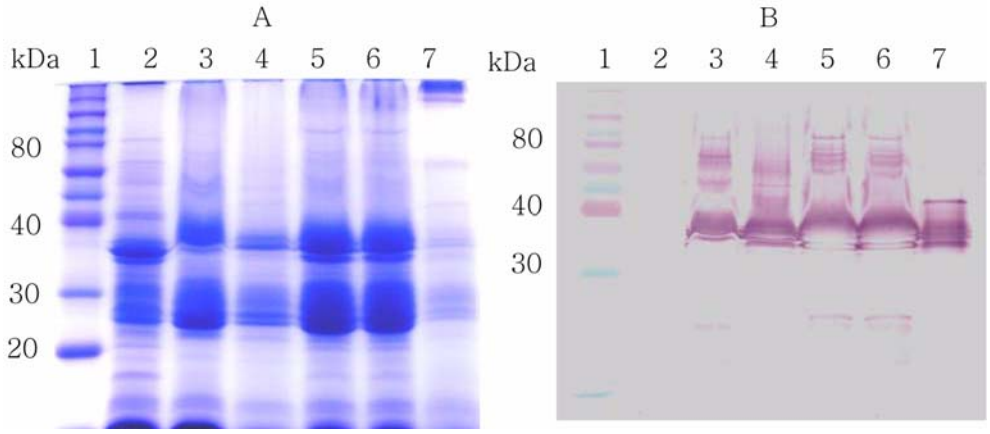

Fig. 2. Electrophoretic and immunological analysis of outer membrane proteins extracted from *Brucella* (*B.*) *abortus* strains by SDS-PAGE (panel A) and Western blot (panel B). Lane 1, molecular weight marker; lane 2, *B. abortus* RB51; lane 3, *B. abortus* 1119-3; lane 4, *B. abortus* 1-7; lane 5, *B. abortus* 1-81; lane 6, *B. abortus* 2-55; lane 7, *B. abortus* 3-60.

Table 3. Optical density of a developed diagnostic method using *Brucella* (*B.*) *abortus* OMPs depending on Standard tube agglutination test titer

Antigen	Standard tube agglutination test titer		
	× 50	× 100	× 200
B.abortus RB51 OMP	0.468 ± 0.084*	0.483 ± 0.105	0.625 ± 0.177
B.abortus 1119-3 OMP	0.934 ± 0.260	0.961 ± 0.210	1.072 ± 0.189
B.abortus 1-7 OMP	0.857 ± 0.210	0.915 ± 0.218	1.054 ± 0.140
B.abortus 1-81 OMP	1.009 ± 0.243	1.007 ± 0.232	1.157 ± 0.186

*Mean O.D. ± SD, $p < 0.05$

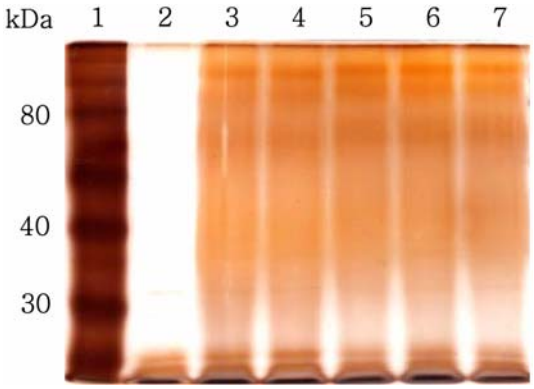

Fig. 3. Analysis of lipopolysacharides of *Brucella* (*B.*) *abortus* strains by SDS-PAGE and silver stainining. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, *B. abortus* RB51; lane 3, *B. abortus* 1119-3; lane 4, *B. abortus* 1-7; lane 5, *B. abortus* 1-81; lane 6, *B. abortus* 2-55; lane 7, *B. abortus* 3-60.

는 정확한 O-side chain의 배열을 파악하기 힘들었으며, 이에 따른 국내 분리주간의 차이는 확인하기 어려웠다 (Fig. 3).

각 균주의 OMP항원을 이용한 ELISA와 표준평판 응집반응의 비교

각각의 OMP를 항원으로 이용하여 ELISA를 실시한 결과 사용한 항원에 따라 약간씩 다른 결과를 나타내었다. 같은 혈청임에도 불구하고 백신주의 외막단백을 항원으로 사용한 경우에는 대체로 낮은 흡광도를 나타내었으며, 몇몇 혈청에서는 사용한 OMP 항원에 따라 각기 다른 값을 나타냄을 확인할 수 있었다. 추가로, 확립된 ELISA 기법이 얼마나 유효성을 가지는지를 알아보기 위하여 각 샘플의 흡광도의 평균으로 선형회귀 방정식을 만들어 SAT를 통한 항체가 와의 상관관계를 분석하였다. 각각 백신주, 표준주, 1-7 및 1-81 항원을 사용했을때의 상관계수(R)는 0.98, 0.82, 0.87, 0.87로, 전반적으로 높은 상관관계를 볼 수 있었으며, 특히 백신주의 OMP 항원을 사용한 경우에서 가장 큰 상관관계를 나타냈다(Fig. 4). 이를 통해 전체적으로 SAT와 사용항원이 다름에도 높은 상관관계를 나타내고 있음을 알 수 있었고, 분산 분석을 통하여, 같은 SAT 역가의 혈청이라도 각 균주의 OMP 항원에 따라 다양한 O.D. 값을 나타냄을 확인할 수 있었다(Table 3).

고 찰

브루셀라병에 대한 효율적인 국가적인 방역대책을 수립하기 위해서는 감염 개체에 대한 정확한 진단이 이루어져야 한다. 현재까지 개발된 소 브루셀라의 진단법은 다양하나 그 진단방법의 민감도와 특이도에서 다양한 차이를 나타내고 있다. 이는 소 브루셀라의 원인체인 *B. abortus* 가 세포내 기생성을 가진 세균으로서 세포성 면역 및 체액성 면역을 유도하고 있으나, 현재는 주로 체액성 면역에 근거한 혈청학적 진단 방법이 사용되고 있고, 또한 다른 장내세균들과의 교차반응 등 균 자체가 가질 수 있는 여러 가지 진단의 어려움, 상재감염 지역에서의 LPS에 대한 높은 항체가 및 다른 속의 *Brucella* 감염증과 구별에 어려움, 그리고 현재 사용중인 진단액 제조균과 감염지역의 균주와 성상차이에 따른 정확한 진단의 어려움 등으로 새로운 진단 방법의 개선이 계속적으로 재기되어 왔다.

이러한 문제점들을 해결하기 위한 기초자료의 확보를 위하여 본 연구에서는 *B. abortus*의 국내 분리주, 현재 국내 브루셀라 진단액 제조에 사용되는 균주 *B. abortus* 1119-3와 외국에서 소 브루셀라 예방을 위하여 백신균주로 사용하고 있는 *B. abortus* RB51 균주의 여러 가지 성상을 비교 분석하였고, 각각 이들 균주의 OMP 및 LPS를 추출하여 그 차이를 조사하였다. 또한, 이들 OMP 항원을 이용하여 ELISA 기법을 정립한 후 기존의 방법과 비교분석 하였다.

본 연구에 사용될 공시균주의 확인을 위하여 브루셀라 야외 분리균주, *B. abortus* 1119-3 및 *B. abortus* RB51의 생화학적 특성, 당분해능 및 유전자 검색을 실시한 결과 본 실험에 공시한 모든 균주가 *B. abortus*에 대하여 기존에 발표된 것들과 동일하게 나타났다. 항생제 감수성 검사에서는 항생제에 대한 균주간의 커다란 차이

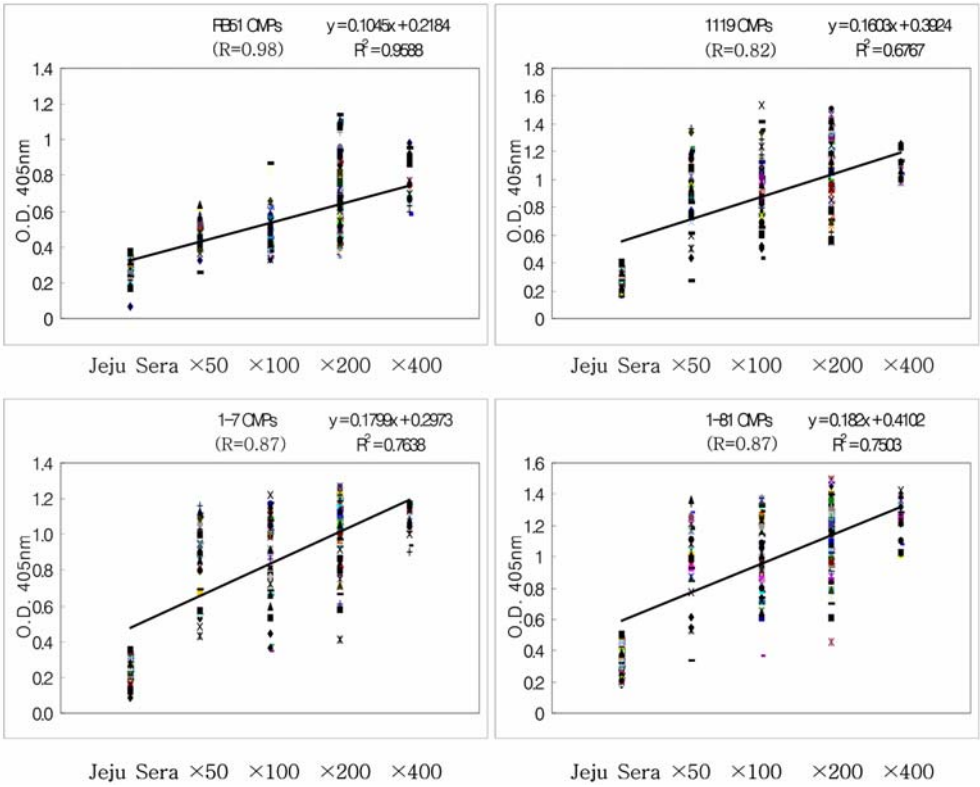

Fig. 4. Comparison of a serological method developed in this study with standard tube agglutination test in field bovine sera.

는 없었으나, 균주가 항생제 종류에 따라서는 감수성 및 저항성이 다양하게 나타났다.

세균벽의 구성은 다양한 물질로 이루어져있는데 이중 특히 세포외막 단백질(OMP)는 세포의 주요 기능뿐만 아니라, 항원으로서도 중요한 역할을 한다. *Brucella* 균의 세포벽을 분석해 본 결과 75개 이상의 protein이 존재함이 밝혀졌고, 이들 protein에는 다양한 OMPs이 존재하였다 [13]. *Brucella* 균의 OMPs는 연구하는 사람에 따라 다를 수 있으나, 크게 세 group으로 나눠지는데 group 1, 2 그리고 3로 분류된다. Group 1은 일명 minor OMPs group으로 불리며 이에 속하는 OMPs로서는 분자량이 88-99 kDa의 단백질과, 분자량 10 kDa의 Omp 10, 16 kDa의 Omp 16, 19 kDa의 Omp 19가 포함된다. Group 2는 major OMPs group으로서 분자량이 34-40 kDa 사이에 존재하며, 일명 porin(transmembrane protein)으로 알려져 있고, 여기에 속하는 OMPs는 분자량이 36-38 kDa의 Omp 2a와 Omp 2b가 포함된다. Group 3 또한 major OMPs group으로서 분자량이 25-30 kDa 사이에 존재하는 proteins 으로써 분자량 25-27 kDa의 Omp 25와 31-34 kDa의 Omp 31이 포함된다 [2]. 현재 이들 group 이외의 저분자량 OMPs에 대한 연구가 다각도로 진행되어져 이들 group은 더욱 세분화 될 것으로 사료된다. 본 실험에 사용한 균주들의 OMP 특성을 분석한 결과 국내 분리주와 *B. abortus* 1119-3와 *B. abortus* RB51 간에는 OMP의 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과 차이를 나타내고 있었다. 이러한 결과는 현재 국내에서 브루셀라 진단액 생산 과 추후 백신의 후보로 *B. abortus* 1119-3와 *B. abortus* RB51이 각각 사용 또는 고려되고 있다는 점에서 볼 때에 대상균주 선발이 재고되어야 할 것으로 생각된다. 그러나, OMPs는 현재까지 *Brucella* 감염증에 있어서, 항원으로서의 작용이 미흡한 것으로 알려져 있고, 또한 야생주 감염에 대해 낮거나 거의 효과가 없는 protective activity를 나타내는 것으로 알려져 있으나, Jimenez de Bagues 등 [28]의 결과에 의하면 group 3 OMPs가 *B.ovis* 접종실험에서 우수한 방어 효과를 나타내는 것이 알려져 병원성 및 항원성으로서 중요한 인자임이 밝혀졌다. *Brucella* 감염증에 있어서 LPS는 높은 면역원성임이 밝혀져 많은 혈청학적 진단 재료로 쓰여지고 있다. 그러나 이러한 훌륭한 면역원성을 갖고 있음에도 불구하고, 이들 LPS는 다른 장내세균(*Y. enterocolitica* O9, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Francisella* spp. 등)과의 교차 반응이 나타나, *Brucella* 감염증의 진단에 큰 어

려움을 겪고 있는 현실이다. 최근 *Brucella* 균의 다양한 OMPs 항원을 이용한 진단 방법이 소개되고 있으며, 교차반응이 적은 결과를 다수 보고하고 있는 바, 앞으로 OMPs를 이용한 Brucellosis의 혈청학적 진단에 다양한 응용이 예상되어지며, 특이적이고 우수한 진단기법이 마련될 것으로 기대된다.

브루셀라 감염증에서 우수한 면역원성을 가지고 있는 것으로 알려진 LPS을 분석한 결과 *B. abortus* RB51에서는 LPS 중 O-side chain을 확인할 수 없었으나, 국내 야외 분리주와 *B. abortus* 1119-3에서는 SDS-PAGE 분석 상에서 동일하게 가지고 있었다. 그러나, O-side chain에서의 당의 배열 순서에서의 차이여부에 대하여는 추후 분석이 이루어져야 될 것으로 사료된다.

각 균주의 OMP를 항원으로 이용하여 ELISA 기법을 정립하여 현재 사용하고 있는 혈청학적 진단방법인 표준응집반응과의 연관성을 분석해본 결과 대체적으로 높은 연관성을 보였다. 특히 백신주의 OMP를 항원으로 사용한 경우 그 연관성이 가장 높은 것으로 나왔지만 흡광도의 절대적인 수치가 낮게 측정되어 그 연관성을 논하기는 힘들다고 생각된다. 표준주나 국내 분리주의 OMP를 항원으로 사용한 경우 음성과 양성은 명확히 구분할 수 있었으며, 같은 역가의 혈청사이에서도 다양한 흡광도가 관찰되었고, 결과에 수록하지는 않았지만 같은 혈청이라도 항원을 다르게 적용한 경우 상이한 흡광도를 볼 수 있었다. 이를 통하여 국내 분리주와 표준주간에 항원적 차이가 있음을 알 수 있었으며, 그 차이를 보이는 OMP의 정제, 분석 및 낮은 반응성을 보인 양성 가검혈청들의 가양성 여부 등의 추후 분석이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

B. abortus 표준주와 국내 분리주의 외막단백의 항원적 차이와 혈청학적 반응의 차이를 조사하기 위해 본 실험을 실시하였다. 표준주와 국내분리주의 외막단백을 추출하여 SDS-PAGE를 통해 각각 다른 발현 양상을 확인하였다. 국내 분리주의 외막단백을 항원으로 이용하여 기존 진단법과의 혈청학적 차이를 확인하기 위하여 SAT를 통해 항체가가 50배, 100배, 200배로 판정된 가검 혈청을 사용하여 비교하는 실험을 실시하였다. 그 결과, 각 항원(백신주, 표준주, 1-7, 1-81)을 사용하였을 때 SAT 항체가와 상관계수가 각각 0.98, 0.82, 0.87, 0.87로 높은 연관성을 보였으며, 같은 역가 혈청의 항원별 흡광도의 분포를 분산분석 해본결과, 같은 SAT역가의 혈청이라도 사용된 항원에 따라 그 반응정도가 다름을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

감사의 글

본 연구과제는 국립수의과학 검역원(550-20070011), BK 21 수의인력양성사업단, 인수공통질병 연구소(KRF-2006-005-J502901)의 지원에 의해 연구되었으며 협조해 주신 관계자 분들께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. **김금화, 안수환, 박용호, 김동성.** 브루셀라병 검색에 사용되는 여러가지 혈청진단법의 비교연구. 대한수의학회지 1982, **22**, 149-153.
2. **김석.** 브루셀라 감염증의 발병 기전; 브루셀라 균의 병원성 인자. 한국수의공중보건학회지 2007, **31**, 105-114.
3. **김태용, 김지영, 장경수, 김명철, 박창식, 한홍율, 전무형.** *Brucella abortus* 국내 분리주의 Heat shock protein 암호 *gro*E 유전자의 염기서열 분석과 발현. 대한수의학회지 2005, **45**, 45-53.
4. **문진산, 박용호, 정석찬, 구복경, 장금찬, 이성일, 백병걸.** 소 브루셀라 감염우의 혈청학적 진단법과 세포성 면역반응에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 1996, **20**, 185-194.
5. **백병걸, 김지형, 박용호.** 한우에 있어서 불활화 *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* 그리고 *Yersinia enterocolitica*에 의한 면역반응 관찰. 한국수의공중보건학회지 1988, **22**, 93-102.
6. **심항섭, 국정희, 정봉수, 고태오, 조중현, 박유순.** 효소면역법을 이용한 *Brucella abortus* 항체 검출에 관한 연구. 한국가축위생학회지 1998, **21**, 107-115.
7. **안수환, 김금화, 박용호, 김동성.** 브루셀라병과 *Yersinia enterocolitica* 감염의 혈청학적 감별진단에 관한 연구. 농시보고(축산가위) 1982, **24**, 106-111.
8. **임현술, 송영구, 유한상, 박미연, 김종완.** 브루셀라증의 개요. 한국역학회지 2005, **27**, 26-36.
9. **정석찬, 조동희, 남향미, 허은정, 조윤상, 황인영, 김종완.** 국내 소 *Brucella* 병의 발생 및 연구동향. 한국수의공중보건학회지 2007, **31**, 91-103.
10. **질병관리본부.** 국내 브루셀라증 발생 현황, 2002~2004. 감염병발생정보 2005, **16**, 28-29.
11. **허문, 조동희, 정병열, 조성근, 정석찬, 김옥경.** 브루세라 RB51의 ELISA 진단법개발 I. Western blot에 의한 *Brucella abortus* RB51 균의 항원 분석. 대한수의학회지 2001, **41**, 43-49.
12. **허문, 조동희, 정병열, 조성근, 정석찬, 김옥경.** 브루세라 RB51의 ELISA 진단법 개발 II. *Brucella abortus* RB51 균의 8kDa 항원 정제 및 ELISA 진단법 개발. 대한수의학회지 2001, **41**, 51-57.
13. **Al Dahouk S, Nöckler K, Scholz HC, Tomaso H, Bogumil R, Neubauer H.** Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections. J Immunol Methods 2006, **309**, 34-47.

14. **Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D.** Laboratory-based diagnosis of brucellosis - a review of the literature. Part II: Serological tests for brucellosis. Clin lab 2003, **49**, 577-589.
15. **Alastair M.** Conventional serological tests. In: Nielsen K, Duncan JR (eds.). Animal Brucellosis. pp. 153-198, CRC Press, Baca Raton, 1990.
16. **Almuneef M, Memish ZA.** Prevalence of *Brucella* antibodies after acute brucellosis. J Chemother 2003, **15**, 148-151.
17. **Alton GG, Jones LM, Pietz DE.** Laboratory Techniques in Brucellosis. Monograph Series. 2nd ed. World Health Organization, Geneva, 1975.
18. **Barenkamp SJ, Munson RS Jr, Granoff DM.** Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer-membrane protein profiles. J Infect Dis 1981, **143**, 668-676.
19. **Bricker BJ, Halling SM.** Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol 1994, **32**, 2660-2666.
20. **Buchanan TM, Hendricks SL, Patton CM, Feldman RA.** Brucellosis in the United States, 1960-1972; An abattoir-associated disease. Part III. Epidemiology and evidence for acquired immunity. Medicine (Baltimore) 1974, **53**, 427-439.
21. **Caroff M, Bundle DR, Perry MB.** Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica serotype* O:9. Eur J Biochem 1984, **139**, 195-200.
22. **Cespedes S, Andrews E, Folch H, Oñate A.** Identification and partial characterisation of a new protective antigen of *Brucella abortus*. J Med Microbiol 2000, **49**, 165-170.
23. **Connolly JP, Comerci D, Alefantis TG, Walz A, Quan M, Chafin R, Grewal P, Mujer CV, Ugalde RA, DelVecchio VG.** Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. Proteomics 2006, **6**, 3767-3780.
24. **Eschenbrenner M, Horn TA, Wagner MA, Mujer CV, Miller-Scandle TL, DelVecchio VG.** Comparative proteome analysis of laboratory grown *Brucella abortus* 2308 and *Brucella melitensis* 16M. J Proteome Res 2006, **5**, 1731-1740.
25. **Ewalt DR, Bricker BJ.** Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. J Clin Microbiol 2000, **38**, 3085-3086.
26. **George WB.** Handbook of Zoonoses. 2nd ed. pp. 9-39, CRC press, London, 1995.
27. **Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H.** Immunity and protection against *Brucella abortus*. Microbes Infect 2001, **3**, 43-48.
28. **Jiménez de Bagüés MP, Marín CM, Blasco JM, Moriyón I, Gamazo C.** An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival B. melitensis strain Rev 1 vaccination. Vet Microbiol 1992, **30**, 233-241.
29. **Lavigne JP, Patey G, Sangari FJ, Bourg G, Ramuz M, O'Callaghan D, Michaux-Charachon S.** Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*. Infect Immun 2005, **73**, 5524-5529.
30. **Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, Mao L, He Y, Wu Y, Wang X.** Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. Infect Immun 2006, **74**, 2734-2741.
31. **Nielsen K, Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, Nicoletti P.** Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. Vet Microbiol 2004, **100**, 25-30.
32. **Oliveira SC, Harms JS, Banai M, Splitter GA.** Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. Cell Immunol 1996, **172**, 262-268.
33. **Portanti O, Tittarelli M, Di Febo T, Luciani M, Mercante MT, Conte A, Lelli R.** Development and validation of a competitive ELISA kit for the serological of ovine, caprine and bovine Brucellosis. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2006, **53**, 494-498.
34. **Ridler AL, Leyland MJ, Fenwick SG, West DM.** Demonstration of polymorphism among *Brucella ovis* field isolates by pulsed-field gel electrophoresis. Vet Microbiol 2005, **108**, 69-74.
35. **Sowa BA, Kelly KA, Ficht TA, Frey M, Adams LG.**

SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus*. Vet Microbiol 1991, **27**, 351-369.

36. **United States Department of Agriculture.** Brucellosis Eradication; Uniform Methods and Rules. pp. 1-121, Animal and Plant Health Inspection Service, Iowa, 2003.