

PFGE를 이용한 경북지역에서 분리된 *Brucella abortus*의 유전형별

조민희 · 김성국* · 김영환 · 김순태 · 엄현정 · 장영술 · 고영환

경상북도가축위생시험소

(접수 2009. 9. 16, 게재승인 2009. 9. 28)

Genotyping of *Brucella abortus* isolated in Gyeongbuk province by PFGE

Min-Hee Jo, Seong-Guk Kim*, Young-Hoan Kim, Soon-Tae Kim, Hyun-Jung Eom,
Young-Sul Jang, Young-Hwal Ko

Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Daegu 702-911, Korea

(Received 16 September 2009, accepted in revised form 28 September 2009)

Abstract

Subtyping of *Brucella abortus* isolates is epidemiologically important for monitoring of bovine brucellosis outbreaks. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is considered as a gold standard of molecular typing methods to study the DNA polymorphisms of bacteria. In this study, we analyzed using PFGE the DNA fragment profiles of *B. abortus* isolated in Gyeongbuk province from 1998 to 2006. The genomic DNA was digested with the restriction endonuclease *Xba I*, *Xho I* and *Smi I* followed gel electrophoresis. No distinguishable patterns of the genomic DNA digested with *Xba I* and *Xho I* were observed among the field isolates of *B. abortus* tested in this study. But *Smi I* restriction enzyme resulted in two PFGE patterns consisting of 13-15 bands that ranged in size from 33 to 668bp by standard marker. The cluster analysis by DNA fingerprinting software showed 93.75% similarity between two PFGE patterns. No different PFGE patterns were recognized among the isolates originated from various years, regions and cow breeds.

Key words : *Brucella abortus*, Molecular typing, PFGE

서 론

소 브루셀라병은 암소에서 불임, 유산 등의 번식장애를 일으키고, 수소에서는 고환염, 전립선염 등의 생식기 질환을 일으키는 질병으로 소뿐만 아니라 사람에게도 감염되어 파상열, 관절통, 오한, 쇠약 등 감기와 유사한 증상을 일으키는 인수공통전염병으로 공중위생상 매우 중요한 질병으로써 미국, 유럽 등 세계적으

로 근절을 위해 많은 노력을 기울이고 있다(Alton 등, 1975; Beran, 1994; Brenner 등, 2005; Nielson 등, 1990; Timoney 등, 1988).

분자생물학의 발전과 함께 브루셀라균과 관련된 많은 유전자 정보가 밝혀지고 DNA-DNA hybridization에 근거한 유전자 지도를 작성한 결과 브루셀라균속의 유전적 동일성이 밝혀짐에 따라 단일 종에 의한 분류법이 제기되고 있다(Foster 등, 2002; Moreno 등, 2002; Verger 등, 1985). 그러나 *Brucella abortus* (*B. abortus*)의 outer membrane protein (OMP)에 대한 추출물을 SDS-

*Corresponding author: Seong-Guk Kim, Tel. +82-53-326-0013,
Fax. +82-54-326-1066, E-mail. ksk8719007@gb.go.kr

PAGE를 이용하여 분석한 결과에 의하면 균종에 따라 protein group의 차이점이 발견되고 이들 균주의 OMP에서 발견된 다형태성은 숙주에 따른 선택성에 기인한 것으로 브루셀라균이 숙주의 체내에 들어가 숙주세포에 부착하고 세포내 침투하는 과정에 OMP가 관여하기 때문이라고 밝혔고, 브루셀라균의 porin protein 정보에 관여하는 *omp2a/omp2b* 관련 유전자에 대한 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)에 의한 다형태성을 관찰한 결과 6균종의 브루셀라균은 뚜렷한 차이가 있는 것으로 알려졌다(Ficht 등, 1990; Verstrete 등, 1984).

Cloeckaert 등(1995)은 *omp2* 유전자와 밀접한 25 KDa OMP 부위의 유전자인 *omp25*에 대한 PCR-RFLP법을 이용하여 다형태성을 조사한 결과 균주간의 진단학적, 역학적 상관관계에 도움이 된다고 보고하였으며, Vizcaino 등(2000)은 브루셀라 균종간의 DNA-DNA hybridization법에 의한 DNA의 상동성이 매우 유사함에도 불구하고 DNA 다형태성에 대한 여러 연구를 종합하여 생물학적 및 숙주특이성에 따라 균종과 생물형으로 분류하는 것이 바람직하다고 하였다.

Moreno 등(1990)은 브루셀라균이 속하는 *α-2 proteobacteria*와 다른 세균들을 대상으로 16S rRNA와 lipid A에 대한 계통유전학적 상관관계를 조사한 결과 브루셀라균은 *rickettsiae*, *agrobacter* 및 *rhizobiae*균과 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 보고하였다.

Cloeckaert 등(2000)은 *B. melitensis* 16M lipo-poly-saccharide O-side chain의 생합성에 관여하는 7형의 유전자를 증명하여 PCR을 이용한 브루셀라균 내의 유전적 다형태성을 보고한 바 있고, Delvecchio 등(2002)과 Paulsen 등(2002)에 의해 *B. melitensis*와 *B. suis*의 전체 염기서열이 밝혀졌으며, *B. suis* biovar 3을 제외한 다른 브루셀라균종은 크기가 다른 두 개의 원형 염색체 구조(circular chromosome, *Chr I*, *Chr II*)로 이루어져 균의 대사경로, DNA 복제, 세포벽의 합성 및 숙주세포 부착관련유전자 등의 다양한 정보를 가지고 있는 것으로 밝혀졌으며 이 중에서 큰 염색체인 *Chr I*은 세포 자체의 복제와 관련되고 작은 염색체(*Chr II*)는 plasmid와 관련된 유전자 정보를 가지는 것으로 나타났다. 이와 같이 브루셀라균의 전체 유전자 구조가 밝혀짐에 따라 브루셀라균의 대사, 균체합성에 관련된 유전자부위를 이용한 분자유전학적 수준에서의 브루셀라균종간 비교분석이 많이 이루어지고 있다(Chain 등, 2005; Halling 등, 2005).

세균의 형별(subtyping)은 역학적으로 질병의 발생, 교차감염의 유무, 감염원의 검출, 병원성 인자의 검출, 예방접종 체계의 수립 등 여러 방면에 걸쳐 매우 중요하게 인식되고 있다. 형별 방법은 고전적으로 생물형, 혈청형, 파지형, 약제내성형 등의 방법이 있으나, 최근 들어 분자생물학의 발전과 더불어 유전자 수준의 분석 방법이 도입되어 분자유전학적 방법에 의한 유전형별 및 분자형별 등의 방법이 있고 어떤 형태의 균형별을 이용하든 높은 감별력과 반복된 실험에서 동일한 결과를 얻을 수 있는 재현성이 반드시 수반되어야 올바른 방법이라 할 수 있다(Chu 등, 1986).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)는 세균을 용해시켜 추출된 DNA에 대하여 특성의 제한효소처리된 DNA를 전기영동시켜 전기파장을 다각도에서 전달하여 절단된 DNA의 분절의 형태학적 양상을 비교하여 큰 DNA 분절(40~1,000kb)을 분리해 낼 수 있다. 이 방법은 우수한 감별력과 재현성을 가짐으로써 다양한 역학 관련 자료의 제공과 더불어 높은 유전적 상관관계를 제시함으로써 여러 유전학적 molecular typing 방식 중에서도 gold standard로 인식되고 있다(McPeck 등, 1986; Olson, 1989).

Tenover 등(1995)은 DNA 분절 양상을 분석하는 표준화된 체계를 제시하여 PFGE에 의한 분자유전학적 균형별 방법을 마련하고 세균별로 DNA를 처리하는 표준제한효소를 제시하였다. Allardet-Servent 등(1988)은 19종의 브루셀라 표준균주를 대상으로 low-cleavage-frequency restriction enzyme인 *Xba I*를 처리하여 적절한 반응조건하에서 PFGE를 실시한 결과 균종별로 구분된다고 보고하였다. Jensen 등(1999; 1995; 1996)은 해양포유류에서 분리한 브루셀라균을 대상으로 PFGE를 실시하여 브루셀라균간의 유전학적 연관성을 보고하여 야외분리주와 백신주인 RB51를 대상으로 DNA 분절양상을 관찰하여 다소의 분절양상의 차이점은 인정되나 유전학적으로 유사한 상관관계를 나타낸다고 보고하였다.

Ridler 등(2005)은 뉴질랜드의 사슴과 면양 농장에서 분리한 *B. ovis*를 대상으로 PFGE를 실시한 결과 두 개의 다른 유전학적 양상을 나타내었다고 보고하였다.

본 연구에서는 경북지방에서 브루셀라병에 걸린 소의 장기 및 혈액에서 분리한 *B. abortus* bv 1를 대상으로 PFGE를 실시하여 분자유전학적 수준의 DNA 다형태성을 관찰하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험균주

1998년부터 2006년까지 경북지방에서 발생한 소 브루셀라병으로 판정된 소에서 분리한 107주의 *B. abortus* bv 1과 백신주인 RB51주를 실험균주로 이용하였다.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

분리주의 molecular typing을 위해 다음과 같이 PFGE를 실시하였다. agarose plug의 구조, 세균의 용해, 제한효소의 처리, agarose gel의 구조, 전기영동의 실시, 염색, 상관관계 분석의 단계로 나누어 수행하였으며, 미국 질병통제센터(CDC)에서 운영중인 PFGE network인 'PulseNet'에서 사용되는 표준 실험법(2004)과 Ridler 등(2005)의 방법을 응용하여 실시하였다.

Agarose plug의 제작 및 균의 용해

분리주의 DNA 크기를 측정하기 위해 표준 DNA marker로써 국립보건연구원에서 분양받은 *Salmonella breanderup* ATCC BAA-664주를 사용하였다(Hunter 등, 2005). 미리 배양시킨 표준균주와 브루셀라균을 준비한 3ml의 cell suspension TE buffer (100mM Tris, 100mM EDTA, pH 7.5)에 넣고 VITEK colorimeter (Hatch[®], USA)로 15~20% (OD₆₁₀=1.35)의 탁도로 조정하여 균을 희석시켰다. Proteinase K (20mg/ml Sigma[®], USA) 10 μ l를 첨가한 micro-tubes에 균현탁액 200 μ l를 취하여 잘 섞은 후 동량(200 μ l)의 1.2% Seakem gold agarose (Cambrex[®], USA)를 첨가하여 균주당 2개의 plug mold (Bio-Rad[®], USA)에 분주하여 4°C에서 굳혀 agarose plug를 제작하였다.

Plug를 1.5ml ES buffer (0.5M EDTA, pH 9.0; 1% sodium-lauroyl-sarcosine)과 40 μ l proteinase K (20mg/ml)가 첨가된 2ml micro-tube에 넣어 55°C 진탕항온수조에서 3시간 동안 반응시켜 세균용해를 시킨 후 washing capsule에 옮겨 washing TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5)로 4회 세척하고 micro-tube에 1ml plug wash TE buffer를 분주하여 최종 세척한 plug를 넣고 4°C에서 냉장보관하였다.

제한효소의 처리

제작한 plug를 1~2mm 두께로 절단하여 *Salmonella breanderup* ATCC BAA-664주는 30U의 *Xba I* 제한효소로 처리하였고 브루셀라균은 균주당 30U의 *Xba I*, *Xho I* 및 *Smi I* (Takara[®], Japan) 제한효소를 제조사의 사용지침에 따라 각각 2시간 동안 진탕처리한 다음 microcentrifuge tube에 1ml plug wash TE buffer를 분주하여 제한효소 처리한 plug 절편을 전기영동 시까지 4°C에서 냉장보관하였다.

전기영동의 실시

처리한 plug 절편을 gel casting stand에 올려놓은 후 준비한 1% Seakem gold agarose를 분주하여 굳힌 다음 comb을 제거하고 빈 공간을 agarose로 채웠다.

전기영동용 용액은 0.5 \times TBE buffer를 이용하였으며, CHEF Mapper XA PFGE system (Bio-Rad[®], USA)의 electrophoresis chamber에 채운 후 냉각장치를 가동하여 14°C로 항시 조절하였다. 굳힌 gel을 elctrophoresis chamber로 옮긴 후 6V/cm, 120°, switch time 10.76~30.35초의 반응조건으로 20시간 동안 전기영동을 실시하였다.

전기영동 완료 후 ethidium bromide (10mg/ml, Bio-neer[®], Korea)를 0.5 μ g/ml로 조절한 500ml 멸균증류수에 30분간 염색하고 UV transilluminator상에서 DNA 분절을 확인한 후 멸균증류수로 2회 세척하고 사진촬영을 위해 화상장치(Gel Doc XR, Bio-Rad[®], USA)를 이용하여 촬영한 후 분석에 이용하였다.

Dendrogram에 의한 상관관계 분석

촬영한 gel 사진은 TIFF 그림화일로 전환하여 분석 프로그램인 Fingerprinting 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 표준 marker의 DNA 분절 lane에 기초하여 normalization하였다. 균주간의 clustering은 unweighted pair group method of average linkage (UPGMA)에 의해 dendrogram을 작성하였다.

결 과

본 실험에 사용한 *B. abortus* 야외분리주의 내역은 Table 1과 같다. 총 107주 중 1998년도 분리주가 3주, 2002년에서 2003년 사이의 분리주가 21주, 2006년 분리주가 83주였다. 브루셀라균의 molecular typing을 위해 제한효소 *Xho I*, *Xba I*과 *Smi I*으로 처리하고 PFGE를 실시하여 *B. abortus* 분리주의 DNA 분절 양상을 분석한 결과는 Fig. 1, 2 및 3과 같다. 제한효소처리한 후 PFGE를 거친 후 DNA 분절은 자동화상장치에서 관찰한 결과 분절 양상에 차이점이 발견되지 않을 정도로 유사하였으며 특히 *Xho I* 및 *Xba I*을 처리한 브루셀라균주는 분절의 양상을 분석할 수가 없었다. *Smi I*를 처리한 경우에는 *B. abortus*에서 DNA 분절 양상을 관찰하기 용이할 정도로 분별력이 있었고 1개의 뚜렷한 DNA 분절이 차이점이 있는 것으로 나타났으며, 분석 프로그램인 Finger-printing II Informatix software를 이용하여 분석한 결과 90% 이내의 유전적 상동성 수준에서 두 가지의 유전적 다형태성을 보였다(Fig. 4).

두 가지의 PFGE 양상을 나타낸 *B. abortus*를 대상으로 지리적, 시기적, 분리축종에 따른 유전적인 상관관계를 알아보기 위해 다양한 조건으로 dendrogram을 작성한 결과는 Fig. 5~8과 같다. 본 실험에서 분류된 2가지 유전적 양상은 분리연도, 분리지역, 분리축종과 크게 연관성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 5~8).

고 찰

세균에 대한 DNA 수준의 형별을 위해 여러 가지 방법이 널리 이용되고 있으며, 그중에서 PFGE법은 세균의 전체 염색체 DNA를 대상으로 제한효소를 처리하여 일반적으로 40에서 1,000kb의 DNA 분절을 염색된 gel상에 나타내어 분자형을 할 수 있는 'Gold standard'로 인식되어 널리 이용되고 있다. PFGE는 동일균주에

Table 1. *B. abortus* strain used in study

| Year of isolation | Breed | No. of isolates |
|-------------------|---------------|-----------------|
| 1998 | Holstein | 3 |
| 2002-2003 | Korean cattle | 10 |
| | Holstein | 11 |
| 2006 | Korean cattle | 80 |
| | Holstein | 3 |
| Total | | 107 |

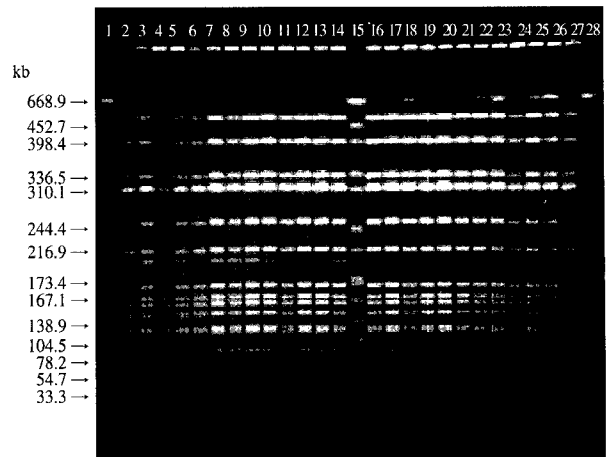


Fig. 1. PFGE of *Smi I* restriction fragments of *B. abortus* isolates. lane 1, 15, 28; PFGE marker, lane 2-14; *B. abortus* isolates, lane 16-27; *B. abortus* isolates.

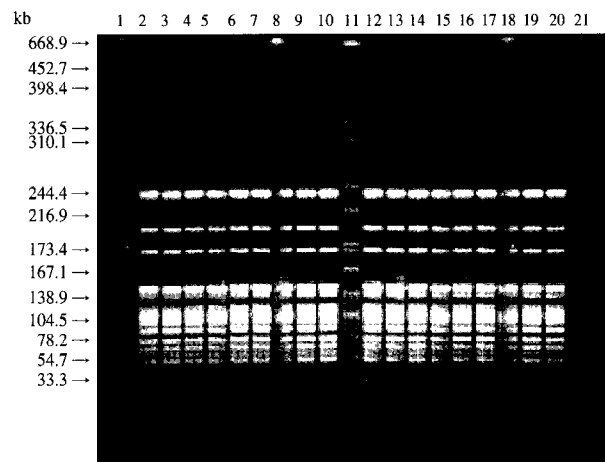


Fig. 2. PFGE of *Xba I* restriction fragments of *B. abortus* isolates. lane 1, 11, 21; PFGE marker, lane 2-10; *B. abortus* isolates, lane 12-21; *B. abortus* isolates.

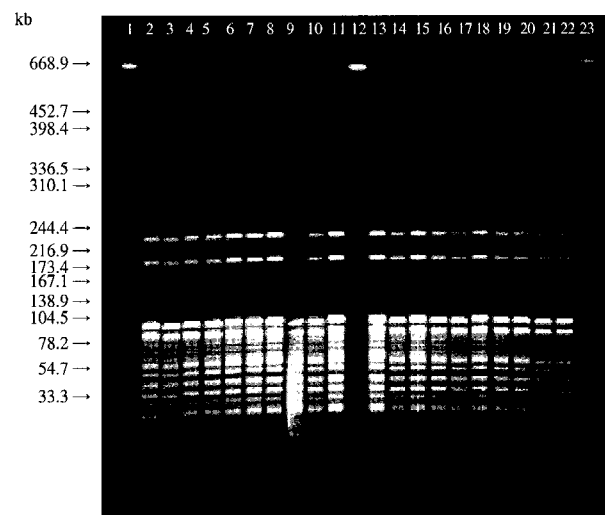


Fig. 3. PFGE of *Xho I* restriction fragments of *B. abortus* isolates. lane 1, 12, 23; PFGE marker, lane 2-11; *B. abortus* isolates, lane 13-22; *B. abortus* isolates.

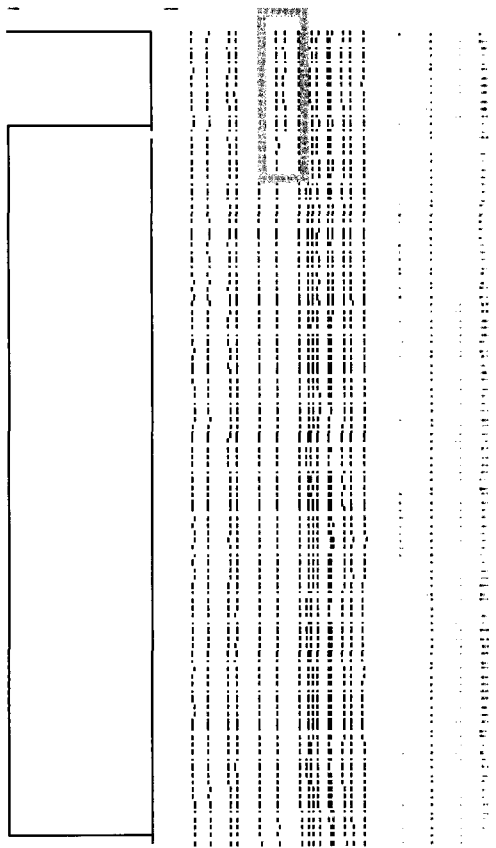


Fig. 4. Dendrogram of *B. abortus* isolated by PFGE pattern restricted *Smi I* (n=108).

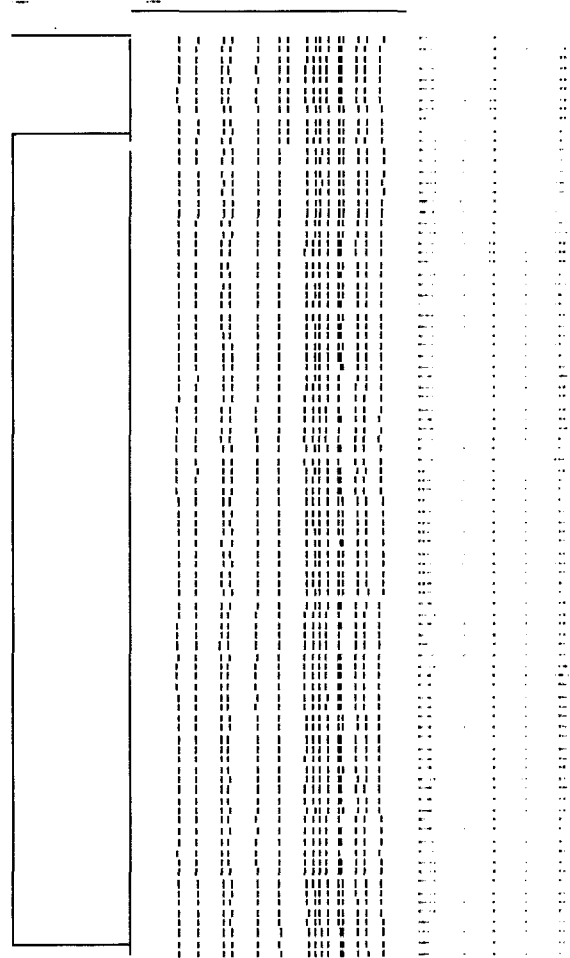


Fig. 5. Dendrogram of *B. abortus* isolated Korean indigenous cattle farms by PFGE pattern (n=90).

대해서 사용하는 제한효소의 종류, pulse 시간의 간격, 기종에 따라 다양한 형태의 분절양상을 나타낸다.

본 실험에서는 소에서 분리한 *B. abortus*의 유전학적 상관관계를 비교분석하기 위해 PFGE를 이용하여 유전자 수준에서의 브루셀라균의 상동성을 조사한 결과 DNA 분절 양상이 모두 동일하게 표출되어 *B. abortus*는 동일 종내에서는 같은 유전자형으로 분류되었다. 브루셀라균의 PFGE는 plug 제작 후 세포용해를 위해 1일간 lysis buffer에 정치시켰으나 본 실험에서는 시간 단축을 위해 1.5시간, 3시간, 6시간 24시간 등의 반응 시간을 주고 DNA의 용출을 확인한 결과 3시간 이상 적용한 경우에 브루셀라균체가 용해되어 DNA가 용출되어 제한효소 처리가 가능함을 알 수 있었다. 다만 같은 브루셀라균인 *B. canis*의 경우에는 1.5시간 경과 후에도 DNA가 용출됨을 확인되었으며, 이는 smooth형인 *B. abortus*의 균체외막의 membrane lipid 성분이 대장균 등 다른 그람 음성균에 비해 lysis buffer에 저항성이 있는 것으로 생각된다. Jensen 등(1999; 1995; 1996)이 해양포유류에서 분리한 브루셀라균과 기타

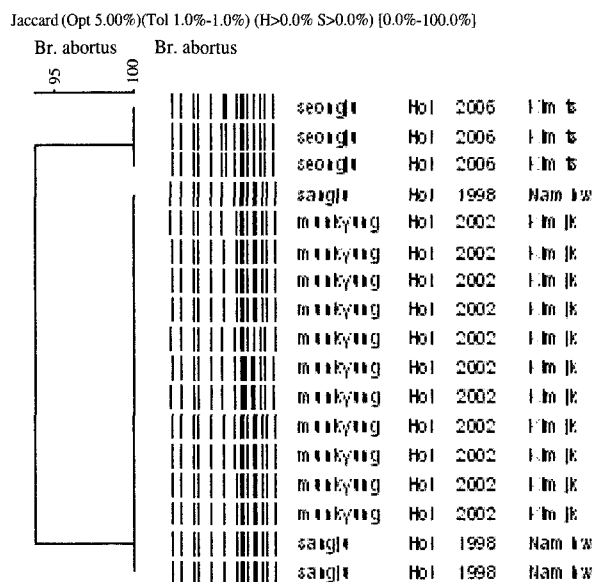


Fig. 6. Dendrogram of *B. abortus* isolated from holstein farms by PFGE pattern (n=17).

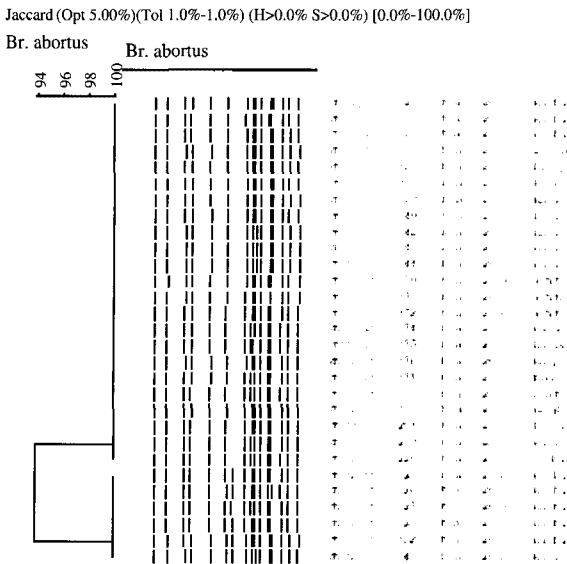


Fig. 7. Dendrogram of *B. abortus* isolates in Cheongdo county by PFGE pattern (n=29).

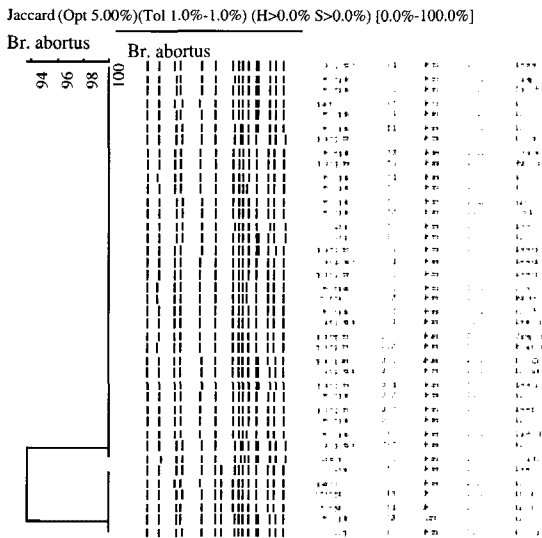


Fig. 8. Dendrogram of *B. abortus* isolated in 2006 year county by PFGE pattern (n=39).

브루셀라균을 대상으로 DNA 제한효소인 *Xba I*을 처리하여 비교분석한 결과 브루셀라균 간에 유전적인 상동성의 차이점이 있고, 백신균주인 RB51주와 기타 브루셀라균 간에도 DNA 분절양상에 차이점이 있다고 보고한 바 있으며, Allardet-Servent 등(1988)은 23주의 브루셀라균에 대해서 *Hind III*, *EcoR I*, *Not I*, *Sfi I*, *Xba I*의 제한효소를 각각 처리하여 PFGE한 결과 *Xba I* 제한효소를 처리하고 PFGE 실시한 경우에서 DNA 다형

태성을 확인하는 것이 용이하며, 브루셀라균속에서 DNA 분절양상이 차이가 있다고 보고하였다.

브루셀라균 동일종 내에서의 PFGE를 이용한 DNA의 다형태성에 대한 연구는 Ridler 등(2005)이 뉴질랜드의 면양과 사슴목장에서 분리동정한 *B. ovis* 12주를 대상으로 제한효소인 *Xba I*과 *Swa I*을 각각 처리하여 PFGE를 실시한 결과 *Swa I*을 처리한 균주에서 뚜렷한 두 가지의 DNA 분절양상을 나타내었다. 이는 브루셀라균 DNA의 guanine과 cytosine (G+C) 함량이 상대적으로 높으며, 사용한 제한효소인 *Swa I*은 목표유전자내의 G와 C가 결여된 유전자 부위(5'-ATTTAAAT-3')를 비주기적으로 절단하여 13~15개의 DNA 분절을 gel상에 나타내도록 하여 브루셀라균의 PFGE 실행시 제한효소로 사용하면 분자수준에서의 형별에 유용하다고 보고하였다.

본 실험에서는 소에서 분리한 107주의 *B. abortus*를 대상으로 *Xba I*, *Xho I* 및 *Smi I*으로 제한효소 처리하여 PFGE를 실시한 결과 gel상에서 확인되는 DNA 분절 양상이 *Xba I* 및 *Xho I*에서는 DNA 분절 양상을 분석하기가 어려웠고 거의 동일한 것으로 나타나 *B. abortus*의 유전적 상관관계를 분석하기 위한 제한효소의 선택으로 바람직하지 않은 것으로 생각되었다. 반면에 *Smi I*으로 제한효소 처리한 경우는 분절의 양상이 확연히 구별되고 일부 균주에서 새로운 DNA 분절이 확인되었으며 Fingerprinting II Informatix software에 의한 dendrogram을 작성해본 결과 93.75%의 유전적 상관관계를 나타내어 두 가지 형태로 분류되는 것으로 조사되었다. 분류된 두 가지 균형들은 지역적 또는 분리시기 및 분리축종에 따른 유사성은 발견되지 않았다. 본 실험에서 브루셀라균의 동일종 내에서 유전형별을 위해 PFGE을 이용한 결과로 볼 때 근소하나 마 다소의 차이가 인정된 것으로 보아 추가적으로 다른 여러 DNA 제한효소 처리에 따른 DNA 분절양상의 확인이 필요할 것으로 생각되고 또한 전기영동시 pulse 시간 등의 조건을 변경함에 따른 DNA 분절의 형태 변화에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 생각되고 추가적으로 보다 분별력이 높은 Multiple-Locus VNTR Assay (MLVA) 또는 Single nucleotide polymorphism (SNP) 등의 유전학적 분석방법에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

경북지방에서 분리한 *B. abortus* bv 1형 107주와 백신주인 RB51주를 대상으로 PFGE에 의한 유전형을 분석한 결과는 다음과 같다.

제한효소인 *Xba I*, *Xho I*, *Smi I*을 각각 처리한 결과 *Smi I*에서만 뚜렷한 DNA 분절의 구분이 가능하였다.

*Smi I*을 처리하여 전기영동한 후 균주간의 상관관계를 분석한 결과 93.75%의 유전적 유사성을 나타내어 두 개의 유전형으로 구분되었다.

역학적인 유사성을 조사하기 위해 연도별, 지역별, 축종별로 균주간의 유전적 상관관계와 비교한 결과 뚜렷한 차이점이 발견되지 않았다.

참 고 문 헌

- Alton GG. 1975. Laboratory techniques in brucellosis, 2nd Ed. WHO, Geneva: 11-63.
- Allardet-servent A, Bourg G, Ramuz M, Pages M, Bellis M, Roizes G. 1988. DNA polymorphism in strains of the genus brucella. *J Bacterol* 170(10): 4603-4607.
- Beran GW. 1994. Handbook of zoonoses, 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton: 9-39.
- Brenner DT, Kreig NR, Staley JT. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd Ed, Vol 2. Springer Press, New York: 370-389.
- CDC, Pulsenet. 2004. Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherchia coli* O157:H7, non-typhoidal salmonella sero-types, and *Shigella sonnei* by PFGE. <http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols>.
- Chain PSG, Comerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, Vergez LM, Aguero F, Land ML, Ugalde RA, Garcia E. 2005. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic brucellae. *Infect Immun* 73(12): 8353-8361.
- Chu G, Vollrath D, Davis RW. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234(4783): 1582-1585.
- Cloekaert A, Verger JM, Grayon M, Grepinet O. 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25kDa and 36kDa outer-membrane proteins of brucella. *Microbiology* 141(9): 2111-2121.
- Cloekaert A, Grayon M, Verger JM, Letesson JJ, Goifroid F. 2000. Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. *Res Microbiol* 151(3): 209-216.
- DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bha-ttacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R. 2002. The genome sequence of the facultative intracellular patho-gen *Brucella melitensis*. *PNAS* 99(1): 443-448.
- Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Marquis H. 1990. Genetic variation at the *omp2* porin locus of the brucellae: Species-specific markers. *Mol Microbiol* 4(7): 1135-1142.
- Foster G, MacMillan AP, Godfroid J, Howie F, Ross HM, Cloekaert A, Reid RJ, Brew S, Patterson IAP. 2002. A review of brucella sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet Microbiol* 90: 563-580.
- Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC. 2005. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* 187(8): 2715-2726.
- Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the pulsenet standardized pulsed-field gel electro-phoresis protocol: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol* 43(3): 1045-1050.
- Jensen AE, Cheville NF, Thoen CO, MacMillan AP, Miller WG. 1999. Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella* spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins. *J Vet Diagn Invest* 11: 152-157.
- Jensen AE, Cheville NF, Ewalt DR, Payeur JB, Thoen CO. 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.
- Jesen AE, Ewalt DR, Cheville NF, Thoen CO, Payeur JB. 1996. Determination of stability of *Brucella abortus* RB51 by use of genomic fingerprint, oxidative metabolism, and colonial morphology and differentiation of strain RB51 from *B. abortus* isolates from bison and elk. *J Clin Microbiol* 34(3): 628-633.
- Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. 1990. Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class proteobacteria. *J Bacteriol* 172(7): 3569-3576.
- Moreno E, Cloekaert A, Moriyon I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* 90(1): 209-227.
- McPeck FD, Coyle-Morris JF, Gemmill RM. 1986. Separation of large DNA molecules by modified pulsed field

- gradient gel electro-phoresis. *Anal Biochem* 156(2): 274-285.
- Nielsen K, Duncan JR. 1990. Animal brucellosis, CRC Press, Boston. 1-453.
- Olson MV. 1989. Separation of large DNA molecules by pulsed-field gel electrophoresis. A review of the basic phenomenology. *J Chromator* 470(2): 377-383.
- Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM. 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *PNAS* 99(20): 13148-13153.
- Ridler AL, Leyland MJ, Fenwick SG, West DM. 2005. Demonstration of polymorphism among *Brucella ovis* field isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet microbiol* 108: 69-74.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33(9): 2233-2239.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and infectious disease of domestic animals, 8th Ed. Cornell University Press, New York. 135-152.
- Verger JM, Grimmont F, Grimmont PA, Grayon M. 1985. Taxonomy of genus *brucella*. *Ann Ins Pasteur Microbiol* 138(2): 235-238.
- Verstrete DR, Winter AJ. 1984. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* 46(1): 182-187.
- Vizcaino N, Cloeckert A, Verger J, Grayon M, Fernandez-Lago L. 2000. DNA polymorphism in the genus *brucella*. *Microbes Infect* 2(9): 1089-1100.