

개 혈액 재료에서의 *Brucella* 검출을 위한 진단방법의 비교

권순오 · 람쑹광 · 허 문¹ · 안동춘² · 박상희³ · 박미연³ · 이영주⁴ · 한태욱*

강원대학교 수의과대학, ¹국립수의과학검역원, ²전북대학교 수의과대학,

³국립보건연구원, ⁴경북대학교 수의과대학

(접수 2009. 12. 7, 게재승인 2009. 12. 24)

Comparison of diagnostic methods for detection of *Brucella* species in dog blood samples

Soon-Oh Kwon, Truong Quang Lam, Moon Her¹, Dong-Chun Ahn², Sang-Hee Park³,
Mi-Yeoun Park³, Young-Ju Lee⁴, Tae-Wook Hahn*

College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-701, Korea

²College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

³National Institute of Health, Seoul 122-701, Korea

⁴College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received 7 December 2009, accepted in revised from 24 December 2009)

Abstract

Canine brucellosis produce abortions and infertility in dogs and is currently diagnosed by serological methods such as rapid slide agglutination test with 2-mercaptoethanol (2-ME RSAT) and immunochromatographic assay (ICA). Bacterial isolation is considered gold standard for *Brucella* diagnosis and the polymerase chain reaction (PCR) is an alternative method to bacterial isolation. A total of 36 whole blood samples were collected from dogs reared in area of Chuncheon and were subjected to serology (2-ME RSAT and ICA for *B. canis*, Rose Bengal test and C-ELISA for *B. abortus*), blood culture and 3 types of PCRs (BCSP31, 16S rRNA, and OMP-2). All blood samples were negative by serology and blood cultures. The BCSP31 and the OMP-2 PCR detected 5 samples were positive whereas the 16S rRNA PCR detected all samples were negative as serological methods and blood culture did. From the results observed in the present study, we conclude that 16S rRNA PCR could be used for direct PCR for canine blood samples.

Key words : *Brucella*, Dog, Blood sample, PCR, BCSP31, 16S rRNA, OMP-2

서 론

브루셀라증은 인간과 동물 모두에 감염되는 인수공통 전염병으로 심각한 경제적, 공중 보건학적인 문제를 일으킨다. 이 질병은 *Brucella*라는 세균에 의한 질

병으로 소, 양, 돼지, 말, 염소, 개 등에서 종 특이적으로 감염을 일으키나 *Brucella* 종들 중에 사람에게 감염되는 브루셀라증의 원인체로는 *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* 등이 있다. 사람에서 *B. canis*의 감염은 때때로 의사나 실험실 연구자들에서 보고되었다 (Blankenship과 Sanford, 1975; Hoff와 Nichols, 1974; Lucero 등, 2005; Tosi와 Nelson, 1982; Wallach 등,

*Corresponding author: Tae-Wook Hahn, Tel. +82-33-250-8671,
Fax. +82-33-244-2367, E-mail. twahn@kangwon.ac.kr

2004).

개 브루셀라증은 임신견의 임신 후반기의 유산과 사산을 일으키며 번식 사육장에서 동정되고 있어 한국의 크고 작은 개 사육 시설에서 주요한 경제적 손실의 원인이 되고 있으며 사람감염의 위험을 초래하고 있다(박 등, 1999; 오와 박, 2001). 하지만 주요 임상증상인 유산 외에 다른 증상은 모호하며 특히 감염 수개월은 고환염, 전립선염 같은 증상이 있기도 하지만 대다수가 임상적으로 정상으로 보이는 경우가 많아 개 브루셀라증의 진단이 쉽지 않다.

브루셀라증 진단을 위한 혈청학적 검사들로서 rose bengal test (RBT), rapid screening agglutination with 2-mercaptoethanol (2-ME RSAT), 시험관내 응집반응, 한천겔 면역확산법들이 가장 보편적으로 사용되어져 온 방법들이다(Carmichael 등, 1984; Kim 등, 2007; Lopez 등, 2005). 하지만 이러한 항체를 측정하는 진단 방법들은 낮은 민감도 때문에 감염초기에 만족스럽지 못하며 혈청학적 교차반응, 치료 후의 항체의 지속으로 인해 최근감염을 정확히 구분하지 못하는 단점이 있었다. 혈액배양을 통한 병원체의 분리가 gold standard로서 가장 확실한 방법이기도 하나 민감도가 15~70%밖에 되지 않는 단점이 있다(Alton 등, 1975; Young 1997). 진단법으로서의 polymerase chain reaction (PCR)은 세균 배양보다 더 예민한 방법이며 혈청학적인 방법들보다 더 특이성이 높아 많은 병원체의 진단에 사용되어 왔다(Cogswell 등, 1996; Thomsen 등, 1999). *Brucella* 진단에서도 여러 PCR 방법들이 보고

되었으며(Baily 등, 1992; Fekete 등, 1990; Herman과 Ridder, 1992; Leal-Klevezas 등, 1995; Romero 등, 1995a), 지금까지 동물(Leal-Klevezas 등, 1995; Fekete 등, 1992; Romero 등, 1995b)과 사람(Leal-Klevezas 등, 1995; Queipo-Ortuno 등, 1997; Zerva 등, 2001)의 검사 재료에서 여러 PCR 방법들이 적용되고 있다.

이 연구에서는 개에서 채취한 혈액을 사용하여 *Brucella* 진단에 가장 많이 사용되고 있는 세 종류의 PCR을 적용하였다. 또한 PCR결과를 세균배양 검사 및 다른 혈청학적 검사 결과와 비교하였다. 실험에 사용된 PCR 방법들은 B4/B5 primer를 이용하여 *Brucella* cell surface protein 31kDa 부위를 증폭시키는 PCR (BCSP PCR (Baily 등, 1992), F4/R2 primer를 이용하여 균의16S rRNA 서열부위를 증폭시키는 PCR (16S rRNA PCR, Romero 등, 1995a), 그리고 JPF/JPR primer를 이용하여 outer membrane protein 부위를 증폭시키는 PCR (omp-2 PCR, Leal-Klevezas 등, 1995)을 실시하여 이들의 결과를 비교하였다.

재료 및 방법

사용 균주

B. canis (ATCC23365)를 1.5% sheep blood 첨가 Trypticase soy agar에 접종한 뒤 37°C, 5% CO₂에서 2일간 배양한 뒤 집락을 PBS로 현탁하여 genomic DNA

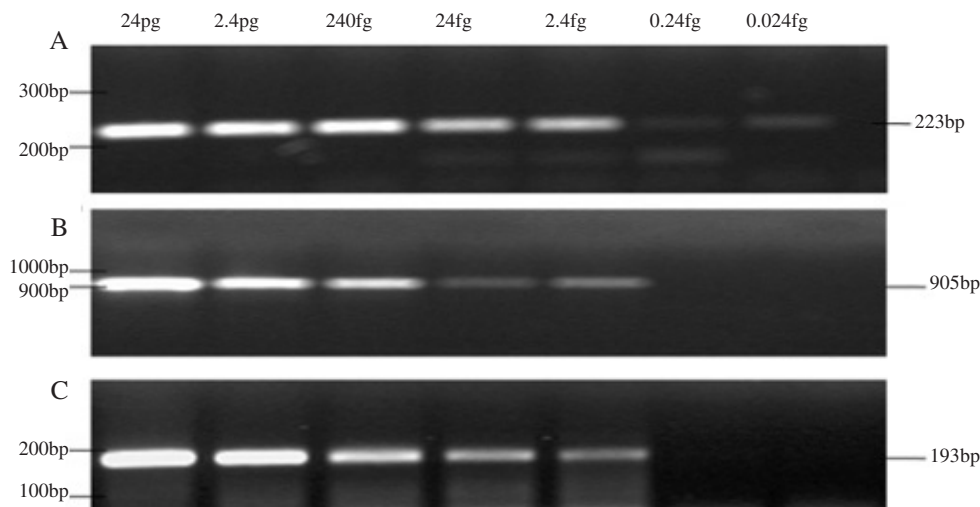


Fig. 1. Sensitivity of three different PCR assays for detection of *B. canis*. The indicated amounts of purified *B. canis* DNA were diluted by serial dilutions with distilled water and then amplified. A, BCSP31, B, 16SrRNA, C, OMP-2. The 223-bp, 905-bp, and 193-bp PCR products are indicated.

Table 1. Primer sequences and conditions used for PCRs in this study

	BCSP31	16S rRNA	OMP-2
Forward primer	B4 5'-TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA-3'	F4 5'-TCG AGC GCC CGC AAG GGG-3'	JPF 5'-GCG CTA AGC CTG CCG ACG CAA-3'
Reverse primer	B5 5'-CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG-3'	R2 5'-AAC C AT AGT GTC TCC ACT AA-3'	JPR 5'-ACC AGC CAT TGC GGT CGG TA-3'
PCR condition denaturation	95°C, 20sec	94°C, 1min	94°C, 1min
Annealing	60°C, 30sec	60°C, 1min	60°C, 1min
Extension	72°C, 1min	72°C, 1min	72°C, 1min
Product size	223bp	905bp	193bp
Reference	Baily et al.(1992)	Romeo et al.(1995)	Leal-Klevevas et al.(1995)

분리 kit (Gentra Puregene Yeast/Bacteria kit, Qiagen, USA)을 이용하여 DNA를 추출하였다.

혈액 시료

혈액 샘플은 강원도 춘천시 부근에 사육하는 개에서 채혈하였다. 21개 혈액은 2007년 춘천 군견훈련소에서 사육 후 강원대로 기증된 개에서 채혈하였고, 8개의 혈액은 2009년 유기견 센터에서 분양 받은 개에서, 7개의 샘플은 강원대학교 동물병원에서 사육하는 개에서 채혈하였다(총 36개의 샘플). 3ml의 혈액을 채혈하였고 2개의 튜브로 나누어 하나는 세균 배양용으로, 다른 하나는 3000~4000rpm으로 15분 원심분리하여 상층액은 혈청학적 진단용으로, 침전물은 DNA 추출용으로 각각 사용하였다.

혈청학적 진단

*B. canis*에 대한 혈청학적 검사는 2-ME RSAT와 immunochromatographic assay (ICA)를 하였다. *B. canis*의 M(-) strain을 이용한 2-ME RSAT의 항원은 국립수의과학검역원에서 항원을 분양받아 Carmichael과 Joubert(1987)의 방법에 따라 실험하였다. ICA는 Mateau-de-Antonio 등(1993)의 방법에 따라 만들어 놓은 Rapid C. *Brucella* Ab test kit (Anigen, Korea)를 사용하였다.

*B. abortus*를 위한 혈청학적 검사로서 *B. abortus* 항원을 사용하는 RBT와 *B. abortus*와 *B. melitensis* 항원을 사용하는 *Brucella*-Ab C-ELISA (Svanova, Sweden)를 제조회사의 첨부된 방법에 따라 실험하였다.

혈액 배양

채혈된 샘플들을 3,000~4,000rpm으로 원심분리하여 침전물을 균 배양에 사용하였다. 침전물을 5% bovine serum이 포함된 Tryptic soy broth(BD, USA)에 분주해서 11일간 37°C 5~10% CO₂ 배양기에서 배양한 후 Neutral red (0.03g/L), I-erythritol (1.0g/L), 항생제 (bacitracin 25units/ml, azotrenam 5µg/ml, nalidixic acid 5µg/ml, vancomycin 20µg/ml, amphotericin B 2.5µg/ml, nystatin 100units/ml)가 포함된 Tryptic soy broth agar (TSA without glucose, BD)에 도말 접종 한 후 37°C 5~10% CO₂ 배양기에서 3~5일간 배양하였다. 배지에서 자란 집락을 백금으로 채취하여 5% bovine serum이 포함된 TSA agar에 계대하여 증균시켜 oxidase, catalase, urease 검사와 이번 실험에서 사용된 세 가지 primer를 이용한 PCR로 확인하였다.

개 혈액 시료에서의 DNA 추출

Genomic DNA Extraction Kit[®] (RBC, Taiwan)를 사용하여 혈액으로부터 제조회사에서 제공한 방법에 따라 Genomic DNA를 추출하였다.

PCR

Brucella 진단을 위해 사용한 세가지 PCR의 primer와 조건 및 PCR product의 예상 크기는 Table 1에 기술하였다.

Navaro 등(2002)의 방법에 따라 모든 PCR은 총 용량 25µl에서 행해졌고 primer와 구성성분들의 농도는 기존의 보고를 약간 변형하여 선택하였다. Reaction

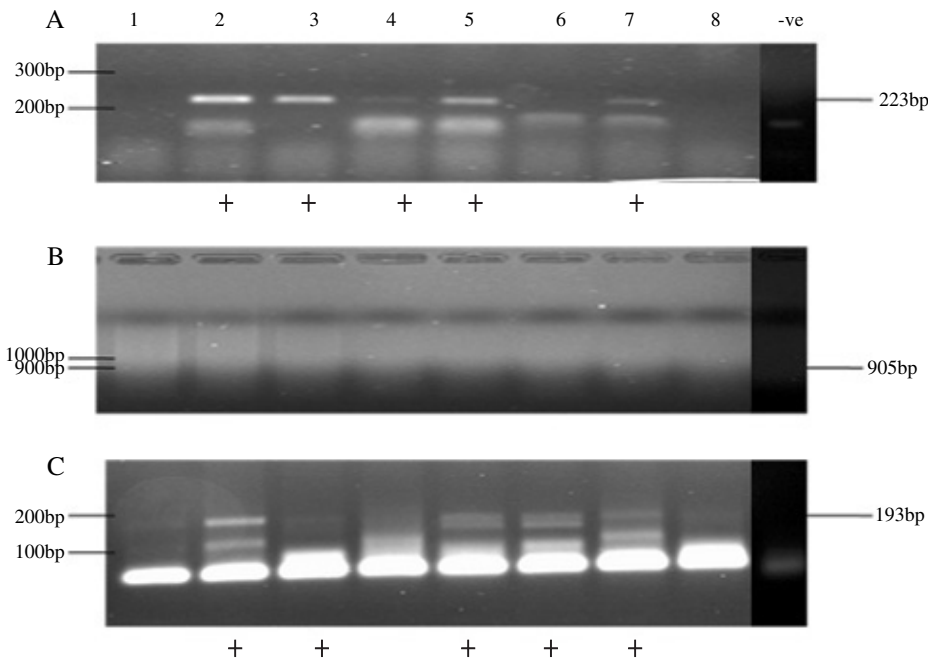


Fig. 2. Representative results of BCSP31, 16S rRNA and OMP-2 in blood samples from dogs. BCSP31 and OMP-2 had some positive results which were all negative in serology and blood culture. And 16S rRNA results were all negative. Lanes 1 to 8 are blood samples clinically collected from dogs. The 223-bp, 905-bp and 193-bp PCR products are indicated.

buffer로는 Flexi buffer (Promega, USA) 5 μ l, 1.5mM MgCl₂ 1 μ l, 250uM dNTPs 0.5 μ l 그리고 1U *Taq* polymerase 0.5 μ l를 혼합하였다. Primer는 각각 50 pmole씩을 첨가하였고 template로 사용한 DNA는 1 μ l씩을 첨가한 후, DNA thermal cycler (PTC-100, MJ Research)를 사용하여 PCR을 실시하였다. BCSP31 PCR의 경우 95°C로 5분간 initial denaturation 시킨 후 40 cycle을 실시한 후(90°C에서 20초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension) 마지막 7분간 72°C에서 final extension 시켰다. 16S rRNA PCR은 94°C로 5분간 initial denaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension으로 40cycle을 실시한 후 마지막 3분간 72°C에서 final extension을 하였다. OMP-2 PCR 반응은 94°C로 5분간 initial denaturation을 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 40cycle 실시한 후 마지막 3분간 72°C에서 final extension 시켰다.

Negative control로서는 template DNA 대신에 해당하는 양만큼의 멸균 3차 증류수를 첨가하였다. 증폭 반응을 시킨 후 ethidium bromide로 염색시킨 1% agarose gel로 전기영동을 실시 하였으며 DNA bands는 UV light 아래에서 image analyzer를 이용하여 촬영하였다.

Table 2. Seroprevalence and direct PCR results of blood samples from dogs

Serology	2-ME RSAT (<i>B. canis</i>)	0/36
	Rapid kit (<i>B. canis</i>)	0/36
	RBT (<i>B. abortus</i>)	0/36
	C-ELISA (<i>B. abortus</i> & <i>B. melitensis</i>)	0/36
Isolation	Blood culture	0/36
Direct PCR	BCSP31	5/36 (13.9%)
	16S rRNA	0/36
	OMP-2	5/36 (13.9%)

PCR의 민감도 비교 검사

세 가지 종류의 PCR의 민감도(sensitivity)를 비교하기 위해 *B. canis*의 DNA를 정량적으로 측정된 후 단계 희석한 DNA를 template로 이용하여 PCR을 실시한 후 PCR product가 검출되는 범위를 비교하였다.

결 과

개 혈액에서 *Brucella* 감염을 진단하기 위해 BCSP31, 16S rRNA 및 OMP-2를 증폭시키는 세가지 종류의 PCR을 실시하여 비교하였으며 이러한 PCR결과와 세균 분리 및 혈청학적 검사 결과를 비교하였다.

우선 세가지 종류의 PCR의 민감도를 *B. canis* DNA를 template로 사용하여 측정하였다. Fig. 1에서 나타난 것 같이 BCSP31 PCR의 경우 223bp, 16S rRNA PCR의 경우 905bp, OMP-2 PCR의 경우 193bp크기의 PCR 증폭 산물이 증폭되어 기존의 보고와 일치하였다. BCSP31 PCR의 민감도는 약 0.024fg까지 희석된 DNA template에서 PCR 산물이 검출된 반면, 16S rRNA 및 OMP-2 PCR에서는 2.4fg의 template DNA가 함유된 PCR에서 증폭 산물이 검출되어 BCSP31 PCR이 다른 두 종류의 PCR보다 높은 민감도를 나타냈다(Fig. 1).

총 36개의 혈액 샘플을 가지고 상기에 언급한 세가지 PCR과 세균 배양검사 및 혈청학적 검사 결과를 비교하였다. Table 2에서 나타난 바와 같이 36개의 혈액 재료는 혈청학적 검사 결과 및 세균 배양 검사 결과 모두 음성으로 나타났다. 그러나 BCSP31과 OMP-2 PCR 결과 각각 5/36 (13.9%)가 양성으로 검출된 반면 16S rRNA PCR의 경우 모두 음성으로 나타나 혈청검사 결과와 세균 배양 결과와 일치하였다(Table 2, Fig. 2).

고 찰

브루셀라증 진단법으로는 전통적으로 많은 혈청학적 검사들이 사용되어 왔지만 높은 의양성 또는 위음성 때문에 세균배양이나 PCR같은 직접적인 브루셀라증 검사 방법들의 개선이 요구되어 왔다(Keid 등, 2009; Navarro 등, 2002). 감염초기의 균혈증은 순환항체의 형성 이전에 일어날 수 있으므로 혈청학적 검사들의 위음성을 설명할 수 있다. *Brucella* 균을 분리하기 위해 주로 이용되는 검사재료는 유즙, 질 분비물, 혈액, 유산태아 등이며, 축종 별로는 균 분리를 위해 소에서는 상유방립프절을 가장 많이 이용하고, 돼지에서는 악하림프절이 많이 이용되며, 개에서는 1년 이상의 균혈증을 나타내는 특성을 고려하여 혈액을 채취하여 균 분리에 많이 이용하고 있다(김 등, 2009; Alton 등, 1975). 그러나 균 분리 역시 특이도가 낮아 보다 민감하며 특이도가 높은 *Brucella* DNA 검출을 위한 여러 PCR 방법들이 개발되어 왔다. 그중 이 연구에서 사용하는 세가지 PCR방법이 사람과 동물의 브루셀라 진단에 주로 이용되어 왔고 이 세가지 PCR을 비교하는 연구도 보고되었다(Navarro 등, 2002). 하지만 *B. canis*를 이용한 이들 세가지 PCR의 비교에 대한 보고가 없었으므로 본 연구에서는 *B. canis* DNA를 이용해 세 가지 다른

PCR 방법들의 민감도를 비교해 보았다. 이 연구에서 얻어진 세가지 PCR의 민감도는 기존의 보고와는 약간 다르게 나타났다. Navarro 등(2002)의 연구에서는 16S rRNA, BCSP31, OMP-2 PCR의 순으로 민감도가 높게 나왔는데 이 실험 결과에서는 BCSP31 PCR의 민감도가 가장 높게 나왔고 16S rRNA와 OMP-2 PCR에서는 비슷한 민감도를 보였다. 이러한 차이는 PCR에 사용되는 dNTPs, MgCl₂, Taq polymerase 농도 등의 PCR 조성과 조건이 기존의 보고와 조금 다르기 때문이라 사료된다. 그리고 기존의 보고는 *B. abortus*와 *B. melitensis* DNA를 이용한 실험이었으나 이번 실험은 *B. canis*를 이용한 점도 영향이 있으리라 판단된다.

개 브루셀라증은 주로 *B. canis*에 의해서 야기되지만, 그 외에 *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*에 의한 감염도 보고된 바도 있어(John 등, 1988; Gary, 1964), *B. abortus*에 의한 감염여부를 알아보기 위한 검사도 실시하였다(*B. abortus* 항원을 이용한 Rose Bengal Test (RBT)와 *B. abortus*와 *B. melitensis* 항원을 사용한 C-ELISA). 2-ME RSAT와 ICA를 사용해 *B. canis*를 검사한 결과 모두 음성이 나왔고 RBT와 C-ELISA를 사용한 *B. abortus*와 *B. melitensis* 검사 결과, 모두 음성이 나왔으며 세균 배양 역시 모두 음성으로 확인 되어 모든 샘플에서 브루셀라증 음성임을 알 수가 있었다. 이렇게 낮은 음성률은 샘플대상이 된 개들이 비교적 위생적인 환경에서 자랐으며 번식과 상관 없는 개들이어서 *Brucella*균에 노출될 가능성이 적었기 때문으로 사료된다. 이는사육장에서 기르는 개들을 제외한 집안의 개들과 유기견들에서의 발생률에 대한 보고가 없는 것(Bae와 Lee, 2009; 오와 박, 2001)과 일치하는 결과였다. 그러나 개 혈액 샘플에서 추출한 DNA를 이용해 direct PCR을 해본 결과 B4/B5 primer를 사용한 BCSP31 PCR에서는 36개의 샘플 중 5개의 양성(13.9%)을 보였고 JPF/JPR primer를 사용한 OMP-2 PCR에서도 5개의 혈액이 양성(13.9%)을 보였다. 두 종류의 PCR에서 의양성이 나온 각각의 5개 샘플들 중 한 샘플만을 제외하고 나머지 4개 샘플들은 동일한 혈액 샘플들로 상당히 높은 일치도를 보임을 알 수 있었다(Cohen's Kappa=0.77). 하지만 F4/R2 primer를 사용한 16S rRNA PCR은 36개의 혈액 샘플 모두 음성의 결과가 나와 혈청학적 검사와 세균 배양 검사와 일치하였다. 이로 미루어 보았을 때 BCSP31과 OMP-2 PCR의 민감도는 높은 편이나 혈액 샘플을 이용한 direct PCR법에서는 의양성이 많이 나오는 것을 알 수 있었다. 본

연구에서는 16S rRNA PCR이 다른 검사 결과와 일치하여 특이도가 높은 것으로 밝혀져 Navarro 등(2002)의 연구 결론에서 16S rRNA를 가장 유용한 방법으로 결론 내린 것과 일치하였다.

비록 이 연구에서는 혈청학적 검사 보다 direct PCR에서 약간의 의양성이 나왔지만 균혈증이 오래 지속되어 혈액에서 *Brucella*균을 검출할 수 있는 개 혈액 샘플에서의 PCR 활용이 반드시 필요하므로 특이도가 높은 16S rRNA PCR 사용이 바람직하다고 사료된다.

결 론

브루셀라증을 진단하기 위해서는 혈청학적 검사법과 균 분리 및 동정과 PCR법을 많이 이용하고 있다. 특히 개의 경우 유사산 및 생식기계 이상을 제외하고는 임상적으로 정상을 보이는 경우가 많아 정확한 진단이 쉽지 않다. 이 연구에서는 강원도 지역에서 사육된 개의 혈액을 사용하여 Rose Bengal test, rapid screening agglutination with 2-mercaptoethanol, immuochromatographic assay, Brucella-Ab C-ELISA의 혈청학적 검사와 균분리 및 세가지 PCR (BSCP, OMP-2, 16s rRNA)을 실시하여 각 진단법을 상호 비교하였다. 총 36개의 개의 혈액재료 중 혈청학적 검사는 모두 음성으로 나타났다. 또한 혈액을 사용한 균 분리동정도 모두 음성으로 나왔다. 혈액에서 직접적인 PCR을 실시하기 위해 우선 세가지 종류의 PCR의 민감도를 조사한 결과, BCSP31 PCR은 0.024fg의 DNA까지 검출할 수 있는 반면, 16S rRNA와 OMP-2 PCR에서는 2.4fg의 DNA까지 검출하여 BSCP31 PCR이 다소 높은 민감도를 나타냈다. 그러나 36개의 개 혈액에서 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 한 결과 BSCP31과 OMP-2 PCR은 5개(13.9%)의 혈액재료에서 특이적인 밴드를 검출한 반면 16S rRNA PCR에서는 모두 음성으로 나타나 16S rRNA PCR이 혈청검사결과와 세균배양결과와 일치하였다. 따라서 개 혈액을 대상으로 직접 PCR을 실시할 경우 비특이적인 반응이 있음을 고려하여 단일 방법보다는 여러 방법을 사용하는 것이 진단의 정확성을 높일 수 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

김성국, 김영환, 조민희, 이영주, 박창규. 2009. 경북지방 소에서

분리된 *Brucella abortus*의 생화학적 특성. 한국가축위생학회지 32(2): 139-146.

박인철, 강병규, 문진산, 박용호, 오기석, 이채용, 정석찬. 1999. 전남지방의 소형견 번식장으로부터 발생한 canine brucellosis. 대한수의학회지 39(6): 1099-1105.

오지연, 박창규. 2001. 대구지역 개의 *Brucella canis* 감염에 대한 세균학적 및 혈청학적 조사. 대한수의학회지 41(1): 67-71.

Alton GG, Jones LM, Piet DE. 1975. Laboratory techniques in brucellosis. 2nd Ed. WHO, Geneva: 11-63.

Bae DW, Lee YJ. 2009. Occurrence of canine brucellosis in Korea and polymorphism of *Brucella canis* isolates by infrequent restriction site-PCR. *Korean J Vet Res* 49(2): 105-111.

Baily GC, Krahn JB, Drasar BS, Stokeer NG. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 95(4): 271-275.

Blankenship RM, Sanford JP. 1975. *Brucella canis*. A cause of undulant fever. *Am J Med* 59(3): 424-426.

Carmichael LE, Joubert JC. 1987. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell vet.* 77(1): 3-12.

Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R. 1984. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: Dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Dev Biol Stand* 56: 371-383.

Cogswell FB, Bantar CE, Hughes TG, Gu Y, Philipp MT. 1996. DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 34(4): 980-982.

Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. 1990. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 69(2): 216-227.

Fekete A, Bantle JA, Halling SM. 1992. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J Vet Diagn Invest* 4(1): 79-83.

Gary A. 1964. Infectious disease of domestic animal 3th. Iowa state university press.

Herman L, De Ridder H. 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58(6): 2099-2101.

Hoff GL, Nichols JB. 1974. Canine brucellosis in Florida: Serologic survey of pound dogs, animal shelter workers and veterinarians. *Am J Epidemiol* 100(1): 35-39.

John FT, James HG, Fredric WS, Jeffrey E. 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. Barlough. 8th ed.

Keid LB, Soares RM, Vasconcellos SA, Megid J, Salgado VR, Richtzenhain LJ. 2009. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Res Vet Sci* 86(1): 22-26.

- Kim JW, Lee YJ, Han MY, Bae DH, Jung SC, Oh JS, Ha GW, Cho BK. 2007. Evaluation of Immunochromatographic assay for serodiagnosis of *Brucella canis*. *J Vet Med Sci* 69(11): 1103-1107.
- Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Martinez-Soriano JP. 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 33(1): 3087-3090.
- Lopez G, Ayala SM, Escobar GI, Lucero NE. 2005. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* 105(3-4): 181-187.
- Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol* 54(5): 457-461.
- Mateau-de-Antonio EM, Martin M, Soler M. 1993. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. *Am J Vet Res* 54(7): 1043-1046.
- Navarro E, Escribano J, Fernandez JA, Solera J. 2002. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34(2): 147-151.
- Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocón P, Manchado P, Colmenero JD. 1997. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 35(11): 2927-2930.
- Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. 1995a. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 33(3): 615-617.
- Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Blasco JM, Lopez-Goni I. 1995b. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J Clin Microbiol* 33(12): 3198-3200.
- Thomsen VO, Kok-Jensen A, Buser M, Philippi-Shulz S, Burkardt HJ. 1999. Monitoring treatment of patients with pulmonary tuberculosis: Can PCR be applied? *J Clin Microbiol* 37(11): 3601-3607.
- Tosi MF, Nelson TJ. 1982. *Brucella canis* infection in a 17-month-old child successfully treated with moxalactam. *J Pediatr* 101(5): 725-727.
- Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, Fossati CA. 2004. Human infection with M-strain of *Brucella canis*. *Emerg Infect Dis* 10(1): 146-148.
- Young EJ. 1997. Especies de *Brucella*. In: Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Mandell, Bennett and Dolin, Eds. Médica panamericana, Buenos Aires 2300-2307.
- Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. 2001. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol* 39(4): 1661-1664.