

## 소 브루셀라병 진단용 고면역원성 항원의 추출과 검증

배재형\* · 조상래 · 정은희 · 장은희 · 김성은 · 권희녕 · 박동엽 · 이국천  
경남 축산진흥연구소 중부지소

(접수 2010. 4. 9, 게재승인 2010. 6. 14)

### Extraction and verification of highly immunogenic antigen for diagnosis of bovine brucellosis

Jae-Hyung Bae\*, Seong-Eun Kim, Sang-Rae Jo, Eun-Hui Jeong,  
Eun-Hui Jang, Hui-Nyeong Kwon, Dong-Yeop Park, Kuk-Cheon Lee

Central branch of Gyeongnam Livestock Veterinary Promotion Research Institute, Kimhae 621-833, Korea

(Received 9 April 2010, accepted in revised from 14 June 2010)

#### Abstract

Bovine brucellosis, an important zoonosis, is diagnosed with serological tests such as the RBT, TAT using inactivated whole bacterial cells or bacterial lipopolysaccharide (LPS) antigen in Korea. However, a strong cross-reaction between *Brucella* spp. and *Yersinia enterocolitica* O9 in these tests has seriously complicated the diagnosis of animal brucellosis because *Brucella* spp. shares common antigenic determinants with *Y. enterocolitica* O9 in the smooth LPS region. In this study, *Brucella*-field strains were isolated from *Brucella*-positive Hanwoo in Kimhae, Korea and outer membrane protein (*omp*) which has low cross-reaction with *Y. enterocolitica* O9 and high immunogenicity was extracted from the field strains. Then we compared ELISA using the extract with RBT-TAT. Fifteen field strains were isolated from 47 supramammary-lymph nodes, which were collected from 18 farms. Isolation rate was 32%. *Brucella*-specific antigen was identified by performing SDS-PAGE or Western blotting on extracted *omp* with at 0.5% *n*-lauroylsarcosine. One hundred and ninety-two serum-samples were used in the experiment: 142 negative and 50 positive samples verified by RBT-TAT. According to ELISA results, 127 samples were negative and 15 appeared positive among 142 negatives by RBT-TAT, while 42 samples were positive and 8 were negative among 50 positives by RBT-TAT. Therefore, it showed 89.4% of specificity and 84% of sensitivity. Through the current experiments, we could set up an ELISA based on the *omp* which has low cross-reaction and high immunogenicity and concluded that the *omp* could be a good material for accurate diagnosis of bovine brucellosis.

**Key words** : Bovine brucellosis, AMOS PCR, *omp*-extracts

#### 서 론

*B. abortus*에 의해 야기되는 소 브루셀라병은 국내에서 가축전염병예방법에 의한 제 2종 가축전염병으로

분류되어 있으며, 주요 임상증상으로 암소에서는 불임, 숫소에서는 고환염, 부고환염, 전립선염 등의 생식기장애를 일으킨다. 동시에 사람에서는 파상열을 특징으로 관절통, 발한 등의 증상으로 일으키는 전염병예방법상 제 3군 법정전염병에 속하는 공중보건학상 매우 중요한 인수공통전염병 중의 하나이다(김, 2007; Harris 등,

\*Corresponding author: Jae-Hyeong Bae, Tel. +82-55-211-5770,  
Fax. +82-55-211-5779, E-mail. bjh1230@korea.kr

1949; 임 등, 2005; 손 등, 1986; 김 등, 1982; 윤 등, 2006).

국내 브루셀라감염증은 1995년 미국에서 도입된 젖소에서 최초로 보고된 이래 매년 지속적으로 발생하고 있으며, 한육우 및 젖소에서 20,000건 이상, 인체에서는 200건 이상의 감염사례가 보고되고 있다. 소 브루셀라병 근절을 위하여 가축전염병예방법에 의한 혈청학적 검사를 통한 양성축 도살(test and slaughter) 방법이 이용되고 있으며, 소브루셀라병 진단 및 살처분보상금 등으로 막대한 경제적 손실을 일으키고 있다(김, 2007; 임 등, 2005; 윤 등, 2006).

소 브루셀라병의 경우 감염되더라도 임상적으로 정상적인 경우가 많기 때문에 임상증상만으로 진단을 내리기는 적합하지 않으며, 유방상립프절, 태반, 양수 등에서의 직접적인 원인균 분리동정이나, *Brucella* 항원에 특이 세포 매개성 또는 혈청학적 반응을 통하여 검사할 수 있다. 그러나 조직 등에서의 원인균 분리동정은 많은 시간과 노력이 요구되며 50% 이하의 민감도를 나타내고, 혈청학적인 검사 방법의 경우 국제수역사무국(Office International des Epizooties, OIE)에 따르면 진단 방법의 선택에 따라 양성 검출률에 상당한 차이가 있다고 보고되고 있다(OIE, 2004). OIE에서는 혈청학적 진단법으로 Rose-Bengal test (RBT), Buffered plate agglutination test, complement fixation test, ELISA, fluorescence polarisation assay 등이 소개되고 있는데, 이들 혈청학적 진단방법들은 스크리닝 검사로 적합하며, 역학적인 상황 하에서 단일진단방법의 적용은 적합하지 않으며 2종 이상의 진단법을 병행하여 사용하여야 한다고 말하고 있다(Muma 등, 2007; OIE, 2004).

소브루셀라병 진단을 위하여 국내 가축방역기관에서는 “소 브루셀라병 표준방역지침”에 따라 1차 스크리닝 검사로 RBT, 민감도 81.2%, 특이도 86.3%를 이용하며, RBT 양성개체에 대하여 2차 확인검사인 시험관응집반응법(tube-agglutination test, TAT, 민감도 75.9%, 특이도 95.7%)으로 혈청희석배수에 따른 응집유무를 통하여 판단하고 있다. 그런데 이들 진단법은 만성적인 감염의 경우 응집력이 약화될 수 있으며, 교차반응의 발생 등의 문제점이 있고, TAT에 의한 혈청희석배수에 의한 응집반응 판정은 숙련된 기술자에 의한 정확한 비교와 판단을 요구한다(농림부, 2006; 손 등, 1986; OIE, 2004).

현재 우리나라에서 브루셀라병 진단에 사용하는 혈청학적 진단법은 bacterial whole cell이나 lipopolysac-

charide (LPS)를 항원으로 하여 항원·항체의 응집반응을 이용한다(Erdenebaatar 등, 2004). 그런데 이들 진단법은 만성적인 경우에 응집력이 약화되는데, 이는 응집반응에서 중요한 역할을 하는 IgM의 응집력을 방해하는 IgG1의 증가 때문으로 알려져 있다. Cobel (1970)은 Smooth *Brucella*종과 *Escherichia coli* (O:116, O:157), *Franciella tularensis*, *Salmonella* (O:30 antigen), *Pseudomonas maltophilia*, *Vibrio cholera* 그리고 *Yersinia enterocolitica* (O:9) 등과 혈청학적 원인관계를 증명하였으며, 이 원인은 LPS의 N-acylated 4-amino-4,6-dideoxy- D-manose (N-acylated D-perosamine)이 공통으로 존재하기 때문이라고 하였다. 또한 TAT의 경우 48시간의 많은 시간이 소요되는 단점도 있다. 이를 보완하기 위하여 LPS만큼 고면역원성의 항원을 이용하면서 교차반응을 최소화하고 신속하게 진단할 수 있는 진단법에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다(김, 2007; Raul 등, 2005; Victoria 등, 2004; Munoz 등, 2005; Nele 등, 2006; Erdenebaatar 등, 2003; Klerk 등, 1985; 백 등, 1999). 교차반응을 최소화할 수 있는 진단법의 개발의 필요성은 브루셀라 검사의 오진을 최소화하여 교차반응에 의한 피해를 최소화하는데 있다.

Erdenebaatar 등(2003, 2004)에 따르면 0.5% *n*-lauroylsarcosine를 처리하여 추출한 *omp*에서 교차반응의 주원인이 되는 *Y. enterocolitica* (O:9)와 교차반응이 인정되지 않음을 착안하여 경남 김해지역에서 분리한 *B. abortus* 야외주를 통해 *omp*를 추출하여 ELISA에 적용해 봄으로써 *omp*가 진단법의 재료로서의 가능성을 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

#### *B. abortus* 표준주와 야외주

야외주 검증시 대조군 표준균주로 경상대학교에서 분양받은 *B. abortus* 2308을 실험에 사용하였다. 야외주 분리는 “브루셀라병 방역실시요령”에 의한 국가방역 표준 검사법으로 1차 Rose Bengal test (RBT)에서 응집반응이 나타나고 2차 확진 진단법인 Tubeagglutination test (TAT)에서 200배 이상의 혈청희석배수에서 응집을 나타낸 살처분축의 “유방상립프절”로부터 야외주를 분리하였고(농림부, 2006), 야외주의 검증에는 생화학적 검사 및 AMOS PCR을 이용하였다(Betsy 등,

2003; Darla 등, 2000).

### 균 배양

선택 배지로 초대 배양 시 항생제 nalidixic acid를 첨가한 *Brucella* agar와 *Brucella* broth (5~10% bovine serum)를 사용하였으며, CO<sub>2</sub> 환경에서 72시간 이상 배양하였다.

### Bacterial stock

검증된 *Brucella* spp. 배양액과 frozen glycerin을 동량(1:1) 혼합하여 -70°C 급속냉동 보관하여 사용하였다.

### 브루셀라병 양성 및 음성 열정

2008년 1~12월까지 경남 김해 지역의 브루셀라병 검사혈청 중 우리나라의 국가표준 검사법을 통하여 검증된 양성혈청(RBT양성, TAT항체역가  $\geq 200$ ) 50점과 음성혈청(RBT 음성) 142점을 사용하였다.

### AMOS-PCR

*Brucella* spp.의 DNA 추출은 브루셀라균을 배양한 균액 100 $\mu$ l를 100°C에서 5분간 끓이거나 -70°C에서 20분간 보관한 후 DNA를 추출하여 PCR 반응에 사용하였다. 본 실험에 사용된 PCR의 Primer 염기서열과 제작은 Bricker 등(Betsy 등, 2003; Darla 등, 2000)이 제안한 방법을 참고하여 Table 1과 같이 제작하여 사용하였다.

PCR 반응 조건은 Intron사의 Maxime PCR Premix istart kit의 튜브에 forward primer와 reverse primer를 각각 1 $\mu$ l씩 분주하고 최종 용량이 50 $\mu$ l가 되도록 조정하였고, 증폭은 95°C에서 1분간 수행한 후 95°C/1분, 56°C/1분, 그리고 72°C/1분간 3단계로 30 cycles 수행하고 post elongation을 72°C에서 5분간 DNA 합성하였다.

### Agarose gel 전기영동

증폭된 DNA 10 $\mu$ l에 6 $\times$  loading buffer (0.03 bromophenol blue, 30% glycerol, 30mM EDTA, 0.03% xylene cyanol) 2 $\mu$ l를 혼합한 뒤 0.002% ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel에서 100V에서 약 1시간 가량 전기영동하였다.

### Antigen preparation

Erdenebaatar 등(2003)이 고안한 방법에 따라 0.5% *n*-lauroylsarcosine을 이용하여 *B. abortus*의 외막단백질(outer membrane protein)을 추출하였다(Erdenebaatar 등, 2003, 2004).

### *B. abortus*균의 항원성 검증

SDS-PAGE와 silver stain을 통하여 *B. abortus* 야의 주에서 추출한 omp를 확인하였다. Western blotting은 SDS-PAGE를 실시한 후 PVDF membrane (Millepore, USA)에 electrotransfer 실시 후 *B. abortus*에 감염된 소의 plasma (STA; 640 이상)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 감작시켰다. Horseradish peroxi-dase-conjugated protein G에 1시간 감작하여 Western blot detection reagents (Amersham Pharmacia Biotec)로 처리하고 X-ray film (Fuji, JAPAN) 켜 현상하여 항원성을 검증하였다.

### Protein assay

항원성을 검증한 sarcosine 추출물을 단백질 정량을 실시하였다. Bradford법에 의하여 정량을 실시하였다. Bio-Rad사의 Protein assay<sup>®</sup>을 사용하였으며, 흡광도 595nm에서 정량 분석하였다.

### ELISA

ELISA test에는 우리나라의 국가표준검사법을 통하여 검증된 경남 김해 지역의 양성혈청(RBT양성, TAT항체역가  $\geq 200$ X 50점과 음성혈청(RBT음성) 142점을 사용하였으며, Erdenebaatar 등(2003, 2004)의 ELISA

**Table 1.** The sequences of oligonucleotide primers

Primers	DNA sequence*	Size (bp)
<i>B. abortus</i> -specific	GACGAACGGAATTTTCCAATCCC	233
<i>B. melitensis</i> -specific	AAATCGCGTCTTGTCTGCTGA	731
<i>B. ovis</i> -specific	CGGTTCTGGCACCATCGTCG	956
<i>B. suis</i> -specific	GCGCGTTTTCTGAAGGTTTCAGG	285

**Table 2.** Comparison of RBT-tube agglutination test and ELISA methods

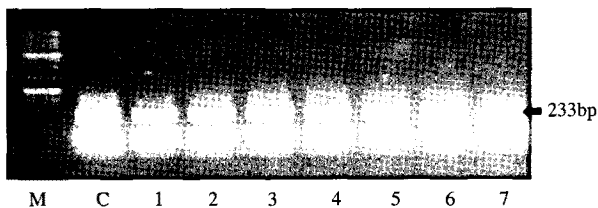
Result / Diagnostic methods	Sample	ELISA		%	
		(-)	(+)	Specificity	Sensitivity
Negative [RBT (-)]	142	127	15	89.4	84.0
Positive [RBT (+) & TAT 200X]	50	8	42		

방법을 이용하였다. Bradford assay를 통하여 정량한 sarcosine 추출물(4µg/ml) 50µl를 4°C에서 약 20시간 U형 96 well plate에 코팅을 시켜, 상온에서 약 30분간 0.5% BSA를 포함한 PBS로 blocking시켰다. 각각의 혈청은 PBS로 200배 희석하여 사용하였다. 항원이 코팅된 플레이트와 희석한 혈청을 약 1시간 37°C에서 반응을 시킨 후 0.01% tween-20이 포함된 PBS로 약 3회 세척하였다. 그리고 horseradish peroxidase가 결합된 protein-G를 1000배 희석하여 37°C에서 약 1시간 반응시키고 위의 세척액으로 약 5회 세척하였다. 그리고 기질로 substrate O-phenylenediamine을 각 well에 첨가한 후 492nm의 흡광도로 읽어 결과를 측정하였으며, OD값을 0.5 기준으로 양성과 음성으로 구분하였다(Erdenebaatar 등, 2003, 2004; Klerk 등, 1985; Ji 등, 1986; Nielsen 등, 2008).

## 결 과

### *Brucella* spp. 야외주 분리 및 AMOS PCR 결과

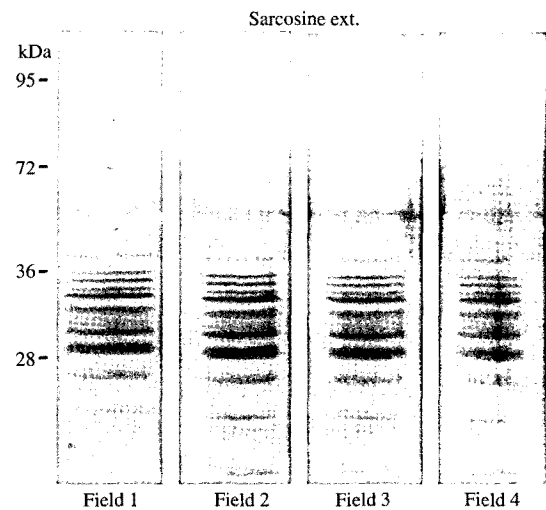
생화학적 검사와 Bricker 등(2003)이 제안한 방법을 이용하여 AMOS PCR을 실시한 결과 *B. abortus* 표준균주(*B. abortus* 2308)균주와 동일 패턴을 나타내어 분리된 야외균주 모두가 233bp의 밴드로 *B. abortus*로 확인되었다(Fig. 1). *Brucella* 야외주를 분리하기 위하여 경남 김해지역의 한우농가 18여 농가 시료 47두에서 채취한 유방상림프절에서 총 15주를 분리하였으며 분리률은 약 32%이었다.



**Fig 1.** Amplification of DNA fragments from *B. abortus* 2308 (standard strain, C) and *Brucella*-field strains [M: marker, C: control, 1~7: field strains].

### *Brucella abortus* 야외주의 Sarcosine extracts의 규명

SDS-PAGE and Silver stain은 *n*-lauroylsarcosine을 이용하여 분리한 단백질의 규명을 위하여 12% SDS-PAGE와 silver stain을 실시하였다. Fig. 2에서 확인된



**Fig. 2.** Analysis of sarcosine extracts of *B. abortus*. Antigens were extracted by sarcosine and were analyzed by 12% SDS-PAGE and silver staining.



**Fig. 3.** Analysis of sarcosine extracts of *B. abortus*. Antigens were extracted by sarcosine and were analyzed by Western blotting with anti-*B. abortus* serum.

것 외에 다른 Field strains에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

### B. abortus 야외주의 Sarcosine extracts의 항원성 검증

B. abortus균의 야외주에 대한 항원성을 확인하기 위하여 각 균주에 대한 Western blotting을 수행하였다. 그 결과 소 감염 혈청과 상당히 넓은 범위에서 다양한 항원이 반응함을 확인하였다(Fig. 3).

### Sarcosine 추출물을 이용한 ELISA 결과

각 야외주에서 추출된 sarcosine extracts를 Bradford assay법에 의하여 측정된 결과 평균 300 $\mu$ g/ml이었으며, ELISA에서는 4 $\mu$ g/ml로 희석하여 사용하였다.

RBT와 TAT로 판정된 음성혈청 및 양성혈청에 대하여 0.5% n-lauroylsarcosine extracts을 이용하여 ELISA를 실시하였다(Erdenebaatar 등, 2003, 2004). 동일 논문들에 따라 OD 값을 0.5로 기준으로 양성과 음성을 구분하여 측정된 결과 Table 2와 같이 음성혈청 142두 중 ELISA에서 133두는 음성, 9두는 양성으로 판정되었으며, 양성혈청 50두 중 42두는 양성, 8두는 음성으로 판정되었다. RBT-TAT법에 대한 omp-ELISA법의 특이도는 89.4%, 민감도는 84%의 결과를 나타내었다.

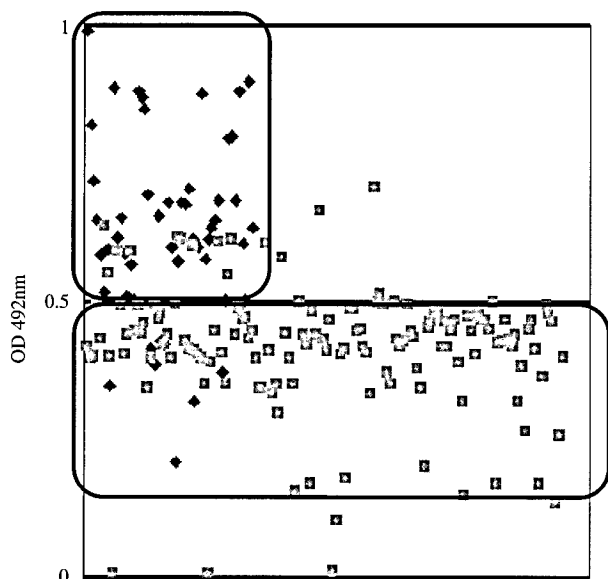


Fig. 4. ELISA reactivities of brucella-positive and -negative samples verified by RBT-TAT brucellosis (P) and Control (N) sera against Sarcosine extracts from *B. abortus* field strain (OD 492nm). [◆ : Positive, ■ : Negative].

실험에 사용된 양성 및 음성 혈청의 OD 값을 도표로 나타내었다(Fig. 4).

## 고 찰

국제수역사무국(OIE)은 “소 브루셀라병을 혈청학적으로 100% 정확하게 진단할 수 있는 진단법은 없다”라고 하였으며, 이는 브루셀라균이 세포내기생성의 특징 때문에 역학적인 상황에서 혈청학적인 검사법의 적용시 두 가지 이상의 검사법을 병행하여 진단에 이용하여야 한다고 소개하고 있다(OIE, 2004; 국립수의과학검역원, 2006). 이에 따라 국내 소 브루셀라병의 혈청학적 진단법으로 “소 브루셀라병 표준방역지침”에 따라 1차 스크리닝 검사로 로즈벵갈법(민감도 81.2%, 특이도 86.3%)을 이용하며, 로즈벵갈 양성개체에 대하여 2차 확인검사인 시험관응집반응법(민감도 75.9%, 특이도 95.7%)을 실시하여 혈청희석배수에 따른 응집 유무를 통하여 판단하고 있다. 현재의 소 브루셀라병의 혈청학적인 진단법은 bacterial whole cell이나 LPS을 항원으로 이용하고 있으나 bacterial whole cell의 LPS는 *Y. enterocolitica* O9등 s-LPS를 가지는 다른 균들과 교차반응을(Erdenebaatar 등, 2003, 2004; Masahisa 등, 2007; JongWan 등, 2007; 김, 2007; Victoria 등, 2004; Munoz 등, 2005) 일으키는 원인이 된다.

현재의 혈청학적 진단방법의 교차반응 등에 의한 오진의 가능성과 현재까지의 소 브루셀라병방역정책에 의한 막대한 경제적인 손실 등의 문제점으로 인해 많은 연구자들이 이러한 단점을 보완할 수 있는 진단법을 개발하는데 힘쓰고 있다. 그 중 하나가 진단법의 재료로써 외막단백질(omp)을 이용하는 것이다(Erdenebaatar 등, 2004; Masahisa 등, 2007; 김, 2007; 국립수의과학검역원, 2006).

이에 이 실험에서는 몇몇 연구를 통하여 교차반응을 줄일 수 있다고 알려진 omp를 추출하여 진단용 항원으로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 경남 김해지역의 소 브루셀라 양성축의 지방상임파절로부터 브루셀라 야외주를 분리하고 Erdenebaatar 등(2004)에서 사용한 0.5% n-lauroylsarcosine을 이용하여 면역원성이 높은 omp를 추출하고 현재 실험법으로 검증한 혈청과 ELISA에 적용하여 비교실험을 하였다(Erdenebaatar 등, 2003, 2004).

소 브루셀라균 야외주에서 추출한 omp를 SDS-PAGE 및 Western blotting을 통하여 항원성을 검증할

수 있었고(Erdenebaatar 등, 2004) 현재의 혈청학적 방법으로 판정한 혈청 192점을 추출한 omp를 이용한 ELISA 실험으로 특이도 89.5%, 민감도 84%의 결과를 얻을 수 있었다. 이는 추출된 omp-ELISA의 진단방법으로서의 가능성을 확인 할 수 있었다. 추출된 단백질을 대한 단순항원성을 확인하는데 그쳤지만 bacterial whole cell이나 LPS와의 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯팅을 통하여 교차반응이 일어나지 않고 항원성이 큰 부분을 탐색하여 ELISA, Latex agglutination test 등에 적용할 수 있다면 더 훌륭한 결과를 얻을 수 있을 것이라고 기대한다. 그리고 *Y. enterocolitica* (O:9) 등 교차반응을 보이는 균들과의 비교실험을 통해 교차반응이 최소화됨을 검증하여야 할 것이다.

앞으로 브루셀라병 진단법에 대한 많은 연구를 통하여 앞서 언급했던 오진 등의 단점을 극복할 수 있는 진단 방법이 개발된다면 진단 및 살처분 등에 의한 경제적인 손실을 최소화할 수 있고, 본 질병은 인간에게도 감염이 가능한 인수공통전염병으로서 인간 브루셀라병의 진단에도 적용이 가능할 것이며 보다 민감하고 정확한 혈청학적 진단법의 개발이 브루셀라 청정화를 이루고 청정화 이후의 교차반응으로 인한 혼란을 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

현재 브루셀라병의 혈청학적 진단법은 불활성화한 whole bacterial cells이나 bacterial lipopolysaccharide (LPS) antigens을 주로 사용하고 있으며, 브루셀라균은 s-LPS상에 *Y. enterocolitica* O9등과 진단함에 있어 강한 교차반응을 나타낸다. 이러한 교차반응의 단점을 보완할 수 있고 면역원성을 가진 항원을 통한 진단법의 개발이 진행되고 있으며, 이 실험에서는 omp를 이용하였다. 경남 김해지역의 브루셀라병 살처분 양성 한우의 유방상임파절을 통해 브루셀라 야외주를 분리하고, 야외주에서 omp를 추출하여 그 항원성을 확인하고 추출된 단백질의 진단법에 적용하여 현재의 혈청학적인 진단법과 비교실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 경남 김해 지역의 브루셀라 양성축의 유방상임파절에서 분리한 브루셀라균 야외주 15주는 AMOS PCR을 실시한 결과 *B. abortus*로 확인되었으며, 분리률은

약 32%이었다.

2. *n-lauroylsarcosine*을 이용하여 추출된 omp를 SDS-PAGE와 silver stain을 통해 분리된 단백질을 확인하였으며, Western blotting을 통하여 분리된 단백질이 양성 소혈청과 상당히 넓은 범위에서 다양한 항원이 반응함을 확인할 수 있었다.

3. 추출한 외막단백질을 ELISA에 적용하여 RBT, TAT에 의해 검증한 음성혈청 142점 [RBT(-)]과 양성혈청 50점 [RBT(+)] 및 TAT 200X이상과 비교실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. 음성혈청 142점을 ELISA와 비교실험을 실시한 결과 127점은 음성, 15점은 양성이었다.

나. 양성혈청 50점의 경우 42점 양성, 8점 음성이었다.

다. 위의 실험을 통하여 특이도 89.5%, 민감도 84%의 결과를 얻을 수 있었다.

이상의 결과를 통해 경남 김해지역에서 분리된 *B. abortus* 야외주에서 분리된 omp를 Western blotting을 통해 항원성을 확인할 수 있었으며, ELISA에의 적용을 통하여 진단재료로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- 국립수의과학검역원. 2006. 동물 브루셀라병 국제 심포지움: 1-163.
- 김 석. 2007. 브루셀라 감염증의 발병 기전: 브루셀라 균의 병원성 인자. 한국수의공중보건학회지 31(2): 105-114.
- 김금화, 안수환, 박용호, 김동성. 1982. 브루셀라병 검색에 사용되는 여러 가지 혈청학적 진단법의 비교연구. 대한수의학회지 22(2): 149-153.
- 김병수, 서창희, 백병걸. 1998. *Brucella abortus* 119-3균의 OMP 항원과 타병원성 균간의 교차반응에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 22(1): 9-15.
- 농림부, 국립수의과학검역원. 2006. 소 브루셀라병표준방역지침: 3-88.
- 농림부. 제 2006-34 (2006.06.26)호. 결핵병 및 브루셀라병방역 실시요령.
- 백병걸, 김지형, 박용호. 1998. 한우에 있어서 불활화 *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* 그리고 *Yersinia enterocolitica*에 의한 면역반응 관찰. 한국수의공중보건학회지 22(2): 93-102.
- 백병걸, 허 진, 진찬문. 1999. 소 브루셀라병 진단을 위한 라텍스 응집반응 시험법. 한국수의공중보건학회지 23(3): 153-163.
- 손준용, 이길용, 유재창. 1986. Zoonosis 브루셀라증에 관한 연구. 국립보건원보 23: 281-295.

- 윤하정, 남향미, 김철희, 박취규, 강문일, 위성환. 2006. 환레-대조군 연구를 이용한 국내 소 브루셀라병 발생위험 요인 분석. *한국수의공중보건학회지* 30(1): 77-82.
- 임윤규, 양기천, 이경갑, 박전홍, 이두식, 박용호, 강승원, 목지원, 이영순. 1995. SDS 처리한 브루셀라 항원과 *Yersinia enterocolitica* O:9주의 혈청학적 교차반응 연구. *대한수의학회지* 35(1): 43-148.
- 임현술, 송영규, 유한상, 박미연, 김종완. 2005. 브루셀라증의 개요. *한국역학회지* 27(1): 26-36.
- Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. 2003. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest* 15(4): 374-378.
- Corbel MJ, Cullen GA. 1970. Differentiation of the serological response to *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus* in cattle. *J Hyg* December 68(4): 519-530.
- De Klerk E, Anderson R. 1985. Comparative evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the laboratory diagnosis of brucellosis. *J Clin Microbiol* 21(3): 381-386.
- Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. 2004. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other alpha-proteobacteria. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(5): 868-873.
- Dohoo IR, Wright PF, Ruckerbauer GM, Samagh BS, Robertson FJ, Forbes LB. 1986. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Can J Vet Res* 50(4): 485-493.
- Erdenebaatar J, Bayarsaikhan B, Watarai M, Makino S, Shirahata T. 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals infected with *Brucella* species from those of animals infected with *Yersinia enterocolitica* O9. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(4): 710-714.
- Erdenebaatar J, Bayarsaikhan B, Yondondorj A, Watarai M, Shirahata T, Jargalsaikhan E, Kawamoto K, Makino S. 2004. Epidemiological and serological survey of brucellosis in Mongolia by ELISA using sarcosine extracts. *Microbiol Immunol* 48(8): 571-577.
- Ewalt DR, Bricker BJ. 2000. 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* 38(8): 3085-3086.
- Harris HJ. 1949. Chronic Brucellosis-The Unsatisfactory Status of Current Diagnostic Methods. *Am J Public Health Nations Health* 39(7): 870-874.
- 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.
- Mainar-Jaime RC, Muñoz PM, de Miguel MJ, Grilló MJ, Marín CM, Moriyón I, Blasco JM. 2005. Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in *Brucella*-free farms showing false positive serological reactions due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Can Vet J* 46(10): 913-916.
- McGiven JA, Sawyer J, Perrett LL, Brew SD, Commander NJ, Fisher A, McLarmon S, Harper K, Stack JA. 2008. A new homogeneous assay for high throughput serological diagnosis of brucellosis in ruminants. *J Immunol Methods* 337(1): 7-15.
- Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. 2007. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *J Clin Microbiol* 45(4): 1211-1218.
- Muma JB, Toft N, Oloya J, Lund A, Nielsen K, Samui K, Skjerve E. 2007. Evaluation of three serological tests for brucellosis in naturally infected cattle using latent class analysis. *Vet Microbiol* 125(1-2): 187-192.
- Muñoz PM, Marín CM, Monreal D, González D, Garin-Bastuji B, Díaz R, Mainar-Jaime RC, Moriyón I, Blasco JM. 2005. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(1): 141-151.
- Nielsen K, Smith P, Yu WL, Elmgren C, Halbert G, Nicoletti P, Perez B, Conde S, Samartino L, Nicola A, Bermudez R, Renteria T. 2008. Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. *Vet Immunol Immunopathol* 125(3-4): 246-250.
- OIE. 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: 409-438.
- Riezu-Boj JI, Moriyón I, Blasco JM, Marín CM, Diaz R. 1986. Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J Clin Microbiol* 23(5): 938-942.
- Watarai M, Kim S, Yamamoto J, Miyahara K, Kazama M, Matsuoka S, Chimura S, Suzuki H. 2007. A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads. *J Vet Med Sci* 69(5): 477-480.
- Wellinghausen N, Nöckler K, Sigge A, Bartel M, Essig A, Poppert S. 2006. Rapid detection of *Brucella* spp. in blood cultures by fluorescence *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol* 44(5): 1828-1830.