

<원 저>

국내 소에서 분리한 *Brucella abortus*의 병원성 분석

임정주¹ · 김정화² · 김동혁¹ · 이진주¹ · 김대근¹ · 전무형³ · 김상훈³ · 장홍희⁴
이후장¹ · 민원기¹ · 김 석^{1,4,*}

¹경상대학교 수의과대학, ²경상북도 가축위생시험소 북부지소,
³충남대학교 수의과대학, ⁴경상대학교 농업생명과학연구원
(게재승인: 2010년 12월 24일)

The virulence of *Brucella abortus* isolated from cattle in Korea

Jeong Ju Lim¹, Jeong-Hwa Kim², Dong Hyeok Kim¹, Jin Ju Lee¹, Dae Geun Kim¹, Moo-Hyung Jun³,
Sang Hun Kim³, Hong Hee Chang⁴, Hu Jang Lee¹, Won-Gi Min¹, Suk Kim^{1,4,*}

¹College of Veterinary Medicine, and ⁴Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University,
Jinju 660-701, Korea

²Northern Branch, Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Andong 760-803, Korea

³College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Accepted: December 24, 2010)

Abstract : In this study, we isolated 12 of *Brucella* (*B.*) spp. from cattle, which have been positive in Rose Bangal test and tube agglutination test in Gyeongbuk province in 2009. According to AMOS PCR analysis, isolated 12 strains were identified as *B. abortus*. Murine derived macrophage, RAW 264.7 cells, were infected with isolated 12 strains or reference strain (*B. abortus* 544), and bacterial internalization were characterized. According to these results, we divided the isolated strains into the following three groups: class I, lower internalization than that of *B. abortus* 544; class II, similar internalization to that of that of *B. abortus* 544; class III, higher internalization than that of *B. abortus* 544 within RAW 264.7 cells. Furthermore, intracellular growth, bacterial adherent assay, LAMP-1 colocalization, virulence in mice and surface protein pattern were characterized. From these results, representative strains of class III showed lower LAMP-1 colocalization, higher adherent efficiency, higher virulence in mice than those of *B. abortus* 544, and showed different pattern of surface proteins. These results suggest that *B. abortus* field strains, isolated from cattle in Korea, possess various virulence properties and higher internalization ability of field strain may have an important role for its virulence expression.

Keywords : *Brucella abortus*, cattle, phagocytes, virulence

서 론

브루셀라(*Brucella*) 균은 브루셀라병의 원인체이며 숙주의 탐식 세포 내에서 증식할 수 있는 그람 음성의 통성 세포 내 기생 세균이다 [5, 7]. 브루셀라 균은 다른 병원성 세균과는 달리 세포에 위해적 요소나 탐식세포의 공격에 저항하는 exotoxin, antiphagocytic capsules, thick walls, fimbriae, plasmid 등이 존재하지 않는데, 이들 병원체의 주요 발병 기전은 숙주의 탐식세포에 침입

하여, 탐식세포의 살균 작용을 저해함으로써 질병을 유발하는 것으로 간주되고 있다 [1, 7, 8, 10].

브루셀라 균의 숙주 탐식세포 내 침입 및 증식 기전에 대한 정확한 해석은 아직까지 확립되어 있지 않지만, 많은 연구자의 결과에서 *B. abortus*는 탐식 세포와 결합한 후에 세포막에서 membrane sorting이 일어난 후 일정한 경과를 거쳐 phagosome을 형성하며, 이 membrane sorting에 참여하는 막 성분은 lipid rafts-associated molecules로서 여기에 속하는 물질로는 GPI anchored

*Corresponding author

Tel: +82-55-751-6631, Fax: +82-55-751-5903

E-mail: kimsuk@gsnu.ac.kr

protein, GMI ganglioside, cholesterol, scavenger receptor 등으로 보고되고 있다 [1, 10].

브루셀라 감염증의 증상은 인체에 감염될 경우 지속적인 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 심내막염, 뇌척수염, 관절염 등 중증 질병으로 진행하게 된다. 감염된 동물에서 보이는 증상은 특별한 외부 증상이 없이 암컷에서의 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 유산과 수컷에서 고환염, 기형정자 등으로 인한 불임을 유발한다. 특히, 감염축은 특별한 외부 증상 없이 균을 장기간 보관하며, 지속적으로 균을 배출하여 사람과 건강한 동물에 감염되어 폭발적인 감염률을 보인다 [2-4].

현재 국내의 브루셀라 감염증의 증가로 인체 및 동물 유래의 야외주가 다수 분리되고 있으나, 진단상의 어려움을 겪고 있으며, 야외주에 대한 병원성 및 항원성에 대한 연구가 미흡하여, 병원성 요인의 분석, 감염경로 및 발병기전에 대한 기초적 자료가 거의 없는 실정이다.

이 연구는 국내 한우 및 젖소 농장에서 분리된 브루셀라 균의 병원성을 분석하기 위하여 탐식세포 및 실험 동물 감염을 수행하여 비교 분석 하였으며, 각 분리주에 대하여 세균학적 및 분자생물학적 방법을 이용 특성을 규명하였다. 본 연구결과는 국내 한우 및 유우 농장에서 브루셀라 감염증을 유발하는 원인체에 대한 특징을 규명함은 물론, 브루셀라 감염증 연구를 위한 역학적 기초 자료로 활용 될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

브루셀라 균 분리 및 PCR

2009년 1월부터 2009년 10월까지 국내 경북 지역 한우농가 4곳과 유우농가 3곳으로부터 김 등 [2]의 방법에 따라 브루셀라 균을 분리하였다. 표준주 *B. abortus* 544와 분리한 야외주 12주를 DNA kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA를 추출 하였고, 브루셀라 균의 subtype 규명을 위해 IS711 element(AMOS)에 기초하여 primer를 설계한 후 전문제조회사(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 제조하였으며, 반응조건 및 증폭산물의 확인은 김 등 [2]의 방법에 준하여 수행하였다.

탐식세포 내 침입 및 증식능력

RAW 264.7 세포는 5% CO₂, 37°C 환경에서 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 RPMI 1640배지를 이용하여 배양하였다. 탐식세포 내 침입과 증식 능력 실험은 Kim 등 [9]의 방법에 준하여 수행하였다. *B. abortus* 544 표준주와 야외주는 10% FBS가 함유된 RPMI 1640에서 배양된 RAW 264.7 세포에 감염시켰으며, 0, 15, 30분 경과 후 각 균주 별 세포 내 세균 침입능력을 확인하였

다. 세포 내 증식능력을 측정하기 위해서 감염된 세포를 37°C에서 30분간 배양한 후 gentamicin을 30 µg/mL 농도로 첨가하고 2, 24 및 48시간 경과 후 세포 내 증식능력을 확인하였고, 각 실험은 세포를 lysis시킨 후 세균이 포함된 상층액을 Brucella agar에서 48시간 배양하여 CFU(colony forming unit)를 측정하였다.

Bacterial adherence assay

탐식세포와 브루셀라 균의 부착 정도를 확인하기 위하여 이전에 기술된 방법을 사용하여 수행하였다 [9, 10]. 멸균된 유리 disk가 있는 12 well plate에 배양된 RAW 264.7 cell에 cytochalasin D 2 mg/mL을 2 µL씩 첨가한 후 37°C에서 40분간 배양한 후 배양된 브루셀라균 10⁵ CFU를 well에 분주하여 반응시키고 -20°C에 보관된 cold absolute methanol에 고정하였다. RAW 264.7 세포에 부착된 균은 anti-*B. abortus* polyclonal rabbit serum과 37°C에서 30분간 반응을 한 후, phosphate buffered saline(PBS)로 3회의 세척과정을 거쳐 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Santa Cruz Biotechnology, USA)로 1시간 염색한 후 3회의 세척과정을 거쳐 형광현미경을 통해 관찰하였다.

LAMP-1 staining

LAMP-1 staining은 이전에 기술된 방법을 사용하여 수행하였다 [9, 10]. 12 well plate에 멸균된 cover glass를 넣은 후 RAW 264.7 세포에 MOI 10의 농도로 브루셀라 균을 감염시킨 후 16% paraformaldehyde와 stock A solution(0.2M lysine 0.9 g + 8% sucrose 2 g + 25 mL PBS)으로 고정하고, anti-LAMP-1 rat monoclonal antibody 1D4B로 염색한 후 Texas red-goat anti-rat immunoglobulin G(Santa Cruz Biotechnology, USA)로 염색하였다. 세균을 동정하기 위하여 anti-*B. abortus* polyclonal rabbit serum과 FITC-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G(Santa Cruz Biotechnology, USA)로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. LAMP-1과의 융합 정도는 3회에 걸쳐 RAW 264.7 세포 100개를 무작위로 선발하고 브루셀라 균을 포함한 phagosome과 LAMP-1 단백질의 colocalization을 확인하였다.

균의 표면단백 표식

브루셀라 균 표면 단백질의 특성을 조사하기 위하여 1% Sulfo-NHS-Biotin(Pierce, USA)에 감작시킨 브루셀라균을 10%의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis를 하였다. 단백질은 nitrocellulose membranes(Millipore, USA)로 옮긴 후, horseradish peroxidase-conjugated streptavidin(Santa Cruz Biotechnology, USA)으

Table 1. Characterization of *Brucella* (*B.*) spp. from cattle in Korea

Farm	Breed	Strain No.	Antibody titrations		Subtypes	Groups*
			RBT	TAT		
A	Hanwoo	K1	+++	400+	<i>B. abortus</i>	Class I
		K2	++	200+	<i>B. abortus</i>	Class I
B	Hanwoo	K3	+++	400+	<i>B. abortus</i>	Class I
		K4	+++	400+	<i>B. abortus</i>	Class I
C	Hanwoo	K5	+++	400+	<i>B. abortus</i>	Class III
		K6	++	200+	<i>B. abortus</i>	Class II
		K7	+	100+	<i>B. abortus</i>	Class I
D	Hanwoo	K8	+++	400+	<i>B. abortus</i>	Class I
		K9	++	200+	<i>B. abortus</i>	Class II
E	Holstein	K10	++	100+	<i>B. abortus</i>	Class I
F	Holstein	K11	+++	400+	<i>B. abortus</i>	Class I
G	Holstein	K12	+	100+	<i>B. abortus</i>	Class III

*Groups are divided by bacterial internalization comparing to that of reference strain *B. abortus* 544.

Class I: lower internalization, Class II: similar internalization, Class III: higher internalization.

RBT: Rose Bengal test, TAT: tube agglutination test.

로 반응하고 ECL(Intron, Korea)반응하여 관찰하였다.

마우스에 대한 병원성

브루셀라 균의 병원성을 확인하기 위하여, 각 균주를 10⁴ CFU의 농도로 희석시킨 후 다섯 마리의 8주령 암컷 ICR mice 복강 내로 감염시켰다. 감염 후 14일 경과 후 감염마우스의 비장을 제거한 후 비장무게와 비장 내 존재하는 브루셀라 균을 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 수행하였으며, 실험결과를 Student's *t*-test를 이용하여 통계처리를 수행하였다. *p* < 0.01는 통계적으로 유의성을 가짐을 의미한다.

결 과

Rose Bengal test와 tube agglutination test에서 브루셀라 양성으로 확인된 경북 지역의 한우 농장 4곳 또는 젓소 농장 3곳의 유방상립프절로부터 12종의 야외주를 분리하였고, AMOS PCR 결과 498 bp에서 *B. abortus*에 특이적인 band가 증폭되어 모두 *B. abortus*로 판명하였다(Table 1). 분리된 12주와 표준주 *B. abortus* 544를 RAW 264.7 세포에 감염을 하여 bacterial internalization 능력에 따라 3개의 class로 나누었다. Class I은 표준주에 비해 낮은 침입능력을 가지는 그룹, class II는 표준주와 비슷한 능력을 가지는 그룹, class III는 표준주보다 높은 bacterial internalization 능력을 가지는 그룹으로 분리하였고, class I에 속하는 야외주는 K1 K2 K3 K4 K7 K8

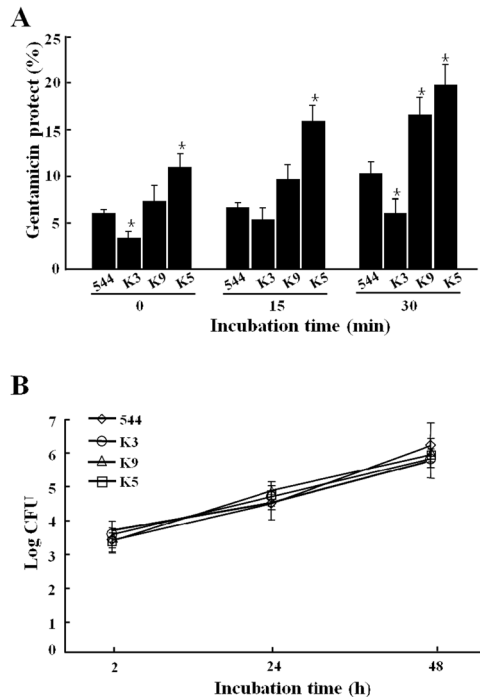


Fig. 1. Bacterial internalization and intracellular replication within RAW 264.7 cells. *Brucella* (*B.*) *abortus* 544 (544) or one of representative strains (K3, K9 and K5) were infected onto macrophages and incubated. After incubation bacterial internalization (A) and intracellular replication (B) within macrophages were estimated. Error bars represent the standard deviations. Statistically significant differences between bacterial internalization and intracellular replication of the reference strain and those of isolated strains are indicated by asterisks (**p* < 0.05).

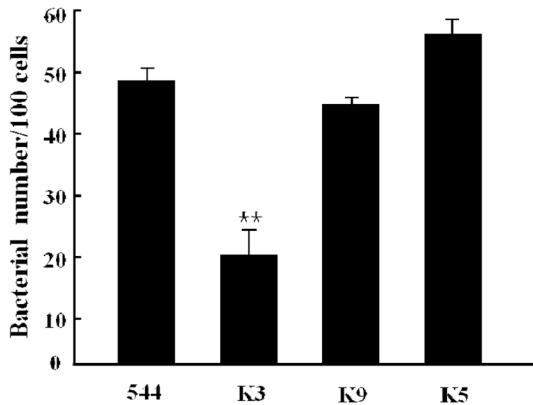


Fig. 2. Bacterial adherence on RAW 264.7 cells. Before bacterial infection, RAW cells were incubated with RPMI 1640 containing cytochalasin D for 40 min at 37°C and then infected with *B. abortus* 544 (544) or one of representative strains (K3, K9 and K5), and bacteria associated with RAW 264.7 cells were scored by immunofluorescence microscopy. Error bars represent the standard deviations. Statistically significant differences between bacterial internalization and intracellular replication of the reference strain and those of isolated strains are indicated by asterisks (** $p < 0.01$).

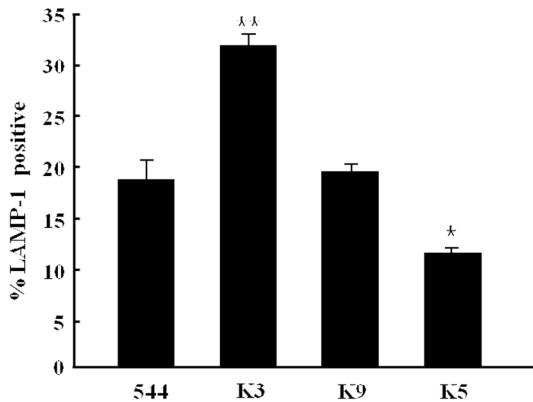


Fig. 3. LAMP-1 colocalization in phagosomes containing bacteria. RAW 264.7 cells were infected with *B. abortus* 544 (544) or one of representative strains (K3, K9 and K5) and then incubated for 30 min, fixed, and stained for LAMP-1. “% LAMP-1 positive” refers to the percentage of internalized bacteria that showed containing with LAMP-1, based on observations of 100 bacteria per coverslip. Error bars represent the standard deviations. Statistically significant differences between bacterial internalization and intracellular replication of the reference strain and those of isolated strains are indicated by asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

H1 H2, class II에 속하는 야외주는 K6과 K9, 그리고 class III에 속하는 K5, H3분리주로 나누었다(Table 1). 이들 야외주 중 각 class 대표 균주인 K3, K9 및 K5를

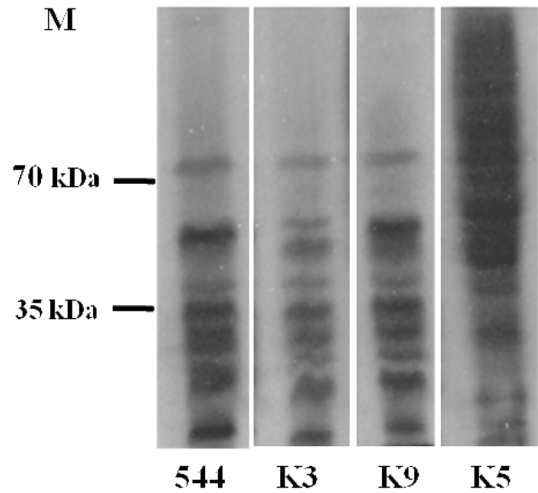


Fig. 4. Modification of surface proteins of bacteria. Surface proteins of *B. abortus* 544 (544) or one of representative strains (K3, K9 and K5) were labeled with Sulfo-NHS-Biotin and then detected by immunoblotting with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin. The positions of molecular mass markers (in kilodaltons) are shown on the left.

선발하였으며, 선발된 균주의 RAW 264.7 세포 내 침입 능력을 비교해 본 결과 K3 균주는 표준주에 비해 낮은 침입능력을 보였고, K9균주는 유사한 침입능력을 보였으며(Fig. 1A), K5균주는 현저히 높은 RAW 264.7 세포 내 침입능력을 보였고, 세포 내 증식능력 실험에서 K3, K9 및 K5균주 모두 감염 후 48시간 동안 표준주와 비슷한 증식능력이 인정 되었다(Fig. 1B).

RAW 264.7 세포와 각 균주 간 adherence assay를 수행해본 결과 K9 및 K5 균주는 표준주와 유사한 부착능을 보였으나, K3균주는 표준주에 비해 낮은 부착능을 보였다(Fig. 2). 탐식세포 내 탐식 경로를 확인하기 위하여 lysosome associated membrane protein-1(LAMP-1) protein과 brucella containing phagosome과의 colocalization 정도를 확인해본 결과, K3 균주는 표준주에 비해 높은 colocalization을 보였고, K9 균주는 유사하였으며, K5 균주는 낮은 colocalization을 보였다(Fig. 3).

야외 분리균주들의 표면 단백질을 분석해 본 결과, K3 및 K9 균주는 표준주와 거의 비슷한 양상을 나타낸 반면, K5 균주는 표준주에 비해 35 kDa 이상에서 10개 이상의 많은 표면단백을 보유하고 있음이 확인되었다(Fig. 4).

각 균주의 실험동물 내 병원성을 확인하기 위하여 mouse 접종시험을 수행해본 결과 K3 및 K5변 균주는 표준주에 비하여 비교적 접종 마우스의 비장내 균수가 증가된 양상을 보였고, 유사한 비장 종대가 인정되었으

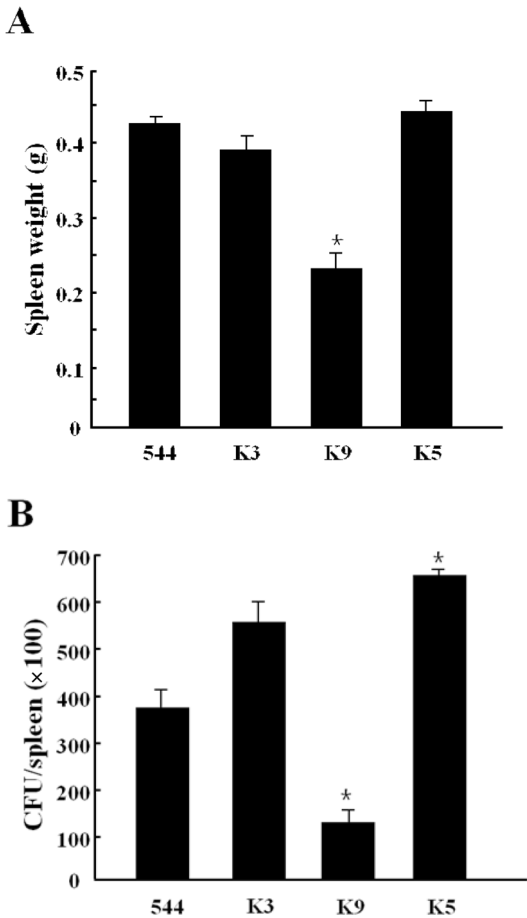


Fig. 5. Proliferation in mice. Each of 5 mouse groups was infected by *B. abortus* 544 (544) or one of representative strains (K3, K9 and K5). After 14 days post infection, the mouse was sacrificed and spleen weight (A) and bacterial proliferation (B) within spleen were estimated. Error bars indicate standard deviations. Statistically significant differences between bacterial internalization and intracellular replication of the reference strain and those of isolated strains are indicated by asterisks ($p < 0.05$).

나, K9 균주는 표준주에 비해 현저히 낮은 비장 내 균 증식과 비장 종대가 인정되었다(Fig. 5).

고 찰

브루셀라병은 대표적인 인수공통 전염병의 하나이며 국내는 물론 전 세계적으로 공중보건학적으로나 경제적으로 매우 심각한 문제를 야기하는 전염병이다. 최근 국내 브루셀라병이 사람과 가축에 폭발적인 증가를 보이고 있어 국민 건강의 심각한 위태와 국가적 경제적으로

막대한 손실초래하고 있으며 이에 대한 대책이 시급한 실정이다. 국내 소에서 발생하는 브루셀라 감염증 원인체는 *B. abortus*에 의한 감염증이 주를 이루고 있다 [2, 4].

본 실험에서 2009년도 국내 경북지역 한우 및 유우 농가에서 발생한 브루셀라 감염우를 통해 브루셀라 균을 분리하였으며, AMOS PCR을 통해 분리된 균 12주 모두 *B. abortus*임을 확인 하였고, 이들 분리주의 병원성 및 특성을 분석하였다. 브루셀라균은 대표적인 탐식세포 내 기생세균의 하나로서, 숙주의 탐식세포 내 증식하며 질병을 유발하는 특징을 보인다 [1]. 본 실험에서는 생쥐 유래 대식세포의 하나인 RAW 264.7 세포를 이용하여 대식세포 내 침입능력을 토대로 세 개의 그룹으로 나뉘었으며, 각 그룹은 class I: 표준주에 비해 낮은 세포내 침입능, class II: 표준주에 비해 유사한 침입능, class III: 표준주에 비해 높은 침입능을 보이는 그룹으로 명명하였다. 농장 별 분리주에 대한 세포내 침입능력은 대체적으로 유사한 패턴을 보였으나, 한우 2농가에서 분리된 5균주는 같은 농가에서 분리된 균주 임에도 불구하고 상이한 세포 내 침입능력을 보여 한 농장 내에서 다양한 침입양상을 보이는 균주가 복합적으로 감염되어 있는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 본 연구에서 정확하게 규명 할 수 없었으나, 외부에서 소를 구입하였거나, 외부 출입 차량 및 야생동물에 의하여 외부에서 유입된 균주가 혼합 감염되어 있을 가능성이 있는 것으로 판단된다. 각 class의 대표적 균주를 선발하여 세포 내 증식능력을 비교해 본 결과 class I, II 및 III의 대표 균주 모두 표준주와 비교하여 유사한 세포 내 증식 능력을 보였다.

Kim 등 [9]은 브루셀라 균의 탐식세포 내 침입과 관련하여, 균 표면단백 패턴에 따른 침입능력의 다양함을 보고하였다. 또한 브루셀라 균 표면단백 중 하나인 SP41 이 브루셀라 균의 탐식세포 내 침입 및 부착에 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였다 [6]. 본 연구에서 수행한 브루셀라 야외주의 표면단백 pattern을 표준주와 비교해본 결과 class I의 경우 약 45-50 kDa 정도에서 표준주에 비해 미약한 표면단백이 나타났으며, 이 균주는 표준주에 비해 낮은 탐식세포 내 침입능력과 부착능력을 보였다. 이에 반해 class III 균주의 경우 표준주에 비해 10종 이상의 표면단백을 보유하고 있는 것으로 나타났다. 이 균주는 표준주에 비해 높은 탐식세포 내 침입능력과 부착능력을 보였다. 이상의 결과를 토대로 브루셀라 균의 표면단백이 탐식세포 내 침입 및 부착에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

브루셀라 균의 탐식세포 내 증식 기전 중 하나는 탐식세포의 lysosome 공격을 회피하여 증식하는 것이다 [1]. 본 연구에서 class I 균주는 표준주에 비해 다소 높

은 lysosome fusion을 보이고 있으나, 탐식세포 내 증식 및 마우스 접종시험에서 표준주와 유사한 비장 내 증식 능력을 보이는 것으로 나타났다. 이와는 반대로 class II 균주는 표준주와 유사한 lysosome fusion을 보이고 유사한 탐식세포 내 증식능력을 보이고 있지만, 마우스 접종 시험에서 표준주에 비해 현저히 저하된 비장 내 증식능력을 보였다. 본 결과를 토대로 브루셀라 야외주의 병원성 발현에 있어 탐식세포의 lysosome 이외에도 다양한 균 축 및 숙주 축 요인이 작용할 것으로 판단된다.

표준주에 비해 높은 탐식세포 내 침입능력을 보이는 class III 균주는 마우스 접종시험에서 표준주에 비해 높은 비장 내 증식 능력을 보이는 것으로 나타나, 야외주의 탐식세포 내 침입능력에 비례해 실험동물 내 높은 병원성을 보이는 것으로 판단된다. Kim 등 [9]은 브루셀라 균의 유전자 변형을 통해 저병원성 변이주에 대한 특성을 분석하여, 표준주에 비해 높은 세포 내 침입능력을 보이지만 낮은 세포 내 증식능력과 마우스 접종시험에서도 낮은 병원성을 보이는 변이주를 규명하였다. 본 결과를 토대로 탐식세포 내 침입능력에 따라 병원성을 규명한다는 것은 다소 어려운 측면이 있지만, 브루셀라 야외주를 대상으로 한 병원성 실험에서는 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

결과적으로 본 실험 결과는 국내 한우 및 유우 농가에서 발생하는 브루셀라 감염증의 특징과 병원성에 대한 기초로 사용될 것이며, 고병원성 브루셀라 야외주를 이용한 백신 개발 및 브루셀라 감염증의 발병기전을 해석하는데 있어 중요한 기초가 될 것이다.

결 론

본 연구에서는 브루셀라병 양성으로 판정되어 살처분된 소의 유방상립프절에서 12종의 브루셀라 균을 분리하고, AMOS PCR로 *B. abortus*임을 확인한 후 야외주와 표준주의 병원성에 대한 특성을 규명하였다. 브루셀라 야외주 12주와 표준주를 대상으로 생쥐 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포 내 침입능력을 확인 해 본 바, 각 야외주들은 표준주에 비해 다양한 양상을 보였으며, 이들 토대로 야외주를 세 개의 그룹으로 나눌 수 있었다. 각 그룹의 대표 균주를 선발하여, RAW 264.7 세포 내 증식능력, 세포 부착능력, 표면단백 형태, 탐식세포 내 탐식경로 및 마우스 병원성 실험을 수행해 본 결과 탐식세포 내 침입능력이 높을수록 병원성이 높게 나타나는 것으로 나타났다. 본 결과를 통하여 국내 한우 및 젖소 농가에서 발생된 브루셀라 감염증은 다양한 병원성을 보이는 *B. abortus*에 의해 발생하는 것으로 나타났으며, 본 연구를 통해 고병원성 및 저병원성을 보이는 야

외주를 활용한 브루셀라 감염증의 발병기전 해석 및 백신개발과 같은 예방적 접근에 유용하게 사용될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단과제 “신규 규명된 브루셀라 균의 세포내 증식에 필요한 핵심 병원성 인자의 특성분석 (과제번호: 2009-0065223)”의 일부임

참고문헌

1. 김석. 브루셀라 감염증의 발병 기전; 브루셀라 균의 병원성 인자. 한국수의공중보건학회지 2007, **31**, 105-114.
2. 김정화, 임정주, 김동혁, 이진주, 김대근, 전무형, 김상훈, 장홍희, 이후장, 민원기, 김석. 국내 경북지역 소에서 분리된 브루셀라 분리주의 생물학적 특성. 대한수의학회지 2010, **50**, 117-124.
3. 박만석, 우영석, 이민정, 심수경, 이혜경, 최영실, 이우홍, 김기현, 박미연. 국내 브루셀라균에 감염된 환자 1예. 감염과 화학요법 2003, **35**, 461-466.
4. 심항섭, 고태오, 유성종, 우종태, 박병욱, 김성렬, 박유순. 경기도에서 발생하는 유우부루셀라병에 관한 연구. 한국가축위생학회지 1996, **19**, 189-198.
5. 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.
6. Castañeda-Roldán EI, Ouahrani-Bettache S, Saldaña Z, Avelino F, Rendón MA, Dornand J, Girón JA. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. Cell Microbiol 2006, **8**, 1877-1887.
7. Dettileux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy. Vet Pathol 1990, **27**, 317-328.
8. Dettileux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. Infect Immun 1990, **58**, 2320-2328.
9. Kim S, Watarai M, Kondo Y, Erdenebaatar J, Makino S, Shirahata T. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. Infect Immun 2003, **71**, 3020-3027.
10. Watarai M, Makino S, Shirahata T. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside-triphosphate-binding domain. Microbiology 2002, **148**, 1439-1446.