

MLVA를 이용한 경북지역 소에서 분리된 *Brucella abortus*의 유전형별

김성국 · 김영환 · 이홍영 · 최정혜 · 최성균^{1*}

경상북도가축위생시험소, ¹경북대학교 수의과대학

(접수 2011. 8. 1; 수정 2011. 9. 14; 게재승인 2011. 9. 15)

Genotyping of *Brucella abortus* isolated from cattle in Gyeongbuk province by MLVA

Seong-Guk Kim, Young-Hoan Kim, Hong-Young Lee,
Jeong-Hye Choi, Seong-Kyoon Choi^{1*}

Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Daegu 702-911, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received 1 August 2011; revised 14 September 2011; accepted 15 September 2011)

Abstract

Brucella (B.) abortus is a facultative intracellular pathogen that infects a wide variety of animal species and human. Brucellosis is the zoonosis and an extremely important disease around the world. Although the eight species can be differentiated by conventional phenotypic tests, these species display a high degree of DNA homology in DNA-DNA hybridization assay (>90%). Various methods have been established for genotyping of *Brucella* species, but most of analytical methods are lack reproducibility and limited capability to differentiate them. The attempt of this study was to evaluate multiple-locus VNTR analysis (MLVA) for use of epidemiological trace-back analysis in bovine brucellosis. Ninety-four *B. abortus* isolates from Gyeongbuk province during 2006~2010 were analyzed using 16 VNTR locus. High resolution automatic capillary electrophoresis system was used for more throughput, simpler, faster, and better discriminable than conventional gel electrophoresis. As a result, 13 different genotypes were identified from 94 *B. abortus* isolates. MLVA could contribute to epidemiological trace-back analysis of bovine brucellosis.

Key words : *Brucella abortus*, VNTR, MLVA, Genotype, Capillary electrophoresis

서 론

*Brucella (B.) abortus*는 세포 내 기생 세균으로써 숙주 영역이 넓으며, 암소에서 불임, 유산 등의 번식장애를 일으키고, 수소에서는 고환염, 전립선염 등의 생식기 질환을 일으키고 소뿐만 아니라 사람에게도 감염되어 파상열, 관절통, 오한, 쇠약 등 감기와 유사

한 증상을 일으키는 인수공통전염병으로 공중위생상 중요하게 취급되는 세균으로 대부분 국가에서 브루셀라병의 근절을 위해 많은 노력을 기울이고 있다 (Alton, 1975; Timoney 등, 1988; Beran, 1994; Garrity 등, 2005).

분자생물학의 발전과 함께 브루셀라와 관련된 많은 유전자 정보가 밝혀지고 DNA-DNA hybridization에 근거한 유전자 지도를 작성한 결과, 브루셀라군속의 유전적 동일성이 밝혀짐에 따라 단일 종에 의한

*Corresponding author: Seong-Kyoon Choi, Tel. +82-53-950-5978, Fax. +82-53-950-5955, E-mail. cskbest@hanmail.net

분류법이 제기되고 있으나(Verger 등, 1985; Foster 등, 2002; Moreno 등, 2002) outer membrane protein (OMP) 추출물을 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과에 의하면 균종에 따라 protein group의 차이점이 발견되고(Ficht 등, 1990), 브루셀라의 porin protein 정보에 관여하는 omp2a/omp2b 관련 유전자에 대한 restriction fragment length polymorphism(RFLP)에 의한 다형태성을 관찰한 결과 6균종의 브루셀라는 뚜렷한 차이가 있는 것으로 알려졌다(Verstrete와 Winter, 1984).

세균의 분류 방법은 고전적으로 생물형, 혈청형, 파지형, 약제내성형 등의 방법이 있으나, 최근 들어 분자생물학의 발전과 더불어 분자유전학적 방법에 의한 유전형 및 분자형 등의 방법이 많이 이용되고 있으나 어떤 형태의 균 분류방법을 이용하든 높은 감별력과 반복된 실험에서 동일한 결과를 얻을 수 있는 재현성이 반드시 수반되어야 올바른 방법이라 할 수 있다(van Belkum, 2007).

질병의 발생과 관련하여 역학조사시 원인균의 분리 및 동정 등의 실험실 검사 결과가 뒷받침될 경우 역학관련 자료로써 유용하게 이용될 수 있으며 원인체 분리시 균주 간의 비교 분석으로 상관관계를 증명함으로써 유입경로 등을 추정할 수 있다(Cloekaert와 Vizcaino, 2004).

기존의 브루셀라의 동정 및 형별은 혈청학적, 성장 요구성, 생화학적 성상, 숙주 특이성, 파지형 등의 세균학적 특성을 이용한 생물형에 의존하는 것으로 제한적이었고, 이러한 생물형별은 지리적으로 뚜렷한 동일성을 나타내는 경우가 대부분으로 역학적 추적조사에 한계를 가지고 있다(Corbel, 1989; Cloekaert와 Vizcaino, 2004).

세균의 유전자 분석은 전염병 발생 시의 흐름 파악과 발생원인 세균의 병원성 정도 또는 약제에 대한 내성패턴 등을 광범위하게 추적할 수 있는 중요한 수단으로 이용되고 있으며, 분석장비 및 기술의 향상으로 실험 시간의 단축, 정확성, 재현성, 자료의 분석 및 응용 등 여러 방면으로 향상된 기술이 지속적으로 개발되어 연구에 쓰이고 있다(van Belkum, 2007).

현재 브루셀라를 대상으로 분자유전학적 방법에 의한 형별을 시도하기 위해 polymerase chain reaction-RFLP (PCR-RFLP), enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR), repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR), arbitrary primed-PCR (AP-PCR), random amplified polymorphism DNA-PCR (RAPD-PCR), amplified fragment length polymorphism

(AFLP) 등의 여러 가지 방법이 연구자들에 의해 많이 수행되고 있으나(Fekete 등, 1992; Mercier 등, 1996; Tcherneva 등, 1996; 2000) 브루셀라의 유전학적 상동성으로 인해 반복실험에 대한 재현성 및 분별력이 부족하여 유전학적 분석방법으로 부적절한 면이 있다.

분자유전학의 발달과 더불어 세균의 유전자 염기 서열이 하나둘씩 밝혀짐에 따라 분자 단위에서의 세균을 감별하는 방법이 점점 개발되고 있으며, 이 중에서 variable number of tandem repeat (VNTR)을 이용하는 방법이 높은 재현성, 간편성, 다형태성 등을 고려할 때 유전형별을 위한 수단으로 높은 가치가 있다고 보고되고 있다(van Belkum, 2007).

Brucella spp., *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium* spp., *Yersinia pestis* 등의 병원성 세균들은 유전적으로 매우 높은 근연관계를 나타내어 동일 종 내에서 단일한 형별을 나타내는 세균이므로 기존의 분석방법이나 실험실 검사로는 다형태성 관찰이 불가능하지만 multi-locus variable number of tandem repeat assay (MLVA)를 이용함으로써 유전적 다형태성을 밝힐 수 있는 것으로 알려졌다(van Belkum, 1994; 2007).

브루셀라에서는 최소 5 bp의 직렬반복을 가진 105개의 직렬반복 유전자좌의 존재가 밝혀졌으며 이를 이용하여 유전적인 다형성을 밝혀내는 데 이용하게 되었고 최근에 105개의 직렬반복 중에서 15개의 직렬반복 유전자 부위를 이용하여 21개 브루셀라 표준균주에 대한 VNTR의 변이성을 조사한 결과 균주마다 특징적인 반복지수의 특성을 나타내는 것으로 밝혀졌다(Le Flèche 등, 2006). 현재 브루셀라에 대한 16개의 tandem repeat 유전자좌를 대상으로 primer를 제작하여 브루셀라의 유전적인 형별과 역학적인 추적 조사를 위해 이용하고 있으며 16개의 직렬반복 부위는 각각 8개의 panel 1과 panel 2로 구분되고 panel 1은 minisatellite marker에 해당하며 panel 2는 micro-satellite marker에 해당하여 panel 1에 비해 분별력이 높은 것으로 보고되고 있다(Al Dahouk 등, 2007).

경북지역은 전국에서 한·육우 사육규모가 가장 큰 지역으로 2002년 경북 영천지역에서 한우 브루셀라병이 공식적으로 보고된 이후 지속적으로 발병되고 있다. 이번 연구에서는 경북지방에서 브루셀라병으로 이환된 소에서 분리한 *B. abortus*를 대상으로 MLVA라는 유전학적 분석방법을 이용하여 유전형별을 시도하고 그 결과를 토대로 소브루셀라병의 역학적 추적 조사를 위한 실험실 분석의 기초자료로 이용

하기 위한 유용성을 확인하기 위해 실험을 하고 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험균주

2006년부터 2010년까지 경북지방에서 브루셀라병으로 확진된 소에서 분리한 *B. abortus* bv 1형 94주를 이용하였으며 분리주는 경북 9개 시·군, 41개 농장에서 유래하였다. 또한 대조균주로서 브루셀라 백신균주인 RB51주를 사용하여 동시에 실험을 수행하였다.

VNTR의 선택, DNA의 추출 및 PCR

Le Flèche 등(2006)과 Al Dahouk 등(2007)이 사용한 16 VNTR locus를 대상으로 primer를 제작(Bioneer®, Korea)하여 사용하였고 실험균주의 DNA 추출 및 증폭은 Le Flèche 등(2006)의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 즉, 실험균주를 TSA에서 CO₂ 10%, 37°C에서 72시간 순수배양한 후 DNA free 멸균 증류수 500 µl가 들어 있는 1.5 ml microtube에 1 loop를 채취하여 부유시킨 다음 100°C에서 10분간 가열하여 균체를 파괴하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 300 µl를 채취하고 새로운 microtube에 분주한 다음 PCR을 위한 template DNA로 사용하였다.

PCR은 AccuPower® HL PCR premix (Bioneer, Korea)에 template DNA 3 µl와 primer를 각각 0.5 µl씩 첨가하고 DNA free 멸균증류수 16 µl를 첨가하고 T-Gradient thermoblock (Biometra, Germany)내에서 실시하였으며 반응조건은 먼저 96°C에서 5분간 pre-denaturation시키고, 96°C에서 30초 denaturation, 60°C 30초 annealing, 70°C 60초 extension을 30회 반복하고 최종적으로 70°C에서 5분간 extension하였다.

PCR 증폭산물(amplicon)의 검출

정확한 VNTR별 PCR 증폭산물의 크기를 측정하기 위해 다채널 자동화 모세관 전기영동시스템(multichannel automatic capillary electrophoresis system)인 QIAxcel (QIAGEN, USA)을 이용하여 ±2 bp의 오차 범위 내에서 증폭산물의 크기를 측정하였으며 방법은 다음과 같다.

QIAxcel DNA high resolution kit (QIAGEN, USA)를 기계에 장착하고 calibration을 수행하였고 측정하고자 하는 PCR 증폭산물을 VNTR별로 선별한 다음 예상되는 증폭산물의 크기와 비례하여 15~400 bp (또는 15 bp~1 kb) alignment size marker (QIAGEN, USA)와 25 bp~1.8 kb (또는 25~800 bp) DNA size marker (QIAGEN, USA)를 장착하고 시료와 함께 12개의 모세관을 통해 자동으로 전기영동을 실시하였다. 전기영동을 마친 후 화면에 출력된 각 시료의 DNA 밴드를 보정하기 위해 전기영동장치 내 Biocalculator software (QIAGEN, USA)를 이용하여 alignment size marker에 맞추어 자동정렬시킨 다음 실험균주와 같이 전기영동한 DNA size marker와 비교하여 균주별 증폭크기를 구한 다음 수식처리를 위해 Microsoft excel 파일로 저장하여 자료분석에 이용하였다.

자료의 분석

QIAxcel을 이용하여 증폭산물의 크기를 측정된 후 VNTR별 증폭된 repeat unit는 Al Dahouk 등(2007)의 지수변환표를 참조하여 다음의 수식에 따라 반복지수(Repeat unit)로 변환하였고 다형성 분석프로그램인 DNA fingerprinting Informatics II (BioRad, USA)의 character type을 적용하여 categorical coefficient와 unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA)에 근거하여 분석하고 덴드로그램을 작성하였다.

$$\frac{\text{Amplicon}-(\text{amplification-unit length} \times \text{basic unit})}{\text{Unit length}} = \text{Repeat unit}$$

결 과

2006년부터 2010년까지 경북지역 브루셀라병으로 판정된 소에서 분리한 *B. abortus* 94주를 대상으로 각각의 VNTR별 PCR을 실시하고 그 증폭산물을 High resolution multichannel automatic capillary electrophoresis system을 이용하여 공시균주별 VNTR 16종의 증폭대를 측정된 결과 Bruce 04, 07, 30, 43의 4종의 VNTR에서만 균주 간 증폭산물의 차이가 확인되었고 나머지 12종의 VNTR은 모든 균주가 동일한 증폭대에서 관찰되었다(Fig. 1).

Capillary electrophoresis system에 의해 ±2 bp의 오

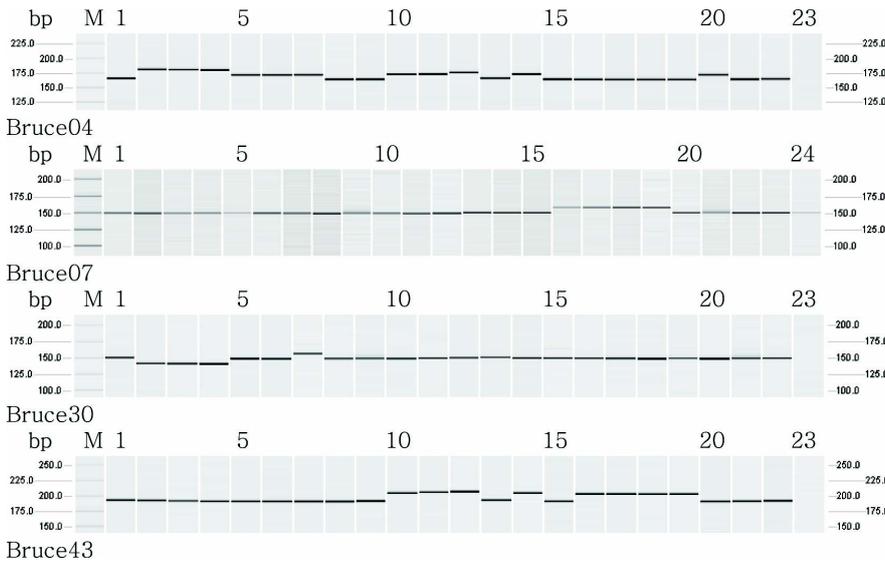


Fig. 1. Amplicon size resolution of VNTR locus by automatic capillary electrophoresis system. Size variability was detected only in Bruce 04, 07, 30 and 43. M; DNA size marker; 1-23(24): *B. abortus* isolates.

차범위 내에서 증폭산물의 크기를 계산한 결과 공시균주의 VNTR별 증폭산물의 크기를 측정하고 16 VNTR별로 증폭산물을 반복지수로 변환하여 전문분석프로그램인 DNA fingerprinting Informatics II의 character type을 적용하여 유전학적 상관관계를 분석한 결과는 Fig. 2와 같이 A에서 M까지 총 13개의 유전형별로 나타났으며, 16 MLVA의 VNTR별 반복지수에 근거한 수치로 pattern을 분석한 결과는 Table 1과 같다. MLVA pattern에 따른 유전형 중에서 D형이 가장 많은 48주(51.0%)이었고, A형이 16주(17.0%), F형이 7주(7.4%), L형이 6주(6.4%) 등으로 나타났다.

94주의 *B. abortus*가 분리된 9개 시군별 유전형을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 경산시의 11 농장에서 분리된 25주의 *B. abortus*는 3개(D, F, M)의 유전형으로 분류되었고 영천시의 8개 농장에서 분리된 18주는 7개(A, B, E, F, J, K, L)의 유전형으로 분류되었으나 가장 많은 유전형인 D형은 없는 것으로 조사되었고 청도군에서 분리된 21주는 5개(A, C, D, G, I)의 유전형으로 분류되었다. 농장별로 분리균주의 유전형은 대부분 동일한 유전형으로 표현되었으나 고령, 영천 및 청도의 5개 농장은 2가지 이상의 유전형이 혼재하는 것으로 조사되었다(Table 3).

연도별로 유전형의 분류를 조사한 결과는 Table 4와 같다. 2006년에 분리된 20개 농장 48주의 *B. abortus*는 8개의 유전형으로 분류되었고 그중에서 D형이 32주로 가장 많은 것으로 나타났고 2009년 및 2010년 분리주는 각 5개의 유전형으로 분류되었다.

고 찰

최근 브루셀라속에 대한 전체적인 유전자 염기서열이 밝혀짐에 따라 VNTR의 존재가 확인되었고 이들 VNTR을 이용한 DNA 지문분석법의 사용으로 역학적인 추적조사에 활용하고자 하는 노력이 많이 시도되고 있다(van Belkum, 2007).

이 실험에 사용한 MLVA는 여러 연구자에 의해 분류가 어려운 여러 병원성을 대상으로 실험한바, 유전학적 상관관계 분석에 아주 적합한 방법의 하나로 이미 입증된 바 있다(Le Flèche 등, 2006).

Bricker 등(2005)은 미국의 5개 주 10개의 우군에서 분리한 *B. abortus* bv 1형 17주와 사슴과 들소에서 분리한 *B. abortus* bv 1형 각각 2주 및 3주, 그리고 *B. abortus* 표준균주 7주와 백신주 2주를 대상으로 8 bp의 직렬반복을 가지는 8개의 loci를 선택하고 capillary genetic analyzer를 이용하여 유전적 유사성을 분석한 결과 유전형에서 차이가 인정되며 농장 내에서 분리한 균주 간에 유전적인 상관관계가 매우 근연이었으며, 지리적인 상관관계를 조사한 결과 또한 유사한 유전적 양상을 나타내었으며 브루셀라병 발생 시에 역학적인 추적조사를 통한 분리균의 상관관계를 밝히기 위한 보조수단으로 가치가 인정된다고 하였다. 또한, PCR 기법에 근거한 VNTR을 이용하여 분자 수준에서의 균형별 방법으로 MLVA가 PFGE, RAPD 등의 다른 유전자지문분석 방법보다 실험의 간편성 자료의 활용도, 처리능력 등의 면에서 우수한 것으로 나타나 VNTR을 이용한 MLVA는 브루셀라에 있어서

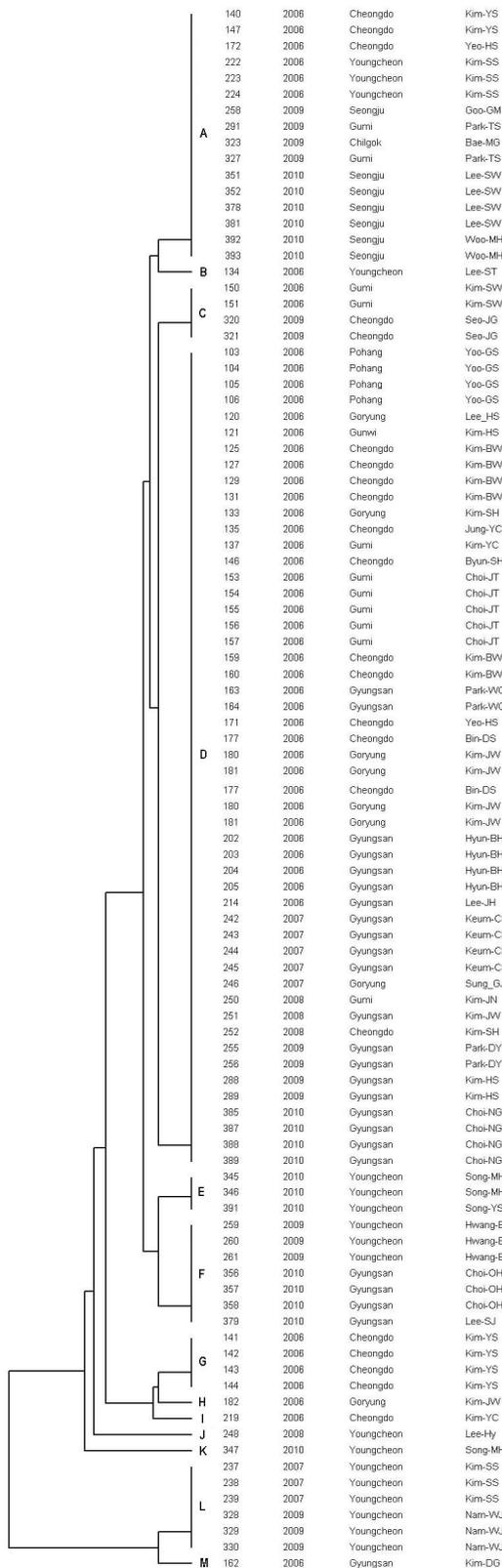


Fig. 2. Dendrogram of 94 *B. abortus* isolates by character type of UPGMA using 16 VNTR locus. Isolates were classified into 13 genotypes (A-M).

Table 1. MLVA patterns of 94 *B. abortus* isolates used in this study

16 MLVA pattern*	No. of farm	No. of isolates (%)	Genotype
4-5-4-12-2-3-3-3-4-4-3-3-6-21-8-6	6	16 (17.0)	A
4-5-4-12-2-3-3-3-4-4-3-3-6-21-8-5	1	1 (1.1)	B
4-5-4-12-2-5-3-3-4-4-3-3-6-21-8-6	2	4 (4.2)	C
4-5-4-12-2-4-3-3-4-4-3-3-6-21-8-6	23	48 (51.0)	D
4-5-4-12-2-3-3-3-5-4-3-3-6-21-8-6	1	3 (3.2)	E
4-5-4-12-2-4-3-3-5-4-3-3-6-21-8-6	3	7 (7.4)	F
4-5-4-12-2-4-3-3-4-5-3-3-6-21-8-5	1	4 (4.2)	G
4-5-4-12-2-4-3-3-4-4-3-3-6-21-8-5	1	1 (1.1)	H
4-5-4-12-2-5-3-3-4-5-3-3-6-21-8-5	1	1 (1.1)	I
4-5-4-12-2-5-3-3-4-4-3-3-6-21-8-7	1	1 (1.1)	J
4-5-4-12-2-3-3-3-5-4-3-3-6-21-8-7	1	1 (1.1)	K
4-5-4-12-2-3-3-3-6-4-3-3-6-21-8-5	2	6 (6.4)	L
4-5-4-12-2-3-3-3-5-4-3-3-6-21-8-5	1	1 (1.1)	M
13 genotypes		94	

*Tandem repeat copy numbers were arranged in the following order. Panel 1 (Bruce 06, 08, 11, 12, 42, 43, 45, 55), and panel 2 (bruce 04, 07, 09, 16, 18, 19, 21, 30).

우수한 감별력을 나타낸다고 하였다.

한편, 조 등(2009)은 유전학적 방법의 하나인 PFGE를 이용하여 경북지역에서 분리한 107주의 *B. abortus*를 대상으로 유전형별을 실시하여 두 가지 유형으로 분리된다고 보고하여 분별력이 낮다고 보고한 바 있다.

Le Flèche 등(2006)은 10개국의 다양한 지역에서 분리된 236주의 *Brucella* spp.를 대상으로 15개의 VNTR로 구성된 MLVA를 실시하여 총 204개의 유전형으로 분류된다고 보고하면서 MLVA는 분별력이 우수하다고 하였고 Al Dahouk 등(2007)은 사람 브루셀라병에 대한 진단적, 역학적 목적을 위한 MLVA의 적용성을 평가하기 위해 사람 유래 *B. melitensis* 128주를 대상으로 기존의 15개의 VNTR marker에 1개의 microsatellite marker를 추가하여 16 MLVA를 구성하여 형별을 시도한바 110개의 유전형으로 분류되며 panel 1에 비해 microsatellite로 구성된 panel 2가 감별력이 더 높다고 보고하였다.

이 실험에서는 94주의 *B. abortus*를 대상으로 MLVA를 실시한 결과 총 13개의 유전형으로 분류되었으며 경북지역이라는 지리적인 제한성을 고려해 볼 때 유전형별이 다소 낮은 것으로 생각하나 연도별, 지역적인 유전형별 차이점을 토대로 브루셀라병 발생과 관련된 역학조사를 위한 유전학적 분석의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각한다. 이 실험에서 균분리하여 적용된 경북지역 9개 시군 중에서 영천시역은 타 시군보다 유전형이 7가지로 상대적으로 많은

Table 2. Distribution of genotype of 94 *B. abortus* isolates by districts of Gyeongbuk province

Region	No. of farms	No. of isolates	Year	Genotype
Gyeongsan	11	25	2006, 2007, 2008, 2009, 2010	D, F, M
Goryeong	4	6	2006, 2007	D, H
Gumi	5	11	2006, 2008, 2009	A, C, D
Gunwi	1	1	2006	D
Seongju	3	7	2009, 2010	A
Yeongcheon	8	18	2006, 2007, 2009, 2010	A, B, E, F, J, K, L
Cheongdo	8	21	2006, 2008	A, C, D, G, I
Chilgok	1	1	2009	A
Pohang	1	4	2006	D
Total	41	94	2006~2010	

Table 3. MLVA patterns of *B. abortus* isolates in farms with two or more genotypes

Name of farm	Region	No. of isolates	16 MLVA pattern	Genotype
Kim-SS	Yeongcheon	3	4-5-4-12-2-3-3-3-4-4-3-3-6-21-8-6	A
		3	4-5-4-12-2-3-3-3-6-4-3-3-6-21-8-5	L
Kim-YS	Yeongcheon	2	4-5-4-12-2-3-3-3-4-4-3-3-6-21-8-6	A
		4	4-5-4-12-2-4-3-3-4-5-3-3-6-21-8-5	G
		1	4-5-4-12-2-5-3-3-4-5-3-3-6-21-8-5	I
Kim-JY	Goryeong	3	4-5-4-12-2-4-3-3-4-4-3-3-6-21-8-6	D
		1	4-5-4-12-2-4-3-3-4-4-3-3-6-21-8-5	H
Song-MH	Yeongcheon	2	4-5-4-12-2-3-3-3-5-4-3-3-6-21-8-6	E
		1	4-5-4-12-2-3-3-3-5-4-3-3-6-21-8-7	K
Ye-HS	Cheongdo	1	4-5-4-12-2-3-3-3-4-4-3-3-6-21-8-6	A
		1	4-5-4-12-2-4-3-3-4-4-3-3-6-21-8-6	D

Table 4. Distribution of genotypes (MLVA patterns) among 94 *B. abortus* isolates

Year	Farm	Isolates	Genotype (No)*
2006	20	48	A (6), B (1), C (2), D (32), G (4), H (1), I (1), M (1)
2007	3	8	D (5), L (3)
2008	4	4	D (3), J (1)
2009	8	16	A (4), C (2), D (4), F (3), L (3)
2010	7	18	A (6), D (4), E (3), F (4), K (1)
Total	42 [†]	94	

*No. of isolates classified by genotype. [†]One farm was duplicated in 2006 and 2007.

것으로 나타났으며 또한 주로 유전형 D형은 한 주도 없어 특이한 점으로 생각되고 유전형이 혼재한 5개 농가 중에서 영천지역이 3농장으로 나타나 브루셀라병 발생과 관련하여 외부 소의 입식 등 감염경로에 대한 추가조사가 필요할 것으로 생각한다. 이 실험에서는 동일한 16 MLVA를 이용하여 경북지역에서 분리한 *B. abortus*를 대상으로 기존의 젤 전기영동법을 대신하여 high resolution automatic capillary electro-

phoresis system을 이용하여 유전형별을 시도한 결과 기존의 PCR 증폭산물을 확인하기 위한 젤 전기영동법보다 시간의 단축, 정확성, 다량의 시료를 처리할 수 있는 장점이 있는 것으로 확인되었고 고가의 자동화 DNA 염기서열 분석기를 이용한 DNA 크기 측정 방법에 비해 저렴하고 간단하게 분석에 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

영천지역은 경북에서 최초로 한우 브루셀라병 발생이 보고되고 우시장과 우상인에 의한 소의 거래가 빈번한 지역으로 이 실험에서 동일농장에서 2개 이상의 유전형이 나타난 경우가 5개 농장이었으며 그 중에서 영천지역이 3개 농장으로 가장 많은 것으로 나타나 영천지역의 브루셀라병 발생 특성과 관련이 있을 것으로 생각한다.

Al Dahouk 등(2005)은 브루셀라병에 걸려 항생제 치료를 받은 환자가 브루셀라병에 재발한 경우에 대해 치료전후에 브루셀라균을 분리하여 MLVA를 이용하여 두 균주 간의 유전적인 상관관계를 조사하여 감염경로가 다른 재감염의 경우인지 또는 치료실패에 의한 지속적인 감염 상태인지를 조사한 결과를 받

표하여 MLVA 결과 문진에 의한 역학상항과 유전적인 유사성을 고려할 때 단기간 항생제 처방에 따른 치료실패로 보고한 바 있다.

Garcia-Yoldi 등(2007)은 *B. suis*를 대상으로 다른 PCR 기법에 근거한 유전자분석법과 VNTR을 이용한 MLVA에 의한 유전자분석을 동시에 수행하고 MLVA에 의한 방법이 감염의 역학적 추적조사와 *B. suis*의 형별을 위한 가장 적합한 방법이라고 제안하였고 Valdezate 등(2007)은 스페인 전역에서 발생한 *B. melitensis*에 의한 사람 브루셀라병에 대한 역학조사를 위한 수단으로 MLVA에 의한 유전학적 분석을 하고 결과를 보고하면서 실험의 재현성이 우수하고 실험실 감염 등의 생물학적 위험성을 고려할 때 신속하고 안전한 방법이라고 제시하였다.

이번 실험에서도 초기의 균 배양과정을 제외한 대부분 실험과정에서 실험자의 감염 등의 위험이 감소하여 실험실 안전성이 유지되었고 많은 검사대상을 동시에 수행할 수 있는 장점이 있는 것으로 나타났다.

Marianelli 등(2007)은 이탈리아 시칠리 섬에서 분리한 20주의 *B. melitensis*를 대상으로 16 MLVA loci를 이용하여 유전형별을 시도하여 17개의 유전형으로 분류하고 VNTR 중 06, 45, 55는 균주 간에 동일한 반복지수를 가지는 것으로 보고하였다.

이번 실험에서는 16개의 VNTR 중에서 Bruce 04, 07, 30, 43의 VNTR만이 균주 간에 일부 다양성이 확인되었고 나머지 VNTR은 동일한 반복지수가 확인되어 브루셀라균종 간에 VNTR의 선택에 따라 다소 차이가 있는 것으로 생각되며 더 많은 균주를 대상으로 지속적인 MLVA에 대한 검사가 필요하고 새로운 VNTR을 추가 선발하여 분별력을 향상하는 시험이 필요하리라고 생각된다.

결 론

브루셀라병은 인수공통전염병으로 전 세계적으로 발생하는 매우 중요한 질병이다. 현재까지 생물학적 실험실 검사에 의해 8개의 종으로 분류되고 있으나 유전적으로 90% 이상의 상동성을 나타내고 있다. 브루셀라를 대상으로 유전학적 분류를 위한 여러 가지 방법이 시도되고 있으나 재현성 및 분류의 한계를 나타내고 있다. 이에 이번 실험에서는 소 브루셀라병의 역학적 추적조사를 위한 실험실에서의 유전학적 분

석을 위한 MLVA의 활용성을 조사하였다. 2006년에서 2010년 사이에 경북지역에서 분리한 94주의 *B. abortus*를 대상으로 16개의 VNTR로 구성된 MLVA를 실시하여 유전형별을 시도하였으며 분석결과 총 13개의 유전형으로 분류되었고 VNTR 04, 07, 30, 43에서 균주 간의 유전학적 다양성이 확인되었다. 따라서 MLVA는 소 브루셀라병의 역학적 추적조사를 위한 실험실적 보조수단으로 이용가치가 있는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

- 조민희, 김성국, 김영환, 김순태, 엄현정, 장영술, 고영환. 2009. PFGE를 이용한 경북지역에서 분리된 *Brucella abortus*의 유전형별. 한국가축위생학회지 32: 257-264.
- Al Dahouk S, Hagen RM, Nockler K, Tomaso H, Wittig M, Scholz HC, Vergnaud G, Neubauer H. 2005. Failure of a short-term antibiotic therapy for human brucellosis using ciprofloxacin. *Chemotherapy* 51: 352-356.
- Al Dahouk S, Flèche PL, Nöckler K, Jacques I, Grayon M, Scholz HC, Tomaso H, Vergnaud G, Neubauer H. 2007. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Methods* 69: 137-145.
- Alton GG. 1975. Laboratory techniques in brucellosis. 2nd ed. pp. 11-63. WHO.
- Beran GW. 1994. Handbook of zoonoses. 2nd ed. pp. 9-39. CRC Press, Boca Raton.
- Bricker BJ, Ewalt DR. 2005. Evaluation of the HOOFF-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC Microbiol* 5: 37.
- Cloeckaert A, Vizcaino N. 2004. DNA polymorphism and taxonomy of *Brucella* species. pp. 1-24. In: López-Goñi I, Moriyón I(ed.). *Brucella: molecular and cellular biology*. Horizon Bioscience. Norfolk, England.
- Corbel MJ. 1989. Brucellosis: epidemiology and prevalence worldwide. pp. 25-40. In: Young EJ, Corbel MJ(ed.). *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. CRC Press, Boca Raton.
- Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Stich RW. 1992. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol* 23: 7778-7783.
- 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: 1135-1142.
- Foster G, MacMillan AP, Godfroid J, Howie F, Ross HM, Cloeckaert 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.

- Garcia-Yoldi D, Le Fleche P, De Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Cvetnic Z, Marin CM, Vergnaud G, López-Goñi I. 2007. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella* suis isolates. *J Clin Microbiol* 45: 4070-4072.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. 2005. Brucellaceae. pp. 370-389. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM(ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol 2. Springer Press, New York.
- Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon O, Denoed F, Nöckler K, Neubauer H, Guilloteau LA, Vergnaud G. 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 9;6:9.
- Marianelli C, Graziani C, Santangelo C, Xibillia MT, Imbriani A, Amato R, Neri D, Cuccia M, Rinnone S, Dimarco V, Ciuchini F. 2007. Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. *J Clin Microbiol* 45: 2923-2928.
- Mercier E, Jamus-Bilak E, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, Ramuz M. 1996. Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. *J Clin Microbiol* 34: 1299-1302.
- Moreno E, Cloeckert A, Moriyón I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* 90: 209-227.
- Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B, Herman LMF. 2000. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Appl Microbiol* 88: 69-80.
- Tcherneva E, Rijpens N, Naydensky C, Herman LMF. 1996. Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains. *Vet Microbiol* 15: 169-178.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. The Genus *Brucella*. pp. 135-152. In: Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals. 8th ed. Cornell University Press, New York.
- Valdezate S, Cervera I, Hernandez P, Saéz Nieto JA. 2007. Characterization of human outbreaks of brucellosis sporadic cases by the use of hyper-variable octameric oligonucleotide fingerprint (HOOF) variable number tandem repeats. *Clin Microbiol Infect* 13: 887-892.
- van Belkum A. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 7: 174-184.
- van Belkum A. 2007. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol* 49: 22-27.
- Verger JM, Grimont F, Grimont PA, Grayon M. 1985. Taxonomy of genus *Brucella*. *Ann Ins Pasteur Microbiol* 138: 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: 182-187.