

< Original Article >

경북지역 개에서 분리된 *Brucella canis*의 MLVA-16 typing

김성국* · 손준형 · 장영술 · 김상윤

경상북도가축위생시험소

MLVA typing of *Brucella canis* isolated from dogs in Gyeongbuk province, Korea

Seong-Guk Kim*, Joon-Hyung Sohn, Young-Sul Jang, Sang-Yoon Kim

Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Daegu 702-911, Korea

(Received 5 September 2012; revised 15 December 2012; accepted 20 December 2012)

Abstract

Canine brucellosis is the zoonosis in worldwide and *Brucella (B.) canis* is a facultative intracellular pathogen that has a very limited host. MLVA-16 (Multilocus VNTR analysis) is a efficient method for genotyping of *Brucella* species. Various methods have been established for genotyping of *Brucella* species, but most of analytical method is lack reproducibility and limited capability to differentiate them. *B. canis* isolates (n=73) from 7 farms in Gyeongbuk province in 2003~2010 were analyzed using 16 VNTR loci. Automatic electrophoresis system was utilized for more high throughput and rapid simple discrimination. Thirty two genotypes were identified from 73 *B. canis* isolates. MLVA could contribute to molecular typing for epidemiological evaluation of canine brucellosis.

Key words : *Brucella canis*, VNTR, MLVA, Genotype

서 론

*Brucella (B.) canis*는 미국의 비글견 번식장에서 발생한 유산증의 원인을 조사하던 중 유산태아에서 처음 분리되었고, 이후 1968년 균의 생화학적 특성을 조사하여 *B. canis*라고 정식 명명되었다(Carter와 Wise, 2004; Metcalf 등, 1994). *B. canis*는 구강, 질, 결막 등 점막조직을 통해 감염되고, 수컷의 오줌을 통해 다량 배출되며 인공감염 후 2~4주 경과부터 혈액에서 균이 검출되며 균혈증이 1년 이상 길게는 5년간 지속되는 것으로 보고되고 있다(Hall, 1989). 개 브루셀라병은 임신 말기인 45~60일령 사이에 유산을 일으키고, 전립선염과 고환의 위축을 일으키며, 특히 감염 3개월 후 정액에는 많은 수의 비정상적인 정충과 염증세포가 존재하며 만성형으로 진행되어 무정자증과 정

자생성의 저하로 인해 교미 후 재발 및 불임을 일으킨다(Carmichael과 Kenney, 1970; Pickerill, 1970; Spink, 1970). 인수공통전염병으로 사람 감염은 극히 드물지만 실험실 또는 감염견과의 접촉에 의한 감염이 보고된 바 있으며, 증상은 다른 브루셀라증에 비해 경미하나 만성 피로와 지속적인 발열, 림프절의 종대 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Metcalf 등, 1994; Shin과 Carmichael, 1999).

개 브루셀라병은 국내에서 Moon 등(1999)이 1994년 전남지역 집단유산 발생 애견 번식장에서 혈청검사와 균분리를 보고하였고, Park과 Oh(2001)는 대구지역에서의 혈청학적 및 균분리 성적을 보고한 바 있으며, Chang 등(2000)이 진돗개를 대상으로 25%의 항체양성률과 균분리 성적을 보고하였고, Kim 등(2007)은 경북지역 애견번식장에서 균분리하여 생화학적 성상과 PFGE (Pulsed field gel electrophoresis)를 이용한 유전학적 특성을 보고하였다.

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

세균의 분류법은 전통적으로 생물형, 혈청형, 파지형, 약제내성형 등의 방법이 있으나, 최근 유전학적 방법에 의한 유전형별이 많이 이용되고 있으며(Chu 등, 1986), 질병 발생 시 원인균을 대상으로 균주 간 유전학적 분석 자료를 이용하여 상관관계를 증명함으로써 질병유입경로 등을 추정할 수 있다.

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 추적 조사에 한계를 가지고 있다(Bricker, 2004; Hall, 1989).

세균의 유전자 분석은 전염병 발생시의 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 있으며 특히 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).

브루셀라균은 최소 5 bp 이상의 직렬반복(Tandem repeat)을 가진 105개의 유전자좌(locus)가 존재하는 것으로 밝혀졌으며 이들 유전자좌 중에서 16개의 직렬반복 유전자좌를 대상으로 primer를 제작하여 브루셀라의 유전적인 형별과 역학조사를 위해 이용하고 있으며 microsatellite marker에 해당하는 panel 2가 분별력이 높은 것으로 보고되고 있다(Al Dahouk 등, 2007).

최근 들어 애완견 산업이 발전하고 외국에서의 종견 수입이 증가하고 애완견 번식장의 규모가 커짐에 따라 개 브루셀라균의 감염에 따른 유사산 질병 발생 시 농장에 막대한 경제적 피해를 초래하게 되는 것은 물론, 공중보건학적인 측면에서도 문제 시 될 수 있

다. 이에 이번 연구에서는 경북지역에서 유산 및 불임 등의 번식장애가 발생한 애견농장에서 병성감정 의뢰된 개의 혈액에서 분리한 *B. canis*를 대상으로 MLVA를 이용하여 질병 발생의 역학적 및 유전학적 상관관계를 분석한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험균주

2003년부터 2010년까지 경북지역 소재 7개의 애견 번식장에서 분리된 *B. canis* 73주를 대상으로 실험을 수행하였다.

MLVA의 수행

Al Dahouk 등(2007)이 사용한 16 VNTR locus를 대상으로 전문업체(Bioneer[®], Korea)에 제작하여 Kim 등(2011)이 실시한 방법에 따라 DNA 추출 및 유전자 증폭을 실시하였다. VNTR별 증폭산물의 크기를 정확히 측정하기 위해 다채널 자동화 모세관 전기영동 시스템(multichannel automatic capillary electrophoresis system)을 이용하여 ± 2 bp의 오차 범위 내에서 증폭산물의 크기를 측정하였다.

측정된 VNTR별 증폭산물의 크기는 Al Dahouk 등(2007)의 지수변환표를 참조하여 반복지수(Repeat unit)로 변환하였고 전용분석프로그램(DNA fingerprinting Informatics II, BioRad, USA)을 이용하여 dendrogram을 작성하고 유전적 거리를 측정하였다.

결 과

2003년부터 2010년까지 경북지역 애견번식장에서 분리된 *B. canis* 73주를 대상으로 각각의 VNTR별 PCR을 실시하고 그 증폭산물을 automatic electrophoresis system을 이용하여 공시균주별 VNTR 16종의 증폭대를 측정하여 panel 1 부위에서는 Bruce 11, panel 2 부위에서는 Bruce 04, 07, 09, 16, 18, 19, 21에서 실험균주 간 증폭산물의 차이가 확인되었으며 Bruce 09는 지수변환에서 9가지의 다양성을 나타내어 16 VNTR 중에서 다형성이 가장 높은 것으로 나타났다(Table 1).

Table 1. Number of alleles of each VNTR for 73 *B. canis* isolates

VNTR		No. of alleles	Copy number*	VNTR		No. of alleles	Copy number
Panel 1	Bruce 06	1	2	Panel 2	Bruce 18	2	4, 5
	Bruce 08	1	3		Bruce 19	4	18, 19, 20, 21
	Bruce 11	3	7, 8, 9		Bruce 21	2	9, 10
	Bruce 12	1	11		Bruce 04	6	3, 4, 5, 6, 7, 8
	Bruce 42	1	3		Bruce 07	3	3, 4, 5
	Bruce 43	1	1		Bruce 09	9	5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
	Bruce 45	1	5		Bruce 16	5	4, 5, 6, 7, 8
Bruce 55	1	2	Bruce 30	1	3		

*Alleles assignment to convert alleles size into number of repeats.

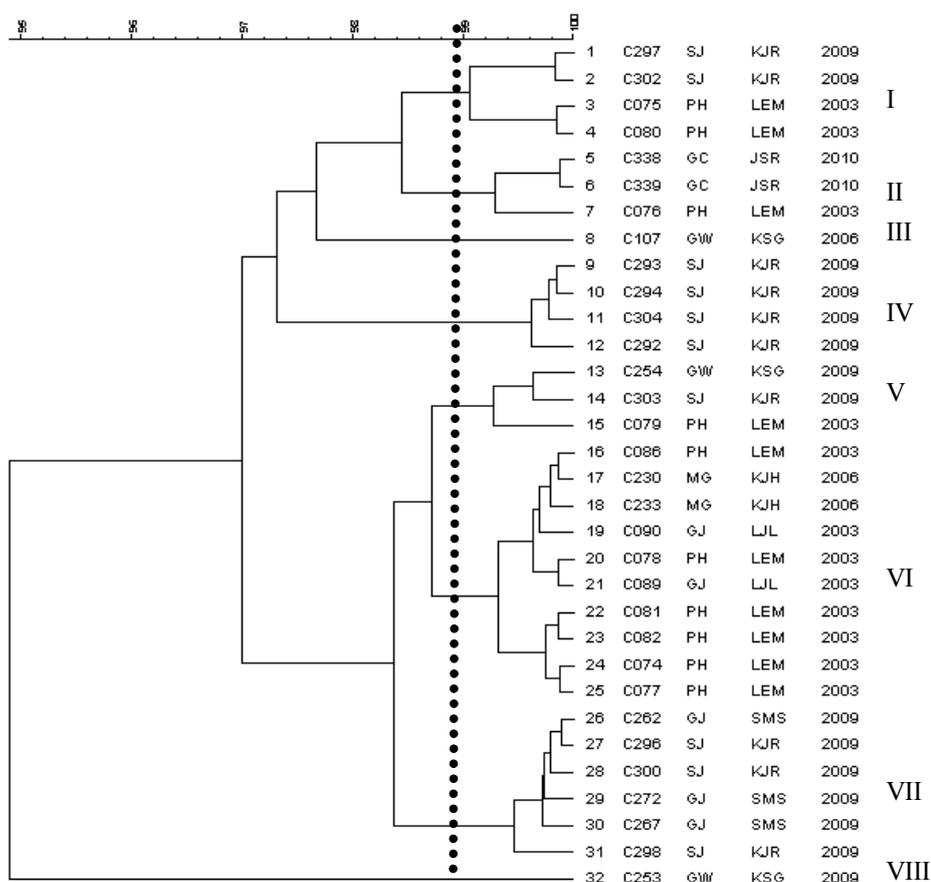


Fig. 1. Dendrogram of 73 *B. canis* isolates by character type of UPGMA using 16 VNTR locus. There were classified into 32 genotypes.

실험균주의 VNTR별 증폭산물의 크기를 측정하고 반복지수로 변환하여 전용분석프로그램으로 유전학적 상관관계를 분석한 결과는 총 32개의 유전형별로 나타났으며(Fig. 1), 16 MLVA의 VNTR별 반복지수에 근거한 수치로 pattern을 분석한 결과는 Table 2와 같았다. MLVA pattern에 따른 유전형 중에서 VII-a형이 가장 많은 23주로 나타났으며 VI-a, VI-j, IV-b, II-a형

이 각각 3주이고 나머지 유전형들은 각각 1~2주로 나타났다.

실험균주의 분리농장별 유전형을 조사한 결과는 Table 3과 같았다. 문경(KJH), 경주(SMS, LJL), 김천(JSR) 소재 농장의 경우 각각, VI형, VII형, VI형, 및 II형으로 농장별 동일한 패턴으로 분류되었으나 군위(KSG) 농장은 III, V, VIII형으로 세분류되었고, 성주

Table 2. MLVA patterns of 73 *B. canis* isolates

16 MLVA pattern*	No. of farm	Isolates	Geno-type
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-5-4-11-5-3	1	1	VI-g
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-5-4-11-6-3	1	2	VI-h
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-10-5-3	2	2	VI-e
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-10-6-3	2	3	VI-a
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-10-7-3	1	1	VI-c
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-11-6-3	1	3	VI-j
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-11-8-3	1	1	V-c
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-12-6-3	1	1	VI-i
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-9-5-3	1	2	VI-f
2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-9-6-3	1	2	VI-b
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-3-5-8-4-3	1	1	IV-c
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-3-14-4-3	1	1	VIII-a
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-10-7-3	2	2	VII-e
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-11-7-3	2	23	VII-a
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-11-8-3	1	2	VII-d
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-5-6-3	1	2	III-a
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-7-7-3	1	1	I-b
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-8-7-3	1	1	I-a
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-5-11-7-3	1	2	VII-c
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-5-7-4-3	1	1	IV-d
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-5-8-4-3	1	3	IV-b
2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-5-9-4-3	2	2	IV-a
2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-4-4-12-7-3	1	1	VII-b
2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-4-4-13-8-3	1	1	VII-f
2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-9-6-3	1	1	VI-d
2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-6-5-7-8-3	1	1	I-d
2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-6-5-8-6-3	1	1	II-c
2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-6-5-8-8-3	1	2	I-c
2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-8-4-12-7-3	2	2	V-a
2-3-8-11-3-1-5-2-4-20-9-7-4-13-8-3	1	1	V-b
2-3-9-11-3-1-5-2-5-21-10-8-5-10-7-3	1	1	II-b
2-3-9-11-3-1-5-2-5-21-10-8-5-9-7-3	1	3	II-a
32 genotypes	38	73	

*Tandem repeat copy numbers were arranged in the following order; Panel 1 (Bruce06, 08, 11, 12, 42, 43, 45, 55), and panel 2 (bruce18, 19, 21, 04, 07, 09, 16, 30).

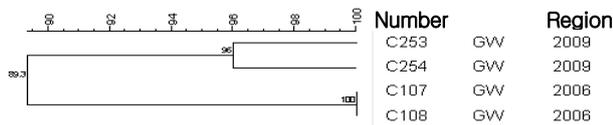


Fig. 2. Genetic relationship of 4 *B. canis* isolates from Gunwi (KSG) farm by character type of UPGMA using 16 VNTR locus.

(KJR), 경주(LEM)의 농장에서도 농장별 다양한 유전형이 존재하는 것으로 확인되었다.

군위(KSG) 농장에서 2006년과 2009년에 분리된 4주의 *B. canis*에 대하여 유전적 상관관계를 작성한 결

과는 Fig. 2와 같았다. 2006년과 2009년 분리주간 유전적 유사도가 89.3%로 연도별 브루셀라병의 유래가 서로 다른 것으로 나타났다.

16 MLVA를 이용하여 분류된 32 유전형에 대하여 maximum parsimony tree를 작성하여 계통학적 유전거리를 조사한 결과는 Fig. 3과 같았다. 2003년의 포항(LEM)과 경주(LJL)농장을 중심으로 하여 경주(SMS), 문경(KJH), 김천(JSR) 등이 각각 좌우로 가지 모양으로 분포하고 있는 반면, 성주(KJR)와 군위(KSG) 농장 분리주는 다양한 분포 양상을 나타내었다.

고찰

브루셀라균에 대한 전체 유전자 염기서열이 밝혀짐에 따라 VNTR을 이용한 DNA 지문분석법인 MLVA를 이용한 역학조사의 과학적 근거로 활용하기 위한 연구가 진행되고 있다.

Bricker와 Ewalt(2005)은 미국 우군에서 분리된 *B. abortus* bv 1형과 사슴과 들소에서 분리된 *B. abortus* bv 1형을 8 bp 직렬반복을 가진 8개의 VNTR loci를 선택하고 실험한 결과 유전형 유사도에서 차이가 인정되며 브루셀라병 발생시에 역학조사를 통한 분리균의 상관관계를 밝히기 위한 보조수단으로 가치가 인정되며 PFGE, random amplified polymorphic DNA (RAPD) 등의 다른 유전자분석법보다 실험의 간편성 자료의 활용도, 처리능력 등의 면에서 우수한 것으로 나타나 VNTR을 이용한 MLVA는 브루셀라에 있어서 우수한 감별력을 나타낸다고 하였다. Kim 등(2007)은 경북지역 애견장에서 분리한 *B. canis*를 대상으로 PFGE를 실시한 결과 두 가지 유전형으로 분류된다고 보고한 바 있으며 이번 실험에서는 32개의 유전형으로 세분되어 PFGE보다 MLVA에 의한 감별력이 뛰어난 것으로 나타났다.

Kang 등(2011)은 14개 농장에서 분리된 77 *B. canis*를 대상으로 유전형별을 조사한 바, 30개의 유전형으로 분류되며 17 VNTR loci 중에서 Bruce 11, 19, 4, 7, 9, 16 및 Hoof-3에서 균주간 유전적 다양성이 확인되었다고 보고한 바 있으나 이번 실험에서는 Al Dahouk 등(2007)의 16 VNTR을 이용하여 조사한 결과 Bruce 11, 18, 19, 21, 4, 7, 9, 16의 VNTR에서 반복지수의 다양성이 확인되었으며 특히 Bruce 09에서는 반복지수가 9가지로 나타나 다양성이 높은 것으로 조사되었다.

Table 3. Comparison of MLVA patterns by farm of *B. canis* isolates

Name of farm	Region	No. of isolates	16 MLVA pattern	Genotype
KSG	Gunwi (GW)	1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-3-14-4-3	VIII-a
		2	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-5-6-3	III-a
KJH	Mungyeong (MG)	1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-8-4-12-7-3	V-a
		1	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-10-6-3	VI-a
		2	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-9-6-3	VI-b
		1	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-10-5-3	VI-e
KJR	Seongju (SJ)	1	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-10-7-3	VI-c
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-3-5-8-4-3	IV-c
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-10-7-3	VII-e
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-11-7-3	VII-a
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-7-7-3	I-b
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-8-7-3	I-a
		2	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-5-11-7-3	VII-c
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-5-7-4-3	IV-d
		3	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-5-8-4-3	IV-b
		2	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-5-9-4-3	IV-a
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-4-4-12-7-3	VII-b
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-4-4-13-8-3	VII-f
		SMS	Gyeongju (GJ)	1
1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-20-9-7-4-13-8-3			V-b
1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-10-7-3			VII-e
22	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-11-7-3			v-a
2	2-3-8-11-3-1-5-2-4-18-9-4-4-11-8-3			VII-d
LEM	Gyeongju (GJ)	1	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-5-4-11-5-3	VI-g
		2	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-5-4-11-6-3	VI-h
		1	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-10-5-3	VI-e
		2	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-10-6-3	VI-a
		3	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-11-6-3	VI-j
		1	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-11-8-3	V-c
		1	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-12-6-3	VI-i
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-6-5-7-8-3	I-d
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-6-5-8-6-3	II-c
		2	2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-6-5-8-8-3	I-c
LJL	Gyeongju (GJ)	2	2-3-7-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-9-5-3	VI-f
		1	2-3-8-11-3-1-5-2-4-19-9-6-4-9-6-3	VI-d
JSR	Gimcheon (GC)	1	2-3-9-11-3-1-5-2-5-21-10-8-5-10-7-3	II-b
		3	2-3-9-11-3-1-5-2-5-21-10-8-5-9-7-3	II-a

Al Dahouk 등(2007)은 16 MLVA를 구성하여 유전형별을 시도한 바 panel 1에 비해 panel 2가 감별력이 더 높다고 보고하였으며 이번 실험에서도 micro-satellite로 구성된 panel 2에서 유전자 내 직렬반복으로 표현되는 반복지수의 다양성이 더 높은 것으로 확인되었다.

Al Dahouk 등(2005)은 항생제 처치한 브루셀라병 환자가 재발한 경우에 치료전·후 브루셀라균을 분리하여 MLVA로 균주간 유전적인 상관관계를 조사한 결과 감염경로가 다른 재감염 또는 치료실패에 의한 지속적인 감염 상태인지를 조사한 결과를 발표한 바 있다. 이번 실험에서 균위 소재 애견번식장의 경

우 2006년도 분리주와 2009년 분리주간의 유전적 상관관계를 조사한 결과를 보면 2006년 분리주에 의한 재발생이 아닌 새로운 유입에 의한 발생인 것으로 나타나 입식견에 대하여 개브루셀라병 검진이 반드시 이루어져야 할 것으로 판단된다.

이번 실험에서 경북지역 유래 73주의 *B. canis*를 대상으로 MLVA를 실시한 결과 총 32개의 유전형으로 분류되어 지리적인 제한성을 고려해 볼 때 유전형이 다소 낮을 것으로 생각하였으나 Kang 등(2011)이 전국 14개 농장을 대상으로 실시한 30 genotype 보다 높은 분별력을 나타낸 것으로 조사되었다. 이번 실험에서는 기존의 겔전기영동법을 대신하여 자동화전기영

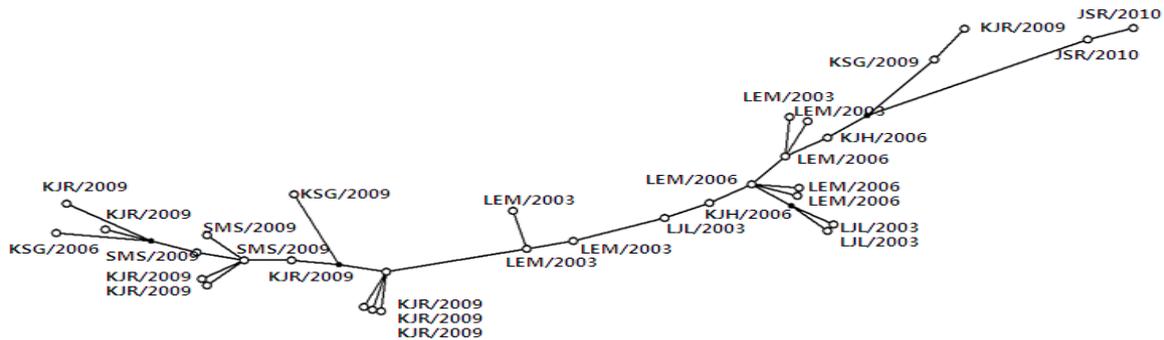


Fig. 3. Maximum parsimony tree of genetic relationship between *B. canis* isolates from 32 genotypes by 16 MLVA.

동장치를 이용하여 유전형별을 시도한 결과 겔전기 영동법보다 시간의 단축, 정확성, 다량의 시료를 처리할 수 있는 장점이 있는 것으로 확인되었으며 DNA sequencer를 이용한 측정방법에 비해 가격이 저렴하고 분석이 간편하여 활용성이 높을 것으로 생각된다.

결 론

2003년에서 2010년 사이에 경북지역 개 유래 *B. canis*를 대상으로 16 MLVA에 의한 유전형별을 시도하였다. 7개 농장 73주의 16 VNTR별 반복지수를 조사한 결과 Bruce 11, 18, 19, 21, 4, 7, 9, 16에서 균주 간 유전적 다양성이 확인되었으며, microsatellite인 panel 2 부위가 panel 1에 비해 분별력이 뛰어난 것으로 조사되었다. 전문분석프로그램으로 산출된 자료를 입력하여 dendrogram을 작성한 결과 총 32개의 유전형으로 분류되었다. MLVA는 개 브루셀라병의 역학적 추적조사를 위한 실험실적 보조수단으로 이용 가치가 있는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

- 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.
- Al Dahouk S, Hagen RM, Nöckler K, Tomaso H, Wittig M, Scholz HC, Vergnaud G, Neubauer H. 2005. Failure of a short-term antibiotic therapy for human brucellosis using ciprofloxacin. A study on in vitro susceptibility of *Brucella* strains. *Chemotherapy* 51: 352-356.
- Bricker BJ. 2004. Molecular diagnostics of animal brucellosis: A review of PCR-based assays and approaches. pp. 25-51. In: Lopez-Goni I, Moriyon I(ed.). *Brucella: molecular and cellular biology*. Horizon Bioscience. Norfolk, England.
- 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.
- Carmichael LE, Kenney RM. 1970. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis, and immune response, *Am Vet Med Assoc* 156 : 1726-1734.
- Carter GR, Wise DJ. 2004. *Brucella* and *Bartonella*. pp. 107-114. In: *Essential of veterinary microbiology*. 6th ed. Iowa State Press, Ames, Iowa.
- Chang CH, Lee JC, Lee CY, Kim SK, Lee CG. 2000. Canine brucellosis in the Jindo. *Korean J Vet Clin Med* 17 : 321-326.
- Chu G, Vollrath D, Davis RW. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234: 1582-1585.
- Hall WH. 1989. History of *Brucella* as human pathogen. pp. 2-7. In: Young EJ, Corbel MJ(ed.). *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. CRC Press, Boca Raton.
- Kang SI, Heo EJ, Cho D, Kim JW, Kim JY, Jung SC, Her M. 2011. Genetic comparison of *Brucella canis* isolates by the MLVA assay in South Korea. *J Vet Med Sci* 73: 779-789.
- Kim SG, Kim YH, Hong HP, Eom HJ, Jang SJ, Jo MH, Lee YS. 2007. Biochemical characterization and PFGE pattern of *Brucella canis* isolated from kennels in Gyeongbuk province. *Korean J Vet Serv* 30: 363-374.
- Kim SG, Kim YH, Lee HY, Choi JH, Choi SK. 2011. Genotyping of *Brucella abortus* isolated from cattle in Gyeongbuk province by MLVA. *Korean J Vet Serv* 34: 227-234.
- Metcalf HE, Luchsinger WL, Ray WC. 1994. *Brucellosis*. pp. 9-39. In: Beran GW, Steele JH(ed.). *Handbook of zoonoses*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Moon JS, Oh GS, Park IC, Kang BK, Lee CY, Jung SC, Park YH, Shin SJ. 1999. Occurrence of canine brucellosis in a large kennel in Chonnam area. *Korean J Vet Res* 39:

- 1099-1105.
- Park CK, Oh JY. 2001. Bacteriological and serological investigation of *Brucella canis* infection of dogs in Taegu city, Korea. 2001. Korean J Vet Res 41: 67-71.
- Pickerill PA. 1970. Comments on epizootiology and control of canine brucellosis. Am Vet Med Assoc 156 : 1741-1742.
- Shin S, Carmichael LE. 1999. Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. <http://www.ivis.org/23>. Nov.
- Spink WW. 1970. Comments on canine brucellosis due to *Brucella canis*. Am Vet Med Assoc 156: 1734-1736.
- 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.