

<원 저>

재조합 리보솜 단백질 L7/L12을 이용한 개 브루셀라병의 진단

이향근 · 김종완 · 하운미 · 허 문* · 김지연 · 이기찬 · 강성일 · 정석찬
농림수산검역검사본부 동물위생연구부 세균질병과
(접수: 2011년 12월 31일, 수정: 2012년 2월 23일, 게재승인: 2012년 2월 27일)

Diagnosis of canine brucellosis using recombinant ribosomal protein L7/L12

Hyang-Keun Lee, Jong-Wan Kim, Yun-Mi Ha, Moon Her*, Ji-Yeon Kim, Kichan Lee, Sung-Il Kang, Suk-Chan Jung

Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-824, Korea
(Received: December 31, 2011; Revised: February 23, 2012; Accepted: February 27, 2012)

Abstract : *Brucella (B.) canis* is mainly transmitted by direct or indirect contact with aborted fetuses and placenta. It's also known to be able to infect human, which likely results in providing veterinarians and companion animal owners for infectious risk. To develop diagnostic ELISA, we cloned and expressed rpL gene of *B. canis*, which encodes the ribosomal protein L7/L12. Using this purified recombinant protein, indirect-ELISA (iELISA) was evaluated using 78 positive and 44 negative sera. The sensitivity and the specificity of iELISA were 94% and 89%, respectively. The results indicated that indirect-ELISA using recombinant ribosomal protein L7/L12 may be useful for diagnosis of canine brucellosis.

Keywords : *Brucella canis*, indirect-ELISA, ribosomal protein L7/L12

서 론

*Brucella(B.) canis*에 의한 개 브루셀라병 발생은 1966년에 처음 보고되었다 [5]. 개 브루셀라병은 유산 및 불임증을 유발하여 개 번식 농장에 경제적 손실을 초래할 뿐만 아니라 [7, 20], 사람에게 감염되어 파상열, 권태감, 관절염 및 골수염 등을 일으킬 수 있는 인수공통질병 중의 하나이다 [21, 28]. 전파방법은 주로 유산 후 유산태아나 유산물질, 질 분비물로부터 브루셀라균의 흡식이나 섭식에 의해서 이루어지며 사람은 이들 유산관련 물질과 직·간접 접촉에 의해 감염된다 [10]. 주로 사육자 및 수의사에 전염된 사례가 보고되고 있지만 반려견을 통한 일반인 감염 문제가 대두될 수 있는 질병이다 [3, 17].

개 브루셀라병에 감염되면 임신 말기에 유산이 발생하는 경우를 제외하고는 대부분의 경우 임상증상을 나타내지 않는다. 또한 브루셀라균은 세포내 기생하는 세

균으로 예방 및 치료가 어렵기 때문에 신속하게 진단하여 질병의 전파를 차단하는 것이 중요하다 [20].

진단을 위한 혈청학적 검사들로서 신속평판응집반응법(Rapid slide agglutination test; RSAT), 로즈벵갈응집반응법(Rose bengal agglutination test; RBAT), 시험관내 응집반응법(Tube agglutination test; TAT), 한천겔 면역확산법(Agar gel immunodiffusion test; AGID), 효소면역학적 반응(Enzyme-linked immuno sorbent assay; ELISA)등이 가장 보편적이며, 단일 진단법으로는 진단이 어려워 나라마다 2~4종의 방법을 병행하고 있다 [18]. 그리고 감염초기에 검출 확률이 낮고 교차반응으로 의양성 결과가 나오는 문제점이 있다 [6].

본 연구에서는 *B. canis*에 감염된 개체를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 항원을 찾고자, 개 브루셀라균으로부터 리보솜 단백질 L7/L12 항원 유전자를 분리, 대장균 내에서 발현을 유도하여 재조합 단백질을 정제하고, 이 재조합 리보솜 단백질 L7/L12 항원의 항원성 검

*Corresponding author
Tel: +82-31-467-1776, Fax: +82-31-467-1778
E-mail: herm@korea.kr

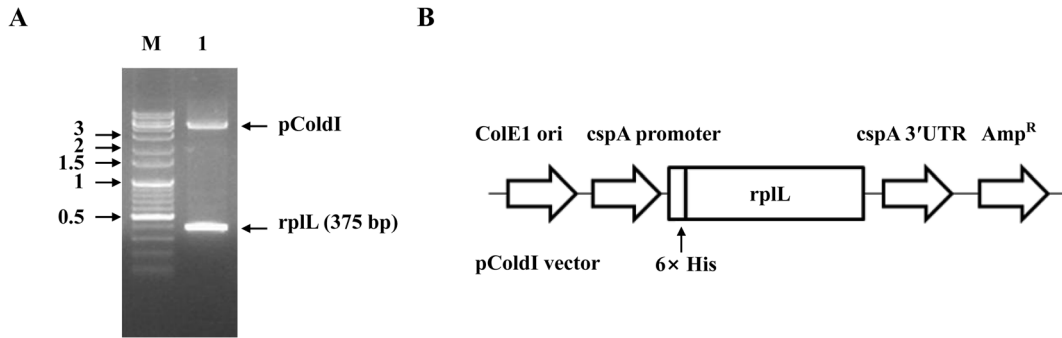


Fig. 1. Strategy for expression in *Escherichia (E.) coli* system. (A) Agarose gel (1%) electrophoresis pattern of the insert DNA and pColdI vector digested with *SacI* and *XhoI*. (B) Schematic diagram of vector for hyperexpression of the *rplL* gene in *E. coli* (BL21) under the control of *cspA* promoter.

정을 통하여, 개 브루셀라병 진단용 항원으로서의 사용 가능성에 대해 확인하였다.

재료 및 방법

개 브루셀라균의 항원 클로닝

B. canis ATCC 23365 표준균주를 200 mL tryptic soy broth(TSB) 배지에 접종한 다음 36~48시간 이상 stationary phase가 되도록 교반 배양하였다. 개 브루셀라균을 10,000 ×g로 원심분리한 후 회수하여 Moore 등 [19]의 CTAB를 이용한 박테리아 게놈 DNA 추출 방법으로 DNA를 분리하였으며, 얻어진 DNA는 분광광도계를 이용하여 정량하여 PCR을 수행하였다. 리보솜 단백질 L7/L12을 암호화하는 *rplL* 유전자를 클로닝하기 위하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information, USA)의 gene bank 검색을 통해서 염기배열을 찾아 이 유전자의 coding sequence를 포함하며 대장균 발현 벡터인 pCold I DNA(3360-3364; Takara, Japan)에 클로닝하기 위하여 *SacI*과 *XhoI* 제한효소자리를 넣어 프라이머(forward primer: GCG CGA GCT CAT GGC TGA TCT CGC AAA GAT CG, reverse primer: GCG CCT CGA GTT ACT TGA GTT CAA CCT TGG CGC)를 제작하고 PCR을 진행하였다. PCR의 총 반응액은 50 μL로 하여 5 μL(0.5 μg) genomic DNA, 5 μL의 10 × reaction buffer, 1 mM dNTP, 각 10 pmol의 *rplL* 양방향 primer를 혼합한 후, nTaq-Tenuto DNA Polymerase 5 U(P225A; Enzymomics, Korea)을 첨가하였다. 94°C에서 7분간 주형 DNA를 변성시킨 후, 94°C 1분, 57°C 1분, 72°C 30초의 반응 사이클을 30회 반복 시행하였으며, 마지막에 72°C에서 5분간 반응하였다. 얻어진 PCR 산물은 TAE 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 QIAquick gel extraction Kit (28706; Qiagen, Germany)를 이용하여 gel로부터 DNA

를 회수하였다. 분리된 DNA는 TOPcloner TA kit (EZ001S; Enzymomics, Korea)를 이용하여 pTOP TA vector에 연결한 후 DH5 100 μg/mL ampicillin이 첨가된 Luria-Bertani(LB) agar plate에서 배양하였다. 배양된 colony에서 AccuPrep Nano-Plus Plasmid mini extraction kit(K-3111; Bioneer, Korea)를 이용하여 plasmid를 추출하여 *SacI*과 *XhoI* 제한효소로 처리하여 클로닝 여부를 확인하였다. pTOP TA vector 클로닝 산물은 마크로젠 (Korea)에 의뢰하여 염기배열을 조사하였고 NCBI의 Blast Search를 통하여 아미노산 수준에서 염기배열의 상동성 조사를 통해 *rplL* 유전자를 확인하였다. 확인된 클로닝 산물을 *SacI*과 *XhoI* 제한효소로 처리하여 pColdI vector와 연결하였다. 이 벡터는 affinity column binding을 위해 N-terminal fusion peptide로 6개의 Histidine을 발현하도록 되어있다. *rplL* 유전자와 연결된 벡터를 *SacI*과 *XhoI*로 잘라 클로닝 여부를 확인한 후 대장균 발현용 숙주 세포인 BL21(DE3)로 옮겨 주었다(Fig. 1).

개 브루셀라균의 항원 발현 및 정제

pCold I *rplL* BL21(DE3)를 100 μg/mL ampicillin이 첨가된 LB 액체배지 500 mL에 접종하여 37°C에서 진탕 배양 하고 Optical density(OD)₆₀₀ 값이 0.4~0.5가 되면 15°C에서 30분간 cold shock을 준 후, 1 mM IPTG를 첨가하여 15°C에서 24시간 진탕배양 하였다. 8,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 회수한 pellet을 PBS 완충용액에 3회 세척한 후, pellet을 30 mL binding buffer(20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4)에 풀어서 French press cell disrupter(FA078A0447; Thermo, USA)를 이용하여 1,150 psi에서 30분 동안 반응 시켰다. 그리고 18,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후, *rplL* 재조합 단백질을 항원이 함유된 상층액을 0.45 μm 필터에 여과하였다. 추출한 단백질을 Histidine이 연

결된 단백질을 정제할 수 있는 His 60 Ni Superflow resin (635659; clontech, Japan) 4 mL에 적하한 후, 20 mL의 wash buffer(50 mM sodium phosphate, 300 mM sodium chloride, 40 mM imidazole, pH 7.4)로 3회 반복 세척하였다. 10 mL의 elution buffer(20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4)로 제조합 단백질을 회수하였다. 이러한 과정으로 분리한 단백질의 농도는 Qubit fluorometer(Q32858; Invitrogen, USA)로 측정하였다.

생산된 개 브루셀라균 리보솜 단백질 L7/L12의 면역 원성 확인

정제된 리보솜 단백질 L7/L12은 15% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동한 후 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell(170-3930; Bio-Rad, USA)에 Transfer buffer (30 g Tris, 14.5 g Glycine, 23 mL 20% SDS, 1 L MeOH, 750 µL Acetic Acid, 5 L)를 넣고 Polyvinylidene Fluoride membrane(PVDF)로 70 V에서 1시간 20분간 실시하였다. PVDF막을 메탄올에 30초간 처리하고 실온에서 말린 후 blocking buffer solution(2% skim milk + TBST) 20 mL에 처리하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 차단완충용액에 1차 항체반응으로서 *B. canis*가 분리된 개 야의 양성 및 음성 혈청을 1 : 2,000배로 희석하여 한 시간 동안 반응시킨 후 완충용액을 버리고 TBST로 5분씩 3회 세척하였다. 2차 항체인 Peroxidase labeled anti goat-dog IgG(H + L)(14-19-06; KPL, USA)는 PBST 20 mL에 1 : 5,000 배로 희석하여 1시간 30분 동안 반응시켰다. 그리고 3회 세척한 후 PVDF막에 West-Q Chemiluminescent Substrate Kit(W3650-012; GenDEPOT, USA)를 뿌려주고 영상분석을 실시하였다.

개 브루셀라균의 감염 혈청 준비

국내에서 개 브루셀라병 증상이 의심되거나 유산을 일으킨 번식 농장에서 분리된 혈청을 시험관내 응집반응과 신속평판응집반응법으로 검사하여 양성반응이 나온 혈청을 대상으로 균 분리를 시도하여 개 브루셀라균이 분리된 78개 혈청을 양성 혈청으로 구분하였다. 그리고 음성 혈청은 개 브루셀라병이 발생 되지 않은 농장에서 위 두 가지 검사법에서 음성반응을 보이면서 균 분리 되지 않은 44개 혈청을 선정하였다.

Indirect-ELISA

정제된 리보솜 단백질 L7/L12을 항원 흡착용 Coating Solution Concentrate Kit(50-84-00; KPL, USA)을 사용하여 정제된 ribosomal protein L7/L12를 1.0 µg/mL이 되도록 희석하여 96-well plate의 각 well에 100 µL씩 분주한

후, 37°C에서 16시간 흡착시켰다. PBST로 4회 세척한 후, blocking buffer solution(5% skim milk in PBST)을 plate에 100 µL씩 분주하여, 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, PBST 완충용액으로 4회 세척하였다. 개 브루셀라균의 야의 양성 혈청과 음성 혈청을 1 : 800 비율로 다른 희석용 plate에서 희석하여 100 µL씩 분주하였다. 혈청이 분주된 plate를 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후, PBST 완충용액으로 4회 세척하였다. Peroxidase labeled anti goat-dog IgG(14-19-06; KPL, USA)를 PBST에 1 : 5,000의 비율로 희석한 후, 세척된 plate에 100 µL씩 분주하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 plate를 PBST 완충용액으로 4회 세척한 후, ABTS Peroxidase Substrate System(50-66-00; KPL, USA)을 100 µL씩 분주하여 실온에서 약 15분 반응시킨 후 4% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 100 µL 분주하여 반응을 정지시켰다. 정지된 plate 내 반응을 ELISA reader (F129035, Genios Pro; TECAN, Austria)를 이용하여 OD₄₀₅에서 흡광도를 측정하여 결과를 판정하였다.

결 과

***rpL* 유전자 cloning**

B. canis ATCC 23365 표준균주로부터 게놈 DNA를 추출하여 두 쌍의 primer를 가지고 PCR을 실시한 후 pTOP TA vector에 클로닝하였다. pTOP TA vector와 *rpL* 유전자가 ligation된 plasmid에 제한효소를 처리하여 insert의 사이즈를 확인한 후 염기분석하여 open reading frame을 확인하였다. NCBI blast 분석을 통하여 다른 균주와의 상동성을 비교한 결과 *Ochrobacterium*과 *Agrobacterium* 등과 같은 토양 미생물과 80% 이상의 높은 상동성을 보였고, 혈청학적 테스트에서 교차반응을 보이는 *Escherichia coli* O157:H7와 *Salmonella enterica* spp. *Yersinia* spp와는 65% 이하의 낮은 상동성을 보여 특이적인 항원으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다 (Table 1).

Table 1. Comparative nucleotide and amino acid sequence analysis of *rpL* gene from different bacteria

Specis	Nucleotide (%)	Amino acid (%)
<i>Brucella</i> spp.	99	98
<i>Ochrobacterium</i>	95	98
<i>Agrobacterium</i>	85	85
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7	64	59
<i>Salmonella enterica</i> spp.	64	61
<i>Yersinia</i> spp.	64	61

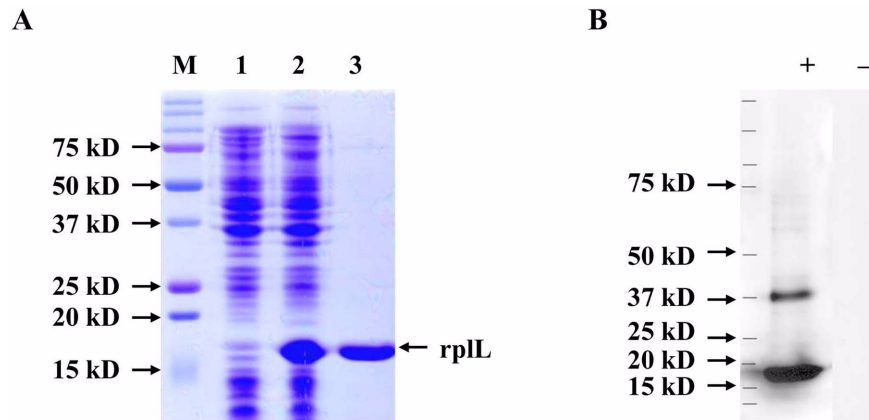


Fig. 2. Purification and characterization of recombinant ribosomal protein L7/L12. (A) SDS-PAGE analysis of purified recombinant ribosomal protein L7/L12. M: molecular size marker, lane 1: before induction by the addition of IPTG, lane 2: after induction, lane 3: purified recombinant ribosomal protein L7/L12. Arrows indicate the expected size of expressed recombinant L7/L12 (Nupage 4~12% Bis-Tris Gels). (B) Immunogenicity of the recombinant ribosomal protein L7/L12 was tested by western blot analysis using pooled *B. canis* positive sera (right) and negative serum (left). The ribosomal protein L7/L12 was loaded on the 15% polyacrylamide gel.

리보솜 단백질 L7/L12 발현 및 정제

rplL 유전자를 대장균 내에서 단백질을 발현시킬 수 있는 pCold I vector에 삽입한 후 제한효소를 처리하여 삽입된 유전자를 확인하였다(Fig. 1). 대장균에서 생산된 리보솜 단백질 L7/L12은 N-말단 부위에 fusion peptide인 6×histidine 등으로 인해 약 4kDa이 증가되어 16.4 kDa의 크기로 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 2A). 생산된 단백질은 6개의 histidine과 재조합되어 있으므로, His 60 Ni Superflow resin을 통하여 단백질을 정제하였다. 500 mL 배양액을 affinity column binding을 통하여 순수 분리된 재조합 단백질의 양은 23.4 mg으로 확인되었다.

재조합 단백질의 면역원성 검증

대장균을 이용하여 발현 및 정제된 재조합 리보솜 단백질 L7/L12의 항원성을 알아보기 위하여 야외에서 *B. canis*에 감염된 개 혈청에서 균 분리가 된 양성 혈청과 균 분리가 되지 않은 음성 혈청을 가지고 western 분석을 수행한 결과 특이적으로 개 야외 양성 혈청과 반응하여 리보솜 단백질 L7/L12 밴드를 확인하였다(Fig. 2B).

Indirect-ELISA

확인된 항원을 이용하여 번식농장에서 수집한 양성 혈청 78개와 음성 혈청 44개를 가지고 진단용 항원으로 가능성이 있는지 iELISA를 통하여 알아보았다. 그 결과 cut-off point를 0.5로 설정하였을 때, iELISA 진단법의 특이도와 민감도는 각각 89% 및 94%로 나타났다(Fig. 3).

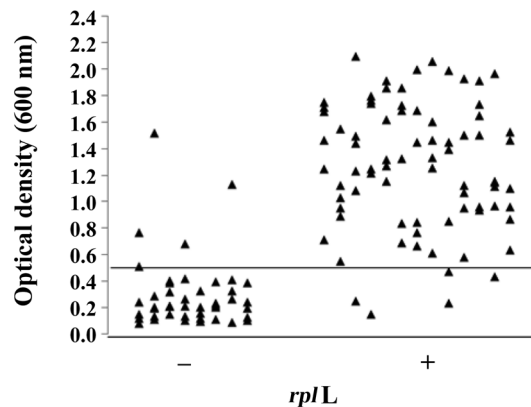


Fig. 3. Level of IgG antibodies to *B. canis* recombinant ribosomal L7/L12 protein determined by iELISA, using anti-dog IgG HRP conjugates among the dog serum samples. -: negative serum, +: positive serum.

고 찰

*B. canis*에 의해 발생되는 개 브루셀라병은 전염성 유산을 일으키는 질병으로 국내 번식 농장에서 경제적으로 큰 손실을 초래한다 [7, 20]. 그리고 특별한 임상 증상을 나타내지 않으면서 세포 내 기생하는 특징을 가지고 있어 만성 질병으로 발전할 가능성이 높으며 아직 virulence factor가 정확하게 알려지지 않아 방제 및 진단이 어려운 질병 중 하나이다. 국내에서는 1966년 음성 혈청이 최초로 보고된 이후 현재까지 번식 농장과 반려견에서 지속적으로 *B. canis*가 분리 되고 있다 [5, 11,

18, 26]. 브루셀라병에 감염되면 30일 이상 항생제를 투여해야 하는 어려움이 있고 항생제를 투여한다고 해도 완치되기 어렵다 [11].

양성 혈청의 진단을 위하여 RSAT, RBAT, TAT, AGID, ELISA 등 많은 방법들이 개발되어 있다. 현재 일차 스크린 방법으로는 간편하고 신속한 RSAT를 변형한 2ME-RSAT 방법이 사용되고 있지만 교차 반응으로 인한 위 양성 결과를 보여 확진을 위한 보조진단법으로 TAT나 AGID를 같이 진행하고 있다. 그러나 두 가지 방법으로 함께 진단하면 높은 민감도를 확보할 수 있으나 비특이 반응을 보이기 때문에 감염초기 및 만성형의 경우 진단이 어려워 번식 농장에서 브루셀라균의 유입을 차단하기 어렵다는 단점이 있다 [6, 8, 12].

브루셀라에서 p39 [1], Cu-Zn SOD [29], L7/L12 [2, 23, 25], GroEL과 GroES [22], 12 kDa, 18 kDa, 31 kDa 단백질 [4, 30]은 면역 반응을 유도하는 단백질로 알려져 있고 대부분 백신 실험을 통한 방어 능력의 검증이 이루어지고 있다. *rpL* 유전자는 helix-turn-helix motif 구조를 나타내는 리보솜 단백질 L7/L12를 암호화하는 면역우성(immunodominant) 단백질로 IFN- γ CD4+ T cell이 활성화되어 Th1 반응을 유도하여 T-림프구를 강하게 자극하는 것으로 알려져 있다 [24]. 그리고 이 유전자를 DNA 백신으로 개발하여 마우스에 접종한 후 *B. abortus*를 공격 접종한 결과 백신 균주인 S19와 비슷한 방어효과를 보여 백신 후보 유전자로 언급되었다 [16]. 리보솜 단백질 L7/L12는 브루셀라 혈청반응에서 교차반응을 일으키는 것으로 알려진 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* spp, *Yersinia* spp 균과는 65% 이하의 낮은 상동성을 보였고 *Ochrobacterium*과 *Agrobacterium* 같은 토양 및 식물 유래균과 85~95% 상동성을 나타냈다. 이는 최근 전체 유전자 분석을 통하여 브루셀라균이 *Ochrobacterium*과 같은 토양근권에 주로 분포하는 균으로부터 유래된 것으로 알려져 있어 이와 같은 높은 상동성을 보인 것으로 여겨진다 [13]. 하지만 이들 균과는 혈청학적인 교차반응이 보고되지 않았다. 이를 바탕으로 면역원성이 높고 방어효과를 가지고 있으며 혈청학적으로 교차 반응이 일어나지 않는 L7/L12 단백질을 암호화하는 *rpL* 유전자를 선발하였다.

브루셀라균은 50S 리보솜 subunit 당 4개의 copies를 가지고 있는 형태가 대장균과 비슷해서 대장균 단백질 발현 시스템을 활용하는 것이 유리하다 [27]. 본 연구에서 대장균 발현시스템을 이용하여 L7/L12를 발현시킨 결과 500 mL 배양시 정제된 단백질의 양이 23.4 mg으로 대장균에서 정제된 다른 단백질에 비하여 다소 높은 효율을 보였다 [15].

전체 soluble 단백질을 사용하여 iELISA 방법으로 개

브루셀라병을 진단하는 것보다 제조합 L7/L12 단백질을 이용할 때 다소 높은 94%의 민감도를 보였고, 교차반응은 전체 soluble 단백질에 비하여 비특이 반응이 낮아질 것으로 예상된다 [9]. 그리고 브루셀라균 감염 혈청을 가지고 간편하게 진단할 수 있는 Immunochromatography Assay(ICA) 방법보다 다소 높은 민감도를 보여 ICA 방법과 함께 사용하면 단점을 보완할 수 있을 것으로 예상된다. ICA 방법에 비하여 낮은 특이도를 보였지만 이는 정제조건을 보완한 후 실험을 진행하면 높일 수 있을 것으로 사료된다 [14].

*B. abortus*와 *B. canis*의 *rpL* 유전자는 98% 이상의 상동성을 보여 본 연구에서 생산된 제조합 L7/L12 단백질은 *B. canis*를 방제하는데 제조합 단백질과 DNA 백신 후보주로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

결론

*B. canis*는 개 브루셀라병을 유발하여 임신견의 임신 후반기의 유산과 사산을 일으키는 균으로 보통 감염된 개의 분비물과 직·간접적인 접촉으로 사람에게 감염을 일으킬 수 있다. 본 연구에서는 면역원성 단백질로 알려진 리보솜 단백질 L7/L12를 암호화하는 *rpL* 유전자를 대장균 발현 시스템에 클로닝하여 제조합 단백질을 발현시켰고 Ni²⁺-charged resin affinity chromatography를 이용하여 순수분리하였다. 국내에서 개 브루셀라균이 분리된 78개의 양성 혈청과 44개의 음성 혈청을 정제된 제조합 L7/L12 단백질을 이용하여 iELISA 방법으로 진단한 결과 민감도와 특이도가 각각 94%와 89%를 나타냈다. 본 연구에서 생산된 제조합 단백질은 개 브루셀라병을 진단하는데 활용될 수 있으며 나아가 현재 개발되지 않은 이 질병의 백신 후보주로 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, Godefroid J, Walravens K, Letesson JJ. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun* 2001, **69**, 4816-4822.
2. Bachrach G, Banai M, Bardenstein S, Hoida G, Genizi A, Bercovier H. *Brucella* ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of brucellin INRA for delayed-type hypersensitivity in brucella-sensitized guinea pigs. *Infect Immun* 1994, **62**,

- 5361-5366.
3. **Blankenship RM, Sanford JP.** *Brucella canis*. A cause of undulant fever. *Am J Med* 1975, **59**, 424-426.
 4. **Brooks-Worrell BM, Splitter GA.** Antigens of *Brucella abortus* S19 immunodominant for bovine lymphocytes as identified by one- and two-dimensional cellular immunoblotting. *Infect Immun* 1992, **60**, 2459-2464.
 5. **Carmichael LE, Bruner DW.** Characteristics of a newly-recognized species of brucella responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet* 1968, **48**, 579-592.
 6. **Carmichael LE, Joubert JC, Jones L.** Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. *Vet Microbiol* 1989, **19**, 373-387.
 7. **Carmichael LE, Kenney RM.** Canine abortion caused by *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc* 1968, **152**, 605-616.
 8. **Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R.** Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Dev Biol Stand* 1984, **56**, 371-383.
 9. **de Oliveira MZ, Vale V, Keid L, Freire SM, Meyer R, Portela RW, Barrouin-Melo SM.** Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. *Res Vet Sci* 2011, **90**, 425-431.
 10. **Doganay M, Aygen B.** Human brucellosis: an overview. *Int J Infect Dis* 2003, **7**, 173-182.
 11. **Heo EJ, Kim JW, Cho DH, Nam HM, Cho YS, Hwang IY, Kang SI, Jung SC, Wee SH, Lee HS.** Antimicrobial susceptibility of *Brucella canis* isolates from dogs in Korea. *J Vet Public Health* 2009, **33**, 213-219.
 12. **Johnson CA, Walker RD.** Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Compend Contin Educ Vet* 1992, **14**, 763-772.
 13. **Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, Ramuz M, Allardet-Servent A.** Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J Bacteriol* 1998, **180**, 2749-2755.
 14. **Kim JW, Lee YJ, Han MY, Bae DH, Jung SC, Oh JS, Ha GW, Cho BK.** Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of *Brucella canis*. *J Vet Med Sci* 2007, **69**, 1103-1107.
 15. **Kim TJ, Lee BJ, Lee JI.** Mass expression of Apx I and Apx II of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Escherichia coli*. *Korean J Vet Res* 2005, **45**, 185-189.
 16. **Kurar E, Splitter GA.** Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine* 1997, **15**, 1851-1857.
 17. **Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N.** Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol* 2005, **54**, 457-461.
 18. **Moon JS, Oh GS, Park IC, Kang BK, Lee CY, Jung SC, Park YH, Shin SJ.** Occurrence of canine brucellosis in a large kennel in Chonnam area. *Korean J Vet Res* 1999, **39**, 1099-1105.
 19. **Moore E, Arnscheidt A, Krüger A, Strömpl C, Mau M.** Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. In: Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans ADL, van Elsas JD (eds.). *Molecular Microbial Ecology Manual*. 2nd ed. pp. 1.01/3-1.01/17, Kluwer Academic, London, 2004.
 20. **Moore JA.** *Brucella canis* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1969, **155**, 2034-2037.
 21. **Munford RS, Weaver RE, Patton C, Feeley JC, Feldman RA.** Human disease caused by *Brucella canis*. a clinical and epidemiologic study of two cases. *JAMA* 1975, **231**, 1267-1269.
 22. **Oliveira SC, Harms JS, Banai M, Splitter GA.** Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. *Cell Immunol* 1996, **172**, 262-268.
 23. **Oliveira SC, Splitter GA.** Subcloning and expression of the *Brucella abortus* L7/L12 ribosomal gene and T-lymphocyte recognition of the recombinant protein. *Infect Immun* 1994, **62**, 5201-5204.
 24. **Oliveira SC, Splitter GA.** Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine* 1996, **14**, 959-962.
 25. **Oliveira SC, Zhu Y, Splitter GA.** Recombinant L7/L12 ribosomal protein and gamma-irradiated *Brucella abortus* induce a T-helper 1 subset response from murine CD4+ T cells. *Immunology* 1994, **83**, 659-664.
 26. **Park CK, Oh JY.** Bacteriological and serological investigation of *Brucella canis* infection of dogs in Taegu city, Korea. *Korean J Vet Res* 2001, **41**, 67-71.
 27. **Rice PA, Steitz TA.** Ribosomal protein L7/L12 has a helix-turn-helix motif similar to that found in DNA-

- binding regulatory proteins. *Nucleic Acids Res* 1989, **17**, 3757-3762.
28. **Swenson RM, Carmichael LE, Cundy KR.** Human infection with *Brucella canis*. *Ann Intern Med* 1972, **76**, 435-438.
29. **Tabatabai LB, Pugh GW Jr.** Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine* 1994, **12**, 919-924.
30. **Vemulapalli R, Cravero S, Calvert CL, Toth TE, Sriranganathan N, Boyle SM, Rossetti OL, Schurig GG.** Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, **7**, 114-118.