

牛由來 Mycobactin依存性 抗酸性細菌 (*M. paratuberculosis*)의 分離同定

全允成 · 李芳煥* · 金鐘培 ·

崔哲淳** · 金振球***

서울大學校 獸醫科大學 · 全南大學校 農科大學 獸醫學科*

中央大學校 醫科大學** · 綠十字獸醫藥品株式會社***

(1984.3.13 接受)

Isolation and Identification of Mycobactin Dependent Acid-fast Bacteria (*M. paratuberculosis*) from Bovine Fecal Material

Yun-seong Jeon, Bang-whan Lee*, Jong-bae Kim,

Chul-soon Choi** and Jin-koo Kim***

College of Veterinary Medicine, Seoul National University; Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chonnam National University*; College of Medicine, Chung-Ang University**, and Green Cross Veterinary Products Co., Ltd.***

(Received March 13, 1984)

Abstract: Fecal material from cattle, which was confirmed to be infected with Johne's disease by clinical and pathological symptoms, was decontaminated with 4% NaOH and inoculated into the Löwenstein-Jensen media supplemented with 1% of heat-killed *Mycobacterium bovis*. After 2-4 week-incubation at 37°C, typical acid-fast mycobacteria was isolated. With the results of staining properties, morphological characteristics, the requirement of mycobactin for growth and the other biochemical properties, isolated mycobacteria was identified as *Mycobacterium paratuberculosis*.

Female guinea pigs were sensitized with the isolates, and skin test was done with purified protein derivatives (PPDs) of *M. avium*, *M. bovis* and *M. paratuberculosis* 4 weeks after sensitization. Animals showed the largest reaction to the PPDs of *M. avium* and *M. paratuberculosis*.

緒 論

*M. paratuberculosis*는 소, 양, 염소에 자연감염하여 많은 손실을 입힌다. 소의 paratuberculosis(Johne病, 파라結核)은 유럽이나 미주에서 흔히 발생하고 있다. 한국에서도 임상적으로 또는 병리조직학적으로 보아 Johne病으로 의심되는 환우가 있음이 전부터 지적되었다¹²⁾.

*M. paratuberculosis*는 감염재료에서 初代分離하는

과정의 매우 까다로워서 우리나라에서는 이것의 분리와 동정이 아직 이루어지지 못하고 있다.

저자들은 대단위 목장에서 사육하고 있는 젖소로서, 임상소견과 분변의 直接檢鏡所見으로 보아 Johne病이라고 믿어지는 환우의 糞便을 분리재료로 삼아 *M. paratuberculosis*를 분리할 수 있었다.

이 연구에서는 *M. paratuberculosis*의 분리시험, 분리세균의 생화학적 성장시험 그리고 allergy반응 등을 비롯한 동정시험을 실시하였다.

材料 및 方法

供試材料: 臨床적으로 보아 Johne病에 이환되었다고 믿어지는 3年生 Hereford 암소에서 채취한 糞便을 병동보관하였던 것을 細菌의 分離재료로 삼았다.

供試培地: *M. paratuberculosis*의 分離 및 培養에는 Löwenstein-Jensen Medium (L-J)을 기초배지⁶⁾로 한 4종의 배지를 사용하였다. L-J배지의 조성⁷⁾과 제법은 다음과 같다.

Löwenstein-Jensen medium의 조성

KH ₂ PO ₄	2.40g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.24g
Magnesium citrate.....	0.60g
Asparagine.....	3.60g
Potato flour.....	30.00g
Glycerol.....	12ml
Distilled water.....	600ml
Homogenized whole eggs.....	1,000ml
Malachite green(2% aqueous).....	100ml

염류와 asparagine을 증류수에 녹인 다음 glycerol과 potato flour를 섞고 121°C에 30분간 멸균하였다. 신선한 계란을 비누물로 씻고 70% 알콜로 표면을 소독한 다음 균질화하고 거즈에 여과하여 앞에 만든 기초배지에 섞었다. 거기에 malachite green을 첨가하고 85°C 50분간 가열하면서 사멸배지가 되도록 만들었다.

기초배지 외의 공시배지로는 *M. bovis*의 加熱 死菌體를 1%가 되도록 첨가하여 만든 L-J/M배지, penicillin (200 I.U./ml)과 chloramphenicol (200mcg/ml)을 첨가하여 만든 L-J/PC배지 그리고 *M. bovis* 死菌體와 앞에 적은 항생제를 함께 첨가한 L-J/MPC배지 등을 사용하였다.

初代分離培養: 液狀인 糞便材料 1ml를 4% NaOH 수용액 4ml와 혼합 용해하고 실온에서 5분간 방치한 후 상청액 15ml를 건어냈다. 이 상청액은 37°C 30분간 정지한 후 HCl로 중성이 되게 중화한 뒤 4000rpm 30분간 원침하여 침전물을 얻었다. 침전물을 멸균증류수 5ml에 재부유한 다음 공시배지에 0.1ml씩 도포 접종하였다. 접종 후 배지의 표면을 고무 누른 후 37°C 12주간 배양하면서 집락형성 여부를 관찰하였다.

生化學的性狀 檢査: 牛由來 mycobactin依存性 抗酸性 分離菌에 대한 다음과 같은 생화학적 특성⁸⁾을 조사하였다.

1) **Mycobactin依存性 및 發育溫度:** *M. paratuberculosis*의 성장촉진 인자인 mycobactin을 분리균이 요

구하는지를 검사하기 위하여 초대분리균을 L-J/M와 L-J배지에서 각각 12주간 배양하고 발육여부를 관찰하였다.

배양온도에 대한 영향을 조사하기 위한 시험에서는 분리균을 L-J/M배지에 심고 37°C, 43°C 그리고 실온(18°C)에서 배양하면서 집락형성 여부를 관찰하였다.

2) **Catalase 생성능:** Tween 80-peroxide액 (10% tween 80 : 30% H₂O₂=1:1) 1ml를 분리균이 배양된 screw-cap 시험관 내의 L-J/M배지에 가한 다음 수직으로 5분간 세워두어 시험관 내에 생성된 기포와 그 기포층의 높이를 측정하여 catalase의 생성능을 조사하였다.

생성된 catalase의 열에 대한 저항성을 조사하기 위하여 M/15 KH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer(pH 7.0) 0.5ml에 분리 배양된 균괴를 풀어 섞고 68°C 항온 수조에서 20분간 열처리한 후 Tween-peroxide액 0.5ml를 가하고 20분간 방치하였다. 그리고나서 기포의 생성여부를 조사하여 catalase의 열저항성을 검사하였다.

3) **Tween 80 분해능:** M/15 KH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer(pH 7.0) 100ml에 Tween 80 0.5ml, 0.1% neutral red 2ml를 혼합하고 *M. bovis*의 가열사균체를 1%로 첨가한 후 멸균하여 분주한 배지에 분리세균을 접종하고 37°C 4주간 배양하면서 Tween 80 분해능을 조사하였다.

4) **질산염 환원능:** 분리세균을 0.1ml의 멸균증류수에 희석하고 거기에 M/100 NaNO₃액(pH 7.0) 2ml를 가하여 37°C 2시간 방치하였다. 거기에 1:1로 희석한 농염산 한 방울을 떨어뜨리고 또 0.2% sulfanilamide액과 0.1% n-naphthylethylene-diamine dihydrochloride액을 각각 2방울씩 떨어뜨려 붉은색의 출현 여부를 보아 질산염의 환원능을 검사하였다.

5) **Urease 생성능:** *M. bovis*의 열처리 사균체를 1%로 첨가한 Christensen's urea agar에 분리균을 접종하고 37°C 4주간 배양하면서 urease 생성능을 검사하였다.

6) **Niacin 생성능:** 분리세균이 왕성하게 발육한 L-J/M배지에 멸균 생리식염수 1ml를 가하고 37°C 30분간 niacin 이 추출되도록 한 다음 시료로 0.5ml를 채취하였다. 이것을 ethanol에 4%로 희석한 aniline 0.5ml와 혼합하고 거기에 10% cyanogen bromide 0.5ml를 가하여 황색 변화를 조사하여 niacin 생성능을 검사하였다.

7) **NaCl에 대한 저항성:** NaCl을 5%로 첨가한 L-J/M에 분리균을 접종하여 37°C 4주간 배양하면서 집락형성 여부를 조사하여 분리균의 고농도(5%) NaCl에 대한 저항성을 검사하였다.

기니픽에서의 SID시험: 분리세균의 한 동정법으로서

분리균으로 감작한 기니피에 Johnin, 牛結核 PPD 그리고 鳥結核菌 PPD를 각각 접종하는 SID allergy 시험을 하였다. 기니피 감작에 쓰인 allergen은 다음과 같이 만들어 사용하였다. 즉 순수한 집락으로 구성된 분리균의 배양물이 들어 있는 L-J/M 사면배지를 선택하여 거기에 멸균 액체 파라핀 5ml를 가하였다. 이것을 37°C 24시간 정지한 후 액체 파라핀과 균괴를 동시에 수집하여 약질구에서 같이 혼합하였다. 이 균부유액을 80°C 항온수조에 정지멸균한 다음 동물접종용 allergen으로 사용하였다. 체중 300g 내외의 건강한 암컷 기니피 뒷다리 근육에 allergen 0.5ml를 주사하였고 그 후 4주일간 감작되게 하였다.

PPD는 안양가축위생연구소에서 분양받은 bovine PPD(100,000 T.U./ml)와 Johnin(PPD, 100,000 T.U./ml) 그리고 avian PPD(25,000 T.U./ml)를 사용하였는데 그전에 접종량을 맞추기 위하여 光度計로 정량한 다음 0.1% gelatin함유 완충액으로 100T.U. PPD/ml가 되도록 조절하였다. 이 PPD를 접종하기 위하여 기니피의 측복부를 탈모하고 3종의 PPD를 각각 0.1ml씩 세 곳에 피내접종하였다. 접종부위의 피내반응의 크기는 접종 후 24, 48, 72시간에 피부경결부의 수평 및 수직직경을 측정하여 이의 평균치로 나타내었다.

結 果

無處理 糞便材料의 檢鏡所見: 糞便材料를 4% NaOH액으로 처리하기 전에 도말표본을 만들어 항산성염색액으로 염색하고 검경하였다. 현미경검사결과 *Mycobacterium* spp.로 의심되는 다수의 항산성 균괴가 관찰되었다(Fig. 1).

初代 및 繼代培養의 所見: 糞便材料를 4종의 *Mycobacterium* 分離培地에 접종하고 37°C에 배양하면서 12주간 세균의 발육여부를 관찰하였다. L-J/M과 L-J/MPC

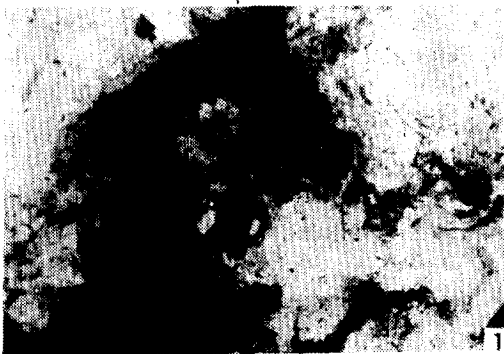


Fig. 1. Clumps of acid-fast bacilli were shown in the fecal sample from a cattle with clinical and pathological symptoms.

배지에서는 배양 2주일 후부터 *Mycobacterium*의 특징적인 집락을 관찰할수 있었으나, L-J와 L-J/PC배지에서는 배양 12주간까지도 *Mycobacterium*의 발육을 관찰할 수 없었다. 한편 L-J/MPC배지에서는 *Mycobacterium*의 성장이 매우 완만하고 L-J/M배지에서와 같이 다수의 집락이 발달되지는 않았다. 이로써 분리된 抗酸性 *Mycobacterium*은 初代分離에 mycobactin이 필요함을 알 수 있었으며 이를 확인하기 위하여 L-J와 L-J/M배지에 계대배양하였다. 계대배양에서는 L-J배지에서는 집락이 형성되지 않음으로써 분리된 항산성 세균은 mycobactin 依存性 細菌임을 확인하였다(Fig. 2).

分離된 抗酸性細菌의 集落形成시간은 初代培養의 경우 2~3주일이며 繼代培養에서는 8~10일이었으며, 집락이 형성된 후 3~4주간을 더 배양하면 매우 잘 발달된 집락을 관찰할 수 있었다. 배양초기(2~4주)의 집락은 옅은 황색으로 평평하며 중앙이 약간 움기된 배근한 형태였으나 배양시간이 경과함에 따라 변연부가 거칠어지고 색깔도 점차 농황색을 나타내었다.

分離菌의 染色性: 분리된 세균을 抗酸性 염색하고 檢鏡한 결과 無處理 糞便材料중의 抗酸性細菌과 형태는 동일하나 크기가 다소 작았으며 염주알 모양(beaded form)의 세균도 가끔 관찰되었다(Fig. 3). 한편 분리 세균을 Auramine O로 염색하고 형광현미경으로 검경

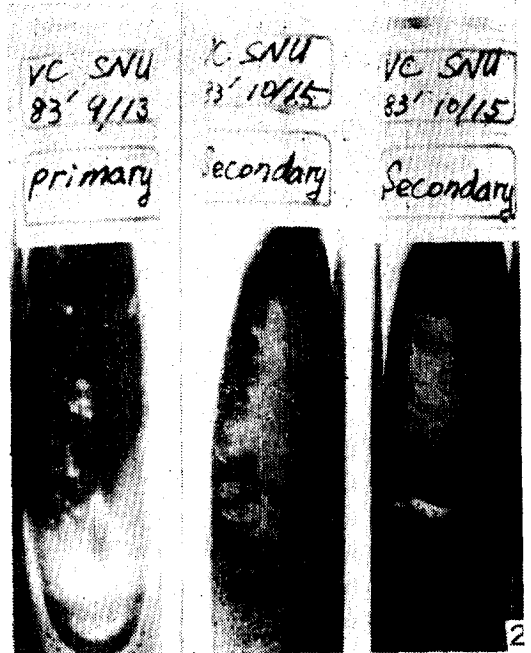


Fig. 2. Colonies of isolated acid-fast mycobacteria on Löwenstein-Jensen medium supplemented with 1% heat-killed *M. bovis* in primary (left) and secondary (middle and right) cultures.

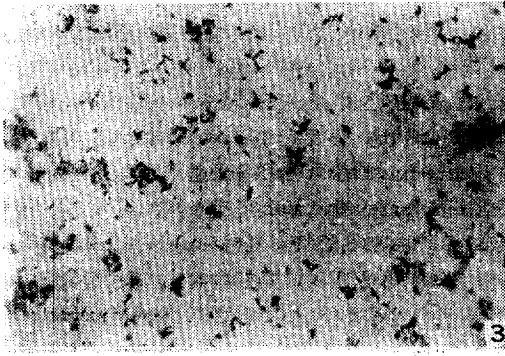


Fig. 3. Isolated acid-fast mycobacteria on Löwenstein-Jensen medium supplemented with 1% heat-killed *M. bovis*, stained with Ziehl-Neelsen stain ($\times 1,000$).

하였더니 *Mycobacterium*의 특징적인 밝은 황색의 형광을 보였다.

分離菌의 生化學的性狀試驗: L-J/M에서 분리된 抗酸性細菌의 생화학적인 성장검사를 실시하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 分離細菌은 발육시 mycobactin을 요구하였고 catalase를 생성하였는데, 이 catalase는 pH 7.0에서 68°C 20분간 가열처리하여도 파괴되지 않았다. Tween 80는 배양 48시간 후부터 분해되었다. 그러나 본 실험에서 실시한 urease, niacin, nitrate 그리고 tellurite의 환원능, 43°C 및 18°C에서의 성장여부, 5% NaCl이 함유된 L-J/M에서의 성장 등의 여러가지 검사는 모두 음성이었다(Table 1).

기니픽에서의 皮內反應: 분리한 항산성 mycobacteria로 기니픽을 감작시키고 4주일 후에 *M. avium*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis* 등 3종의 PPD를 기니픽 피

Table 1. Biochemical properties of the isolate (*M. paratuberculosis*)

Mycobactin (<i>M. bovis</i> , heat killed) requirement	+
Production of catalase (semiquantitative)	+(60mm)
Stability of catalase (at pH 7.0, 68°C for 20min)	+
Hydrolysis of Tween 80	+
Urease production	-
Niacin production	-
Nitrate reduction	-
Tellurite reduction	-
Growth on 5% NaCl medium	-
Growth at 43°C	-
Growth at 18°C	-

Table 2. Reactions of intradermal injections of purified protein derivatives into guinea pigs sensitized with *M. paratuberculosis* suspected isolates

Skin-test antigens	Size of erythema(mm)		
	24hrs.	48hrs.	72hrs.
<i>M. avium</i>	15.2 \pm 2.6	11.0 \pm 2.5	9.5 \pm 1.8
<i>M. paratuberculosis</i>	12.9 \pm 0.4	10.9 \pm 1.0	9.9 \pm 1.5
<i>M. bovis</i>	10.5 \pm 1.4	8.4 \pm 0.7	7.9 \pm 1.3

내에 각각 접종하여 피내반응의 정도를 관찰하였다. 감작된 기니픽은 모두 지연형과민반응을 나타내었으며 *M. avium*과 *M. paratuberculosis* PPD에 대하여 가장 큰 피내반응 병변을 보였다(Table 2).

考 察

韓國에서 사육되는 소에서 Johne病이 만연되고 있을 것이라는 추측은 1960년대에 이미 지적되고 있었는데, 이 사실이 1981년과 1983년에 臨床적으로 그리고 臨床病理學적으로 각각 보고된 바 있다^{11,12}. 그리고 本 研究에서 病原體로 밀어지는 *M. paratuberculosis*가 분리 동정되었다.

本 研究에서 病原菌 分離에 使用한 糞便材料는 臨床적으로나 病理學적으로 Johne病에 이환된 것으로 믿어지는 患牛의 것이었으며, 이것은 細菌學적으로도 菌塊를 보이는 抗酸性細菌이라는 점으로 더욱 뒷받침되었다. 즉 臨床的患牛의 50%는 전형적인 抗酸性桿菌塊를 보이며 이 사실은 Johne病을 確診하는 소견이 될 수 있기 때문이다^{2,6}.

人工培地에서 菌分離가 가능하였던 조건으로 여러가지 지를 지적할 수 있다.

첫째, mycobactin源으로 비교적 많은 量(1%)의 *M. bovis* 加熱死菌體를 培地에 첨가한 점이다. *Mycobacterium* 속세균은 mycobactin을 요구하는 것과 그렇지 않은 것의 두 군으로 나누는데 *M. paratuberculosis*는 mycobactin 依存性 細菌이다^{3,5,8,9}.

둘째, 糞便材料를 decontaminant인 4% NaOH액으로 處理하고 이 材料를 HCl로 中和하여 *M. paratuberculosis*가 NaOH에 의하여 파괴되는 것을 최소한으로 제한한 점이다. 糞便材料의 decontaminant로는 NaOH, phenol, benzalkonium chloride, NaOCl, Antiformin 등 여러가지 것이 사용되고 있으며 그 중에서도 NaOH와 benzalkonium chloride가 우수하다고 알려져 있다⁸. 그러나 본 연구에 의하면 4% NaOH 수용액을 사용할 경우 처리시간과 접종전 증화과정이 조대분

리에서 중요함을 알 수 있었다. 즉 지나친 처리시간이나 증화과정을 생략하는 일은 *M. paratuberculosis*까지도 파괴하는 결과를 초래하며 강 알칼리성 접종물은 배지에까지도 좋지 않은 영향을 끼칠 수 있기 때문이다.

셋째, 적당한 양의 malachite green을 첨가한 L-J培地를 들 수 있다. malachite green은 L-J培地에서 발육할 수 있는 非抗酸性細菌의 發育抑制劑이다. 그러나 報文에 따라 2% 수용액을 20ml⁴⁾와 200ml⁵⁾를 넣는 두 예를 볼 수 있었는데 本 研究에서는 100ml를 첨가하였다. 그 이유는 200ml 添加群에서는 발육이 없었거나 극히 완만하게 발육한 반면에 20ml 添加群에서는 雜菌의 발육을 허용하는 경향을 보였기 때문이다.

넷째, 糞便可檢材料를 培地에 넣어 접종함으로써 *M. paratuberculosis*가 培地中の mycobactin에 보다 잘 접촉되게 하여 발육이 가능토록 한 점이다. 接種材料中の *M. paratuberculosis*나 培地 中の mycobactin은 모두 lipophilic한 것이나 그 양자 사이에 lipophobic한 물질이 개재하여 양자의 접촉을 방해할 수 있는 가능성이 있다고 믿어지기 때문이다.

初次分離를 가능케 한 그밖의 조건으로는 밀폐배양을 들 수 있다. *M. paratuberculosis*는 CO₂에 의하여 발육이 증진된다¹⁰⁾. 그러기 때문에 斜面培地의 空氣相의 크기를 제한하였고 아울러 細菌의 발육과정에서 일어나는 CO₂를 최대한으로 이용하려 하였다. Na pyruvate 역시 *M. paratuberculosis*의 발육을 촉진하는데³⁾, 이 사실은 앞에서 지적한 CO₂ 요구를 뒷받침하여 준다.

*M. paratuberculosis*의 生化學的 性狀에 관하여는 뚜렷한 同定基準이 없다⁷⁾. 本 研究에서 수행한 性狀調查에서 分離菌이 mycobactin을 요구하는 것이 *M. paratuberculosis*로 同定하는 근거가 되겠다.

Bergy manual¹⁾에 근거하면 catalase 시험, Tween 80 분해시험, urease 생성시험 그리고 tellurite 환원 시험으로 分離菌이 牛型結核菌이 아님을 알 수 있다. 한편 分離菌이 鳥型結核菌과 다른 性狀으로는 Tween 80 분해시험과 tellurite 환원시험의 결과를 들 수 있다. 그러나 *Mycobacterium*속 세균의 生化學的 性狀은 同一菌種에 있어서도 菌株에 따라 다르기 때문에 mycobactin要求性 이외의 것에는 그다지 신뢰할 수 없다.

기니피콜을 이용한 allergy 시험에서 역시 生化學的 性狀試驗처럼 分離菌이 *M. paratuberculosis*라는 결정적인 사실을 증명하기는 어려웠다. 이 문제는 感作原製法에 있어서 種特異性을 발휘할 수 있는 실험법이 확립되어야 할 것으로 믿어진다.

結 論

臨床病理學的으로 보아 Johne病에 이환되었다고 믿어지는 肉牛의 糞便 재료를 4% NaOH액으로 처리한 후 *Mycobacterium bovis*의 加熱 死菌體를 1%로 첨가한 Löwenstein-Jensen medium에 접종하고 37°C, 2~4주간 배양하여 抗酸性의 細菌을 분리하였다. 分離細菌의 염색성, 형태학적인 특징, mycobactin 요구성을 비롯한 생화학적인 정상검사 결과 分離細菌을 *Mycobacterium paratuberculosis*로 동정하였다. 한편 分離菌으로 기니피콜을 감작시키고 4주일 후 *M. avium*, *M. bovis* 및 *M. paratuberculosis* PPD로 피내반응을 실시한 결과 *M. avium*과 *M. paratuberculosis*의 PPD에 대하여 가장 강한 반응을 나타내었다.

參 考 文 獻

1. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, (1974) p.699.
2. Gilmour, N.J.L. and Angus, K.W.: The specificity and sensitivity of the fluorescent antibody test for *Mycobacterium johnei* infection in abattoir and culled cattle. Res. Vet. Sci. (1979) 20:10.
3. Jorgensen, J.B.: An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. Acta vet. scand. (1982) 23:325.
4. Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R. and Sommers, H.M.: Mycobacteria. In "Color atlas and textbook of diagnostic microbiology," J.B. Lippincott Co., Philadelphia, (1979) p.368.
5. Lennette, E.H., Spaulding, E.H. and Truant, J.P.: Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, 2nd ed., Washington D.C, (1978) p.908.
6. Merkal, R.S., Kopeccky, K.E., Larsen, A.B. and Thurston, J.E.: Improvement in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. (1964) 25:107.
7. Merkal, R.S. and Thurston, J.R.: Comparison of *Mycobacterium paratuberculosis* and other

- mycobacteria, using standard chemical tests. Am. J. Vet. Res. (1966) 27 : 519.
8. Smith, H.W.: Modification of Dubos media for the cultivation of *Mycobacterium johnei*. J. Path. Bact. (1953) 66 : 375.
 9. Taylor, C.B.: Observation on the isolation of *Mycobacterium johnei* in primary culture. J. Path. Bact. (1950) 62 : 647.
 10. Wheeler, W.C. and Hanks, J.H.: Utilization of external growth factors by intracellular microbes: *Mycobacterium paratuberculosis* and wood pigeon mycobacteria. J. Bacteriol. (1965) 89 : 889.
 11. 李芳煥: 擬似吞氏病(John's disease)의 國內 發生 蔓延을 注視한다. 大韓獸醫師會誌 (1981) 17(3) : 11.
 12. 李芳煥, 林鳳鎬, 河昶守, 成洪龍: 國內發生의 파라 結核病(Jone's disease)例에 對한 臨床病理學的 追跡 調查報告. 大韓獸醫師會誌 (1983) 19(2) : 8.