

다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 소의 Johne병 진단 기법 확립

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과, 충남대학교 수의과대학 수의학과¹,
강원대학교 축산대학 수의학과²

김종배[†] · 송혜원 · 김근희 · 김 흥 · 신광순¹ · 김 두²

국문초록: 반추수에서 발생하는 Johne병의 조기 진단 방법을 제시하고 이 질병의 원인체와 미생물학적 특징이 유사한 *M. bovis*, *M. avium* 등의 mycobacteria 감염증을 감별 진단하는 방법을 개발하기 위하여 *Mycobacterium* 균속의 표준균주를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 확립하였다. Johne병으로 의심되는 소의 혈액과 유즙을 채취하여 분리한 단핵구 및 거식세포로부터 genomic DNA를 추출하였다. 각 시료로부터 추출한 DNA를 template로 이용하여 *Mycobacterium* spp.에 특이적인 16S rDNA primer set를 이용한 PCR을 수행하여 시료내의 mycobacterial DNA 보유 여부를 확인하였다. 한편 mycobacteria 양성으로 확인된 시료는 *M. avium* complex 균종에 특이한 16S rDNA 염기서열을 기초로 하여 제작한 primer set와 *M. paratuberculosis*의 IS900 sequence에 특이한 primer set를 이용하여 duplex PCR을 수행하여 Johne병 원인체의 보균 여부를 조사하였으며, 이 결과를 oligonucleotide probe를 사용한 Southern blot hybridization을 통하여 다시 확인하였다. 이와 같은 duplex PCR 기법을 실제 축산 현장에서 수집한 유즙과 말초혈액으로부터 분리한 단핵구 및 거식세포 시료에 적용한 결과 본 연구에서 확립한 duplex PCR 기법 유용성을 확인할 수 있었다.

서 론

*Mycobacterium paratuberculosis*가 반추동물에 감염하여 유발되는 Johne병은 지속적인 만성설사를 주증으로 하는 장관내 육아종성 염증성 질환으로⁵⁾, 전 세계적으로 사육되는 소의 1~15% 가량이 감염되어 있는 것으로 추정된다¹¹⁾. 이 질병의 세계적인 전파로 인하여 낙농업자에게 커다란 경제적 손실을 초래하고 있을 뿐만 아니라, 이 병의 원인체인 *M. paratuberculosis*는 사람에서도 Crohn's disease를 유발하여 직접적인 피해를 주고 있는 것으로 밝혀져 있다.

Johne병의 효과적인 통제 방법은 소가 어릴 때부터 이 병원균에 노출되는 것을 방지하는 것이 최선인 것으로 알려져 있다. 원인균의 전파 방법

으로는 분변 감염을 통한 전파가 가장 일반적이며^{5,8)}, 자궁내 노출¹³⁾로 인하여 전파되거나 초유와 우유^{14,15)}를 통하여 전파되는 경우 등이 알려져 있다.

우리 나라에서도 전 등¹⁾이 1984년에 대단위 목장에서 사육하고 있는 젖소에서 Johne병이라고 의심되는 환우의 분변을 분리 재료로 이용하여 *M. paratuberculosis*를 최초로 분리 보고한 바 있으며, 이후 임상학적 또는 조직병리학적으로 보아 Johne병에 감염된 환우가 국내에도 상당수 있는 것으로 추정되고 있다.

*M. paratuberculosis*는 장관내 lamina 층의 거식세포 안에서 증식하는 세포내 기생성 병원체로서 질병기에 분변 속으로 배설된다. 이 세균을 in vitro에서 배양할 경우 mycobactin이라는 iron-chelating 성장인자를 필요로 하고²⁾, 성장속도 또한 매우 느려 대개 8~16주 이상의 배양 기간을 필요로 한다³⁾. 이와 같은 *M. paratuberculosis*의 미생물학적인 특성 때문에 Johne병을 신속하게 진단할 수 있는 적절한 조기 진단 방법이 개발되어 있지 못한 실정이다. 그리고 현재 환우의 분변을

* 논문 접수: 2000년 1월 26일

수정재접수: 2000년 3월 2일

[†] 별책 요청 저자

* 이 논문은 1998~1999년도 한국과학재단의 핵심전문연구비 (981-0612-061-2) 지원으로 수행되었음.

검체로 이용하여 원인균의 분리를 시도하고 있지만, Johne병을 억제하기 위한 역학적인 질병 통제 방안으로서는 적합하지 않은 것으로 판단된다.

한편 Johnin을 이용한 피부반응시험, ELISA 그리고 보체결합반응과 같은 면역학적인 진단 방법은 질병의 감염기에도 위음성으로 판명되기 쉽고⁴⁾, 원인균이 환우의 면역체계에 미리 노출된 경우나 주변 환경에 있는 다른 mycobacteria에 의한 항원 자극에 대한 반응으로 인하여 위양성의 결과를 나타내기도 한다. 이런 단점을 보완하기 위한 진단 방법의 일환으로서 중합효소 연쇄반응은¹²⁾ 원인체로부터 DNA를 추출하여 검출함으로써 장시간의 배양 기간을 단축하여 조기에 진단할 수 있기 때문에 현재 사람의 결핵과 같은 mycobacteria 감염증의 검출에 많이 이용되고 있다^{6,7)}.

본 연구에서는 Johne병 원인 세균의 target DNA에 특이한 primers를 제작하여 Johne병의 진단 뿐만 아니라, 이 질병의 원인체와 미생물학적 특징이 유사한 *M. bovis*, *M. avium* 등의 병원성 세균을 각각 단일 중합효소 연쇄반응 및 다중 중합효소 연쇄반응을 이용하여 감별 진단하는 방법을 확립함으로써 동물의 mycobacteria 감염은 물론 Johne병의 병인체를 단시간 내에 진단할 수 있는 간편하고 우수한 조기 진단 방법을 제시하는데 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

Mycobacteria 표준균주

Mycobactin-J (Allied Monitor Inc., U.S.A.)를 2 µg/ml 농도로 첨가하여 제작한 Herold's egg yolk medium에 *M. paratuberculosis* ATCC19698과 국내 분리주인 4682, 0098 각각의 세균주를 접종하고 37℃에서 8~12주간 배양하여 본 실험에 사용하였다. 이와 함께 Ogawa medium에 *M. avium* ATCC 19075, *M. bovis* BCG (ATCC35726, ATCC35737, ATCC35744, 및 11T392), *M. tuberculosis* H37Ra ATCC25177, *M. intracellulare* ATCC13950, *M. fortuitum* ATCC6841, *M. smegmatis* ATCC14468의 각 세균주를 배양하여 대조 mycobacteria 균주로 사용하였다.

Peripheral blood monocyte 분리

Johne병으로 의심되는 소의 혈액으로부터 말초 혈액 단핵구 (peripheral blood monocyte)를 분리하

기 위하여, 헤파린으로 처리한 용기에 채혈한 말초혈액 10 ml를 취하여 2000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 buffy coat를 회수하였다. 회수한 buffy coat를 동량의 Hank's balanced salt solution으로 희석한 다음 3 ml의 Histopaque[®] 1077 (Sigma, U.S.A.)에 경계면이 혼합되지 않도록 주의하여 중층하고 2000 rpm으로 30분간 원심분리하여 단핵구를 포함하는 층을 분리하였다. 이렇게 분리한 단핵구를 5% fetal bovine serum을 첨가한 RPMI 1640 (Sigma, U.S.A.) 배지를 이용하여 1×10^6 /ml의 농도로 희석한 후, 12 well Transwell[®] 세포 배양 용기 (Costar Corp., U.S.A.)에 분주하고 5% 이산화탄소 농도하의 37℃ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 배양된 세포 중 세포 배양 용기의 polycarbonate membrane에 부착되지 않은 임파구 등은 phosphate buffered saline (pH 7.4)을 이용하여 3회 세척하여 제거한 후, membrane에 부착된 monocyte만을 분리하여 genomic DNA 추출에 사용하였다.

Genomic DNA의 추출

Johne병으로 의심되는 소들로부터 말초혈액 단핵구, 또는 유즙 거식세포를 분리하고 이들 세포로부터 DNA를 추출하였다. 즉, 수집된 유즙을 원심분리하여 얻은 침사를 시료로 하여 얻은 유즙 거식세포와 상기한 방법으로 말초혈액으로부터 분리한 단핵구로부터 QIAamp tissue kit (Qiagen Inc., U.S.A.)를 이용하여 제조회사의 권장술식에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA 시료는 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량한 다음 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

중합효소 연쇄반응

각각의 PCR 반응에 사용한 primer sets는 검출 대상 균종에 따라 적절한 것을 사용하였다. Primer 제작시 참조한 mycobacteria 균종의 16S rDNA의 유전자 염기서열은 GenBank의 data를 이용하였다. 각 균종별 GenBank accession number는 *M. bovis*의 경우 M20940, X55589, *M. avium*의 경우 M29572, M29573, M61667, M61668, M61669, M61670, M61671, M61672, M61672, *M. paratuberculosis*의 경우 M61674, M61675, M61676, M61677, M61678, M61679, M61680을 참조하였다. 한편 본 실험에 사용한 oligonucleotide의 sequence는 아래

Table 1. The sequences of PCR primers and oligonucleotide probe used in this study

Specific target gene in	Primer sequences (5' to 3')	References
16S rDNA of Prokaryotes	POmod : AGA GTT TGA TCM TGG	17
	PC5 : TAC CTT GTT ACG ACT T	
16S rDNA of <i>Mycobacterium</i> spp.	MaF : GAA AGC TTT TGC GGT GTG	This study
	MaR : CCG CTG GCA ACA TGA GAC	
16S rDNA of <i>M. avium</i> complex	MAP1 : AAG ACG CAT GTC TTC TGG TG	This study
	MAP2 : AAA CCC GGA CCT TCG TCG AT	
IS900 of <i>M. paratuberculosis</i>	150C : CCG CTA ATT GAG AGA TGC GAT TGG	16
	921 : AAT CAA CTC CAG CAG CGC GGC CTC G	
	probe : AGG TTG TGC CAC AAC CAC CTC CGT A	

와 같다 (Table 1).

중합효소 연쇄반응은 각각의 시료에서 추출한 DNA 2 µl에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTP를 2 µl 넣은 후 10X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂) 2.5 µl, primer set (20 pmol/µl)를 각각 2.5 µl, *Taq* DNA polymerase 0.3 U를 첨가하고 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 25 µl이 되도록 한 후 thermal cycler (Hybaid Limited, U.K.)에서 표적 DNA의 증폭을 시도하였다.

먼저 추출한 DNA를 template로 사용하여 prokaryote의 16S rDNA specific primer set (POmod, PC 5)를 이용한 PCR을 수행하였다. 이와 같이 증폭된 DNA를 template로 위와 동일한 방법으로 *Mycobacterium* spp.에 대해서는 MaF와 MaR primer set, *M. avium*과 *M. paratuberculosis*에 대하여는 MAP1과 MAP2 primer set로 *M. avium* complex 균종에 특이한 16S rDNA의 증폭 여부를 확인하였다. 여기에서 양성으로 확인된 DNA 시료만을 선택하여 *M. paratuberculosis*의 IS900 sequence에 특이한 921과 150C primer set를 이용하여 각종 Johne병 원인체의 보균 여부를 확인하였다.

PCR 반응은 총 35 cycle을 시행하였으며 첫 cycle이 시작하기 전에 94℃에서 2분 30초간 가온한 후, 매 cycle 당 94℃에서 45초 동안 denaturation, primer set 종류에 따라 42~52℃ 내외의 온도에서 45초 동안 annealing, 72℃에서 30초 동안 extension 반응을 시행하였다. 그리고 마지막 extension은 72℃ 15분간 지속함으로써 완전한 extension이 이루어지도록 하였다. 반응이 종료된 후 1.5% aga-

rose gel에 전기영동하여 target sequence의 증폭 여부를 확인하였다.

Southern blot hybridization

PCR 결과 증폭된 DNA bands 중 target이 되는 *M. paratuberculosis* IS900에 특이한 sequence에 해당하는 PCR amplicon을 확인하기 위하여 Southern blot hybridization을 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel을 depurination 용액 (0.2 M HCl)에 10분, 변성 용액 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 10분, 중화용액 (0.5 M Tris, pH 7.0, 3.0 M NaCl)에 10분간 처리하였다. 이와 같이 처리한 agarose gel을 transfer solution (20X SSC)에 담근 후, 90분간 vacuum transfer system을 이용하여 nylon membrane으로 전사하였다. 이 membrane을 80℃ 진공오븐에 2시간 정치한 다음 internal oligonucleotide probe를 ECL kit (Amersham, RPN 2131, U.S.A.)를 사용하여 제작회사의 권장술식에 따라 labelling 시키고, hybridization, membrane washing 과정을 거친 다음 detection 용액을 처리하여 X-ray film에 25분 노출시킨 후 chemiluminescence 방법을 이용하여 특이적인 band를 확인하였다.

결 과

Johne병의 조기 진단 방법을 제시하고 이 질병의 원인체와 미생물학적 특징이 유사한 *M. bovis*, *M. avium* 등의 mycobacteria 감염증을 감별 진단하는 방법을 개발하기 위하여 *Mycobacterium* 균속의 표준균주를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 확립

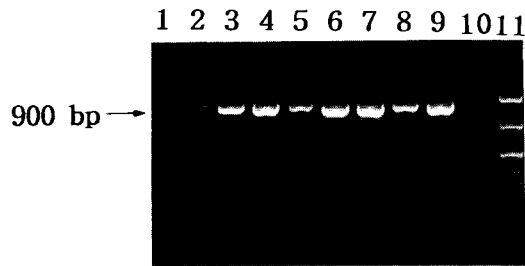


Fig. 1. PCR amplification of mycobacterial strains with MaF, MaR primer set. PCR products from the following mycobacterial strains were electrophoresed on 1.5% agarose gels in different lanes. Lane 1, *M. fortuitum* ATCC6841; lane 2, *M. smegmatis* ATCC 14468; lane 3, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC25177; lane 4, *M. bovis* BCG ATCC35726; lane 5, *M. intracellulare* ATCC13950; lane 6, *M. avium* ATCC 19075; lane 7, *M. paratuberculosis* ATCC19698; lane 8, *M. paratuberculosis* 4682; lane 9, *M. paratuberculosis* 0098; lane 10, distilled water (negative control); lane 11, DNA size marker of pBH20 digested with *Hinf*I.

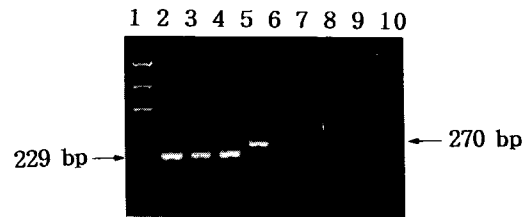


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis patterns showing PCR-amplified products in duplex PCR for the IS900 gene of *M. paratuberculosis* and 16S rDNA gene of *M. avium* complex. Lane 1, DNA size marker of pBH20 digested with *Hinf*I; lane 2, *M. paratuberculosis* ATCC19698; lane 3, *M. paratuberculosis* 4682; lane 4, *M. paratuberculosis* 0098; lane 5, *M. avium* ATCC19075; lane 6, *M. intracellulare* ATCC13950; lane 7, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177; lane 8, *M. bovis* BCG ATCC35726; lane 9, *M. fortuitum* ATCC6841; lane 10, distilled water (negative control).

하였다.

우선 *Mycobacterium* spp.를 확인하기 위하여 mycobacterial 16S rDNA 염기서열에 특이적인 MaF, MaR primer set를 이용하여 PCR을 실시한 결과 본 실험에 사용한 모든 mycobacteria에서 900 bp의 양성 증폭산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

한편 *M. paratuberculosis*를 포함하는 *M. avium* complex 균종의 16S rDNA 염기서열에 특이적인 primer set인 MAP1, MAP2를 이용하여 PCR을 시행한 결과 본 실험에 사용한 3종의 *M. paratuberculosis*와 *M. avium*에서만 270 bp의 양성 결과를 확인할 수 있었다 (data not shown). 또한 *M. paratuberculosis*의 IS900 gene의 염기서열에 특이적인 primer set인 921, 150C를 사용하여 PCR을 시행한 결과 3종의 *M. paratuberculosis*에서만 229 bp의 PCR 증폭산물이 확인되었으며 본 실험에 사용한 다른 mycobacteria에서는 모두 음성으로 나타났다 (data not shown).

이와 같은 결과를 토대로 *M. paratuberculosis*의 IS900 gene의 염기서열에 특이적인 primer set과 *M. avium* complex 균종의 16S rDNA 염기서열에 특이적인 primer set를 혼합하여 duplex PCR을 수행하였다. 그 결과 3종의 *M. paratuberculosis*의 경우에는 229 bp의 IS900 gene의 증폭산물만이 생성되었으며, *M. avium* 균종의 경우에는 270 bp의 16S rDNA에 특이적인 증폭산물이 확인되어 (Fig. 2.),

M. avium complex 균종에 포함되는 *M. paratuberculosis*와 *M. avium*을 한번의 PCR을 수행하여 감별할 수 있었다.

이상의 mycobacteria 표준균주를 이용하여 확립한 PCR 진단 기법을 사용하여 축산 현장에서 채취한 유즙 및 말초혈액 시료를 이용하여 Johne병 원인체의 보균 여부를 조사하였다. 1998년 7월부터 1999년 10월까지 경기도 지역에 산재하고 있는 다수의 목장에서 우유를 생산하고 있는 500마리의 소로부터 유즙 (초유 포함)을 수집하였다. 또한 동일 기간 동안 강원도 지역에 산재한 목장에서 Johne병에 감염된 것으로 의심되는 57마리의 소에서 말초혈액을 채취하였다. 이와 같이 채취한 유즙에서 macrophage를, 말초혈액 시료로부터 monocyte를 분리하고 위에서 확립한 duplex PCR 기법으로 *M. paratuberculosis* DNA의 검출을 시도하였다. 이와 더불어 Johne병의 endemic area인 미국 New York주 Ithaca시에 위치한 다수의 목장에서 22마리 소와 35마리 면양의 유즙에서 분리한 macrophage와 말초혈액에서 분리한 monocyte를 이용하여 동일한 방법으로 genomic DNA를 추출하여 본 실험에서 확립한 duplex PCR 기법을 시행하였다.

그 결과 국내에서 수집한 소의 유즙 macrophage 및 말초혈액 monocyte에서 추출한 genomic DNA 시료에서는 단 한 예에서도 *M. paratuberculosis*

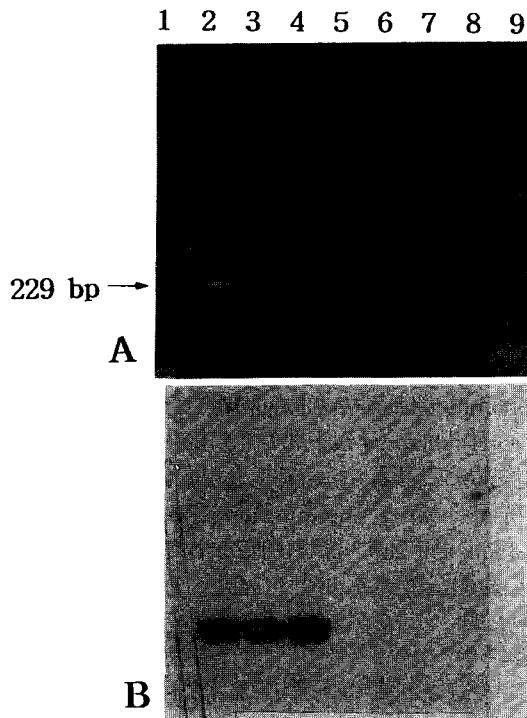


Fig. 3. Representative results of duplex PCR on peripheral blood monocytes and milk macrophage specimens by agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot hybridization of the same gel (B) were demonstrated. Lane 1, DNA size marker of pBH20 digested with *Hinf*I; lane 2, *M. paratuberculosis* ATCC 19698 (positive control); lane 3, *M. paratuberculosis*-positive monocytes from peripheral blood; lane 4, *M. paratuberculosis*-positive macrophages from milk; lanes 5 to 6, *M. paratuberculosis*-negative monocytes from peripheral blood; lanes 7 to 8, *M. paratuberculosis*-negative macrophages from milk; lane 9, distilled water (negative control).

DNA가 검출되지 않았다. 그러나 Johne병이 만성적으로 유행하고 있는 것으로 확인된 미국의 Ithaca시에서 채취한 시료에서는 22마리의 소의 유즙 macrophage 시료 중 3예에서, 35마리의 면양 시료 중 8예의 말초혈액 monocyte와 7예의 유즙 macrophage에서 *M. paratuberculosis* DNA가 검출되어 양성 결과를 얻었으며 (Table 2), PCR 증폭산물을 Southern blot hybridization을 실시한 결과 (Fig. 3.) duplex PCR의 결과와 완전히 일치되는 결과를 확인할 수 있었다.

Table 2. The detection of *M. paratuberculosis* DNA with duplex PCR system with the specimens collected in Ithaca, N. Y.

Animal	Positives in genomic peripheral blood monocytes	DNAs from milk macrophages
Cow	0/22 (0%)	3/22 (13.6%)
Sheep	8/35 (22.9%)	7/35 (20.0%)
Total	8/57 (14.0%)	10/57 (17.5%)

고 찰

반추동물에서 설사를 주증으로 하는 만성장관염증성 질환의 하나인 Johne병 (또는 paratuberculosis)은 원인체인 *M. paratuberculosis*의 미생물학적인 특성으로 인하여 미생물학적인 조기 진단 방법이 개발되어 있지 못한 실정이며, 면역학적인 진단 방법은 검사 기법의 특성상 위양성 등의 결과로 인하여 임상진단에 사용하기에는 판독상의 어려움이 많다. 이와 같은 까닭으로 Johne병의 국내에서의 발생 현황 조차 체계적으로 파악되지 않고 있으며, Johne병 전파를 차단하기 위한 통제 방안은 극히 제한적인 수준에 머물러 있다고 할 수 있다.

한편 소에서 *M. paratuberculosis* 감염으로 유발되는 Johne병의 증상과 매우 유사한 특징을 보이는 사람의 Crohn's disease¹⁰⁾는 만성장관염증성 질환으로 설사, 급격한 체중감소, 복통을 야기하며 아직까지 이 병의 치료 방법이 없는 것으로 알려져 있다. 더욱이 Crohn's disease를 앓고 있는 사람에서는 원인 세균이 체내에서 spheroplast 상태로 존재하고 있으므로 삼투압 등에 의하여 균체가 쉽게 파괴되는 까닭에 아직까지 원인 세균을 실험실내에서 분리하지 못하고 있다. 그러나 동물과 접촉이 많은 낙농업자와 Crohn's disease와의 상관관계를 역학적으로 조사한 최근 보고⁹⁾에 따르면 낙농업 관련 종사자나 *M. paratuberculosis*에 오염된 축산물 등이 사람에서 Crohn's disease를 전파할 수 있는 위험요소로 인정되고 있음을 암시하고 있다. 또한 *M. paratuberculosis*가 과거에 생각했던 것 보다 훨씬 많이 확산되어 있다는 점 등을 고려할 때 *M. paratuberculosis*는 수의학적인 측면 뿐만 아니라 공중위생학적인 측면에서도 중요

한 인수공통 전염병의 원인체임이므로, 이 세균의 조기 검색 방법 확립은 그 의의가 매우 높다고 할 것이다.

특정 DNA sequence만을 증폭하는 중합효소 연쇄반응 (PCR)은 원인균의 배양이 까다롭고 배양 시간이 8~16주 이상이 소요되는 *M. paratuberculosis*를 배양하지 않고 임상 가검물에 포함된 원인균의 특정 DNA 부분만을 선택적으로 빠르게 증폭한 다음 검출함으로써, Johne병의 진단에 효과적으로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 질병의 초기에 정확한 진단이 가능하므로 이들 질병의 전파를 차단하기 위한 적절한 역학적인 조치를 취하는 데에도 기여할 수 있을 것으로 판단되어 본 연구를 실시하였다.

각각의 mycobacteria 표준균주로부터 추출한 DNA를 template로, 본 실험에서 16S rDNA 염기서열에 기초하여 자체 제작한 primer set를 이용한 mycobacteria의 검출용 1차 PCR과 Johne병 원인체인 *M. paratuberculosis*가 속한 *M. avium* complex를 검출하기 위한 2차 PCR 결과 *Mycobacterium* spp.에 속한 모든 미생물종에서 900 bp의 증폭산물이, *M. paratuberculosis*와 *M. avium* complex의 각종 세균에서 추출한 DNA 시료에서는 270 bp의 증폭산물이 생성되었으며, 기타 다른 대조균주에서는 PCR 증폭산물을 확인되지 않아 primer 제작시 예상하였던 바의 성적을 얻을 수가 있었다.

그러나 *M. avium* complex내 세균 중에서 *M. paratuberculosis*와 *M. avium*을 감별하기 위하여 실시한 duplex PCR에서는 IS900 gene과 16S rDNA를 동시에 보유하고 있는 *M. paratuberculosis*의 경우 229 bp의 IS900 증폭산물만이 확인되었으며, 16S rDNA만을 보유한 *M. avium*의 경우에는 270 bp의 16S rDNA 증폭산물만이 확인되어 PCR 설계 당시 *M. paratuberculosis* DNA를 사용하면 229 bp와 270 bp의 2종의 DNA band가 증폭되리라고 예상하였던 것과는 다소 차이가 있는 결과를 얻었다. 이와 같은 결과는 duplex PCR mixture내에 첨가하는 2종류 primer set의 target gene sequence에 대한 반응 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단되며, *M. paratuberculosis*의 IS900 sequence에 특이적인 921-150C primer set의 친화성이 16S rDNA에 대한 MAP1-MAP2 primer set의 친화성보다 높은 것으로 추정된다.

본 실험에서 확립한 duplex PCR 기법을 실제로 축산 현장에서 채취한 유즙 및 말초혈액 시료

를 이용하여 Johne병 원인체의 보균 여부를 조사한 결과, 국내에서 수집한 소의 유즙 및 말초혈액에서 분리된 monocyte에서 추출한 genomic DNA 시료에서는 단 한 예에서도 *M. paratuberculosis* DNA가 검출되지 않았다. 그러나 Johne병이 만성적으로 유행하고 있는 것으로 확인된 미국내 목장에서 채취한 말초혈액으로부터 분리한 monocyte 중 14%, 유즙에서 분리한 monocyte의 17.5%에서 *M. paratuberculosis* DNA가 양성으로 확인되어 본 연구의 duplex PCR 기법 유용성을 확인할 수 있었다. 한편 duplex PCR에서 양성으로 나타난 PCR 증폭산물을 Southern blot hybridization을 실시한 결과 (Fig. 3.) duplex PCR의 결과와 완전히 일치되는 결과를 얻어 PCR 결과의 정확도를 다시 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 요약하여 볼 때 본 실험에서 확립한 duplex PCR 방법은 축산 현장의 검사실에서 Johne병 원인체인 *M. paratuberculosis*는 물론 기타 mycobacteria 균주를 신속하게 검출하는 방법으로 응용 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다. 그러므로 본 연구에서 확립한 duplex PCR 기법을 이용하여 국내의 Johne병 발생 현황 등에 관한 보다 체계적인 연구를 수행하여야 할 것으로 사료되며 사람의 Crohn's disease 진단에도 응용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 duplex PCR 기법을 이용한 mycobacteria 감염증에 대한 역학적인 조사를 원활하게 수행할 수 있으므로 원인 세균의 검출 및 역학적인 감염원 차단을 통한 질병 관리에도 기여할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- 1) 전윤성, 이방환, 김종배, 최철순, 김진구 (1984): 우유내 Mycobactin 의존성 항산성 세균 (*M. paratuberculosis*)의 분리동정. 대한수의학회지, **24**: 58-63.
- 2) Aduriz JJ, Juste RA and Cortabarría N (1995): Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet Microbiol*, **45**: 211-217.
- 3) Barclay R, Ewing DF and Ratledge C (1985): Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofu-*

- laceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Bacteriol*, **64**: 896-903.
- 4) Bendixen PH (1978): Immunological reactions caused by infection with *M. paratuberculosis*. A review. *Nord Veterinaermed*, **30**: 163-168.
 - 5) Chiodini RJ, van Kruinigen HJ and Merkal RS (1984): Ruminant paratuberculosis (Johne's disease). The current status and future prospects. *Cornell Vet*, **74**: 218-262.
 - 6) Hance A, GrandchampB, Levy-Frebault V, Lecossier D, Rauzier D and Gicquel B (1989): Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol*, **37**: 843-849.
 - 7) Hartskeet R, De Wit YM and Klatser P (1989): Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol*, **155**: 2357-2364.
 - 8) Julian RJ (1975): A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. *Can Vet J*, **16**: 33-43.
 - 9) McFadden JJ, Butcher PD, Thompson J, Chiodini R and Hermon-Taylor J (1987): The use of DNA probes identifying restriction fragment length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium complex*. *Mol Microbiol*, **1**: 283-291.
 - 10) McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R and Taylor RH (1987): Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis* as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin Microbiol*, **25**: 796-801.
 - 11) Merkal RS (1984): Paratuberculosis, pp. 1237-1249. In Kubica GP and Wayne LG (ed.), "The Mycobacteria: a sourcebook", Marcel Dekker, Inc., New York.
 - 12) Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Higuchi R, Mullis K and Erlich H (1988): Primerdirected enzymic amplification of DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
 - 13) Seitz S, Heider LE and Heuston WD (1989): Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Am Vet Med Assoc*, **194**: 1423-1426.
 - 14) Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, Shulaw WP and Ring DM (1995): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res*, **56**: 1322-1324.
 - 15) Taylor TK, Wilks CR and McQueen DS (1981): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet Rec*, **109**: 532-533.
 - 16) Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J and McFadden JJ (1990): Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol*, **28**: 933-937.
 - 17) Wilson KH, Blitchington RB and Greene RC (1990): Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **28**: 1942-1946.

=Abstract=

Diagnosis of Bovine Johne's Disease Using Multiplex Polymerase Chain Reactions

**Jong-Bae Kim[†], Hye-Wone Song, Geun-Hee Kim, Hong Kim,
Kwang-Soon Shin¹ and Doo Kim²**

*Department of Medical Techonology, Yonsei University,
Department of Veterinary Medicine, Chungnam National University¹,
Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University²*

In order to improve the early diagnosis of Johne's disease in ruminants, duplex polymerase chain reaction system for the detection of the etiologic agent of *M. paratuberculosis* and for the differentiation of other mycobacterial animal pathogens, such as *M. bovis* and *M. avium*, was applied. Genomic DNAs were purified from peripheral blood monocytes or milk macrophages and were used as templates in the duplex PCR. Detection of *Mycobacterium* spp. in the specimen was carried out by PCR using primer set specific to the mycobacterial 16S rDNA. And then, mycobacterial DNA-positive specimens were further differentiated with duplex PCR system which was composed of primer sets specific to 16S rDNA of *M. avium* complex and IS900 gene of *M. paratuberculosis*. The results were re-confirmed by Southern blot hybridization with oligonucleotide specific to the internal sequence of IS900 PCR amplicons. The applicability of this duplex PCR system was evaluated with DNAs extracted from clinical specimens of peripheral blood monocytes and milk macrophages. In summary, the duplex PCR amplification system described in this experiment is promising molecular technique for the early diagnosis of Johne's disease in ruminants.

Key Words: Johne's disease, *M. paratuberculosis*, Duplex PCR

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(1): 65-72, March, 2000]

[†] Corresponding author