

PCR을 이용한 소 세균성 호흡기질병 원인체 신속동정

정 병 열*

국립수의과학검역원 동물약품과
(게재승인: 2004년 6월 23일)

Rapid identification of bacterial pathogens related with bovine respiratory diseases by using PCR

Byeong-yeal Jung*

Veterinary Pharmacology Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
(Accepted: June 23, 2004)

Abstract : *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella multocida* were responsible for respiratory diseases in bovine. Methods for identifying these bacteria had poor sensitivity and specificity. In this paper, PCR assays were applied for rapid identification of *H. somnus*, *M. bovis*, *P. multocida* B:2 and *P. multocida* capsular types. The specific PCR products were amplified from *H. somnus*, but not from other bacteria. Ten-fold diluted *H. somnus* were mixed with *P. multocida* and then the mixed cultures were inoculated on agar plates. After incubation, PCR was performed with harvest from agar plates and could detect as few as 3.4 CFU/ml of *H. somnus*. The primers MboF and MboR produced an amplification product unique to *M. bovis* and sensitivity of PCR was as low as 100 pg of DNA. Only serotype B:2 of *P. multocida*, the causal agent of haemorrhagic septicemia in bovine, was specifically amplified in PCR among the 16 reference serotypes. The multiplex capsular PCR typing for *P. multocida* was produced the *P. multocida*-specific product as well as the capsular serogroup-specific product. The present PCR assays should be useful for the rapid identification of bacterial pathogens from bovine respiratory diseases.

Key words : *H. somnus*, *M. bovis*, *P. multocida*, PCR

서 론

국내 소의 호흡기질병은 주로 infectious bovine rhinotracheitis virus(IBRV), parainfluenza type-3 virus(PI-3V), bovine respiratory syncytial virus(BRSV) 등과 같은 바이러스 및 *Mycoplasma(M.)* spp., *Pasteurella(P.)* spp.와 같은 세균의 단독 또는 혼합감염에 의해서 발생되는데, 사육환경 및 사육밀도, 초유섭취정도, 백신접종유무 등 여러 가지 요인에 의하여 발생율이 다양하게 나타난다. 이들 소 호흡기질병 원인체 중 바이러스성 원인체에 대해서는 감염을 및 면역원성 등 많은 연구가 이루어졌으나 [1, 3, 4, 5], 세균성 원인체에 대해서는 일부 균종에서만 연구가 보고되었다 [2].

소의 호흡기질병에 관여하는 주요 세균으로서는

P. multocida, *M. bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis*, *Haemophilus(H.) somnus*, *Mannheimia(Man.) haemolytica*, *Arcanobacterium(A.) pyogenes* 등이 알려져 있다 [19].

*H. somnus*는 송아지에서 중증의 폐렴을 유발하고 성우에서는 전염성 혈전색성 뇌수막염, 폐혈증, 유산, 관절염 등을 일으키며 상부호흡기계나 생식기계에 상재균으로 존재하나 [16, 23], 항생제에 민감하기 때문에 다량의 항생제 처치를 받은 소에서 또는 다른 호흡기 세균과 혼합되었을 경우 균분리가 어려워진다 [18]. Tegtmeier 등은 *H. somnus* 진단을 위해 균분리 배양법, PCR, in situ hybridization, 면역 조직 염색법 등을 비교하여 그 중 PCR이 가장 민감하며 효율적이라고 보고하였으며 [22], Appuhamy 등은 효율적인 역학조사를 위하여 PCR 이용을 제안하였다 [7]. *M. bovis*는 소에서 병원

*Corresponding author: Byeong-yeal Jung

Veterinary Pharmacology Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
[Tel: +82-31-467-1733, Fax: +82-31-467-1740, E-mail: jungby@nvrqs.go.kr]

성이 높은 mycoplasmas 중의 하나이며, 폐렴, 유방염, 관절염, 생식기 질환 등을 유발한다 [17]. 그러나 *M. bovis* 를 배양할 수 있는 실험실은 제한적이며, 혈청학적인 진단법은 잠복기나 다른 mycoplasmas와 교차반응 등으로 인하여 사용하기가 용이하지 않다. Ghadersohi 등은 PCR 기법을 이용하여 *M. bovis*를 20 CFU까지 검출하였으며 [12], Hu와 Buck은 바이러스 배양액에서 mycoplasmas 오염 유무를 확인하기 위해서 nested PCR을 보고하였다 [15]. 현재 우리나라에서 발생보고가 없는 소의 출혈성 폐혈증은 *P. multocida*의 일부 혈청형에 의해 유발되며 동남아시아지역에서 많이 발병하고 있다 [8]. 우울, 발열, 호흡곤란, 악취수종 등을 동반하며 임상증상 발현후 1일 이내에 폐사하는 심급성 질병으로써 특이적인 임상증상이나 병리소견을 관찰할 수 없어 PCR 등과 같은 유전적인 진단법이 이용되고 있다 [25]. *P. multocida*는 capsule 항원에 근거하여 serogroup A, B, D, E, F로 구분되고 [21], 균체항원 lipopolysaccharide(LPS)에 따라 1부터 16까지 16종으로 구분되며 [13], 이들 capsule 항원과 LPS 항원의 조합으로 혈청형을 명명한다. *P. multocida*는 각 capsule 혈청형에 따라 특정 질병과 연관되는데 B, E는 소의 출혈성 폐혈증에 관여하며, A는 가금콜레라, D는 돼지 위축성 비염에 주로 관여한다. 그러나 *P. multocida*의 capsule 항원형을 동정하기 위해 항혈청을 유지 관리하기가 힘들며 capsule이 없는 *P. multocida*들도 보고되고 있어 [20], PCR을 이용한 *P. multocida* capsule 혈청형 동정이 각광받고 있다 [24].

국내에서 시판되고 있는 소의 세균성 호흡기백신은 *Man. haemolytica* 균체와 leukotoxin을 함유한 불활화백신과 *Man. haemolytica*와 *P. multocida*를 함유한 생균백신 등 2종류가 있으나 모두 수입백신이며, 이들 백신의 효과는 국내 소 세균성 호흡기질환의 원인체 분포상황에 따라 달라질 것이며, 이러한 배경을 기초로 본 연구에서는 소의 주요한 세균성 호흡기질환의 원인체인 *H. somnus*와 *M. bovis* 및 출혈성 폐혈증을 유발하는 *P. multocida* B:2를 신속히 동정할 수 있는 PCR기법과 *P. multocida* capsule 혈청형 동정을 위한 multiplex PCR기법의 특이도와 민감도 등을 조사하여 향후 소의 세균성 호흡기질환 원인체 신속동정에 이용하고자 한다.

재료 및 방법

시험균주

본 연구에 사용된 시험균주는 *H. somnus*(ATCC 43626), *P. multocida* serotype 1~16(provided by Dr. Frank, National Veterinary Service Laboratory, USA), *Man. haemolytica*(ATCC 29694), *Streptococcus suis*(provided

by Dr. Gottschalk, University of Montreal, Canada), *Bordetella bronchiseptica*(ATCC 19395), *Actinobacillus pleuropneumoniae*(isolate, NVRQS), *Clostridium perfringens*(isolate, NVRQS), *M. bovis*(ATCC 25025), *M. hyorhinis*(ATCC 25021), *M. hyopneumoniae*(ATCC 25934), *M. pulmonis*(ATCC 19612), *M. pullorum*(ATCC 33553), *M. gallisepticum*(ATCC 19610), *M. iowae*(ATCC 33552), *M. synoviae*(ATCC 25204), *M. anatis*(ATCC 25524) 등을 사용하였다. Mycoplasmas는 Freund에 따라 각각 최적 증균배지를 선별하였고 [11], 그 외 균들은 brain heart infusion broth(Difco)를 기본배지로 이용하였으며 최적 배양조건으로 발육시켜 -70°C에 보관하였다.

PCR primers

소 세균성 호흡기질환의 주요 원인체에 대해 다음과 같이 PCR primers를 작성하였다. *H. somnus*와 *M. bovis* 검출을 위해서는 각각 16S rRNA을 이용하였고, 소 출혈성 폐혈증을 유발하는 *P. multocida* B:2에 특이적인 primers를 사용하였다. *P. multocida*에 반응하는 primers와 각 capsule 혈청형 A, B, D, E, F에 특이적으로 반응하는 primers를 동시에 사용하였으며, 각 PCR primers의 염기서열은 Table 1에 나타난 바와 같다.

PCR mixtures와 conditions

각 균종에 대한 PCR mixtures의 최종 반응량은 50 μ l가 되도록 Table 2와 같이 조성하였으며 Promega(USA) 제품을 사용하였다. Template DNA 용액은 원심수세된 균을 멸균증류수에 부유시켜 10분간 중탕하고, 얼음물에 20분간 방치한 후 원심 상층액을 사용하였다. DNA thermal cycler(Perkin-Elmer 9600)를 이용하여 PCR을 실시하였고, 반응조건은 Table 3에 나타난 바와 같으며 PCR 증폭산물 10 μ l를 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 특이유전자 증폭 유무를 관찰하였다.

특이도 및 민감도 조사

각 균종별 PCR기법의 특이도 조사는 순수배양된 시험균주를 이용하였다. 즉, *H. somnus* PCR의 특이도는 *Man. haemolytica*를 비롯한 8종의 세균을 대상으로 실시하였으며, *M. bovis* PCR의 특이도는 9종의 *Mycoplasma* 속균을 포함한 총 15종의 세균을 대상으로 실시하였다. *P. multocida* B:2 동정을 위한 PCR은 혈청형 1부터 16까지 16종의 *P. multocida* 시험균주를 이용하였으며, *P. multocida* capsule 혈청형 동정을 위한 multiplex PCR은 capsule 혈청형이 A, B, D로 확인된 3종의 *P. multocida*를 사용하였다.

M. bovis PCR기법의 민감도는 추출된 DNA를 이용하

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers

Bacteria	Primers	Sequences (5' to 3')	Product size (bp)	References
<i>H. somnus</i>	HS-F	GAAGGCGATTAGTTTAAGAG	408	6
	HS-R	TTCGGGCACCAAGTR*TTCA		
<i>M. bovis</i>	MboF	CCTTTTAGATTGGGATAGCGGATG	361	9
	MboR	CCGTCAAGGTAGCATCATTTCCCTA		
<i>P. multocida</i> B:2	PmHS-F	AGGCTCGTTTGGATTATGAAG	618	25
	PmHS-R	ATCCGCTAACACACTCTC		
<i>P. multocida</i> (multiplex capsular typing)	PM-F	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	457	24
	PM-R	GCTGTAAACGAACTCGCCAC		
	CapA-F	TGCCAAAATCGCAGTCAG	1,046	
	CapA-R	TTGCCATCATTGTCAGTG		
	CapB-F	CATTTATCCAAGCTCCACC	760	
	CapB-R	GCCCGAGAGTTTCAATCC		
	CapD-F	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	648	
	CapD-R	CATCTACCCACTCAACCATATCAG		
	CapE-F	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	514	
	CapE-R	GCTTGCTGCTTGATTTTGTC		
CapF-F	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	852		
CapF-R	TTCCGCCGTCAATTACTCTG			

*R denotes A or G

Table 2. Composition of PCR mixtures used in this study

Reagents	Volume of reagents for the indicated bacteria (μl)			
	<i>H. somnus</i>	<i>M. bovis</i>	<i>P. multocida</i> B:2	<i>P. multocida</i> (multiplex capsular typing)
10×PCR buffer	5	5	5	5
25 mM MgCl ₂	4	3	2	2
10 mM dNTPs	1	0.3	1	4
Each primer(100 pmole/μl)	1	0.5	1	0.2
<i>Taq</i> DNA polymerase(5 unit/μl)	0.2	0.2	0.2	0.2
DW	32.8	39.5	36.8	30.4
Template DNA solution	5	1	3	6

Table 3. PCR conditions for DNA amplification of the indicated bacteria

Steps	PCR conditions			
	<i>H. somnus</i>	<i>M. bovis</i>	<i>P. multocida</i> B:2	<i>P. multocida</i> (multiplex capsular typing)
Initial denaturation	94°C, 3 min	94°C, 3 min	95°C, 4 min	95°C, 5 min
Denaturation	94°C, 1 min	94°C, 45 sec	95°C, 1 min	95°C, 30 sec
Annealing	55°C, 1 min	60°C, 1 min	55°C, 1 min	55°C, 30 sec
Extension	72°C, 1 min	72°C, 2 min	72°C, 1 min	72°C, 2 min
Cycles	35	35	30	35
Final extension	72°C, 15 min	72°C, 15 min	72°C, 15 min	72°C, 15 min

였다. 즉, GeneQuant(Pharmacia Biotech, USA)로 template DNA 용액의 농도를 측정하고, 10 ng/μl 부터 100 ag/μl 까지 10진 단계희석하여 각 희석배수별로 PCR을 적용하여 *M. bovis* PCR의 민감도를 조사하였다.

*P. multocida*와 *H. somnus*를 혼합한 후 PCR기법으로 *H. somnus* 검출 민감도를 조사하였다. 즉, *H. somnus* 배양균액을 멸균식염수로 6.7×10^4 CFU/ml 부터 6.7×10^{-2} CFU/ml 까지 10진 단계희석한 각각의 시험관에 3.5×10^8 CFU/ml의 *P. multocida*를 동량 혼합하고 혼합균액 1 ml을 면양혈액한천배지에 도말하여 1일 배양 (37°C, 5% CO₂)한 다음, 멸균식염수로 집균하여 *H. somnus* PCR을 실시하였다.

결 과

H. somnus PCR에 대한 특이도를 조사하기 위하여 8종의 세균을 대상으로 PCR을 실시하였던 결과(Fig. 1), *H. somnus*에서만 408 bp의 특이적인 증폭산물이 형성되

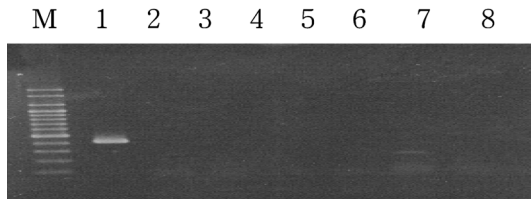


Fig. 1. Specificity of PCR for detection of *Haemophilus somnus*. The PCR products were analysed by 1.5% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. Lane M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea); lane 1, *Haemophilus somnus*; lane 2, *Mannheimia haemolytica*; lane 3, *Streptococcus suis*; lane 4, *Bordetella bronchiseptica*; lane 5, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; lane 6, *Clostridium perfringens*; lane 7, *Mycoplasma bovis*; lane 8, *Mycoplasma hyorhinis*.

었고 *Man. haemolytica* 등 기타 세균에서는 증폭산물이 확인되지 않아 본 PCR기법으로 *H. somnus*를 신속하게 확인할 수 있었다.

신속하고 특이적으로 *M. bovis*를 동정하고자 PCR기법을 이용한 결과, *M. bovis*에서만 361 bp의 특이 증폭산물이 형성되었고, *M. hyorhinis* 등 8종의 기타 *Mycoplasma* 속균(Fig. 2A)과 *Man. haemolytica* 등 7종의 기타 세균(Fig. 2B)에서는 증폭산물이 관찰되지 않아 *M. bovis* PCR기법의 특이성이 인정되었다. 한편, *M. bovis* PCR기법의 민감도를 알아보기 위하여 *M. bovis*의 DNA를 추출하여 10 ng/μl 부터 100 ag/μl 까지 10진 단계희석하여 각각 PCR을 실시한 결과, 본 PCR기법으로 *M. bovis* DNA 100 pg 까지 검출이 가능하였다(Fig. 3).

소 출혈성 폐혈증을 유발하는 원인체인 *P. multocida* B:2를 특이적으로 검출할 수 있는가를 확인하기 위하여 *P. multocida* 혈청형 1부터 16까지 시험균주 16주를 대상으로 PCR기법의 특이도를 조사한 결과(Fig. 4), *P. multocida* B:2에서만 618 bp의 특이 증폭산물이 관찰되어 본 PCR기법으로 소의 출혈성 폐혈증 원인균을 신속

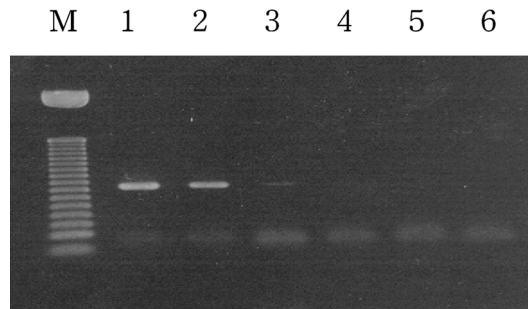


Fig. 3. Sensitivity of PCR for detection of *Mycoplasma bovis*. Lane M, 50 bp DNA ladder (Promega); lane 1 to 6, serial 10-fold dilution of genomic DNA of *M. bovis* (10 ng/μl to 100 ag/μl).

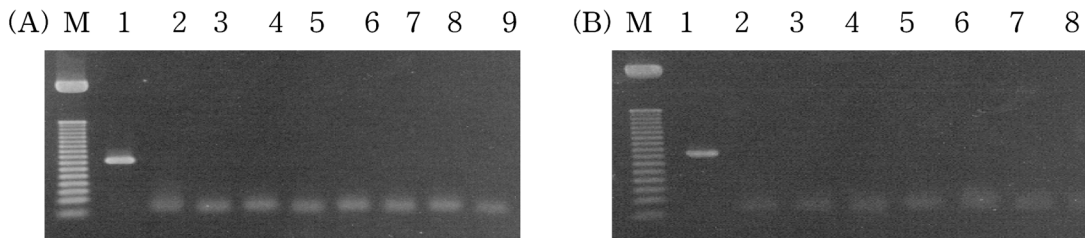


Fig. 2. Specificity of *Mycoplasma bovis* detection in PCR using species-specific primers. Lane M, 50 bp DNA ladder (Promega). (A) Lane 1, *M. bovis*; lane 2, *M. hyorhinis*; lane 3, *M. hyopneumoniae*; lane 4, *M. pulmonis*; lane 5, *M. pullorum*; lane 6, *M. gallisepticum*; lane 7, *M. iowae*; lane 8, *M. synoviae*; lane 9, *M. anatis*. (B) Lane 1, *M. bovis*; lane 2, *Mannheimia haemolytica*; lane 3, *Streptococcus suis*; lane 4, *Bordetella bronchiseptica*; lane 5, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; lane 6, *Clostridium perfringens*; lane 7, *Pasteurella multocida*; lane 8, *Haemophilus somnus*.

하게 확인할 수 있었다.

P. multocida capsule 혈청형 A, B, D 시험균주로

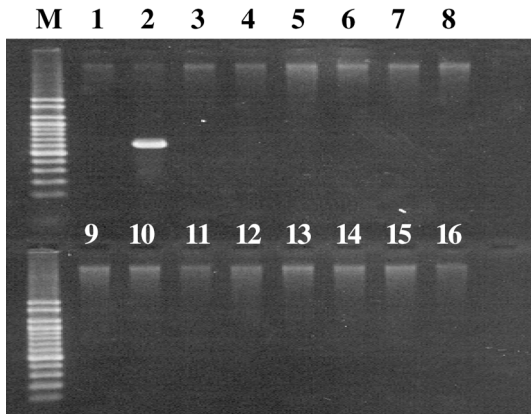


Fig. 4. Specificity of PCR for detection of *Pasteurella multocida* B:2, the agent of haemorrhagic septicemia in bovine. Lane M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea); lane 1 to 16, *P. multocida* somatic serotype 1 to 16. Lane 2 was *P. multocida* somatic serotype 2 with capsular serogroup B.

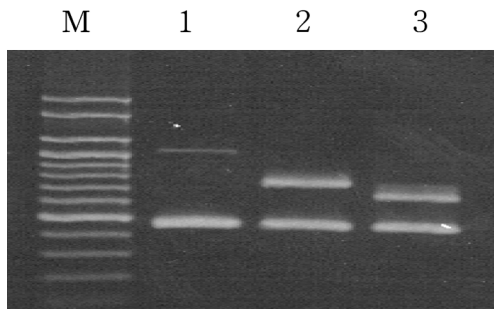


Fig. 5. *Pasteurella multocida* multiplex capsular PCR typing. Lane M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea); lane 1, *P. multocida* capsule type A; lane 2, *P. multocida* capsule type B; lane 3, *P. multocida* capsule type D.

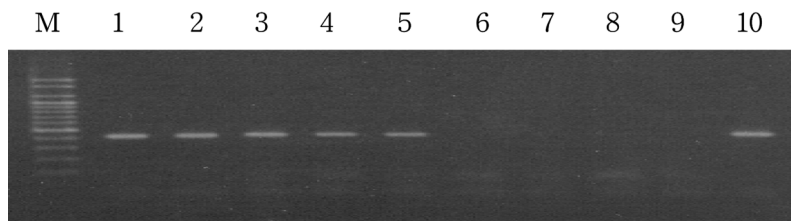


Fig. 6. Sensitivity of PCR assay for detection of *Haemophilus somnus* in mixed cultures. A 10-fold dilution of the *H. somnus* culture (6.7×10^4 to 6.7×10^{-2} CFU/ml) was mixed with *Pasteurella multocida* (3.5×10^8 CFU/ml). Each mixed culture was inoculated on sheep blood agar plates. The bacteria were harvested after 1 day incubation, and then PCR was performed with the extracted DNA. Lane M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea); lane 1 to 7, 10-fold diluted *H. somnus* mixed with *P. multocida*; lane 8, negative control; lane 9, *P. multocida* only; lane 10, *H. somnus* only.

multiplex capsular PCR typing을 실시한 결과(Fig. 5), *P. multocida*에 공통적으로 반응하는 457 bp의 유전자 증폭 산물을 모두 확인할 수 있었고, capsule 혈청형 A, B, D에서 각각 1,046 bp, 760 bp, 648 bp의 특이 유전자 증폭 산물이 확인되어, 본 multiplex PCR기법으로 *P. multocida*의 capsule 혈청형을 신속하고 간편하게 동정할 수 있었다.

소의 호흡기계에 많이 분포하는 *P. multocida*가 *H. somnus*와 혼합된 경우, PCR을 이용하여 *H. somnus* 검출 민감도를 조사하였던 결과, 3.4 CFU/ml의 *H. somnus* 까지 검출이 가능하여(Fig. 6), 비록 고농도의 *P. multocida*에 의해 초대분리배지상에서 육안적으로 *H. somnus* 단독 집락을 확인할 수 없더라도 PCR로 *H. somnus* 존재 여부를 신속히 확인할 수 있었다.

고 찰

소의 호흡기질병은 여러 가지 바이러스나 세균 등이 관여하여 혼합감염되는 경우가 많으므로 원인체별 폐렴 진단을 위해서는 반드시 원인체 동정이 이루어져야 한다. 그러나 소의 호흡기질병에 대한 연구는 미진한 상태이며, 주로 세균성 원인체보다는 IBRV, PI-3V, BRSV 등 바이러스성 원인체에 대한 연구가 많이 이루어졌다. 따라서 본 연구에서는 소의 세균성 호흡기질병의 주요 원인균으로 지목되는 *H. somnus*, *M. bovis*, *P. multocida*에 대한 신속동정을 위해서 PCR기법을 이용하여 민감도 및 특이도 등을 조사하였다.

호흡기질병에 감염된 소는 항생제처치를 받는 경우가 많으며, 이런 경우 *H. somnus* 분리가 어려워 PCR기법이 많이 이용된다. 본 연구에서는 *H. somnus* PCR기법을 이용하여 *Man. haemolytica* 등 8종의 세균에 적용하여 특이도를 조사한 결과, *H. somnus*에서만 특이적인 408 bp의 증폭산물이 확인되어 신속하게 *H. somnus*를 동정할 수 있었다. 한편, 3.5×10^8 CFU/ml의 *P. multocida*

와 6.7×10^4 CFU/ml 부터 6.7×10^2 CFU/ml 까지 10진 단계희석된 *H. somnus*를 혼합한 후 *H. somnus* PCR의 민감도를 조사한 결과, 고농도의 *P. multocida*에 의해 육안적으로는 *H. somnus* 집락을 관찰할 수 없더라도 PCR로 3.4 CFU/ml의 *H. somnus*가 오염된 검체도 확인할 수 있어 민감도가 인정되었다. 자료로 제시되지는 않았지만 소 호흡기질병 가검물이 접종된 초대분리배지를 집균하여 *H. somnus* PCR기법을 적용한 결과, 여러 종류의 세균들이 존재하더라도 PCR로 *H. somnus* 존재 여부를 신속히 확인할 수 있어 균분리 배양법보다 PCR기법이 훨씬 효율적임을 알 수 있었다.

*M. bovis*를 진단하기 위한 혈청학적인 방법이나 균분리 배양법 등은 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라 민감도나 특이도 등의 문제점 때문에 DNA probe나 PCR기법이 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 *M. bovis* PCR에 대한 특이도를 조사한 결과, 8종의 *Mycoplasma* 속균과 7종의 기타 세균에 대해서는 전혀 증폭산물이 형성되지 않고 *M. bovis*에서만 특이적인 증폭산물이 형성되었다. 한편 추출된 *M. bovis* DNA를 10진 단계희석하여 PCR기법의 민감도를 조사하였던 결과, template DNA 100 pg 까지 검출이 가능하여 *M. bovis* 신속동정에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

소의 출혈성 폐혈증은 *P. multocida*에 의해 유발되며 아시아에서는 주로 B:2, 아프리카에서는 E:2 혈청형이 관여하며 신속한 진단은 본 질병을 관리하는데 있어서 가장 중요하다. 아직까지 병인론은 잘 밝혀져 있지 않으나 갑자기 발병하여 급성 폐사하는 특성으로 미루어 endotoxaemia가 의심된다 [14]. Brickell 등은 *P. multocida* B:2의 병원성 유전자를 이용한 PCR을 개발하여 신속하게 출혈성 폐혈증을 진단하였고 [8], Townsend 등은 출혈성 폐혈증 원인체로 지목되는 *P. multocida* B:2, B:5 그리고 B2,5에서 특이적인 유전자 증폭산물을 확인하였다 [25]. 본 연구에서 사용된 PCR기법은 *P. multocida* B:2 혈청형에서 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었으며, 향후 소 출혈성 폐혈증 발생시 신속하게 원인체를 확인할 수 있어 진단시 유용하리라 본다.

P. multocida capsule 혈청형 동정은 많은 어려움과 시간이 소요되며 더욱이 미동정 분리균들도 계속 출현하고 있다. Davies 등은 가끔콜레라 검체에서 분리한 *P. multocida*의 capsule 혈청형을 동정한 결과, A형이 68%로 가장 우세하였고 F형, D형, B형이 각각 14%, 5%, 4%이었으며 미동정 9%를 보고하였다 [10]. 본 연구에서는 *P. multocida*의 capsule 혈청형 동정을 위해 multiplex PCR기법을 이용하여 시험균주에 적용한 결과, 각 capsule 혈청형별로 특이 증폭산물이 형성되어 분리균주가 *P. multocida*인지 아닌지를 그리고 어떠한 capsule 혈청형

에 속하는지를 동시에 확인할 수 있었다.

결 론

소의 세균성 호흡기질병에 관여하는 원인체를 신속히 동정하기 위해서 *H. somnus*, *M. bovis*, *P. multocida* 등에 PCR기법을 적용하고 민감도와 특이도 등을 조사하였다. *H. somnus*와 *M. bovis*에 대한 PCR에서는 각각 408 bp와 361 bp의 특이 증폭산물이 관찰되었고 기타 다른 균종에서는 증폭산물이 나타나지 않아 PCR기법의 특이성이 인정되었다. *M. bovis*의 DNA를 추출하여 단계희석한 후 PCR을 적용한 결과, *M. bovis* PCR기법으로 100 pg의 DNA까지 검출이 가능하였다. *H. somnus*를 *P. multocida*와 혼합하여 초대분리배지에 접종하고 *H. somnus* PCR을 적용한 결과, 3.4 CFU/ml의 *H. somnus*까지 검출이 가능하였다. 한편 소의 출혈성 폐혈증을 유발하는 *P. multocida* B:2에서만 618 bp의 특이 증폭산물을 관찰할 수 있었으며, *P. multocida* multiplex capsular PCR typing에서는 혈청형에 상관없이 457 bp의 공통 증폭산물과 capsule 혈청형 A, B, D에서 각각 1,046 bp, 760 bp, 648 bp의 특이 증폭산물을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 강문일, 한동운, 정용운, 정도영, 이채용, 이정길, 위성환, 조재진. 한우 송아지의 질병발생과 폐사를 조사. 한국가축위생학회지. 2001, 24, 223-241.
2. 김종염, 조성근, 박정문. 소 *Mycoplasma* 폐렴에 관한 연구. 농사시험연구논문집. 1989, 31, 30-35.
3. 박봉균, 유한상, 김덕원, 허영, 안수환, 김용희. 소 전염성 비기관지염 및 파라인푸루엔자-3 불활화예방약의 면역원성에 관한 연구. 농사시험연구논문집. 1988, 30, 14-17.
4. 박봉균, 유한상, 김덕원, 허영, 안수환, 김용희. Bovine Respiratory Syncytial Virus의 감염상태조사. 농사시험연구논문집. 1988, 30, 23-26.
5. 이채용, 이정길, 남선문. 광주·전남지역내 소의 바이러스성 질병에 관한 혈청학적 연구. 대한수의학회지. 1995, 35, 615-623.
6. Angen, Ø., Ahrens, P. and Tegtmeier, C. Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. Vet. Microbiol. 1998, 63, 9-48.
7. Appuhamy, S., Parton, R., Coote, J. G. and Gibbs, H. A. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. J. Clin. Microbiol. 1997, 35, 288-291.
8. Brickell, S. K., Thomas, L. M., Long, K. A., Panaccio, M. and Widders, P. R. Development of a

- PCR test based on a gene region associated with the pathogenicity of *Pasteurella multocida* serotype B:2, the casual agent of haemorrhagic septicemia in Asia. Vet. Microbiol. 1998, **59**, 295-307.
9. **Chávez González, Y. R., Bascuñana, C. R., Bölske, G., Mattsson, J. G., Molina, F. C. and Johansson, K. E.** In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. Vet. Microbiol. 1995, **47**, 183-190.
 10. **Davies, R. L., MacCorquodale, R. and Caffrey, B.** Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. Vet. Microbiol. 2003, **91**, 169-182.
 11. **Freundt, E. A.** Culture media for classic mycoplasmas. In *Methods in Mycoplasmaology*. pp. 127-135, Razin, S. and Tully, J. G. Academic Press, 1983.
 12. **Ghadersohi, A., Coelen, R. J. and Hirst, R. G.** Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. Vet. Microbiol. 1997, **56**, 87-98.
 13. **Heddleston, K. L., Gallagher, J. E. and Rebers, P. A.** Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis. 1972, **16**, 925-936.
 14. **Horadagoda, N. U., Hodgson, J. C., Moon, G. M., Wijewardana, T. G. and Eckersall, P. D.** Role of endotoxin in the pathogenesis of haemorrhagic septicemia in the buffalo. Microbial Pathogenesis. 2001, **30**, 171-178.
 15. **Hu, M. and Buck, C.** Detection of *Mycoplasma* contaminant in viral stocks by a polymerase chain reaction technique. J. Tiss. Cult. Meth. 1993, **15**, 155-160.
 16. **Humphrey, J. D. and Stephens, L. R.** 'Haemophilus somnus': a review. Vet. Bull. 1983, **53**, 987-1004.
 17. **Kirk, I. H. and Lauerman, I. H.** *Mycoplasma* mastitis in dairy cows. Compendium continuing education for the practising veterinarian. 1994, **16**, 541-551.
 18. **Martin, S. W. and Meek, A. H.** The interpretation of antimicrobial susceptibility patterns. Can. J. Comp. Med. 1981, **45**, 199-202.
 19. **Peters, A. R.** Vaccines for respiratory disease in cattle. Vaccine. 1987, **5**, 164.
 20. **Rhoades, K. R. and Rimler, R. B.** Capsular serogroups of *Pasteurella multocida* isolated avian hosts. Avian Dis. 1987, **31**, 895-898.
 21. **Rimler, R. B. and Rhoades, K. R.** Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. J. Clin. Microbiol. 1987, **25**, 615-618.
 22. **Tegtmeier, C., Angen, Ø. and Ahrens, P.** Comparison of bacterial cultivation, PCR, in situ hybridization and immunohistochemistry as tools for diagnosis of *Haemophilus somnus* pneumonia in cattle. Vet. Microbiol. 2000, **76**, 385-394.
 23. **Tegtmeier, C., Uttenthal, Å., Friis, N. F., Jensen, N. E. and Jensen, H. E.** Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. J. Vet. Med. 1999, **46**, 693-700.
 24. **Townsend, K. M., Boyce, J. D., Chung, J. Y., Frost, A. J. and Adler, B.** Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. J. Clin. Microbiol. 2001, **39**, 924-929.
 25. **Townsend, K. M., Frost, A. J., Lee, C. W., Papadimitriou, J. M. and Dawkins, H. J. S.** Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. J. Clin. Microbiol. 1998, **36**, 1096-1100.