

소 림프절에서 *Mycobacterium bovis* DNA의 신속 검출과 *M. bovis*와 *M. tuberculosis* 감별을 위한 real-time PCR 개발

고바라다* · 장영부¹ · 구복경¹ · 조호성² · 배성열 · 나호명 · 박성도 · 김용환 · 문용운
광주광역시보건환경연구원, ¹농림수산검역검사본부 동식물위생연구부 세균질병과, ²전북대학교 수의과대학

(접수 2011. 11. 24; 수정 2011. 12. 12; 게재승인 2011. 12. 16)

Development of real-time PCR for rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes and differentiation of *M. bovis* and *M. tuberculosis*

Ba-Ra-Da Koh*, Young-Boo Jang¹, Bok-Kyung Ku¹, Ho-Seong Cho², Seong-Yeol Bae,
Ho-Myung Na, Seong-Do Park, Yong-Hwan Kim, Yong-Un Mun

Gwangju Metropolitan Health & Environment Research Institute, Gwangju 500-210, Korea

¹Bacteriology Disease Division, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-757, Korea

²College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received 24 November 2011; revised 12 December 2011; accepted 16 December 2011)

Abstract

Mycobacterium bovis, a member of the *M. tuberculosis* complex (MTC), is the causative agent of bovine tuberculosis. Detection of *M. bovis* and *M. tuberculosis* using conventional culture- and biochemical-based assays is time-consuming. Therefore, a simple and sensitive molecular assay for rapid detection would be of great help in specific situations such as faster diagnosis of bovine tuberculosis (bTB) infection in the abattoirs. We developed a novel multiplex real-time PCR assay which was applied directly to biological samples with evidence of bTB and it was allowed to differentiate between *M. bovis* and *M. tuberculosis*. The primers and TaqMan probes were designed to target the IS1081 gene, the multi-copy insertion element in the MTC and the 12.7-kb fragment which presents in *M. tuberculosis*, not in the *M. bovis* genome. The assay was optimized and validated by testing 10 species of mycobacteria including *M. bovis* and *M. tuberculosis*, and 10 other bacterial species such as *Escherichia coli*, and cattle lymph nodes ($n=113$). The tests identified 96.4% (27/28) as *M. bovis* from the MTC-positive bTB samples using conventional PCR for specific insertion elements IS1081. And MTC-negative bTB samples ($n=85$) were tested using conventional PCR and the real-time PCR. When comparative analyses were conducted on all bovine samples, using conventional PCR as the gold standard, the relative accuracy of real-time PCR was 99.1%, the relative specificity was 100%, and the agreement quotient (kappa) was 0.976. The detection limits of the real-time PCR assays for *M. bovis* and *M. tuberculosis* genomic DNA were 10 fg and 0.1 pg per PCR reaction, respectively. Consequently, this multiplex real-time PCR assay is a useful diagnostic tool for the identification of MTC and differentiation of *M. bovis* and *M. tuberculosis*, as well as the epidemiologic surveillance of animals slaughtered in abattoir.

Key words : Real-time PCR, *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis* complex, IS1081, 12.7-kb fragment

*Corresponding author: Ba-Ra-Da Koh, Tel. +82-62-613-7653, Fax. +82-62-613-7649, E-mail. barada@korea.kr

서 론

소에서 결핵은 *Mycobacterium (M.) bovis* 감염에 의한 만성 소모성 질병이며 인수공통전염병으로써 축산업에서 경제적 손실이 크다는 점에서 중요한 질병으로 취급되고 있다(Thoen 등 2006). *M. bovis*의 성장 속도는 매우 느리지만, 일단 감염되면 면역세포 내에서 오랫동안 생존할 수 있기 때문에 감염된 개체를 찾아내기 어려워 박멸하기 어려운 세균 중 하나이다(Thone과 Chiodini, 1993). *M. tuberculosis*를 비롯한 많은 결핵균은 매우 느리게 성장하기 때문에 고체배지에서 3~8주가 소요되고 많은 노력이 필요하고 모호한 결과가 도출되기도 한다(Soini와 Musser, 2001). 배양된 균의 생화학 동정을 위해 2~3주가 더 소요될 뿐만 아니라, 배양 민감도가 100%가 아니며, 위음성의 결과도 나타나는 등의 많은 문제점을 가지고 있다(Soini와 Musser, 2001). *M. tuberculosis* complex (MTC) 검출을 위해 BACTEC MGIT 960 시스템과 같은 액체배지를 사용하면 평균 15.3일로 Löwenstein-Jensen과 같은 고체배지에서 평균 32.6일보다 약 17.3일 정도 빠르게 검출되지만, 시료로부터 결핵균 검출물을 향상하기 위해서는 역시 고체배지를 함께 사용하여야 한다(Sorlozano 등, 2009).

최근에는 임상 시료로부터 *M. bovis* DNA를 직접 검출할 수 있는 유전자 검사법의 도입으로 진단시간과 노력이 절감되었다. PCR에 기초한 염기서열 분석법은 결핵균 동정에 가장 신뢰할 만한 “gold standard”이다(Soini와 Musser, 2001). *M. bovis*의 유전체는 *M. tuberculosis*와 99.95%가 일치한다(Garnier 등, 2003; Soini와 Musser, 2001). *M. bovis*와 *M. tuberculosis* 유전체의 염기서열 분석으로 *M. tuberculosis*에 존재하는 12.7-kb 절편이 *M. bovis*에서는 결여된 것으로 규명되었고(Zumárraga 등, 1999), 이 부위는 여러 연구자에 의해서 이 두 가지 결핵균을 감별하는데 유용한 표지로 사용되었다(고 등, 2007; Bakshi 등, 2005; Chen 등, 2010).

M. bovis 확인을 위해 세균 종간에 특이성을 나타내는 internal transcribed spacer (ITS), MTC에 특이적인 삽입서열(insertion sequence, IS)인 IS6110과 IS1081 부위, 여러 개 RD (region of difference) 중 일부 RD의 결손 여부, *oxyR* 유전자, *pncA* 유전자, *gyrB* 유전자 및 *narGHJI* 유전자 등을 이용한 multiplex PCR, PCR restriction analysis, allele-specific PCR, real-time PCR, oligonucleotide array 및 microsphere-based multiplex as-

say 등 여러 가지 검사법이 보고 되었다(Bakshi 등, 2005; Barouni 등, 2004; Chen 등, 2010; Ereqat 등, 2010; Espinosa de los Monteros 등, 1998; Niemann 등, 2000a; Niemann 등, 2000b; Park 등, 2005; Parra 등, 2008; Pinsky와 Banaei, 2008).

Park 등(2005)이 보고한 ITS의 염기서열을 이용한 oligonucleotide array 기법으로 MTC 등 20주의 결핵균을 동시에 저렴한 비용으로 감별하였지만, 염기서열 검증, 두 시료 사이에서 상대적인 유전자 발현의 측정, 부실한 접착력에 의한 칩의 오류, 노동 집약적이며 고도의 숙련된 실험자가 필요하다는 단점이 있다. Chen 등(2010)은 *M. tuberculosis*에 특이적인 12.7-kb 절편 유전자의 특정 부위와 *M. bovis* 유전체에서 연속된 229-bp의 고유한 염기서열을 이용하여 microsphere-based multiplex assay로 *M. bovis*와 감별하였다. 이 방법은 상보적인 특정 oligonucleotide와 혼성화 과정을 거쳐야 하는 번거로운 단점이 있다. 일반적인 PCR 기법은 결핵균 검출을 위해 PCR 반응에 의한 증폭산물을 전기영동을 통해 확인하는 작업을 요구하는 등 시간이 오래 걸릴 뿐만 아니라, 비특이적인 PCR 반응 산물의 생성으로 우결핵 진단에서 정확한 양성 판정에 문제가 있고 추가적인 검증실험에 시간이 소요되는 단점이 있다.

Real-time PCR은 형광색소의 양을 실시간 별로 측정하여 유전자를 검사하는 방법으로 두 가지로 분류되는데 TaqMan 또는 FRET 화합물질이 PCR 산물에 상보적으로 결합할 수 있는 probe와 SYBR[®] green처럼 염기서열과 상관없이 핵산의 특이적으로 결합하는 DNA intercalating dye로 구분된다(Klein, 2002). SYBR[®] green을 이용하는 경우 핵산의 염기서열과 상관없이 이중나선과 반응해서 형광을 발산하기 때문에 부정확할 수도 있으며, 여러 유전자를 동시에 검출할 수 없으며, PCR 산물의 크기에 따라 형광의 세기가 달라지는 단점이 있다(Klein, 2002). 그러나 형광 probe에 기초한 5'-3' exonuclease 기법은 비특이적으로 형광을 발산하지 않아 특이성과 민감성이 일반 PCR 검사보다 크게 향상되었으며, 검사에 걸리는 시간을 절약해 주는 장점이 있다(Heid 등, 1996).

따라서, 이번 연구는 소의 림프절 시료에서 *M. bovis*를 신속하고 정확하게 검출하고 동정하기 위해서 MTC의 특이적인 IS1081 유전자와 *M. tuberculosis*에만 존재하고 *M. bovis*에서는 결여된 12.7-kb 절편부위의 유전자로 TaqMan probe를 이용한 multiplex real-time PCR 기법을 개발하고자 실시되었다.

재료 및 방법

공시 균주(Bacterial strains) 및 시료

이번 연구에 이용한 10종의 결핵균은 *M. bovis* AN5, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. kansasii*이며, 이들 균주는 농림수산검역검사본부에서 보유하고 있는 DNA를 사용하였다. 다른 병원성 세균 10종은 *E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus (Sta.) aureus*, *Clostridium (Cl.) perfringens*, *Listeria (L.) monocytogenes*, *L. innocua*, *Campylobacter (Cam.) coli*, *Cam. jejuni*, *Enterobacter (Ent.) faecium*, *Ent. faecalis*이며, 이들 균주는 농림수산검역검사본부로부터 축산물 정도관리 시험으로 배부된 시료에서 분리하였다. 10종의 결핵균에 대한 특이성 검사는 농림수산검역검사본부에서 수행하였다.

그리고 2010년부터 2011년까지 광주지역 도축장에서 육아종성 결핵병변이 발견되어 소 결핵 양성으로 진단된 소 림프절 28건(Table 1)과 육안적으로 정상으로 확인된 림프절 85건을 실험에 이용하였다.

Genomic DNA 추출

E. coli 등 병원성 세균 10종은 균주별 배양액을 끓는 물에 15~20분 처리한 후 원심분리하여 상층액을 사용하였다.

소의 림프절에서 genomic DNA 추출을 위한 시료 전 처리는 고 등(2007)의 방법을 일부 변형하여 사용

하였다. 림프절 조직 1~3 g 정도를 가위로 세절하여 유발에서 분쇄한 후 멸균 생리식염수 5 ml를 첨가하여 균질화하였다. 균질액에 4% NaOH 용액 5 ml를 첨가하여 혼합하고 상온에서 15분간 정치하여 림프조직을 액화시킨 후 2% HCl 6.8 ml를 첨가하여 중화시켰다. 중화된 균질액 50 ml conical tube에 분주한 후 3,000 ×g에서 15분 동안 원심분리를 한 후 상층액은 버리고 침전물에 멸균된 PBS (pH 7.2) 2 ml를 첨가하여 재균질화시킨 후 300 µl를 eppendorf (EP) tube에 채취하여 DNA 추출 시료에 사용하였다.

전 처리된 시료로부터 genomic DNA 추출은 Sambrook와 Russell (2001)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 실시하였다. 전 처리된 시료 300 µl에, 0.5 ml의 extraction buffer [1 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS]와 proteinase K (10 mg/ml) 10 µl를 첨가하여 65°C에서 30분 간 반응시켰다. 이 혼탁액에 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1, v/v) 용액 0.5 ml를 넣고 혼합한 후 실온에서 14,500 ×g로 3분간 원심 분리하여 단백질을 침전시켰다. 상층액을 새로운 1.5 ml EP tube로 옮겨서 isopropanol 600 µl와 혼합하여 실온에서 14,500 ×g로 3분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA가 포함된 EP tube에 70% ethanol 700 µl로 2회 세척 후 건조하여 멸균된 3차 증류수를 100~200 µl 가하여 실험에 사용하였다.

추출된 DNA는 NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)를 이용하여 260 : 280 nm에서 정량하여 실험 전까지 -20°C에 보관하였다.

Table 1. Lymph nodes of Korean native cattle with tuberculosis lesions found at abattoir in Gwangju province

Case	Sex	Months	Lesion	Farm region	Years detected	Case	Sex	Months	Lesion	Farm region	Years detected
1	F	89	Liquefaction	Damnyang	2010	15	F	59	Yellowish-pus	Jangseong	2011
2	F	39	Yellowish-pus	Damnyang	2010	16	F	52	Yellowish-pus	Jangseong	2011
3	F	41	Enlargement	Damnyang	2011	17	F	25	Calcification	Naju	2010
4	F	49	Liquefaction	Damnyang	2011	18	F	84	Yellowish-pus	Naju	2010
5	F	50	Calcification	Damnyang	2011	19	F	88	Yellowish-pus	Naju	2011
6	F	82	Calcification	Damnyang	2011	20	F	77	Yellowish-pus	Naju	2011
7	F	37	Liquefaction	Gochang	2010	21	F	72	Liquefaction	Namwon	2010
8	F	55	Calcification	Gochang	2011	22	F	26	Calcification	Namwon	2010
9	M	38	Yellowish-pus	Gokseong	2011	23	F	37	Yellowish-pus	Namwon	2010
10	F	76	Calcification	Gwangju	2011	24	F	49	Yellowish-pus	Sunchang	2010
11	F	25	Calcification	Hampyeong	2010	25	M	36	Calcification	Sunchang	2011
12	F	44	Calcification	Jangseong	2010	26	F	43	Calcification	Yeongam	2011
13	F	61	Calcification	Jangseong	2010	27	F	39	Calcification	Yeonggwang	2010
14	F	27	Yellowish-pus	Jangseong	2011	28	F	68	Yellowish-pus	Yeonggwang	2011

Conventional PCR에 의한 MTC 검출

소 림프절에서 *M. bovis* 검출을 위해 Taylor 등 (2007)의 primer를, PCR 증폭을 위해서는 Maxime PCR PreMix Kit (*i-StarTaq*, iNtRON biotechnology, Korea)을 각각 사용하였다. PCR 증폭산물은 100 bp DNA ladder (Invitrogen, USA)와 함께 SYBR[®] safe DNA gel stain (10,000×, Invitrogen, USA)를 첨가한 2% agarose gel에 침적하여 100 V에서 30분 동안 전기영동하여 135 bp의 증폭산물을 확인하였다.

Real-time PCR을 위한 primer와 probe 디자인

IS1081을 이용한 MTC 검출을 위해서 GenBank database에서 제공된 *M. bovis* IS1081 (accession no. X61270) 염기서열을 검색하여 oligonucleotide를 직접 설계하였다(Table 2).

*M. bovis*와 *M. tuberculosis* 감별을 위한 oligonucleotide 디자인은 Zumárraga 등(1999)이 보고한 *M. bovis*의 고유한 연속된 229-bp의 염기서열을 분석하여 *M. bovis* AF2122/97 전체 유전자서열(accession no. BX248339)과 *M. tuberculosis*에 특이적인 12.7-kb 절편 부위(accession no. BX842576)를 분석하여 각각의 특이적인 primer와 TaqMan probe를 직접 설계하였고, Bioneer (Korea)에 의뢰하여 합성하였다. *M. bovis*와 *M. tuberculosis* 감별을 위해 사용된 정방향 primer와 TaqMan probe는 공통으로 사용되도록 디자인하였고, 역방향 primer는 각각 다르게 설계하였다(Table 2).

IS1081을 이용한 MTC 검출과 *M. bovis*의 고유한 연속된 229-bp의 염기서열을 동시에 검출하기 위해서 real-time PCR에 사용된 TaqMan probe의 5' 말단에 각각 FAM (6-carboxyfluorescein)과 JOE (6-carboxy-4',5'-

dichloro-2',7'-dimethoxy-fluorescein)를 표지하였고, 두 개 probe의 3' 말단에는 모두 BHQ1 (black hole quencher)를 표지하였다.

Real-time PCR 반응 조건

TaqMan PCR을 위한 최적의 primer와 probe 농도를 찾기 위해서 정방향과 역방향 primer는 200, 300, 400 nM과 TaqMan probe는 250, 375, 500 nM을 조합하여 *M. bovis*의 genomic DNA로 실험하였다. 정방향과 역방향 primer의 최적 농도는 400 nM이었고, TaqMan probe의 최적 농도는 500 nM이었다. Real-time PCR 반응액은 Premix Ex Taq (2×, Perfect Real time, Takara, Japan)과 ROX (50×, Takara, Japan), 주형 DNA 2 μl를 첨가하여 총 반응액은 20 μl로 하였다.

Multiplex real-time PCR 반응액은 상기와 같은 반응액에 MTC 검출을 위한 primer와 probe를 각각 *M. bovis* 또는 *M. tuberculosis* 검출을 위한 real-time PCR 반응액에 추가로 혼합하고 총 반응액은 20 μl가 되도록 증류수로 조절하였다.

유전자 증폭기는 7500 FAST Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 95°C에서 1분간 1회 실시한 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분 주기를 45회 반복하였다. 증폭결과는 7500 software (Ver. 2.0.5, Applied Biosystems, USA) 프로그램을 이용해 확인하였다.

*M. bovis*와 *M. tuberculosis*에 대한 real-time PCR의 검출한계 검사를 위해서 DNA를 10 ng/μl로 정량한 후 10배 계단 희석하여 실험하였다.

통계 분석

소 림프절 시료를 대상으로 한 conventional PCR과

Table 2. Oligonucleotide primers and probes for the real-time PCR

Target species	Oligonucleotide	Sequence (5'→3')	Target gene/sequences	Product size (bp)
MTC	IS1081_650F	CGGACTGGCTGCTGCAGC	IS1081	166
	IS1081_815R	AGCTCTTTGGCCATGATCGA		
	IS1081_712P	FAM-TGCTACCTGCTGGGAGTATCCACTCGC-BHQ1		
<i>M. bovis</i>	THB_312851F	TGTGCGAGCTGAGCGATGTC	The 229-bp contiguous sequences	187
	Tbovis_825R	AAATGGCTATTGACCAGCTAAGATAT		
	THB_312940P	JOE-CCGTAGTCGTGCAGAAGCGCAACAC-BHQ1		
<i>M. tuberculosis</i>	THB_312851F	TGTGCGAGCTGAGCGATGTC	The 12.7-kb fragment	153
	TH_313003R	GCGCCCTATTGATCTCTGCAA		
	THB_312940P	JOE-CCGTAGTCGTGCAGAAGCGCAACAC-BHQ1		

real-time PCR의 민감도와 특이도를 비교하였다. 이들 두 검사 사이의 일치도는 Cohen's Kappa 분석을 실시하였다(Fleiss와 Cohen, 1973).

Table 3. Results on *Mycobacterium* strains and other species tested by the real-time PCR

Strain	Target gene/sequences		
	IS1081	The 229-bp contiguous sequences	The 12.7-kb fragment
<i>M. bovis</i>	+*	+	-
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	+
<i>M. avium</i>	-†	-	-
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-
<i>M. fortuitum</i>	-	-	-
<i>M. phlei</i>	-	-	-
<i>M. peregrinum</i>	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	-	-	-
<i>M. smegmatis</i>	-	-	-
<i>M. kansasii</i>	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>Samonella spp.</i>	-	-	-
<i>Sta. aureus</i>	-	-	-
<i>Cl. perfringnes</i>	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-
<i>Cam. coli</i>	-	-	-
<i>Cam. jejuni</i>	-	-	-
<i>Ent. faecium</i>	-	-	-
<i>Ent. faecalis</i>	-	-	-

*Positive result, †Negative result.

결 과

Real-time PCR

결핵균 10주와 *E. coli* 등 병원성 세균 10주에서 추출된 DNA를 대상으로 특이성을 실험하였다. IS1081을 이용한 real-time PCR에서는 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*에서만 검출되었고, 다른 8주의 결핵균과 병원성 세균(10주)에서는 비특이 반응이 관찰되지 않았다(Table 3).

*M. bovis*의 고유한 연속된 229-bp의 염기서열을 이용한 real-time PCR에서는 *M. bovis*만 검출되었고, *M. tuberculosis*를 비롯한 기타의 결핵균과 다른 병원성 세균에서는 음성이었다. *M. tuberculosis*에 특이적인 12.7-kb 절편부위를 이용한 real-time PCR 실험에서는 *M. tuberculosis*만 검출되었고, *M. bovis*를 포함한 다른 결핵균과 병원성 세균에서는 교차반응이 관찰되지 않았다(Table 3).

MTC 검출을 위한 primer (IS1081_650F와 IS1081_815R)와 TaqMan probe (IS1081_712P) 그리고 *M. bovis* 검출을 위한 primer (THB_31851F와 Tbovis_825R)와 TaqMan probe (THB-312940P)을 사용하여 multiplex real-time PCR을 하였다. 그 결과 *M. bovis*의 고유한 연속된 229-bp의 염기서열과 IS1081 유전자가 동시에 검출되었다(Fig. 1A). *M. tuberculosis*에 대해서도 multiplex real-time PCR를 적용한 바 *M. tuberculosis*에 특이적인 12.7-kb 절편 부위와 IS1081 유전자 증폭곡선이 동시에 확인되었다(Fig. 1B).

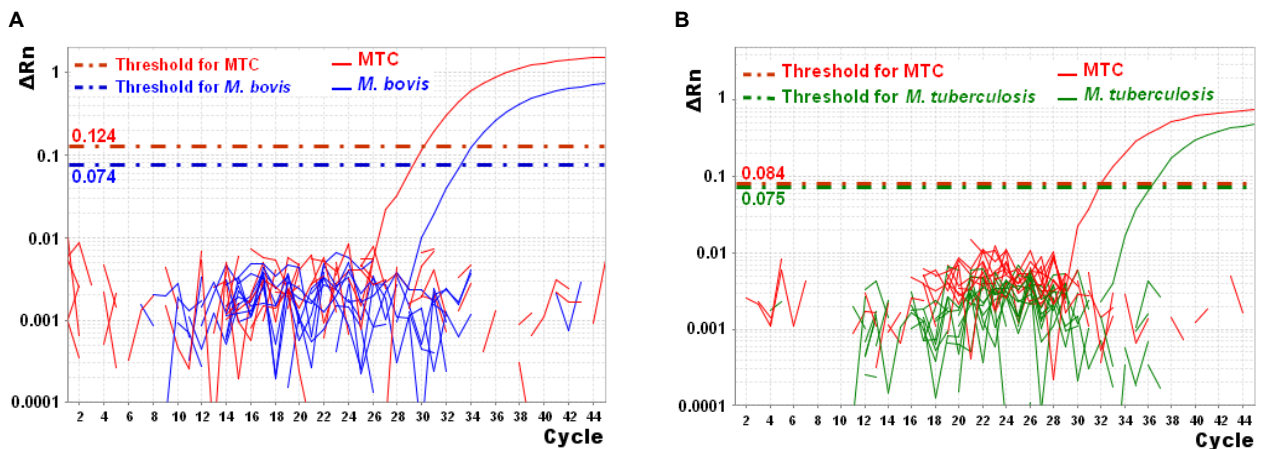


Fig. 1. Amplification curves of multiplex TaqMan real-time assays for detection MTC using IS1081 gene and 12.7-kb insertion/deletion fragment primers and TaqMan probe. (A) *M. bovis* DNA was amplified simultaneously by the MTC and *M. bovis*-specific primers (THB_312851F and Tbovis_825R) and TaqMan probe. (B) *M. tuberculosis* DNA was amplified together in one tube by the MTC and *M. tuberculosis*-specific primers (THB_312851F and TH_313003R) and TaqMan probe.

*M. bovis*와 *M. tuberculosis*에 대한 real-time PCR 검출한계

*M. bovis*와 *M. tuberculosis*의 DNA를 10 ng/μl부터 10배 계단 희석하여 검출한계를 검사하였다. MTC 검출용 primer 조합과 *M. bovis*의 고유한 연속된 229-bp의 염기서열을 이용한 단일 real-time PCR과 multiplex real-time PCR 방법 모두에서 두 가지 유전자를 모두 10 fg/μl까지 검출이 가능하였다(Fig. 2A, 2B). *M. tuberculosis*에 대한 IS1081 유전자와 12.7-kb fragment 유전자의 검출한계는 동일하게 0.1 pg/μl까지 검출되었다(Fig. 3A, 2B).

M. bovis 양성 시료와 음성 시료를 구분하기 위한

IS1081 유전자와 *M. bovis*의 고유한 연속된 229-bp의 염기서열에 대한 cut-off 값은 특이성, 민감도 및 검출한계를 고려하여 37.0 cycle 미만으로 설정하였고, *M. tuberculosis*에 대한 cut-off 값은 40.0 cycle 미만으로 설정하였다.

소 림프절에 대한 conventional PCR과 real-time PCR 비교

결핵 양성인 소 림프절 28개 시료와 육안적으로 정상으로 확인된 85개 시료에 대한 *M. bovis* 검출을 위해 conventional PCR과 real-time PCR을 적용하였다. Conventional PCR 방법으로 육아종성 결핵 병변을 보

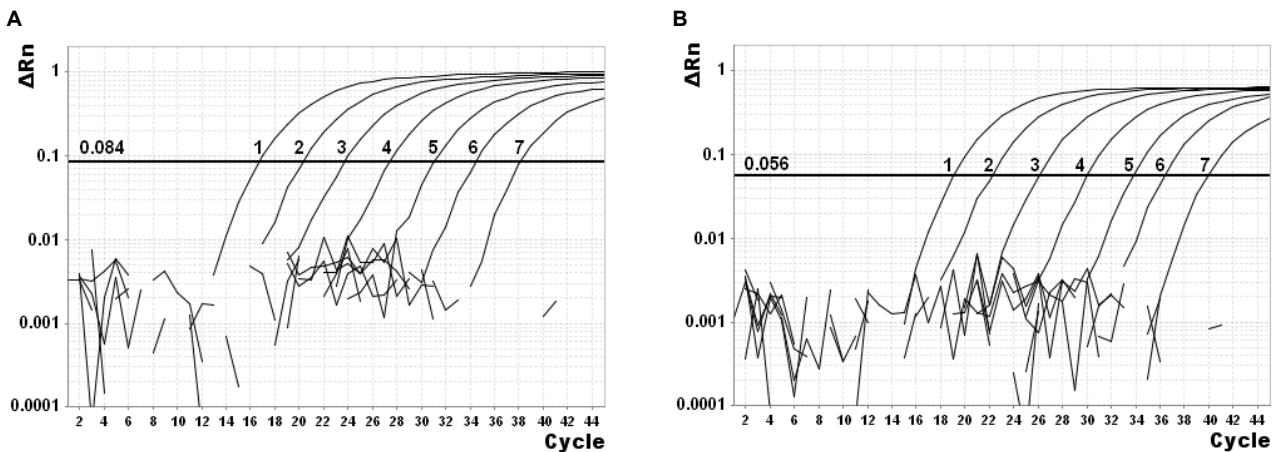


Fig. 2. Amplification curves of TaqMan real-time PCR to detect *M. bovis*. (A) *M. bovis* using IS1081 primers and TaqMan probe. (B) *M. bovis* using the 229-bp contiguous sequences primers and TaqMan probe. A minimum of 10 fg/ul of DNA could be detected after 45 cycles. Lanes 1) 10 ng; 2) 1 ng; 3) 0.1 ng; 4) 0.01 ng; 5) 1 pg; 6) 0.1 pg; 7) 10 fg.

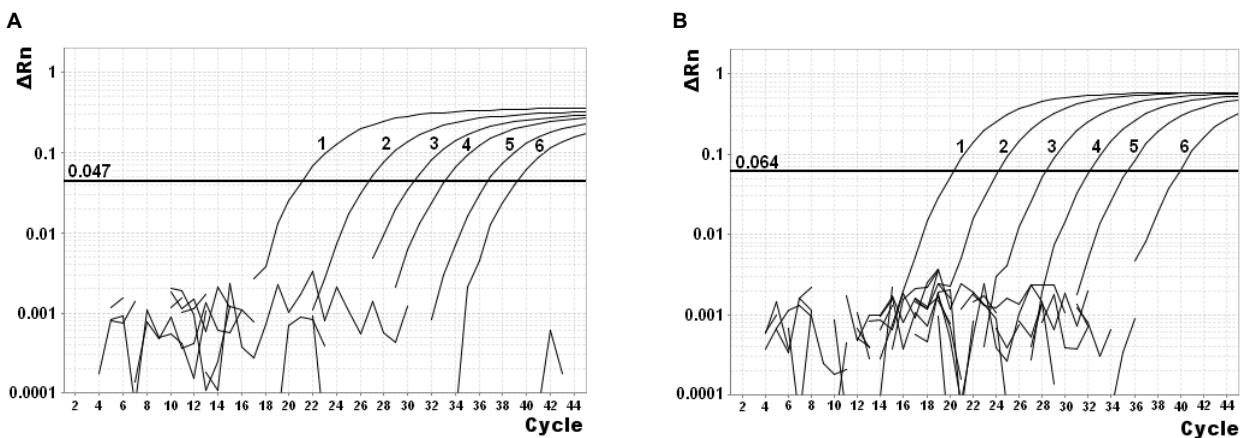


Fig. 3. Amplification curves of TaqMan real-time PCR to detect *M. tuberculosis*. (A) *M. tuberculosis* using IS1081 primers and TaqMan probe. (B) *M. tuberculosis* using 12.7-kb fragment primers and TaqMan probe. A minimum of 0.1 pg/ul of DNA could be detected after 45 cycles. Lanes 1) 10 ng; 2) 1 ng; 3) 0.1 ng; 4) 0.01 ng; 5) 1 pg; 6) 0.1 pg.

Table 4. Comparison of the sensitivity and specificity of conventional-PCR and real-time PCR for the detection of *M. bovis* in cattle lymph nodes

		No. of real-time PCR lymph node samples		Kappa index
		Positive	Negative	
Conventional PCR	Positive	27	1	0.976
	Negative	0	85	

인 28개 시료 모두에서 IS1081 유전자가 검출되었으며, 육안적으로 정상인 시료 85건에서는 IS1081 유전자가 검출되지 않았다.

Conventional PCR 방법에서 양성인 시료 28개 중 real-time PCR 방법으로 cut-off 값을 37.0 cycle 미만으로 적용하였을 때, 27개 시료에서 양성으로 확인되어 민감도는 96.4%이었으며, 육안적으로 정상으로 확인된 85개 시료에 대한 real-time PCR 적용 결과 모두 음성으로 확인되었으며 특이도는 100%이었다. 그리고 conventional PCR 방법으로 확인된 양성고 음성시료에 대한 real-time PCR의 정확도는 99.1%이었다. Conventional PCR과 real-time PCR의 검사 일치도 (kappa)는 0.976로 우수함을 확인할 수 있었다(Table 4).

고 찰

이번 연구의 목적은 TaqMan probe을 이용한 multiplex real-time PCR 기법으로 동물 임상 시료에 존재하는 *M. bovis*를 신속하고 정확하게 검출하고 동정하는 것이다. 이와 관련하여 세 가지 PCR 방법을 설계하고 최적화하였다. 이번 연구에서 MTC의 고유한 IS1081과 *M. bovis*의 고유한 연속된 229-bp의 염기서열을 동시에 검출하는 방법을 제시하였을 뿐만 아니라 사람에서 결핵을 일으키는 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*를 감별하는 방법까지 개발하였다.

결핵균 분리를 위한 여러 가지 액체배양법이 최근에 소개되어 배양시간이 고체배지를 사용했을 때보다 단축되기는 했지만 자라는 속도가 매우 느려 진단하는데 여전히 많은 노력과 시간이 필요하고 검출률 향상을 위해서는 고체배지를 여전히 함께 사용하여 한다(Sorlozano 등, 2009). 유전자 검사법의 도입으로 임상 시료로부터 *M. bovis*를 직접 검출할 수 있게 되어 진단시간과 노력이 절감되었다. PCR에 기초한

염기서열 분석법이 결핵균 동정에 가장 신뢰할 만한 “gold standard”이지만 *M. bovis*의 유전체는 *M. tuberculosis*와 99.95%가 일치한다(Garnier 등, 2003; Soini와 Musser, 2001). 하지만 이들 두 가지 유전체를 비교하면 약 2,400개가 넘는 single-nucleotide polymorphism (SNP)이 있으며, 1 bp 이상 결손되거나 삽입된 부위는 177개 이상이다(Garnier 등, 2003). *M. tuberculosis*에서 특이하게 결손 부분을 TbD1이라 명명된 염기서열 부위는 *M. bovis*에서 한 locus에서만 존재하고, RD4, RD5, RD7~RD10, RD12, RD13 그리고 N-RD25 부분은 *M. bovis*에서 결손되었다(Brosch 등, 2002; Mostowy 등, 2005). 이런 유전자 부위는 여러 연구자에 의해서 결핵균 동정에 이용되었다(Barouni 등, 2004; Niemann 등, 2000a; Niemann 등, 2000b; Pinsky와 Banaei, 2008).

염기서열 분석에 가장 일반적으로 사용되는 대상은 모든 세균에 존재하는 16S rRNA 유전자이지만 많은 진단 실험실에서 MTC를 감별할 수 있는 유용한 유전자로써 평가를 받지 못했다(Soini와 Musser, 2001). 반면에, IS6110과 IS1081은 MTC에서만 발견되는 삽입 유전자이다(Collins 등, 1993; Collins와 Stephens, 1991; Thierry 등, 1990; van Soolingen 등, 1992). 이들 삽입 유전자는 신속한 결핵 진단을 위한 PCR 기법에 사용되어 MTC 검출 시간을 단축할 수는 있었지만, 두 균종을 감별하지 못했다(Chen 등, 2010; Pounder 등, 2006; Savelkoul 등, 2006; Yeboah-Manu 등, 2001). Thacker 등(2011)은 IS6110을 이용한 real-time PCR로 *M. bovis*를 검출하고자 하였지만 *M. wolinskyi*에서 교차반응이 검출되었다. 이번 연구에서 IS1081을 이용한 real-time PCR로 *M. bovis*를 검출하였고, 나머지 다른 결핵균에서는 교차반응은 관찰되지 않았다.

*M. bovis*와 *M. tuberculosis*에 존재하는 SNP를 이용한 감별 방법으로 MTC에 존재하는 결핵균 치료제인 pyrazinamide 감수성과 관련된 유전자인 *pncA* 유전자, oxidative stress regulator에 관여하는 *oxyR* 유전자 그리고 DNA gyrase의 subunit B 단백질을 암호화하는 *gyrB* 유전자의 점돌연변이를 검출하기 위해서 allele-specific PCR (Espinosa de los Monteros 등, 1998)과 PCR restriction analysis (Barouni 등, 2004; Niemann 등, 2000a; Niemann 등, 2000b) 기법을 사용하였다. 특히, Niemann 등(2000a)은 MTC에 해당되는 여러 종을 정확하게 감별하는 방법을 제시하였지만 두 가지 균종이 혼합되어 있으면 변별력이 감소하고 최종진단

에 제한효소 처리 등의 다소 시간이 소요되는 단점이 있었다.

Real-time PCR 장비로 Ereqat 등(2010)은 *oxyR* 유전자와 nitrate reductase에 관여하는 *narGHJI* 유전자에 존재하는 SNP를 검출하기 위해 high-resolution melt curve 분석법을 사용하였고, Pinsky와 Banaei(2008)는 RD1, RD4 그리고 RD9 존재 유무를 확인할 수 있는 melting-curve 기법을 이용한 real-time PCR 방법으로 *M. bovis*, *M. tuberculosis*, 그리고 다른 MTC를 감별하였다. 이들 방법은 임상시료에 직접 시료에서 *M. bovis* 검출에 적용하기에는 SYBR[®] green의 특성상 염기서열과 상관없이 이중나선과 반응해서 형광을 발산하는 단점 때문에 부정확한 결과를 얻을 수 있는 문제점이 있다. 이번 연구에서 개발된 real-time PCR 기법은 이런 단점을 극복하기는 했지만 모든 MTC에 대해서 감별 실험이 적용되지 않아 향후 추가적인 연구가 필요하다.

한편, Park 등(2005)이 보고한 세균종 사이에 특이성을 나타내는 ITS 염기서열을 이용한 oligonucleotide array 기법으로 MTC 등 20주의 결핵균을 저렴한 비용으로 동시에 동정하였지만 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*를 감별할 수는 없었다. Parra 등(2008)은 MTC 검출을 위해서 16S-23S rDNA ITS 부분으로 TaqMan probe를 디자인하여 real-time PCR 방법으로 *M. avium* complex와 감별할 수 있었고, 임상시료에도 직접 적용하여 신속하고 정확하게 진단하였을 뿐만 아니라 수의학적으로 문제가 되고 있는 다양한 결핵균을 검출하는데 유용한 진단법으로 제시하였다. 그리고 최근에 소개된 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 방법은 *Bst* polymerase를 이용하여 기존의 real-time PCR 방법보다 더욱 짧은 시간 안에 MTC를 검출할 수 있는 장점이 있지만, real-time에 사용되는 primer보다 더 많은 oligonucleotide가 필요하고, 눈으로 형광을 판별하거나 1회 실험으로 처리할 수 있는 시료의 개수가 제한되어 있다는 단점이 있다(Zhu 등, 2009).

M. bovis 유전자가 *M. tuberculosis*에 존재하는 12.7-kb 절편이 결여된 부위는 RD 7 부분으로 여러 연구자에 의해서 이들 두 가지 결핵균을 감별하는데 multiplex PCR, microsphere-based multiplex assay 등에 유용한 지표로 사용하였다(고 등, 2007; Bakshi 등, 2005; Chen 등, 2010; Zumárraga 등, 1999). *M. bovis*에서 결손된 이 부위는 숙주 세포로 침입하는데 관련된 부위 중 *mce-3* operon 대부분에 해당하기 때문에 병

원성과 숙주 특이성에 차이를 나타낼 것으로 추측하였다(Zumárraga 등, 1999). 이번 연구에서도 이 유전자 부위를 이용하여 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*를 감별할 수 있는 real-time PCR 기법을 제시하였다. 이들 두 가지 결핵균을 감별하기 위해서 정방향 primer와 TaqMan probe는 공통으로 사용하였고 역방향 primer만 각각의 균주에 특이적인 부위를 선택하여 실험하였으며, 교차반응은 관찰되지 않았다.

최근, Chen 등(2010)이 보고한 xMAP (flexible multi-analyte profiling) 기술은 Miller와 Tang (2009)이 기본 개념을 제시한 방법으로써 5.6 mm의 미세한 microsphere를 사용하여 biotinylated primer로 표적 유전자를 PCR 기기로 증폭한 다음 microsphere의 표면에 고정된 상보적인 특정 oligonucleotide (capture probe) 사이에서 혼성화를 수행한 후 마지막으로 streptavidin-phycoerythrin (SAPE) reporter를 추가하여 532nm flow cytometry 기기를 사용하여 biotin-SAPE 반응으로부터 평균 형광 강도 신호를 측정함으로써 특정 혼성화 구성물을 나타내는 microsphere의 종류의 색상을 식별하는 방법이다. 이 기술은 몇몇 유전자를 많은 시료에 대해 동시에 적용하여 검출하고 감별할 수 있는 장점이 있지만, 혼성화 과정을 거쳐야 하는 번거로운 단점이 있다.

이번 연구에서 *M. bovis* 최소 검출한계는 10 fg 즉, 2 genome에 상당하는 농도이다. Wards 등(1995)은 조직에서 IS10181을 증폭하여 *M. bovis*를 1 fg 또는 0.2 genome 수준까지 검출할 수 있다고 보고하였다. Taylor 등(2007)은 MTC에 6 copy 존재하는 IS1081을 이용하여 소 결핵에 걸린 림프절 병변으로부터 *M. bovis*를 신속하게 검출할 수 있는 PCR 방법 제시하였으며, 최소 검출한계는 1 genome 이하였고, 같은 실험에서 RD4 PCR의 최소 검출한계는 5 genome copy라고 보고하였다. Shah 등(2002)은 *pncA* 유전자를 이용한 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*를 감별하기 위한 multiplex PCR 방법으로 DNA를 약 4,000 genome에 상응하는 20 pg까지 검출하였다. Kurabachew 등(2004)은 23S rDNA와 *oxyR* 유전자부위의 SNP로 MTC 감별을 위한 multiplex PCR 방법으로 1 pg까지 검출하였고 이론적으로 약 200 균체에 해당한다고 보고하였다.

Conventional PCR 방법에서 양성인 소 림프절 28개 과 음성인 소 림프절 85개에 대한 real-time PCR의 검사 일치도(kappa)는 0.976로 우수하였으며(Table 4), cut-off 값을 37.0 cycle 미만으로 적용하였을 때 민감도는 96.4%이었고, 특이도는 100%이었다. 하지만

cut-off 값을 38 cycle 미만으로 적용하였을 때 민감도는 동일하였지만, 특이도와 검사 일치도가 각각 96.5%와 0.907로 저하되었다. 그리고 cut-off 값을 36.0 cycle 미만으로 적용하면 민감도와 검사 일치도가 각각 85.7%와 0.90으로 더욱 하락하여 최적의 cut-off 값을 37.0 cycle 미만으로 설정하였다.

*M. tuberculosis*는 사람 결핵의 가장 빈번한 원인체이지만, *M. bovis*에 의해서도 발생한 임상사례가 보고되고 있다(Cosivi 등, 1998; Thoen 등, 2006). 그래서 *M. bovis*에 의해서 사람 결핵의 유행과 전파를 규명하기 위해서는 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*를 감별할 필요가 있다.

현재 우리나라는 결핵 및 브루셀라 방역실시요령에 따라 단일 피내 검사법을 통해 양성인 개체에 대해 살처분을 하고 있는 실정이지만, 소결핵은 대부분 임상증상이 나타나지 않으며, 결핵 감염 초기와 말기에 검출이 잘 되지 않아 도축장에 출하되어 도축과정의 해체검사에서 경미한 것부터 심한 병변을 나타내는 결핵 감염소가 관찰되고 있는 실정이다(고 등, 2007; 변 등, 2007). 한우에서 결핵 발생률은 0.15~0.19%로 매년 도축장에서 결핵감염 소의 검색률이 증가하고 있다(고 등, 2007; 공 등, 2002; 변 등, 2007; 이 등, 2010). 따라서 도축과정의 결핵검사가 보다 강화되어야 할 것으로 생각한다.

결론적으로 이번 연구에서 개발된 TaqMan probe을 이용한 multiplex real-time PCR 기법은 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*를 감별할 수 있으며, 동물 임상시료에 존재하는 *M. bovis*를 신속하고 정확하게 진단할 수 있을 뿐만 아니라 이들 2종의 결핵균에 동시 감염된 사람에 대한 역학적 진단을 수행함으로써 의학적 치료에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

이번 연구는 *M. bovis*와 *M. tuberculosis* 감별과 소 림프절에 존재하는 *M. bovis*를 검출하기 위해서 IS1081 유전자와 *M. tuberculosis*에만 존재하는 12.7-kb 절편에 기초한 TaqMan probe을 이용한 multiplex real-time PCR 기법을 개발하였다.

1. Real-time PCR 기법으로 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*의 IS1081 유전자의 확인과 2종의 결핵균이 정확하게 감별되었으며, 8주의 다른 결핵균과 대장균 등 10주의 다른 병원성 세균에서는 교차반응이

나타나지 않았다.

2. Real-time PCR 기법을 이용한 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*의 genomic DNA의 검출한계는 각각 10 fg/μl과 0.1 pg/μl이었다.

3. 도축장에서 발견된 결핵 감염소 28건과 육안적으로 정상인 개체의 소 림프절 85건에 대한 conventional PCR 검사와 real-time PCR 진단 기법의 활용성을 평가한 일치도(kappa)는 0.976로 우수하였으며, 민감도는 96.4%, 정확도는 99.1%이었다.

이번 연구에서 개발된 TaqMan probe을 이용한 real-time PCR 기법은 *M. bovis*와 *M. tuberculosis* 감별과 소 림프절에 존재하는 *M. bovis*를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 유용한 도구로 사용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- 고바라다, 김현중, 박덕용, 박성도, 김재익, 박종태, 김용환. 2007. PCR 기법을 이용한 도축 소의 결핵병 신속진단. 한국가축위생학회지 30: 393-406.
- 공신국, 이권택, 임종묵, 양승민, 이요안나, 문순화. 2002. PCR 기법을 이용한 젖소 결핵균 검색 분리 조사. 한국가축위생학회지 25: 135-140.
- 변현섭, 이현주, 이상명, 한성태, 곽학구, 최해연, 조윤상, 안병우. 2007. 도축 한우에서 발견된 결핵병. 한국가축위생학회지 30: 407-414.
- 이종진, 김덕순, 이종화, 이청산. 2010. ELISA를 이용한 우결핵검사 결과에 대한 PPD 접종법 결과 분석 비교. 한국가축위생학회지 33: 335-340.
- Bakshi CS, Shah DH, Verma R, Singh RK, Malik M. 2005. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. Vet Microbiol 109: 211-216.
- Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MT, Zanini MS, Salas CE. 2004. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell Probes 18(3): 167-170.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA 99: 3684-3689.
- Chen R, Bi Y, Yang G, Liu Z, Liu Z, Zeng B, Tong T. 2010. Development of a fluorescent microsphere-based multiplex assay for simultaneous rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis* in clinical samples.

- Diagn Mol Pathol 19: 172-179.
- Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates FG, De Lisle GW. 1993. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. J Clin Microbiol 31: 1143-1147.
- Collins DM, Stephens DM. 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. FEMS Microbiol Lett 67: 11-15.
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis 4: 59-70.
- Ereqat S, Bar-Gal GK, Nasereddin A, Azmi K, Qaddomi SE, Greenblatt CL, Spigelman M, Abdeen Z. 2010. Rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* by high-resolution melt curve analysis. J Clin Microbiol 48: 4269-4272.
- Espinosa de los Monteros LE, Galán JC, Gutiérrez M, Samper S, García Marín JF, Martín C, Domínguez L, de Rafael L, Baquero F, Gómez-Mampaso E, Blázquez J. 1998. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. J Clin Microbiol 36: 239-242.
- Fleiss JL, Cohen J. 1973. The equivalence of weighted kappa and the intraclass correlation coefficient as measures of reliability. Educational and Psychological Measurement 33: 613-619.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci USA 100: 7877-7882.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Res 6: 986-994.
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol Med 8: 257-260.
- Kurabachew M, Enger Ø, Sandaa RA, Skuce R, Bjorvatn B. 2004. A multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group- and species-specific detection of mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 49: 99-104.
- Miller MB, Tang YW. 2009. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 22: 611-633.
- Mostowy S, Inwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, Kremer K, Cousins D, Behr MA. 2005. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. J Bacteriol 187: 6386-6395.
- Niemann S, Harmsen D, Rüsich-Gerdes S, Richter E. 2000a. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. J Clin Microbiol 38: 3231-3234.
- Niemann S, Richter E, Rüsich-Gerdes S. 2000b. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. J Clin Microbiol 38: 152-157.
- Park H, Jang H, Song E, Chang CL, Lee M, Jeong S, Park J, Kang B, Kim C. 2005. Detection and genotyping of *Mycobacterium* species from clinical isolates and specimens by oligonucleotide array. J Clin Microbiol 43: 1782-1788.
- Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, Freire F, Moran J, Hermoso de Mendoza J. 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. Vet Microbiol 127: 315-324.
- Pinsky BA, Banaei N. 2008. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. J Clin Microbiol 46: 2241-2246.
- Pounder JI, Aldous WK, Woods GL. 2006. Comparison of real-time polymerase chain reaction using the Smart Cycler and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *M. tuberculosis* complex in clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 54: 217-222.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Savelkoul PH, Catsburg A, Mulder S, Oostendorp L, Schirm J, Wilke H, van der Zanden AG, Noordhoek GT. 2006. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with Real Time PCR: comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. J Microbiol Methods 66: 177-180.
- Shah DH, Verma R, Bakshi CS, Singh RK. 2002. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 214: 39-43.
- Soini H, Musser JM. 2001. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chem 47: 809-814.
- Sorlozano A, Soria I, Roman J, Huertas P, Soto MJ, Piedrola G, Gutierrez J. 2009. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. J Microbiol Biotechnol 19: 1259-1264.
- Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. 2007. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. BMC Vet Res 3: 12.
- Thacker TC, Harris B, Palmer MV, Waters WR. 2011. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. BMC Vet Res 7: 50.
- Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL. 1990. IS6110, an IS-like ele-

- ment of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Res 18: 188.
- Thoen C, Lobue P, de Kantor I. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet Microbiol 112: 339-345.
- Thone CO, Chiodini R. 1993. *Mycobacterium*. pp. 44-56. In: Gyles CL, Thone CO(ed.). Pathogenesis of bacterial infectious in animals. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PEW, van Embden JDA. 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol 30: 1772-1777.
- Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Vet Microbiol 43: 227-240.
- Yeboah-Manu D, Yates MD, Wilson SM. 2001. Application of a simple multiplex PCR to aid in routine work of the mycobacterium reference laboratory. J Clin Microbiol 39: 4166-4168.
- Zhu RY, Zhang KX, Zhao MQ, Liu YH, Xu YY, Ju CM, Li B, Chen JD. 2009. Use of visual loop-mediated isothermal amplification of *rimM* sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. J Microbiol Methods 78: 339-343.
- Zumárraga M, Bigi F, Alito A, Romano MI, Cataldi A. 1999. A 12.7 kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. Microbiology 145(Pt 4): 893-897.