

## 소의 임상병리 가검물에서 *Mycobacterium* species 감별진단을 위한 multiplex PCR 기법

김용환<sup>1</sup> · Al-Haddawi MH · 조호성 · 강성귀 · 조경오 · 박형선 · 이봉주 · 박남용\*

<sup>1</sup> 광주광역시보건환경연구원  
전남대학교 수의과대학  
(2001년 10월 25일 게재승인)

### Multiplex PCR for differential diagnosis of *Mycobacterium* species from bovine clinical samples

Yong-hwan Kim<sup>1</sup>, Al-Haddawi MH, Ho-seong Cho, Sung-kwi Kang, Kyoung-oh Cho, Hyung-seon Park, Bong-joo Lee, Nam-yong Park\*

<sup>1</sup> Gwangju Metropolitan City Institute of Health and Environment, Gwangju 500-210, Korea  
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Accepted October 25, 2001)

**Abstract :** A multiplex PCR technique was developed for detecting specifically each *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, respectively, using clinical samples of field cattle. To apply this novel technique to clinical specimens, blood sample was obtained from live cows comprising 11 intradermal tuberculin test (ITT)-positive and 17 ITT-negative and tested by multiplex PCR. Positive results were obtained from 15 cows by the multiplex PCR, showing that 4 (23.5%) of the 17 ITT-negative cows were multiplex PCR positive. The multiplex PCR results also showed that among the 15 positive cows, 7 (46.7%) were infected with *M. bovis*, 1 (6.7%) with *M. tuberculosis* and 7 (46.7%) with *M. avium*. The sensitivity and specificity of multiplex PCR in comparison with those of ITT were 100% and 76.5%. The correlation between the multiplex PCR and ITT assays with blood samples was considered excellent, 85.7% agreement and  $\kappa = 0.72$ . The results obtained, using reference mycobacterial strains and typed clinical samples, show that the multiplex PCR method may be a rapid, sensitive, and specific tool for the differential identification of various mycobacterial strains in a single-step assay. Therefore, multiplex PCR assay is a useful tool for early diagnosis of tuberculosis in live cattle and to identify the species or complex of mycobacterium from clinical samples.

**Key words :** Bovine, Clinical samples, Intradermal tuberculin test, Multiplex PCR, *Mycobacterium*

### 서 론

결핵은 *Mycobacterium* 균속에 의해서 발생하는 사람과 동물의 만성 소모성 질병으로서 세계적으로 문제시되고 있다. 동물에서 발생하는 결핵중 소의 결핵은 경제적으로나 공중보건학적으로 심각한 피해를 일으키고 있어서 중요하게 다

루어지고 있다<sup>1,4</sup>. 이러한 우결핵은 주로 *Mycobacterium bovis*에 의해 발생하지만 *M. tuberculosis*, *M. avium*에 의해서도 유발된다.

이 같은 우결핵 진단을 위해 현재 대부분의 나라에서 튜버큘린 피내반응검사(intradermal tuberculin test, ITT)를 이용하고 있으며<sup>2,3</sup>, 국내에서도 젖소를 중심으로 우군에 대한

\*Corresponding author : Dr. Nam-yong Park, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

ITT를 시행하고 있다. 그러나 이 ITT의 민감도가 72%, 65.6% 등 보고자에 따라 큰 차이가 있어 논란이 되고 있다<sup>5,6</sup>. 뿐만 아니라, ITT에 의해 얻은 양성 결과는 때때로 다른 원체와의 교차반응에 의한 위양성(false-positive) 때문에 항상 정확한 것은 아니다<sup>7</sup>.

한편 결핵균의 실험실 진단을 위해 가장 고전적이고 신뢰할만한 'gold standard'로 알려진 균 분리동정 방법과 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>와 같은 방사성동위원소를 사용하여 짧은 시간에 균의 증식을 확인할 수 있는 BACTEC system (Becton Dickinson, USA)이 개발되어 사용되어 왔다<sup>8,9</sup>. 이외에도 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)<sup>10,11</sup>나 interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) assay<sup>6</sup>를 이용한 면역학적 진단법과 결핵균에 특이한 핵산 표지자를 이용하거나 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 등을 이용하는 분자생물학적 진단법<sup>12-14</sup> 등이 주로 인의에서 *M. tuberculosis* 진단을 위해 먼저 개발되어 소개되고 있다. 그러나 이들 역시 검사소요 시간이 길거나, 민감도와 특이도 등이 낮은 것으로 보고되고 있다<sup>15,16</sup>. 아울러 그동안 많은 연구를 통해 결핵균의 신속하고 정확한 진단법 개발이 꾸준히 요구되었다.

최근에는 *Mycobacterium species*의 여러 유전자들의 염기 배열이 밝혀지고, 목적하는 부분의 DNA만을 선택적으로 시험관내에서 대량으로 증폭시킬 수 있는 polymerase chain reaction (PCR)방법이 개발되었다<sup>17,18</sup>. 또한 PCR 기법 중에서 동시에 여러 질병 원인체를 검출할 수 있는 multiplex PCR이 개발되어, 결핵균의 감별에도 시도되고 있다<sup>19,21</sup>. 하지만, 국내 소에 대한 결핵균주의 감별을 위해 multiplex PCR 기법의 응용에 관한 보고는 없다.

따라서 본 연구는 결핵에 감염된 소의 임상병리 가검물로부터 multiplex PCR을 이용하여 *Mycobacterium spp.*중에서도 가장 문제가 되고있는 *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. avium subsp. paratuberculosis*에 대한 동시검출 기법을 확립하고, 이들 균종의 신속한 감별진단을 시도하였다. 또한 multiplex PCR의 민감도와 특이도를 ITT와 비교하여 실제 우결핵 근절을 위한 임상검사로서의 적용에 있어서 보다 효율적이고 경제적인 방법을 모색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

2000년 4월부터 2001년 7월 사이 전남과 전북지역에서 젖소에 대하여 ITT를 실시한 결과 우결핵 양성으로 판정된 9개 농장의 3~6세 된 살처분 대상의 소 11두와 이들 양성 우와 동거 중이던 ITT 음성으로 판정된 소 17두로부터 sodium citrate로 항응고 처리한 채혈 혈액 28건, 우유 19건 및 비즙 28건의 임상병리 가검물을 채취하여 실험에 사용

하였다(Table 1). 또한 시료의 오염을 최대한 방지하기 위해 야외에서 가능한 한 무균적으로 조작하고 냉장상태로 즉시 운반하여 실험을 실시하였다.

### 튜버큐린 피내반응검사

튜버큐린 피내반응검사(intradermal tuberculin test, ITT)는 국내에서 실시하고있는 우결핵 검진방법으로써 *M. bovis* AN5로 제조된 purified protein derivation (PPD) 진단액을 미근부 추벽에 점종하고 72시간 후 점종부위의 종창크기에 따라 판정하였다. 5 mm 이상은 양성, 3 mm 이하는 음성, 3~5 mm는 위양성으로 판정하여 60일 후 동거우와 함께 재검을 실시하였고, 양성우에 대해서는 곧바로 살처분을 실시하였다.

### 표준 mycobacterial DNA

*M. bovis* (ATCC 19210), *M. tuberculosis* (ATCC 27294), *M. avium* (ATCC 25291)와 *M. avium subsp. paratuberculosis* (ATCC 19698)의 표준균주로부터 추출한 DNA를 대한결핵 연구원과 국립수의과학검역원에서 분양받아 PCR과 multiplex PCR 기법에 이용하였다. 또한 각각 표준 균주 DNA의 농도를 측정 후, 10배 계단 희석하여 PCR과 multiplex PCR의 검출한계를 검사하기 위해서 사용하였다.

### DNA 추출

실험재료로부터 DNA의 추출은 Romero *et al.*<sup>20</sup>의 방법을 변형하여 실시하였다. 혈액, 우유 및 비즙을 각각 1.5 ml 취하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하였다. 침전된 pellet을 멸균증류수로 3회 세척한 후, 여기에 NaI용액[NaI 6 M, 13 mM EDTA (pH 8.0), 26 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 % sodium-N-lauryl sarcosine and 10  $\mu$ g of glycogen] 400  $\mu$ l을 섞고, chloroform : isoamyl alcohol (24:1)용액을 첨가하여 55 °C에 30분간 정치시킨 후 10분 동안 혼합시켜 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액의 1/2이 되게 isopropanol alcohol을 넣고 10분간 반응시킨 후 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 pellet을 70% ethanol로 세척하고 공기중에 건조시킨 다음 멸균증류수 20  $\mu$ l에 재부유시켜 -20 °C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 음성 대조군도 위와 동일한 방법으로 DNA를 추출하여 multiplex PCR에 사용하였다.

### Primer

*M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*과 *M. avium subsp. paratuberculosis*를 검출하기 위해 5종의 primer set를 작성하였다(Table 2). Primer는 각각 특이적인 부위에서 작성하였는데 *M. avium*을 증폭하기 위해서 IS1245, *M. avium subsp.*

*paratuberculosis*는 IS900을 선택하였고<sup>22,26</sup>, 이 둘 모두를 증폭할 수 있는 *M. avium* complex의 IS1311 부위를 선택하였다. 또한 *M. bovis*와 *M. tuberculosis*에 특징적인 primer를 제작하였다<sup>27,28</sup>. Primer의 특이 염기서열 선정은 Gene bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 각각의 종에 대한 유전정보를 얻은 후 이를 mutialin (<http://protein.toulouse.inra.fr/mutialin.html>)을 이용하여 배열한 다음 잘 보존된 부위를 선정하여 Primer3 ([http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi))를 이용하여 특이부위를 선정하여 합성하였다(Bioneer Co, Korea).

### DNA 증폭

추출한 template DNA 10  $\mu$ l를 PCR tube에 넣고 PCR

**Table 1.** Distribution of positive and negative cows for differential diagnosis of *Mycobacterium* species by multiplex PCR and ITT

Farm	Case No.	ITT*	Multiplex PCR		
			Blood	Milk	Nasal swab
A	1	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
B	2	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	ND	-
	6	-	-	ND	-
C	7	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
	8	-	-	ND	-
	9	-	-	ND	-
D	10	+	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	-
	11	-	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
	12	-	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
	13	-	<i>M. avium</i>	ND	-
E	14	+	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	-
	15	-	-	-	-
	16	-	-	-	-
F	17	+	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
	18	-	-	ND	-
G	19	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
	20	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
	21	-	-	-	-
	22	-	-	ND	-
	23	-	-	ND	-
H	24	+	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	-
	25	-	-	-	-
	26	-	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
I	27	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
	28	+	<i>M. bovis</i>	ND	<i>M. bovis</i>
Total		11/28	15/28	13/19	11/28

\*: intradermal tuberculin test (ITT), ND: not done, *M*: *Mycobacterium*.

mixture [2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.25% Tween 20<sup>®</sup>, 각각의 200  $\mu$  M deoxynucleosides triphosphate와 각각의 0.2  $\mu$  M primer, 2.5 U DNA *Taq* polymerase]를 가한 후 총량이 100  $\mu$ l가 되도록 3차 증류수를 가하여 사용하였다<sup>20</sup>. 증폭과정은 PCR thermal cycler (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2400, Perkin Elmer, USA)를 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 preheating 시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 반응을 35회 반복한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 더 반응시켰다. 증폭산물을 확인하기 위하여 PCR산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 증폭여부를 검사하였다.

### Multiplex PCR

Multiplex PCR 반응은 먼저 표준균주를 이용하여 확립한 후, 임상 가검물로부터 추출한 DNA을 이용하여 검사를 실시하였다. Multiplex PCR의 reaction mixture와 반응 cycle은 앞서 언급한 DNA 증폭과 동일한 조건으로 수행하였다.

### 데이터 분석

Kappa value ( $\kappa$ )를 ITT와 multiplex PCR 기법 사이의 일치 정도를 결정하기 위해 계산하였다.  $\kappa = 0$ 는 agreement가 전혀 없을 때이고,  $\kappa < 0.3$ 은 agreement가 불충분(poor),  $\kappa$ 가 0.3 ~ 0.5는 수용(acceptable), 0.5 ~ 0.7은 유효(good),  $\kappa > 0.7$ 은 우수(excellent)로 평가하였다<sup>29</sup>.

## 결 과

### 각종 *Mycobacterium* species에 대한 특이적인 multiplex PCR의 개발

표준균주를 이용하여 각각의 PCR primer의 특이성을 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 primer pair MBf와 MBr은 오직 *M. bovis* DNA에서만 예상 크기인 414 bp의 특이적인 산물을 증폭하였다. MTF와 MTr은 오직 *M. tuberculosis*에서만 예상 크기인 314 bp의 특이적인 산물을, MAF와 MAr은 오직 *M. avium*에서만 예상 크기인 637 bp의 특이적인 산물을, MAPf와 MAPr은 오직 *M. avium* subsp. *paratuberculosis*에서만 예상 크기인 750 bp의 특이적인 산물을 증폭하였다. 또한, MACPf와 MACPr은 *M. avium* complex와 *M. avium* subsp. *paratuberculosis*의 두 표준균주에서만 197 bp크기의 특이적인 산물을 증폭하였다.

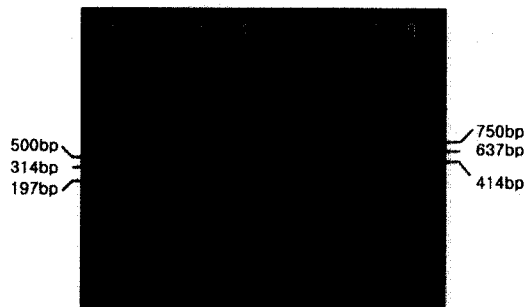
Multiplex PCR의 *Mycobacterium* spp.에 대한 각각의 primer pair의 특이도를 검사하였다. Primer pair 혼합액에 각각의 표준균주를 단독으로 증폭한 결과, 증폭하고자 하는 표준균주에 대한 특이적인 증폭산물만 관찰되었으며, 또한 각각의

primer pair와 각각의 표준균주들을 한꺼번에 혼합하여 multiplex PCR을 수행한 결과 상기한 특이적인 증폭산물들이 동시에 관찰되었다(Fig 1).

PCR과 multiplex PCR의 각각의 표준균주들에 대한 최저 검출한계(minimum detection limit)를 검사하기 위해서 각각의 표준균주들의 DNA를 10배 계단희석하여 PCR과 multiplex PCR에 사용하였다. PCR과 multiplex PCR을 수행한 결과 각각 표준균주 DNA 2 fg까지 검출이 가능하였다.

**임상병리 가검물에서 Mycobacterium species의 검출**

Table 1에서 보는 바와 같이 ITT 양성이었던 11두와 양성 우와 동거중이던 ITT 음성 17두를 합한 총 28두에 대하여 multiplex PCR을 실시하였다. 임상병리 가검물 혈액의 경우



**Fig 1.** Results of testing of *Mycobacterium* reference strain with each primer separately and with the multiplex PCR. lane 1: 100bp molecular size marker (Bioneer), lane 2: *M. avium* positive for IS1311, lane 3: *M. tuberculosis* positive for MPT40, lane 4: *M. bovis* positive for Bovis specific primer, lane 5: *M. avium* positive for IS1245, lane 6: *M. avium* sub *paratuberculosis* positive for IS900 and lane 7: mixture of template DNA positive with multiplex PCR and lane 8: Lambda DNA *EcoRI* and *HindIII* (Promega) molecular size marker.

ITT 양성 11두 모두 multiplex PCR에 양성이었으며, ITT 음성이었던 동거우 17두 중에서 4두(23.5%)가 multiplex PCR에서 양성으로 관찰되었다. 또한 임상병리 가검물 우유와 비즙에 대해서도 multiplex PCR을 실시하였다. 그 결과 우유 19건 중 13건이 multiplex PCR 양성이었으며, 비즙 28건 중 11건이 multiplex PCR 양성으로 검출되었다.

Multiplex PCR 양성 15두 중 *M. bovis*가 7두(46.7%), *M. tuberculosis*가 1두(6.7%), *M. avium*이 7두(46.7%)였으며, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*는 검출되지 않았다. ITT 양성 7두 임상병리 가검물로부터 *M. bovis*의 414 bp 크기에서 증폭산물이 관찰되었으며, ITT 양성 3두와 ITT 음성 4두가 *M. avium* IS1245의 637 bp 크기에서 band가 확인되었다. *M. avium*과 *M. avium* subsp. *paratuberculosis*의 공통으로 검출되는 IS1311의 197 bp 크기에서도 증폭산물이 확인되었다(Fig 2). 또한 ITT 양성 1두에서 *M. tuberculosis*에 특이적인 MTP40의 band가 314 bp 크기에서 관찰된 반면, 공시된 가검물 전부에서 *M. avium* subsp. *paratuberculosis*에 대한 IS900의 750 bp 크기에서 band는 관찰되지 않았다.

**Table 3.** Result of multiplex PCR and ITT on blood samples

Multiplex PCR	ITT		Total
	Positive	Negative	
Positive	11	4	15
Negative	0	13	13
Total	11	17	28

\* : intradermal tuberculin test (ITT).

Sensitivity =  $11/(11+0) \times 100 = 100\%$ .

Specificity =  $13/(4+13) \times 100 = 76.5\%$ .

Kappa = 0.72

Percent observed agreement (Po) =  $(11+13)/28 = 85.7\%$ .

Chance number of +/- agreement =  $(15 \times 11)/28 = 5.9$ .

Chance number of -/- agreement =  $(17 \times 13)/28 = 7.9$ .

Chance agreement (Pc) =  $(5.9+7.9)/28 = 49.2\%$ .

Kappa =  $(Po-Pc)/(100-Pc) = (85.7 - 49.2)/(100 - 49.2) = 0.72$ .

**Table 2.** Oligonucleotide primer sets used in the multiplex PCR

Organism	Site	Primer name	Sequence	Region	Product size (bp)
<i>M. bovis</i>	M. bovis specific site	MBf	5'CCTGTACAGTTGAATCCGA	1864-1882	414
		MBr	5'ATGTCGGCTACGAGTCGGT	2277-2259	
<i>M. tuberculosis</i>	MTP40	MTf	5'ATAGGGAATGCTCGGCAAC	5-23	314
		MTr	5'GTCTGGGTTTTCGCGTTC	318-301	
<i>M. avium</i>	IS1245	MAf	5'ACCAAGAATCACTACCGAGAGG	88-109	637
		MAr	5'GACCTCAAAGCCAGTACCT	724-705	
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	IS900	MAPf	5'TCGCTTAGGCTTCGAATTG	33-51	750
		MAPr	5'CAGTAAGCAGGATCAGCGC	782-764	
<i>M. avium</i> complex + <i>paratuberculosis</i>	IS1311	MACPf	5'GCTGGACGCATTACGCAAT	89-107	197
		MACPr	5'GCAACTCCAAATCGCCAG	285-268	

M: *Mycobacterium*, bp: base pair.

이상의 임상병리 가검물 혈액에서의 multiplex PCR 결과와 ITT 결과를 상대 비교한 결과 multiplex PCR의 민감도는 100%였고 특이도는 76.5%였다. 또한 두 방법간의 관계에 있어서 85.7%의 agreement와 kappa value 0.72로서 상당히 신뢰도가 높게 나타났다(Table 3).



Fig 2. Multiplex PCR amplifications of DNA from cattle samples infected with tuberculosis. lane 1: Lambda DNA *EcoRI* and *HindIII* (Promega) molecular size marker, lane 2: *M. avium* DNA positive for IS1245 and IS1311, lanes 3 and 4: *M. avium* DNA positive for IS1245, lanes 5 and 6: *M. bovis* positive for the Bovis specific primer and lane 7: *M. tuberculosis* positive for MTP40 and lane 8: 100bp molecular size marker (Bioneer).

## 고 찰

세계적으로 결핵은 감염성 질병 중 이환률이 가장 높은 질병으로서 최근 AIDS나 면역억약물의 남용 등으로 그 중요성은 더욱 강조되고 있다. 결핵의 진단법에는 많은 문제점이 있었다. 결핵균의 배양은 민감성이 있는 반면 많은 시간이 필요할 뿐만 아니라 배양 중 연구자에 감염을 일으킬 수 있는 위험이 있다<sup>20</sup>. 이러한 문제점을 해결하기 위해 꾸준히 연구가 진행되고 있으며, 최근 PCR 기법이 나와 결핵 연구에 새로운 전기를 마련하였다<sup>21,31</sup>. 결핵균을 검출하기 위한 방법은 가능한 신속하고 문제되는 여러 균주들을 감별할 수 있어야 하며, 동시에 많은 임상 가검물을 검사할 수 있어야 한다. 또한, 가능한 사용자의 제한과 경제적인 면에 있어서 방사선동위원소를 사용하지 않는 것이 좋다. 이러한 조건들을 만족하기 위해서 multiplex PCR을 본 연구에서 개발하였다.

Multiplex PCR 기법을 이용한 각각의 결핵균주에 대한 감별진단이 사람에서 많이 응용되고 있다. 하지만, 수의분야에서 특히 소에서는 본 연구에서와 같이 *M. bovis*, *M.*

*tuberculosis*, *M. avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*를 동시에 신속하게 진단하기 위한 multiplex PCR 기법의 응용에 대한 보고는 없는 것 같다. 본 연구에서 수행한 multiplex PCR에 사용한 primer set의 설계는 상기한 각각의 균주에 특이적으로 결합할 수 있는 부분에서 하였다. *M. avium* subsp. *paratuberculosis*는 특히 *Mycobacterium avium*의 특성과 유사하여, 이들 두 균주의 유전자 차이가 1에서 2%의 염기 구성성분만이 다를 뿐이어서 정확한 구분을 위해 두 개의 primer set (IS1245, IS1311)를 사용하였다<sup>32-34</sup>. 또한 본 연구의 모든 primer set에 대한 증폭 조건은 분석이 잘될 수 있도록 하나로 동일화하였으며, 실제로 먼저 표준균주를 이용한 선행실험에서 특이적인 증폭산물을 관찰하였다. 따라서, 본 연구에서 개발한 multiplex PCR은 소에서 각각의 결핵균주에 대하여 신속하고 특이도 높게 진단하는데 유용하게 사용할 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구에서 개발한 multiplex PCR은 단독으로 수행한 PCR 결과와 똑같은 최저 검출한계가 2 fg이었다. 이는 Vitale *et al.*<sup>9</sup>의 PCR 기법에 의한 보고에서 검출한계가 1 fg 인 것과 비교할 때 본 연구의 기법도 상당히 높은 민감도를 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발한 multiplex PCR은 단독의 PCR에서 얻어지는 것과 같이 민감도가 높으며, 동시에 여러 가지 균주를 감별할 수 있어서, 실제적으로 임상진단에 유용하리라 생각된다.

외국뿐만 아니라 국내에서도 폭넓게 사용하고 있는 ITT 방법의 경우 비정형 결핵균, *Corynebacteria*, *Fasciola hepatica* (liver fluke), *Nocardia* species 균들의 감염이 있을 경우 위양성으로 나올 수 있을 뿐만 아니라 높은 비율로 위음성 결과가 나와서 이러한 것에 대하여 보고가 되어있다<sup>35</sup>. 이러한 위양성이나 위음성의 결과는 실제적인 결핵균 존재를 증명하기 위하여 결핵균의 특이 종 검색을 위해 multiplex PCR 기법의 도입을 유도하였다<sup>36,37</sup>.

본 연구에서도 multiplex PCR을 ITT 양성 및 음성우의 혈액을 이용하여 수행하였다. 그 결과 민감도는 100%였으며, 특이도는 76.5%였다. 뿐만 아니라 86%의 agreement와 0.72의 kappa value를 가지고 있어서 multiplex PCR의 결과가 상당히 우수한 진단법임을 알 수 있었다. 더욱이, 임상례에서 ITT에 음성으로 진단된 예의 23.5%가 multiplex PCR 양성으로 확인되어 본 진단법의 우수성을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Vitale *et al.*<sup>9</sup>의 보고와 유사하였는데, 즉, ITT에 음성 예증에서 52%가 PCR에 양성이었다고 한다. Romero *et al.*<sup>20</sup>은 ITT 음성우증에서 11.4%가 PCR에서 양성우였다. 또한, 이러한 ITT 양성이든 음성이든 상관없이 본 multiplex PCR로 검사한 결과 *M. bovis*가 7두, *M. tuberculosis*가 1두, *M. avium*이 7두 관찰되어서 국내 소에서의 결핵균 감염증의 실태를 알 수 있었다. 이렇게 결핵균 감염증의 대표적인

4가지 균주들을 동시에 검출하여 이들의 분포상황을 보고한 논문은 접할 수 없었다. 따라서, 본 연구 결과에 의해서 국내에서 폭넓게 사용하고 있는 소의 결핵균 진단법으로서의 ITT 방법을 보완할 수 있는 새로운 진단법으로서 multiplex PCR법이 도입될 수 있겠다 하겠다. 또한, 국내 소에서 결핵균은 단지 *M. bovis*뿐만 아니라 *M. avium*과 *M. tuberculosis*가 혼재되어 발생하고 있음을 알 수 있어 이에 대한 적절한 방역대책이 필요할 것으로 생각된다. 하지만, 본 연구에서는 제한된 수의 소를 대상으로 이용하였기 때문에 장차 전국적인 규모로 대규모의 소를 이용한 국내에서의 결핵균 감염 상에 대하여 분자생물학적 역학조사가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

반추수에서 *M. tuberculosis*의 발생이 드물다는 보고가 있는데<sup>38</sup>, 본 연구의 multiplex PCR 결과 15두 중 오직 1두에서 *M. tuberculosis*가 확인되었다. 이 같은 결과는 아마 결핵에 감염된 사람과의 접촉에 의해 소에서 발생되었을 것으로 추정해 본다. 또한 살아있는 동물에서 채취할 수 있는 임상 가검물로는 혈액을 비롯한 우유, 분변, 타액, 비즙 등이 있겠으나, 본 실험에서 이용한 우유와 비즙에 대한 multiplex PCR 결과는 우유가 비즙보다 높게 검출되었으며, 이는 우유 시료가 우결핵 진단에 좋은 시료라는 앞서 수행된 다른 연구와 같게 나왔다<sup>19</sup>. 그러나 건유기의 소에서는 시료 채취가 불가능해서 이 경우에 다소 제약이 있음을 알 수 있었다.

무병소우들에 대한 ITT 및 multiplex PCR에 대하여 각각 양성 반응이 나온 것은 이러한 무병소우들이 감염의 초기에 있어서 아직 육안적으로나 조직학적으로 병변을 형성하지 않았지만, 혈액내의 백혈구에는 균들이 존재하고 또한 ITT 반응을 충분히 유발할 수 있는 항체 등이 생성되었기 때문이라고 추정할 수 있다. 실제로 감염의 초기에는 결핵균이 혈액내의 탐식세포에만 존재하고 육안적으로나 조직학적으로 관찰할 수 있는 병변은 유발할 수 없다고 하였다<sup>39</sup>. 뿐만 아니라, 본 연구의 이러한 결과는 선행 연구자의 결과에 의해서 뒷받침될 수 있는데<sup>19</sup>, 즉 PCR 양성우 중에서 10%는 무병소우로서 이러한 것들은 감염의 초기에 의한 것으로 추정하였다.

결론적으로 multiplex PCR 기법은 농장의 동물로부터 간단히 쉽게 채취할 수 있는 임상병리 시료에서 용이하게 수행할 수 있음을 확인하였다. 이 방법은 시료로부터 겔상에서 증폭된 DNA의 검출을 위해 24시간 안에 빨리 진단할 수 있다. 우결핵 진단을 위해 ITT와 함께 PCR을 병행할 시 매우 유용할 것이며, 또한 multiplex PCR은 높은 전파의 위험으로 고려되는 지역에서 감염된 동물의 역학적 조사에 유용하게 사용될 것으로 사료되며, 이 같은 효율적인 진단 기법은 우결핵 예방과 근절대책에 큰 도움을 주리라 기대

한다.

## 결론

소의 임상병리 가검물인 혈액, 우유, 비즙 등에서 *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*과 *M. avium* subsp. *paratuberculosis*를 동시에 특이적으로 검출할 수 있는 multiplex PCR 기법을 개발하였다. 이 새로운 기법을 응용하기 위해 튜버큘린 피내반응검사(ITT) 양성 11두와 ITT 음성 17두의 살아있는 소로부터 가검물을 채취하여 multiplex PCR을 실시하였다. Multiplex PCR에 의해 15두가 양성으로 검출되었으며, 17두의 ITT 음성우중 4두(23.5%)가 multiplex PCR 양성으로 검출되었다. 또한 multiplex PCR 양성 15두 중 7두(46.7%)가 *M. bovis*, 1두(6.7%)가 *M. tuberculosis*, 7두(46.7%)가 *M. avium*에 감염되어 있었다. 이상의 multiplex PCR과 ITT 결과를 상대 비교한 결과 민감도는 100%였으며, 특이도가 76.5%였다. 두 방법간에 85.7%의 일치와 kappa value는 0.72로서 상당히 신뢰도가 높게 나타났다. 표준균주와 임상 가검물을 사용하여 multiplex PCR 방법이 한번의 분석으로 다양한 결핵균주의 감별진단을 할 수 있는 신속하고 민감하며 특이적인 기법이었다. 따라서 multiplex PCR 분석은 살아있는 소에서 결핵의 조기진단과 임상 가검물로부터 *Mycobacterium* 균종의 동정을 위해 유용한 기법이라 사료된다.

## 참고문헌

1. Moda G, Daborn CJ, Grange JM, et al. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tuber Lung Dis*, 77(2):103-108, 1996.
2. Hardie RM, Watson JM. *Mycobacterium bovis* in England and Wales. past, present and the future. *Epid Infect*, 109:23-33, 1992.
3. Feizabadi MM, Robertson ID, Cousins DV, et al. Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 34:1136-1142, 1996.
4. Grange JM, Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol*, 40(1-2):137-151, 1994.
5. Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, et al. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet Res*, 103:420-425, 1978.
6. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, et al. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis.

- Aust Vet J*, 68:286-290, 1991.
7. Mausner JS, Kramer S. Epidemiology and introductory text. Philadelphia. WB Saunders Company, 1985.
  8. Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigertt WD. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am Rev Respir Dis*, 115:1066-1069, 1977.
  9. Whittington RJI, Marsh S, McAllister MJ, et al. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J Clin Microbiol*, 37:1077-1083, 1999.
  10. Ritacco V, Lopez B, Barrera L, et al. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Zentralbl Veterinarmed*, 37(1):19-27, 1990.
  11. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, et al. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol*, 31(1):71-79, 1992.
  12. Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, et al. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for the diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 28:2051-2058, 1990.
  13. Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, et al. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 29:2030-2033, 1991.
  14. Aranaz A, Liebana E, Mateos A, et al. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: A comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 61:311-324, 1998.
  15. Small PM, McClenny NB, Sing SP, et al. Molecular stain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J Clin Microbiol*, 31:1677-1682, 1993.
  16. van Embden JA, Donal Cave M, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 31:406-409, 1993.
  17. 윤경한, 이태윤, 조상래 등. 가검물내 결핵균 검출에 있어서 DNA 분리방법에 따른 중합효소연쇄반응의 민감도 비교. *대한미생물학회지*, 26(2):159-166, 1991.
  18. Patel RJ, Fries JWU, Piessens, et al. Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 28:513-518, 1990.
  19. Vitale F, Capra G, Maxia L, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspiration and nasal swabs. *J Clin Microbiol*, 36:1050-1055, 1998.
  20. Romero RE, Garzon, DL, Mejia GA, et al. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. *Can J Vet Res*, 63:101-106, 1999.
  21. Del Portillo P, Thomas MC, Enrique Martinez, et al. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 34:324-328, 1996.
  22. Guerrero C, Bernasconi C, Buoki D, et al. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245 is a special target for analysis of strain relatedness. *J Clin Microbiol*, 33:304-307, 1995.
  23. Bauerfeind R, Benzaai S, Weiss R, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goat and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. *J Clin Microbiol*, 34:1617-1621, 1996.
  24. Bono M, Jwmni T, Bernasconi C, et al. Genotyping characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl Environ Microbiol*, 61:371-373, 1995.
  25. Cousins D, Francic B, Dawson D. Multiplex PCR provides a low-cost alternative to DNA probe methods for rapid identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol*, 34:2331-2333, 1996.
  26. Vary PH, Andersen PR, Green E, et al. 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, 1990.
  27. Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, et al. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology*, 141: 2131-2138, 1995.
  28. Leao SC. Tuberculosis. New strategy for the development of diagnostic tests and vaccine. *Braz J Med Biol Res*, 26:827-833, 1993.
  29. Martin SW, Bonnett B. Clinical epidemiology. *Can Vet J*, 11:147-156, 1987.
  30. Klemen H, Bogiatzis A, Ghaliatian M, et al. Multiplex polymerase chain reaction for rapid detection of atypical mycobacteria and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Diag Mol Path*, 7:310-316, 1998.
  31. DeWit D, Steyn L, Shoemaker S, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol*, 28:2437-41, 1990.
  32. McFadden JJ, PD Butcher, J Thompson, et al. The use of DNA probes identifying restriction fragment-length

- polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Microbiol*, 1:283-291, 1987.
33. Sherman DM, Markham RJ, Bates F. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 185(2):179-182, 1984.
  34. 김태종, 김윤식, 김재천 등. 분자생물학과 면역학적 방법에 의한 소 요네병 진단의 연구. *대한수의학회지*, 37(2):349-358, 1997.
  35. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animal and man: a review. *Tuber Lung Dis*, 76(1):1-46, 1995.
  36. Duffield BJ, Norton JH, Hoffman D. An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic mycobacteria from cattle in Northern Queensland. *Aust Vet Res*, 103:420-425, 1989.
  37. Ridell M. Cross-reactivity between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and various actinomycetes and related organisms. *Tubercle*, 64:211-216, 1983.
  38. Miller J, Jenny A, Rhyan J, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J Vet Invest*, 9:244-249, 1997.
  39. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of domestic animals. 4th ed, *Academic Press Inc*, 2:641-652, 1992.