

중합효소연쇄반응을 이용한 소에 감염된 *Anaplasma marginale*의 신속한 진단

박진호 · 최경성 · 권오덕 · 이주목¹
전북대학교 수의과대학

Rapid detection of *Anaplasma marginale* with the Polymerase Chain Reaction in Cattle

Jin-ho Park, Kyong-seong Chae, Oh-deog Kwon and Joo-mook Lee¹
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

ABSTRACT : The present study was carried out for the rapid and accurate detection of *Anaplasma marginale* in cattle using Polymerase Chain Reaction. One pair of primer, BAP-2 and AL34S, were designed to amplify a 409 bp fragment of the *A. marginale* membrane surface protein encoding beta(msp β 1) gene with a highly sensitive and specific PCR. *A. marginale* isolated from naturally infected calf in Chonbuk area were used to obtain target genomic DNA for PCR. This study showed that a 409 bp of msp β 1 gene fragment could be detected as little as 15 fg of purified *A. marginale* genomic DNA. The amplified fragment with PCR was checked for the identification of msp β 1 gene by enzyme restriction and sequencing. Also, the target DNA extracted directly from blood were used in the PCR reactions without prior purification to shorten the detection time. The PCR in the present study was considered convenient and rapid method for the detection of *A. marginale* in whole blood of infected cattle.

Key word : *Anaplasma marginale*, msp β 1, PCR

서 론

Anaplasmosis는 진드기와 모기에 의한 매개, 기계적 전파, 태반감염 등에 의하여 발열, 빈혈 및 체중감소 등의 임상증상을 일으키는 rickettsia성 질병으로서, 우리나라를 포함하여 미국, 남아프리카, 오스트리아 등 전세계적으로 소, 양, 산양, 사슴, 야생반추수에 발생하고 있다¹⁻⁵. 만성형에 있어서는 다른 질병에 대한 감수성이 증가하며, 영양결핍이나 환경변화 등과 같은 stress가 가해질 경우는 급성 anaplasmosis를 일으켜 폐사할 수 있다고 알려져 있다^{6,8}.

소에서 anaplasmosis를 일으키는 원인체로서는 *Anaplasma marginale*, *A. centrale* 등이 알려져 있으나, 이중 *A. marginale*는 병원성이 강한 것으로 보고되고 있

으며, 어린 연령의 송아지보다는 나이가 많은 소에서 급성형이 유발되어 폐사율이 증가하는 것으로 보고되고 있다⁹⁻¹¹.

우리나라에서도 anaplasmosis의 형태학적 연구, 혈청학적 연구, 병원체 분리동정 등에 관한 연구가 보고되어 있으나, 대부분 비교적 병원성이 약한 *A. centrale*가 분포하고 있는 것으로 알려져 있었다¹²⁻¹³. 그러나 최근들어 국내의 Holstein 송아지에 *A. marginale*가 감염되어 있는 것이 보고되었는데¹⁴, 이것은 송아지의 항체가 낮은 상태에서 영양부족이나 추위 등의 stress가 가해져 anaplasmosis가 발병한 것으로 추정되고 있다.

Anaplasmosis의 진단법에는 Giemsa염색, acridine orange 염색 또는 IFA법 등이 알려져 있으나 이러한 방법들은¹⁵⁻¹⁶ 적혈구내의 감염율이 저조하거나 임상증상이 나타나지 않는 잠복감염상태에서는 명확한 진단이나 감별진단을 하기가 쉽지 않은 실정이다. 따라서 최근에는 *A. marginale*의 특이 DNA 염기서열분석¹⁷을 근거로 한 hybridization기법이나 중합효소연쇄반응과 같은 유전공학적인 진단법이 세계적으로 활발히 연구

이 논문은 1998년도 전북대학교부속 생체안전성연구소 학술 연구비의 일부지원으로 이루어졌음(CNU-BSRI, NO. 98-08)

¹Corresponding author.

되고 있으며^{18,21}, 이러한 유전공학적 기법을 이용한 진단법은 신속성과 그 특이성이 매우 높은 것으로 알려져 있다.

이에 저자 등은 소 Anaplasmosis의 신속하고 정확한 진단법을 확립하고자 *A marginale*를 감염우의 적혈구에서 분리하여 DNA를 정제한 후 중합효소연쇄반응으로 membrane surface protein encoding beta1 gene (*mospβ1* gene)의 증폭을 시도하였고, 또한 중합효소연쇄반응의 특이성을 알아보기 위하여 cloning을 통한 제한효소절단 및 염기서열분석을 실시하여 증폭된 유전자를 분석하였다. 또한, 진단에 소요되는 시간을 단축하기 위하여 *A marginale*의 DNA 정제과정을 거치지 않고 감염우 혈액에서 target genomic DNA를 바로 추출한 후 중합효소연쇄반응을 실시하였다.

이와 같이 확립된 중합효소연쇄반응의 신속하고 특이적인 진단법을 통하여 전북지역에서 사육되고 있는 소들의 *A marginale* 감염상태를 조사하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

A marginale 분리

A marginale 감염우의 경정맥에서 채취한 혈액을 Diff-Quick과 acridine orange 염색을 실시하여 적혈구 내에 존재하는 *A marginale*를 확인하였다. 이 혈액에서 Ge NL *et al.*의 방법²⁰에 준하여 백혈구를 제거한 다음 nitrogen cativation method로 적혈구를 용혈시켰다. 그리고 초원심분리하여 침전물을 회수하고 ultrasonication을 실시하였다.

중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응으로 *A marginale* *mospβ1* gene(Gene-Bank Accession No. M59845)을 증폭하기 위하여 BAP-2와 AL34S primer 1쌍을 제작(DNA Intern INC)하였다 (Table 1). Target genomic DNA는 Sambrook의 방법²²에 준하여 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1)을 처리하여 추출하였고 ethanol 침전한 후 TE buffer에 녹여서 사용하였다. 중합효소연쇄반응의 혼합액은 target genomic DNA 1 ng, primer 각각 1 uM, 2.5 mM dNTP, 10×PCR buffer 그리고 Tag DNA polymerase 1.25 unit

(Promega Co)를 첨가한 후 총량이 100 μl가 되도록 하였으며, 반응조건은 95°C에서 7분간 pre denaturation을 실시하였으며, denaturation, annealing 그리고 polymerization을 각각 95°C에서 1.5분, 57°C에서 2분, 72°C에서 3분간 30 cycle을 수행하였다. 그 후 72°C에서 7분간 post polymerization을 실시하였다²⁰. 유전자 증폭기로는 DNA Thermal cycler 2400(Perkin-Elmer Co, USA)을 사용하였다.

증폭된 DNA 유전자의 분석

중합효소연쇄반응으로 증폭된 DNA 산물의 size를 확인하기 위하여 반응액 15 μl를 1.3% agarose gel에서 전기영동하였다. 그리고 Ethidium-Bromide 염색을 실시한 후, UV transilluminator로 관찰하였다. 증폭된 DNA의 크기를 확인하기 위하여 DNA ladder(Gibco BRL U.S.A.)를 size marker로 사용하였다.

증폭유전자의 염기서열 분석

중합효소연쇄반응의 특이성을 알아보기 위하여 증폭된 DNA 산물을 cloning한 후 제한효소 절단 및 염기서열 분석을 실시하였다. 먼저 증폭된 DNA 산물을 추출하여 정제한 후 pGEM TA vector(InVitrogen Inc)에 cloning을 하였고²³, 이 clone을 top 10F *E. coli* strain에 transformation을 실시하였다. 그리고 LB broth에서 37°C, overnight shaking incubation하였다. *A marginale* *mospβ1* gene이 clone된 plasmid DNA는 alkaline 방법에 준하여 추출하였고, 제한효소 절단 및 colony PCR을 수행하여 *mospβ1* gene의 clone을 확인하였다.

염기서열 분석은 Sanger 등의 Dideoxy chain termination법에 준하여 실시하였으며²⁴, sequencing primer는 M-13 forward와 reverse primer(Promega Co)를 사용하였다(Table 2). 즉 single strand plasmid DNA, Cyclist TM Exo-Pfu DNA sequencing Kit (STRATAGENE)의 반응액 그리고 ³²P]-dATP를 혼합한 후 sequencing reaction을 실시하였다. 상기의 방법으로 PCR 증폭된 DNA의 sequence를 인식하였고 *mospβ1* gene과 비교하여 분석하였다.

Target genomic DNA의 최소농도 결정

추출한 target genomic DNA의 농도를 결정하기 위해

Table 1. PCR primers used for amplification of *A marginale* *mospβ1* gene

Primer	Length (mer)	Nucleotide sequence 5' to 3'	Expected product size
BAP-2 primer	24	5'-GTATGGCACGTAGTCTTGGGATCA-3'	409 bp
AL34S primer	20	5'-CAGCAGCAGCAAGACCTTCA-3'	

Table 2. M-13 primers used for sequencing of cloned mspβ1 gene

Primer	Length (mer)	Nucleotide sequence 5' to 3'
Forward primer	20	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'
Reverse primer	20	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

여 U/V spectrophotometer(DuckSan Co)로 260 nm에서 OD값을 측정하였다²². 그리고 중합효소연쇄반응에 요구되는 template의 최소농도를 알아보기 위하여 추출한 target genomic DNA를 2-fold serial dilution한 후 상기에 기술한 방법으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다.

야외 감염우의 *A. marginale* 진단

중합효소연쇄반응에 소요되는 시간을 단축하기 위하여 *A. marginale*의 정제과정을 거치지 않고 감염우 혈액에서 target genomic DNA를 바로 추출한 후 중합효소연쇄반응을 실시하였다²⁵. 그리고 전북지역의 *A. marginale* 감염실태를 조사하기 위하여 지역별로 야외 방목우의 혈액을 채취한 후 각각 Diff-quick 및 acridine orange 염색에 의한 현미경검사와 중합효소연쇄반응을 병용하여 실시하였고, 이들의 검사결과를 비교 분석하였다.

결 과

감염우의 혈액에서 *A. marginale*를 분리하여 중합효소연쇄반응을 수행한 결과 *A. marginale* mspβ1 gene을 증폭할 수 있었다. 중합효소연쇄반응의 특이성을 알아보기 위하여 증폭된 유전자 산물을 cloning한 후 제한효소절단 및 염기서열을 분석하였다. 또한 야외방목우의 혈액에서 *A. marginale* target genomic DNA는 바로 추출한 후 중합효소연쇄반응을 실시하였고, Diff-quick 및 acridine orange 염색 등과 같은 기존의 현미경 검사결과와 비교 분석하였다.

***A. marginale* 분리**

송아지의 혈액을 채취하여 Ge NL *et al.*의 방법²⁰에 준하여 *A. marginale*를 분리한 후 Diff-Quick 염색을 실시하여 분리된 *A. marginale*를 확인하였다.

중합효소연쇄반응

분리된 *A. marginale*에 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1)을 처리하여 target genomic DNA를 추출한 후 중합효소연쇄반응을 수행한 결과, 409 bp의

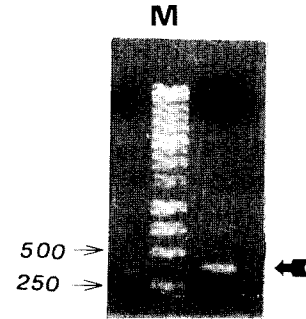


Fig 1. Amplified *A. marginale* mspβ1 gene. The M lane contains a 1 kb DNA ladder.

A. marginale mspβ1 gene을 증폭할 수 있었다(Fig 1).

증폭유전자의 제한효소절단 및 염기서열분석

중합효소연쇄반응에 의하여 증폭된 유전자를 elution하여 pGEM TA-vector에 cloning을 실시하였고 (Fig 2), 이 clone의 plasmid DNA를 추출하여 제한효소절단(Fig 3) 및 colony PCR을 실시하여 본 결과 mspβ1 gene이 clone되어있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 sanger 등의 Dideoxy chain termination법²⁴에 준한 DNA sequencing으로 염기서열을 분석한 결과(Fig 4), 증폭된 유전자가 mspβ1 gene임을 확인할 수 있었다.

Template DNA 최소농도 결정

중합효소연쇄반응에 요구되는 template DNA의 최소농도를 알아보기 위하여 추출한 target genomic DNA를 2-fold serial dilution하여 중합효소연쇄반응을 수행한 결과, 15 fg의 target genomic DNA까지 증폭할

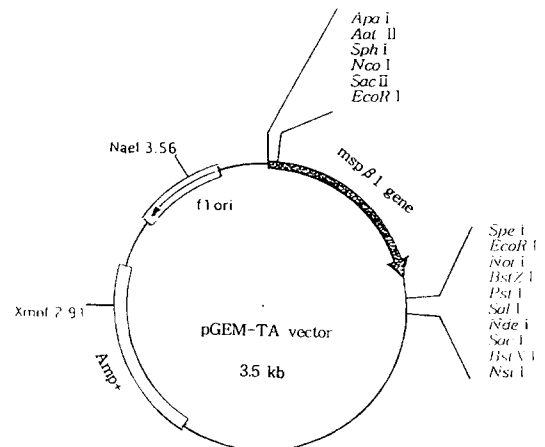


Fig 2. Strategy for plasmid construction containing mspβ1 gene of pGEM vector.

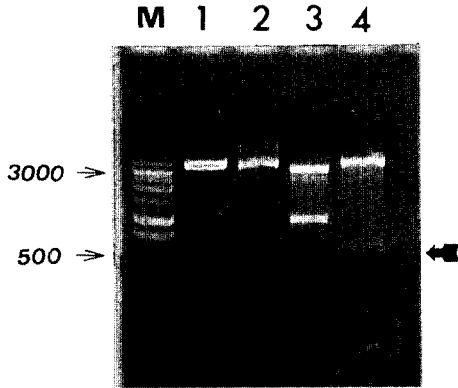


Fig 3. Restriction endonuclease analysis of pGEM-mspβ1 plasmid.

M: 1 kb Marker
 Lane 1: pGEM-mspβ1 plasmid DNA
 Lane 2: Enzyme restriction with *EcoRI*
 Lane 3: Enzyme restriction with *PvuII*
 Lane 4: Enzyme restriction with *SalI* and *NcoI*

수 있음을 알 수 있었다(Fig 5).

야외 감염우의 *A. marginale* 진단

중합효소연쇄반응에 소요되는 시간을 단축하기 위

하여 감염우 혈액에서 target genomic DNA를 바로 추출²⁵한 후 중합효소연쇄반응을 실시한 결과, mspβ1 gene이 증폭되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 전북 지역의 야외방목우 45두의 혈액을 채취한 후 각각

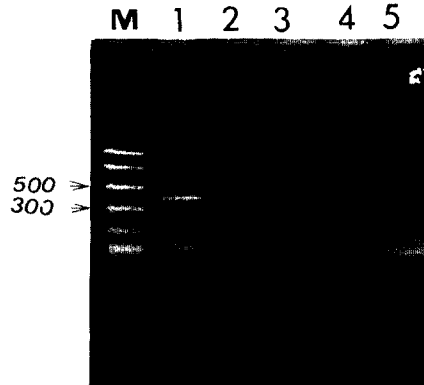


Fig 5. Determination of the minimum amount of the *A. marginale* DNA for PCR amplification.

M: DNA Marker
 Lane 1~5: The amount of template DNA is 60, 30, 15, 7, 5 and 3.3 fg. The DNA were obtained from isolated *A. marginale*

msp β1 gene	gtatggcactg agtcttggga tcatgagcaa agctagtata gaggcaact cgcaggacaa	61
amplicon	CACGT AGTCTT GGA TCATGAGCAA AGCTAGTATA GAGGCAAAC TGCAGGACAG	
msp β1 gene	agtgtagag gtggcagaga tcagcccaga aacgcagaac atgagcgacg ctatacctgt	121
amplicon	AGTGTAGAG ATGGCAGAGA TCAGCCCAGA AGCGGAGAAA ATGAGCGACG CTATACTGC	
msp β1 gene	gaagaagcc caaattgtcg aaactgcctt acttgcagca gtaaattgaca ctagtaagga	181
amplicon	GAAG AGCC CAAATTGTCTG AAAC TGCCTT ACTTGCAGCA GTAAATGACA CTAGTAAGGA	
msp β1 gene	gaccaagca attgttactg accttataaa cgctacaata gaggtgtgca cagagcagac	241
amplicon	GACCAAGCA ATTGTTAATG ACCTTATAAA CGCTACAATA GAGGTGTGCA CAGAAGCAGAC	
msp β1 gene	aatacactt gcggggcata ctgccgaggt ccaagcaggg ctggaagctg cgggtattag	301
amplicon	AATACACTT GCGGGGCATG CTGCCGAGGT CCAAGCAAAG CTGGAAGCTG CAGGTGTAA	
msp β1 gene	ttcgaogat gcacagggac tacaagaagc taccctgaa gccaaagggcg tgaaggcat	361
amplicon	GTCGACGAT GCACA CACC TACAAGAAGC TACCCCTGAA GCCAAGGGCG TGAAGGCAT	
msp β1 gene	taatcagag gaactcgagc aggcagctga aggtcttctg gctgctg	408
amplicon	TAATCTAGAG GAACTCGAGC AGGCAGCTGA AGGTCTTCTGCT GCT	

Fig 4. Sequence alignment of the *A. marginale* mspβ1 gene(GeneBank Accession No. M59845) and amplicon.

Diff-quick 및 acridine orange 염색에 의한 현미경검사와 중합효소연쇄반응을 병용하여 실시한 결과, 현미경검사결과 55%, 중합효소연쇄반응에서는 67%의 감염율을 나타내었다.

고 찰

산악지역이 대부분인 우리나라는 지난 20여년간 진드기의 매개에 의해 발생하는 theileriosis나 babesiosis와 같은 piroplasma병으로 축산농가가 경제적으로 심한 피해를 입어왔었으나^{13,27}, 소의 anaplasmosis 발생보고는 거의 접할 수가 없었다. 최근에 저자 등은 태반 감염에 의한 것으로 추정되는 어린송아지의 anaplasmosis 발생을 볼 수 있었는데¹⁴, 이것은 이미 이 지역에 *A marginale*가 상재하고 있었다는 것을 추정해 볼 수 있다. 그러나 소가 잠복감염상태일 때에는 임상 증상이 경미하고, 적혈구내의 감염율이 낮거나 형태가 뚜렷하지 않을 뿐더러, 이에 대한 신속하고 명확한 감별진단법이 국내에 아직 확립되어 있지 않았기 때문에 많은 임상수의사가 그동안 anaplasmosis의 발생을 소홀히 지나쳐 버렸을 것으로 생각된다.

지금까지 국내에서는 *Anaplasma* sp의 감별진단을 이들의 형태, 크기 그리고 적혈구내 위치 등의 현미경적소견에 의존했었다^{12-16,28}. 그러나 이러한 검사방법은 숙주가 임상증상을 나타내지 않거나, *Anaplasma* sp의 형태가 명확하지 않고 적혈구내 감염율이 저조하면 정확한 감별진단을 할 수 없으며¹⁶, 객관적인 기준보다는 주관적인 소견이 개입될 수 있어 감염진단의 신빙성이 떨어질 수 있다. 이와 달리 전자현미경적 관찰이나 역학조사 등에 근거한 진단은 명확할 수는 있으나, 진단에 장기간의 시간이 소요된다는 문제점이 있다²⁸. 현재 세계적으로는 특정 유전자만을 선택적으로 증폭하여 진단하는 PCR기법²⁹이 개발됨에 따라 기존의 진단방법을 대체해 나가고 있는 실정이다.

본 연구에서 전라북도 지역에서 사육중인 소의 *A marginale* 감염실태를 알아보기 위하여 혈액을 채취한 후 Diff-quick과 acridine orange 염색에 의한 현미경검사를 중합효소연쇄반응과 병행하여 실시하였다. 그 결과 현미경검사(55%)와 중합효소연쇄반응에 의한 검출율(67%)은 커다란 차이를 나타내지 않았지만, *A marginale*의 형태가 명확하지 않은 경우에는 현미경소견만으로 단정지어 진단할 수는 없었다. 그러나 Stich 등¹⁸이 보고한 *A marginale* membrane surface encoding gene의 sequence를 토대로 하여 BAP-2와 AL34S primer를 제작한 후 중합효소연쇄반응을 실시

한 후, 그 염기서열을 분석한 결과 증폭된 유전자가 *A marginale* mspβ1 gene임을 확인할 수 있었다. 즉 *A marginale* mspβ1 gene만을 특이적으로 증폭하기 때문에 다른 병원체나 이물 등과의 감별진단을 명확히 할 수 있었으며, 기존의 진단방법에 비하여 특이성과 신속성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

따라서 현미경검사와 중합효소연쇄반응을 병용하여 anaplasmosis의 진단을 실시한다면, 그 효율성과 신속성이 극대화될 수 있으리라 생각된다. 또한 중합효소연쇄반응을 이용하여 검사한 결과, 전라북도 지역의 *A marginale* 감염율이 의외로 높게 나타나는 것을 볼 수 있으며, 이로 인해 발생되고 있는 농가의 피해를 최소화하기 위하여 역학조사와 피해상황 등에 관한 세부적인 실태조사와 함께 이에 대한 시급한 예방 대책이 마련되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

소에 감염된 *A marginale*를 신속하고 정확하게 진단하고자 중합효소연쇄반응을 수행하였고, 증폭된 유전자의 제한효소절단 및 염기서열분석을 실시하였다. 또한 중합효소연쇄반응을 이용하여 야의 방목우의 감염율을 조사하여 본 바 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 중합효소연쇄반응을 이용하여 409 bp의 *A marginale* mspβ1 gene을 증폭할 수 있었다.
2. Cloning을 통한 제한효소절단 및 염기서열분석을 실시한 결과 증폭된 유전자가 *A marginale* mspβ1 gene임을 확인할 수 있었다.
3. *A marginale*을 중합효소연쇄반응으로 검출할 수 있는 target genomic DNA의 최소농도는 15 fg이었다.
4. 감염우의 혈액에서 target genomic DNA를 바로 추출한 후 중합효소연쇄반응을 실시한 결과, 409 bp의 *A marginale* mspβ1 gene을 증폭할 수 있었다.
5. 전라북도 지역의 야의 방목우 45두를 대상으로 현미경검사와 중합효소연쇄반응을 이용한 *A marginale* 검출율을 조사하여 본 결과, 각각 55%와 67%임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. McCallon BR. Anaplasmosis. *J Dairy Sci.* 1976; 59: 1171-1174.
2. Renshaw HW, Vaughn HW, Magonigle *et al.* Evaluation of free roaming mule deer as carriers of anaplasmosis in an area of Idaho where bovine anapla-

- smosis is enzootic. *Am J Vet Res.* 1977; 170: 334-339.
3. Zaugg JL, Kuttler KL. Bovine anaplasmosis: *In utero* transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. *Am J Vet Res.* 1984; 45(3): 440-443.
 4. Zaugg JL. Bovine anaplasmosis: Transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am J Vet Res.* 1985; 46(3): 570-572.
 5. Zaugg JL. Ovine anaplasmosis: *In utero* transmission as it relates to stage of gestation. *Am J Vet Res.* 1987; 48(1): 100-103.
 6. Jain NC. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. 4th ed, Lea & Febiger, Philadelphia: 1986; 589-626.
 7. Radostits OM, Blood DC, Gay CC. Anaplasmosis. In: *Veterinary Medicine*. 8th ed, Tindall, Bailliere: 1994; 963-972.
 8. Lincoln SD, Zaugg JL, Maas J. Bovine anaplasmosis: Susceptibility of seronegative cows from an infected herd to experimental infection with *Anaplasma marginale*. *JAVMA.* 1987; 190: 171-173.
 9. Jain NC. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia: 1993; 177-191.
 10. Kuttler KL. Clinical and hematologic comparison of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* infections in cattle. *Am J Vet Res.* 1966; 27: 941-946.
 11. Roby TO, Gates DW, Mott LO. The comparative susceptibility of calves and adult cattle to bovine anaplasmosis. *Am J Vet Res.* 1966; 27: 941-946.
 12. 전영, 한태우. 아나플라즈마병에 관한 혈청학적 분포조사. 농시보고, 12:57, 1969.
 13. 전영. 아나플라즈마병에 관한 연구. 대한수의학회지. 1978; 18(1): 19-22.
 14. 이주목, 권오덕, 송희종 등. 겨울철에 발생한 Holstein 송아지의 *Anaplasma marginale* 감염. 대한수의학회지. 1997; 37(4): 911-916.
 15. 손재영, 이현범, 장인호. 경북지방 산양에 발생한 Anaplasmosis, 경북대학교 논문집 제 9집. 1965; 99-109.
 16. 백병걸, 최인혁, 박강희 등. 재래산양과 호주산 산양에서의 Anaplasmosis 발생보고. 대한수의학회지, 1993; 33(2): 289-293.
 17. Barbet AF, Allred DR. The msp1 beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infect Immun.* 1991; 59(3): 971-976.
 18. Stich RW, Sauer JR, Bantle JA, et al. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in secretagogue-induced oral secretions of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the polymerase chain reaction. *J Med Entomol.* 1993; 30(4): 789-794.
 19. Stich RW, Bantle JA, Kocan KM, et al. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the polymerase chain reaction. *J Med Entomol.* 1993; 30(4): 781-788.
 20. Ge NL, Kocan KM, Murphy GL, et al. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in bovine erythrocytes by slot-blot and in situ hybridization with a PCR-mediated digoxigenin-labeled DNA probe. *J Vet Diagn Invest.* 1995; 7: 465-472.
 21. Gale KR, Dimmock CM, Gartside M, Leach G. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. *Int J Parasitol.* 1996; 26(10): 1103-1109.
 22. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
 23. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. In: *molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York. 1989.
 24. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitor. *Pro Natl Acad Sci.* 74; 5 463-5467.
 25. Kawasaki ES. Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press Inc: 146-152, 1990.
 26. 서명득, 장두환. 도입우의 진드기매개 주혈원충 감염상과 *Theileria sergenti*의 치료예방에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지. 1982; 6:33-57.
 27. 이주목, 김명철. 젖소의 파이로플라즈마증의 효과적인 집단검색과 치료방법에 관한 연구. 대한수의학회지. 1987; 27: 321-330.
 28. 백병걸, 김진호, 진찬문 등. 한우에 있어서의 *Anaplasma marginale*의 미세구조. 한국수의공중보건학회지. 1989; 13(3): 241-244.
 29. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Prime-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239:487-491.