

중합효소연쇄반응을 이용한 돼지 증식성 장염 진단기법 확립

임숙경 · 이희수 · 우승룡 · 윤순식 · 문운경 · 이유영 · 고흥범*

농림부 국립수의과학검역원
전남대학교 수의과대학*
(1998년 12월 2일 접수)

Establishment of a diagnostic method for porcine proliferative enteropathy using polymerase chain reaction

Suk-kyung Lym, Hee-soo Lee, Sung-ryong Woo, Soon-seek Yoon, Oun-kyong Moon,
Yoo-young Lee, Hong-bum Koh*

National Veterinary Research & Quarantine Service, Ministry of Agriculture & Forestry
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University Kanju, Korea*

(Received Dec 2, 1998)

Abstract : Porcine Proliferative Enteropathy(PPE) is an infectious enteric disease and a major cause of economic loss in swine industry due to weight loss, poor growth and sudden death in growing and finishing pigs at 6 to 20 weeks of age.

PPE has been diagnosed by clinical signs, syndrom and lesions in the intestine in Korea. However, the diagnostic method had several problems in the detection of infected or carrier pigs.

Therefore, in this study, we established the polymerase chain reaction(PCR) which was a fast, specific and sensitive method for identification of *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*). We designed and synthesized primer on the 16S rDNA and p78 gene encoding *L. intracellularis*. Specificity of the method was confirmed by comparison of the PCR results using other enteric bacteria and the study has shown that PCR method was sensitive to detect 1ng of genomic DNA as a template. Identity of the PCR products was confirmed by comparison of pattern of restriction endonuclease analysis with restriction enzyme *Hae* III and *Pst* I. Also, the PCR method was applicable to the naturally affected pigs with PPE.

Based on the results from this study, the PCR method could be used as a fast and specific diagnostic tool for PPE.

Key words : porcine proliferative enteropathy(PPE), diagnosis, PCR.

서 론

돼지 증식성 장염(Porcine Proliferative Enteropathy, PPE)은 *Lawsonia intracellularis*에 의해 발생하는 질병으로¹ 미국², 영국³, 오스트레일리아⁴ 등 세계 각 지역에 만연되어 있으며 우리나라에서도 황 등⁵에 의해 1995년 발생이 확인된 이후 지속적으로 발생되고 있는 질병이다. 주로 6~20주령의 비육돈의 출하시기에 소장 특히 회장 상피 세포의 증식과 이에 따른 점막비후가 특징이며 병변의 양상은 장선종증(intestinal adenomatosis), 괴사성 장염(necrotic enteritis), 국소성 회장염(regional ileitis), 증식성 출혈성 장병증(proliferative hemorrhagic enteropathy)의 4가지 형태로 나타나며^{6,7} 사료효율 저하, 중체량 감소, 시장 출하시기 지연, 폐사 등으로 인한 경제적 피해는 심각하다⁸.

이 질병의 원인균은 이 질병이 처음 알려진 초창기에는 캄필로박터균(*Campylobacter (Vibrio) sputorum subspecies mucosalis* 및 *C. hyointestinalis*)으로⁹ 믿어 왔으나 이들 균체에 대한 DNA 분석결과 DNA의 염기서열이 다른 것으로 밝혀졌으며 그후 순수 분리배양한 ileal symbiont intracellularis균을 돼지에 인공감염시켜 PPE을 유발시킴으로서 PPE의 원인체임을 확인하였으며¹⁰⁻¹² 1995년 공식적으로 *Lawsonia intracellularis*로 명명되었다¹.

이 세균은 그람음성의 곡선모양의 막대형태이며^{12,13} 일반 인공배지에서는 자라지 않으며 IEC-18(ATCC CRL 1589)이라는 랫트의 장세포주에서 가장 잘 자라며¹³ 발육란에서도 증식하지만 돼지에 대한 병원성은 상실하는 것으로 알려져 있다^{14,15}.

이 질병의 진단은 이 병의 전형적인 병리조직소견과 감염된 장조직이나 분변을 직접 Warthin-Starry와 같은 도염색을 실시하여 세포질내에 간균을 관찰하거나^{13,16} 단클론항체를 이용하여 간접형광항체법으로 진단해 왔다^{13,17}. 그러나 분변을 이용한 도염색이나 형광항체법은 비특이반응이 많이 나타나며 민감하지 못하기 때문에 널리 활용되지 못하며 장조직을 이용할 경우 폐사된 돼지에서만 가능하기 때문에 이 질병에 대한 역학조사나 경제적인 피해정도를 조사하는데 어려움이 많았다. 또한 이 질병의 원인체는 세포에서만 배양이 가능하며 배양조건도 까다롭기 때문에 원인체의 분리시도를 일반적인 진단방법으로 이용하는 데는 한계가 있다. 실제로

이 질병의 전파경로가 감염된 돼지의 분변을 통해 감염이 이루어지고 있어^{18,19} 분변을 이용한 진단방법이 확립되어 감염돈 및 보균돈을 검출하는 것이 무엇보다도 시급한 실정이다.

따라서 최근에는 DNA probe을 이용한 Hybridization 기법이나^{20,21} *L. intracellularis*만을 특이적으로 수신탄배 증폭하여 검출하는 중합효소연쇄반응(PCR, Polymerase Chain Reaction)이 이용되고 있으며 진단특이성이 높고 미량의 균이 감염되어 있어도 검출할 수 있어 분리, 배양이 어려운 이 질병의 진단에 가장 많이 이용하고 있다²²⁻²⁵. 그러나 우리나라에서는 이 균의 분리배양법이나 분자생물학적 기법을 이용한 진단방법이 확립되어 있지 않기 때문에 주로 양돈장내 발병상황, 임상증상, 육안적 및 조직병리학적 병변을 관찰하여 진단해왔다. 따라서 본 실험에서는 우리나라에서도 이 질병을 신속, 정확하게 진단하기 위해 multiplex PCR 기법을 확립하였다.

재료 및 방법

사용균주 : 본 실험에 사용한 *L. intracellularis* genomic DNA는 Minnesota 대학에서 증식성 장염으로 판정된 돼지의 장점막으로부터 분리한 DNA를 Dr. Connie Gebhart로부터 분양받아 실험에 공하였다.

Genomic DNA 분리 : DNA의 분리는 Jones *et al*²²의 방법을 변형하여 Guanidine thiocyanate(GuSCN)-diatomaceous earth(DE)을 이용하여 추출하였다. 감염된 장조직으로부터 점막을 유제한 후 750×g에서 10분간 원심분리하여 5µm와 1.2µm, 0.8µm로 여과한 후 다시 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 phosphate-buffered saline(PBS)로 부유시켰다. 여과된 장유제액 50µl에 동량의 20%(w/v) DE 부유액과 950µl의 lysis buffer(5M GuSCN, 22mM EDTA, 0.05M Tris HCl, 0.65% Triton X-100)를 혼합한 후 실온에서 30분간 방치시켰다. 이를 14,000g에서 20초간 원심분리한 후 lysis buffer를 제거하고 washing buffer(5.5 M GuSCN+0.05M Tris HCl(pH 6.4))로 2회 원심분리하였다. 침전물을 70% cold ethanol과 acetone으로 세척한 후 vacuum concentration system에서 20분간 건조시킨 후 PCR buffer에 용해시켜 4℃에 보관하였다. 추출된 DNA 농도는 spectrophotometer을 이용하여 260nm에서 OD를 측정하여 사용하였다. 특이성 검사에 사용된 세균은 증균배지에서 배양후 위와 동일한 방법으로 DNA를 분리하였다.

Table 1. Primer sets used for the optimization for the multiplex PCR and their expected size of amplified DNA

Primer	Nucleotide Sequence	Position of Sequence
878F	5'-TAACGCGTTAAGCACC-3'	868-883
1050R	5'-GTCTTGAGGCTCCCCGAAAGGCACCTCTTAATC-3'	1020-1052
C	5'-TTACAGGTGAAGTTATTGGG-3'	285-304
D	5'-CTTTCTCATGTCCATAAGC-3'	45-64

Primer 제작 : 본 실험에 사용한 878F와 1050R primer는 *L intracellularis* 의 16S rDNA를 encoding 하는 gene (GenBank accession number L08049)²⁴을, C와 D primer는 IS-intracellularis specific DNA clone p78을 encoding 하는 gene(GenBank accession number L15739)^{22,24}을 (주)한국생명공학연구소에 의뢰하여 합성제작하여 사용하였다. 작성한 primer들의 염기서열 및 그 위치는 Table 1과 같다.

PCR

반응조건 : Minnesota 대학의 Dr. Connie Gebhart로부터 분양받은 *Lawsonia specific DNA*를 사용하여 Cooper *et al*²⁴ 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 증류수 33.5µl에 10x PCR buffer(50mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8.3, 15mM MgCl₂) 5µl, 25mM MgCl₂ 4µl, 10mM dNTP 1µl, forward primer 1µl, reverse primer 1µl, template DNA 1µl, *Taq polymerase*(2.5U/µl) 1µl를 PCR tube에 넣은 후 thermal cycler (Perkin Elmer 9600)에서 증폭을 시도하였다.

PCR 반응온도의 조건은 Jones *et al*²²의 방법을 변형하여 실시하였다. 95℃에서 5분간 predenaturation 시킨 후 93℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간 35회 반복 실시한 후 마지막 extension은 72℃에서 7분간 실시하였다.

PCR 산물의 확인 : 12µl의 PCR 증폭산물은 2µl의 loading buffer(0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol)와 혼합한 후 2% agarose gel에 loading 하여 100V에서 1시간 TBE buffer(0.45M Tris base, 0.45M Boric acid, 0.01 M EDTA)에서 전기영동하여 EtBr(0.5µg/ml)로 염색한 후 UV light로 조사하여 확인하였다.

특이성 검사 : Primer의 특이성을 검사하기 위해 다른 장내 세균들은 증균배지에 배양하여 genomic DNA를 순수분리하여 동일한 조건하에서 PCR을 실시한 다음 PCR 증폭산물을 확인함으로써 특이성을 확인하였다. 특이성 검사에 사용한 균주는 증식성 장염과 임상증상이 유사

한 *Serpulina hyodysenteriae*, *Campylobacter jejuni* (ATCC 43440), *Campylobacter coli* (ATCC 43488), *Campylobacter lari* (ATCC 35221)와 주로 비육돈에서 문제시 되는 장내 세균인 *Clostridium perfringens* type C, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* 과 그외 장내세균으로 *Yersinia enterocolitica* (ATCC 55075), *Helicobacter pylori* (ATCC 43504), *Clostridium perfringens* type C, *E coli*, *Listeria monocytogenes* 을 사용하였다.

민감성 검사 : *L intracellularis* 의 genomic DNA를 1µg에서 1pg까지 10진 희석하여 이것을 template로 하여 PCR을 실시한 다음 증폭산물을 관찰함으로써 PCR 기법의 민감성을 조사하였다.

PCR 산물의 확인을 위한 제한효소 분석 : DNA의 제한효소처리를 이용한 분석은 Sambrook *et al*²⁶의 방법을 응용하였다. PCR로 증폭시킨 DNA를 1µg당 1-2 Unit의 제한효소로 37℃에서 1시간 반응시킨 후 1/6 volume의 loading buffer를 첨가하여 반응을 중지시켰다. DNA는 2% agarose gel 상에서 100V에서 1시간 전기영동한 후 EtBr (0.5µg/ml)로 염색하였다. PCR 증폭산물을 분석하기 위해 사용한 제한효소는 Genbank을 이용하여 분석한 결과 *Hae III*, *Pst I* (Gibco/BRL)을 선택하여 사용하였다.

결 과

PCR 반응조건 : PCR의 반응조건은 95℃에서 5분간 최초로 denaturation 시킨 후 55℃에서 30초간 annealing 한 후 72℃에서 30초간 extension 하고 다시 93℃에서 30초간 denaturation 하는 과정을 35회 반복한 다음 72℃에서 7분간 최종 extension 시켰다. 위와 같은 반응조건으로 Dr. Connie Gebhart로부터 분양받은 *L intracellularis* DNA에서 878F와 1050R primer는 182bp 크기, C와 D primer는 258bp 의 *L intracellularis* 특이유전자를 증폭할 수 있었다(Fig 1).

Fig 1. Establishment of the multiplex PCR using 878F&1050R and C&D primer sets.

M: DNA size marker(100bp ladder), lane 1: *L intracellularis* genomic DNA, lane 2: control reaction with template of porcine normal tissue.

PCR의 특이성 : 확립된 PCR기법의 특이성을 조사하기 위해 12개의 다른 장내세균의 유전자 증폭산물을 비교해본 결과 *L intracellularis* 에서만 특이유전자가 증폭됨을 확인할 수 있었다(Fig 2).

Fig 2. Specificity of the multiplex PCR using 878F&1050R and C&D primer sets.

M: DNA size marker(100bp ladder), lane 1: *L intracellularis* genomic DNA, lane 2: *Campylobacter jejuni* (ATCC 43440), lane 3: *Campylobacter coli* (ATCC 43488), lane 4: *Campylobacter lari* (ATCC 35221), lane 5: *Yersinia enterocolitica* (ATCC 55075), lane 6: *Helicobacter pylori* (ATCC 43504), lane 7: *Clostridium perfringens* type C, lane 8: *Salmonella choleraesuis*, lane 9: *Salmonella enteritidis*, lane 10: *Salmonella typhimurium*, lane 11: *E coli*, lane 12: *Serpuling hyodysenteriae*, lane 13: *Listeria monocytogenes*.

PCR의 민감성 : 확립된 multiplex PCR 기법은 *L intracellularis* genomic DNA를 1ng까지 검출이 가능하였다.

제한효소에 의한 PCR 산물의 분석 : 증폭된 PCR 산물이 *L intracellularis* 의 특이유전자 증폭산물임을 확인하기 위해 제한효소를 이용하여 분석한 결과는 Fig 4와

Fig 3. Sensitivity of the multiplex PCR assay for detection of *L intracellularis* genomic DNA.

M: DNA size marker(100bp ladder), lane 1~6: Genomic DNA serially ten fold diluted from 1µg to 1fg.

Fig 4. Analysis of *L intracellularis* amplified by multiplex PCR and digested with restriction endonucleases.

M: DNA size marker(100bp ladder), lane 1: Amplified PCR products, lane 2: 182bp fragment digested with *Hae* III, lane 3: 258bp fragment digested with *Pst* I.

Fig 5. Multiplex PCR amplification of *L intracellularis* DNA from the naturally affected pigs with PPE.

M: DNA size marker(100bp ladder), lane 1: *L intracellularis* genomic DNA, lane 2~5: PCR products from ileal mucosa of pigs, lane 6: No DNA control.

같다. PCR 증폭산물을 *Hae* III 와 *Pst* I 로 처리한 결과 182bp와 258bp의 증폭산물은 각각 64bp와 118bp, 62bp와 196bp의 fragment가 관찰되어 Genbank을 이용하여 분석

한 이들 fragment들이 확인되어 *L intracellularis* 유전자가 특이적으로 증폭됨을 확인할 수 있었다.

야외적용시험 : 특이성과 민감도가 확인된 primer을 이용하여 국립수의과학검역원에 의뢰된 가검물중 돼지 증식성 장염의 전형적인 출혈증상과 비후 등의 병변이 관찰된 조직을 PCR을 적용한 결과 4개의 야외시료로부터 182bp와 258bp의 특이 증폭산물을 확인할 수 있었다.

고 찰

최근 돼지 증식성 장염에 대한 관심이 높아지면서 미국, 영국 등 선진국에서는 이 질병에 대한 진단기법 개발, 배양조건 확립, 발병기전, 유효한 치료제 선별 등 여러방면에서 활발한 연구가 진행중에 있다^{2,4}. 초창기에는 이 병의 진단은 임상증상이나 육안적, 병리조직학적 소견과 병변을 silver stain 하여 장상피세포내에 간균을 관찰함으로써 진단해왔다⁶. 그러나 이 방법들은 사후검사에 의존하고 있어 역학조사시 보균돈을 검출하는데 어려움이 많아 이 질병을 monitoring 하는데 한계가 있으며 이 균의 분리법이 확립된 실험실에서는 원인체를 순수분리한 후 IEC-18 세포에 감염시켜 Warthin-Starry stain 하거나 형광항체법^{13,17}으로 진단할 수 있지만 도염색은 비특이반응이 많이 나타나며 형광항체법은 역학조사에 이용하기에는 민감하지 못하고¹⁹ 단클론항체 등이 필요하기 때문에 쉽게 이용할 수 없는 실정이다.

혈청학적 방법으로 ELISA법은 항체가 낮고 변이가 심하고 IgG가 이 질병의 변화 pattern과는 상관성이 낮아 이 질병이 진행된 돼지에서도 주로 IgA나 IgM만이 증가하는 것으로 알려져 있어^{27,28} 보균동물이나 병변을 나타내지 않은 돼지에서 혈청학적 방법으로 이 질병을 진단하기 또한 쉽지 않다.

최근에는 Dot-blot hybridization²⁹, PCR/Southern hybridization²², Nested PCR, Multiplex PCR^{22,23} 등의 분자생물학적 기법들을 이용하여 장조직 뿐만 아니라 분변에서도 이 질병을 진단하는데 널리 활용하고 있다. DNA probe를 이용한 Dot-blot hybridization 기법은 분변 1g당 10⁷개의 *L intracellularis*가 감염되어 있을 경우 검출가능하나³⁰ PCR 기법은 분변 1g당 10⁵개 감염시에도 검출할 수 있어 PCR 기법이 좀 더 민감한 방법으로 알려져 있으며 증식성 장염에 감염되어 임상증상을 나타내는 돼지는 분변 1g당 10⁷~10⁸개의 균을 분변으로 배출하기^{31,32} 때문

에 2가지 기법 모두 감염돈을 검출하는데 이용할 수 있으나 PCR 기법을 이용한다면 소량의 균을 배출하면서 만성적으로 농장에서 문제를 일으키는 보균돈이나 균이 많이 존재하지 않은 돈사바닥, 사료통 등 주위환경에서도 검출해낼 수 있을 것으로 생각된다. Nested PCR이나 PCR/Southern hybridization 기법은 민감성을 증가시킬 수 있는 방법으로 알려져 있으나 PCR 수행후 Southern hybridization나 1차 PCR 산물을 다시 증폭을 해야하는 번거로움이 있고 nested PCR의 경우 이전의 증폭산물로부터 오염가능성이 있어 본 실험에서는 2개의 primer 쌍을 이용하여 동시에 2개의 다른 PCR 산물을 증폭시키는 Multiplex PCR 법을 확립하였다.

본 실험에 사용한 *L intracellularis* genomic DNA은 증식성장염으로 확인된 돼지의 장점막으로부터 분리한 *L intracellularis* genomic DNA를 미네소타대학의 Dr. Connie Gebhart로부터 분양받아 시험에 공하였다.

Primer는 Jones *et al*²²이 *L intracellularis* 를 검출하는데 매우 특이적인 primer로 알려진 C, D primer를 이용하였으며 또한 878F와 1050R primer set는 16S rDNA 중에서 선택하여 *L intracellularis*에 대해 특이적일 뿐만 아니라 매우 conserved 한 sequence를 선택하였다. 또한 DNA fragment가 200bp 이상인 경우 오래된 시료에서 DNA를 온전히 보존하기 어렵기 때문에³³ 역추적조사시 큰 절편을 encoding 하는 primer의 이용은 한계가 있으나 본 실험에서 사용한 primer는 비교적 짧은 절편을 encoding 하여 Cooper *et al*²⁴은 paraffin block으로 보관중인 조직으로부터 DNA를 추출하여 이 기법을 적용하여 이 질병의 전염원이나 역학적인 조사에 이용하였다.

PCR이 성공적으로 이용되기 위해서는 template DNA 양, primer의 농도, dNTP의 농도, Mg²⁺ 농도, 반응온도 그리고 반응시간 등의 조건들이 적정해야 한다. 또한 분변이나 장 점막에는 PCR 반응을 저해하는 인자들이 많이 존재하고 특히 증폭산물이 작을 경우 위양성 산물이 생산되기 쉽기 때문에 시료를 끓이거나 희석하여 사용하는 등 순수 DNA를 분리하는 것이 중요하다. 따라서 본 실험에서는 비교적 간단하면서도 신속하고 재현성이 높으며 순수한 DNA를 추출할 수 있는 방법으로 알려진 GuSCN-DE 방법³⁴을 이용하여 DNA를 분리하여 시험에 이용하였다.

본 실험에서 특이성 검사에 사용한 균주들은 발생일령과 임상증상이 이 질병과 유사한 돈적리 및 *Campylo-*

bacter와 비교하였으며 그의 다른 장내 세균들과도 교차 반응이 없어 그 특이성이 증명되었다.

증식성 장염은 햄스터^{35,36}, 말³⁷, 사슴³⁸ 등에서도 이 질병이 보고되고 있으며 본 실험에서 확립한 multiplex PCR 법을 이용하여 이들 동물의 병변에서 분리한 세포내 세균에서도 돼지에서 분리한 *L intracellularis* 와 똑같은 PCR 증폭산물이 확인된 것으로 보아²⁴ 이들 동물의 세포내 세균과 *L intracellularis* 와 DNA sequence에 있어서 어떤 연관성이 있음을 짐작할 수 있으나 앞으로 이에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

현재 우리나라에서는 이 질병발생시 주로 병리조직소견을 통해 진단이 이루어지고 있어 뚜렷한 병변으로 진행되기전까지는 진단이 어려우며 임상증상은 나타내지 않으면서 계속적으로 균을 배출하여 농장에 만성적으로 문제가 되고 있는 보균돈을 검출하는데 어려움이 많다. 본 실험에서는 병성감정으로 의뢰된 돼지의 장조직만을 적용하였으나 분변을 이용하여 만성적으로 문제가 되고 있는 농장에서 보균돈을 검출하거나 급성으로 발생하여 신속한 진단을 필요로 할 경우에 확립한 multiplex PCR 기법을 이용하여 신속, 정확하게 진단할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 신속하고 정확한 진단을 바탕으로 우리나라에서도 이 질병의 발생상황, 발병요인 및 발병기전 등에 대한 활발한 연구가 이루어져야 할 것이다. 현재 우리나라에서는 이 질병발생시 외국분리주에 감수성이 있다고 보고된 tylosin, tiamulin, tetracycline³⁹ 등의 항생제를 무분별하게 사용하고 있어 내성균이 발생될 수 있어 이 질병의 원인균인 *L intracellularis* 를 분리하여 분리주에 대한 특성을 조사하여 우리나라 실정에 맞는 치료 및 예방대책이 요구된다.

결 론

돼지 증식성 장염은 주로 6~20주령의 비육돈에서 특이적인 회장염 소견을 나타내며 혈변, 설사, 식욕결핍, 우둔, 허약 등의 임상증상과 더불어 폐사, 사료효율 저하, 증체량 감소, 시장출하시기 지연 등으로 인한 경제적 피해는 심각하다. 우리나라에서도 1995년 최초로 보고된 이후 지속적으로 발생되고 있어 이 질병을 조기에 진단할 수 있는 정확한 진단기법이 요구되어지고 있으나 지금까지는 이 질병의 원인체인 *Lawsonia intracellularis* 가 일반 인공배지에서는 자라지 않고 랫드의 장세포에

서만 자라기 때문에 분리동정이 어려워 주로 병리조직소견에 의존하여 이 질병을 진단해왔다.

본 실험에서는 *L intracellularis* 에 대한 특이 primer를 작성하여 multiplex PCR 진단기법을 확립하여 민감도 및 특이성을 검사한 결과 genomic DNA 1ng까지 검출가능하였으며 *Campylobacter* 등 여러 장내세균의 시험에서 *L intracellularis* 에서만 특이적인 182bp, 258bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다. 또한 증폭된 PCR 산물의 identity는 제한효소로 분석하여 Genbank 분석결과와 비교함으로써 확인 가능하였으며 확립된 PCR 기법을 이용하여 병리조직소견에서 양성으로 판정된 4개의 야외시료에 적용한 결과 모두 특이 DNA를 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 배양이 까다롭기 때문에 분리동정이 어려운 이 질병의 진단에 본 연구에서 확립한 multiplex PCR 기법을 적용함으로써 보다 신속하고 정확한 진단이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. McOrist S, Gebhart CJ, Boid R. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int J System bacteriol*, 45(4):820-825, 1995.
2. Lomax GL, Glock RD. Naturally occurring porcine proliferative enteritis pathologic and bacteriologic findings. *Am J Vet Res*, 43:1608-1614, 1982.
3. Rowland AC, Lawson GHK. Porcine intestinal adenomatosis; a possible relationship with necrotic enteritis regional ileitis and proliferative hemorrhage enteropathy. *Vet Rec*, 97:178-180, 1975.
4. Holyoake PK, Cutler RS, Caple IW. Prevalence of proliferative enteritis on pig farms in Australia. *Aus Vet J*, 71:418-422, 1994.
5. 황의경, 김재훈, 정태성 등. 돼지의 증식성 장병증 (Proliferative Hemorrhagic Enteropathy) 발생증례보고. *농업과학논문집*, 37(1):495-500, 1995.
6. Lawson GH, Rowland AC. Porcine proliferative enteropathies. *Disease of swine*. ed 7 Ames IA Iowa state University press, pp.960-569, 1992.
7. Rowland AC, Lawson GHK. Intestinal adenomatosis in the pigs; a possible relationship with haemorrhagic

- enteropathy. *Res Vet Sci*, 18:263-268 1975.
8. Winkelman NL. Proliferative enteritis-"Ileitis". *Proc Am Assoc Swine*, 225-234, 1987.
 9. Gebhart CJ, Ward GE, Murtaugh MP. Species-specific cloned DNA probe for identification of *Campylobacter hyointestinalis*. *J Clin Microbiol*, 27:2717-2723, 1989.
 10. Gebhart CJ, Barns SM, McOrist S, *et al.* Ileal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *Int J Sys Bacteriol*, 43(3):553-538, 1993.
 11. Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP. Relationship between ileal symbiont intracellularis and porcine proliferative enteritis. *Infect Immun*, 60:4184-4191, 1993.
 12. Smith SH, McOrist S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res Vet Sci*, 62:6-10, 1997.
 13. Lawson GH, McOrist S, Jasni S, *et al.* Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy; Cultivation and maintenance *in vitro*. *J Clin Microbiol*, 31(5): 1136-1142, 1993.
 14. Ward GE, Harp KJ, Jones GF. Use of embryonating eggs for isolation of *Campylobacter* species from intestine of swine with proliferative enteritis. *Am J Vet Res*, 52(6):810-812, 1991.
 15. Jones GH, Ward GE, Collins JEL. Transmission of proliferative enteritis to swine by use of embryonating chicken eggs. *Am J Vet Res*, 54(8):1256-1261, 1993.
 16. Thompson SW, Hart RD. *Select histochemical and histopathological methods*. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, III 1966.
 17. McOrist S, Boid R, Lawson GH. Monoclonal antibodies to intracellular *Campylobacter* like organism of the porcine proliferative enteropathies. *Vet Rec*, 121:421-422, 1987.
 18. Mapother ME, Jones LA, Glock RD. Experimental reproduction of porcine proliferative enteritis. *Vet Rec*, 121:533-536, 1987.
 19. McOrist S, Lawson GH. Proliferative enteropathies; *Campylobacter* species in the faeces of normal and contact pigs. *Vet Rec*, 124:41, 1989.
 20. Gebhart CJ, Lin GF, McOrist S, *et al.* Cloned DNA probes specific for the intracellular *Campylobacter*-like organism of porcine proliferative enteritis. *J Clin Microbiol*, 29(5):1011-1015, 1991.
 21. Jones GF, Ward GE, Gebhart CJ, *et al.* Use of a DNA probe to detect the intracellular organism of proliferative enteritis in the feces of swine. *Am J Vet Res*, 54(10):1585-1590, 1993.
 22. Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP, *et al.* Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis in feces by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 31:2611-2615, 1993.
 23. McOrist S, Gebhart CJ, Lawson GH. Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol*, 41:205-212, 1994.
 24. Cooper DM, Swanson DL, Gebhart CJ. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from a hamster, horse, deer, ostrich using a *Lawsonia intracellularis* specific multiplex PCR assay. *Vet Microbiol*, 54:47-62, 1997.
 25. McCormick BM, Hasse D, Monkton RP. Detection of ileal symbiont intracellularis in porcine fecal sample by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 47:387-393, 1995.
 26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. A laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.
 27. Holyoake PK, Cutler RS, Caple IW, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for measuring ileal symbiont intracellularis-specific immunoglobulin G in sera of pigs. *J Clin Microbiol*, 32:1980-1985, 1994.
 28. Lawson GH, McOrist S, Rowland AC, *et al.* Serological diagnosis of the porcine proliferative enteropathies: Implication for etiology and epidemiology. *Vet Rec*, 122:554-557, 1988.
 29. Jones GF, Davies PR, Rose R, *et al.* Comparison of technique for diagnosis of proliferative enteritis of swine. *Am J Vet Res*, 54:1980-1984, 1993.
 30. Jones GF, Ward GE, Gebhart CJ, *et al.* Use of a DNA probe to detect the intracellular organism of proliferative enteritis in swine feces. *Am J Vet Res*, 54:

1585-1590.

31. McOrist S, Jasni S, Mackie RA, *et al.* Reproduction of porcine enteropathy with pure cultures of ileal symbiont intracellularis. *Infect Immun* , 61:4286-4292, 1993.
 32. McOrist S, Mackie RA, Neef N, *et al.* Synergism of ileal symbiont intracellularis and gut bacteria in the reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet Rec* , 134:533-536, 1994.
 33. Paabo S, Higuchi RG, Wilson AC. Ancient DNA and the polymerase reaction, the emerging field of molecular archeology. *J Biol Chem* , 264:9709-9712, 1989.
 34. Boom R, Sol CJA, Salimans MM, *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acid. *J Clin Microbiol* , 28:495-503, 1990.
 35. Frisk CS, Wagner JE, Owens DR. Hamster enteritis ; A review. *Lab Anim* , 11:79-85, 1977.
 36. Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, *et al.* Intracellular Campylobacter like organism from ferret and hamsters with Proliferative bowel disease is a desulfovibrio spp. *J Clin Microbiol* , 32(5):1229-1237, 1994.
 37. Williams NM, Harrison L, Gebhart CJ. Proliferative enteritis in a foal caused by *Lawsonia intracellularis* - like bacteria. *J Vet Diagn Invest* , 8:254-256, 1996.
 38. Drolet R, Dai Y, Kohn D. Proliferative enteritis in white tailed deer. *J Vet Diagn Invest* , 8:250-253 1996.
 39. Moore GM, Shryock TR. *Lawsonia intracellularis* and swine enteric disease. *The compendium* , Food animal: S12-S17, 1996.
-