

## 국내 소 분변 및 소장조직으로부터 *Mycobacterium paratuberculosis* 분리

조동희, 정석찬, 정병열, 우계형,  
윤용덕, 윤상보\*, 박용호\*\*

국립수의과학검역원, \*축산기술연구소, \*\*서울대학교 수의과대학

Fecal materials and mesenteric lymphnodes from asymptomatic cattle confirmed to be infected with Johne's disease by ELISA were decontaminated with 1% hexadecylpyridinium chloride (HPC) for 20~24 hours at room temperature and inoculated into herrold egg york medium (HEY) supplemented with mycobactin J. Simultaneously the pathologic lesions were examined with morphological characteristics and staining properties. After 12~16 weeks incubation at 37°C, typical acid-fast mycobacteria were isolated. By inoculating the 6 isolates into Bactec 460 TB bottle, mycobactin J dependency was monitored for 8 weeks and confirmed as *M. paratuberculosis*. The 21 isolates including these 6 ones showed the PCR products of 229 base pair which originated from IS900. It's the first time that *M. paratuberculosis* are isolated from asymptomatic cow in Korea.

## 서론

*Mycobacterium paratuberculosis*는 반추동물에서 만성장염을 일으키는 항산성 세균의 일종으로서 성장속도가 느려 균 집락 형성은 *Mycobactin*이 함유된 배지에서 최대 6개월이 소요된다. 현재 이 질병은 전 세계적으로 양축가에 큰 경제적 피해를 입히고 있으며, 한국에서도 병리조직학적(3) 또는 혈청학적 검사로(4) 요네병이 의심되는 경우는 보고되었으나 균을 분리하는 방법이 매우 까다로워 쉽게 균을 분리하고 있지는 못한 실정이다. 따라서 저자들은 ELISA에 의해 요네병으로 진단된 한우 및 유우의 분변과 소장 조직을 분리재료로 삼아 PCR에 의해 IS900 유전자가 증폭되는 항산성 세균 21주를 분리하였다. 본 실험에서는 *Mycobactin* J 의존성 실험, PCR등을 실시하여 분리균이 *M. paratuberculosis*임을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

ELISA에 의해 요네병 양성으로 확인되었으나 특별한 임상증상을 나타내지 않은 3개 목장 젖소 및 한우의 분변과 장간막 임파절, 소장 조직을 균분리 재료로 사용하였다.

### 병리조직학적 염색

병리조직학적 소견을 관찰하기 위하여 채취한 소장조직을 10% 완충포르말린용액에 넣어 고정시킨 후 파라핀으로 포매하여 3 $\mu$ m의 두께로 절편하였다. 이를 H&E 염색과 항산성염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 초대분리 배양

가검재료는 1% hexadecylpyridinium chloride(HPC)로 실온에서 20~24시간 처리하여 오염세균을 제거하였다. 분리배지는 *Mycobactin* J(2mg/L)가 함유된 herrold egg yolk medium(HEY)을 사용하였으며 37 $^{\circ}$ C에서 12~16주간 배양하면서 매주 집락의 형성유무를 관찰하였다.

### PCR

요네균 genomic DNA의 분리는 Boom등의 방법에 의해 guanidinium thiocyanate를 이용하여 추출하였으며<sup>(2)</sup> *M. paratuberculosis*에 특이적인 IS900유전자 부위를 PCR기법으로 증폭하여 229bp의 증폭산물을 확인하였다<sup>(4)</sup>.

### *Mycobactin* J 의존성 시험

*M. paratuberculosis* 표준균주로 등록되어 있는 ATCC 19698 과 PCR기법으로 확인된 요네균 양성 21주 중 6주의 야외 분리균주를 이용하여 *Mycobactin* J 의존성 실험을 실시하였다. Bactec<sup>®</sup> 460TB system을 사용하여<sup>(1)</sup> *Mycobactin* J(Allied Monitor, USA)가 함유된 Middlebrook 7H12 배지와 함유되지 않은 배지에 균을 접종하고 8주 동안 성장지수를 조사하였다.

### 병리조직학적 관찰

가검물중 일부 개체는 회장의 용모가 위축되어 있고, 짐막고유층에는 핵이 원형 또는 난원형의 형태로 변연부에 치우쳐서 위치하며 포말성

의 세포질이 풍부한 전형적인 유상피세포와 다핵거대세포, 소수의 림프구가 침윤되어 심하게 비후되었으며, 이로 인해 Lieberkuhn's crypts 가 소실되거나 다소 변형되어 있어 전형적인 요네병 조직 병변을 나타내었다. 또한 병변조직에 대한 항산성염색 결과, 유상피세포와 다핵거대세포의 세포질 내에 담적색의 항산성세균을 확인할 수 있었다.

### 초대분리 결과

HEY배지에 가검재료를 접종한 후 16주 동안 매주 집락의 형성을 관찰하였으며 항산성 염색, 발육속도 및 집락의 색깔, 모양에 의해 요네균으로 의심되는 항산성 세균 42주를 분리하였다.

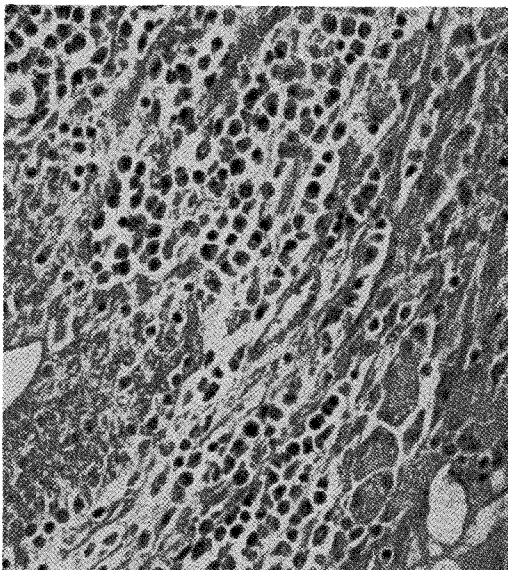


Figure 1. Ileum showing typical feature of paratuberculosis (H&E stain  $\times 400$ )

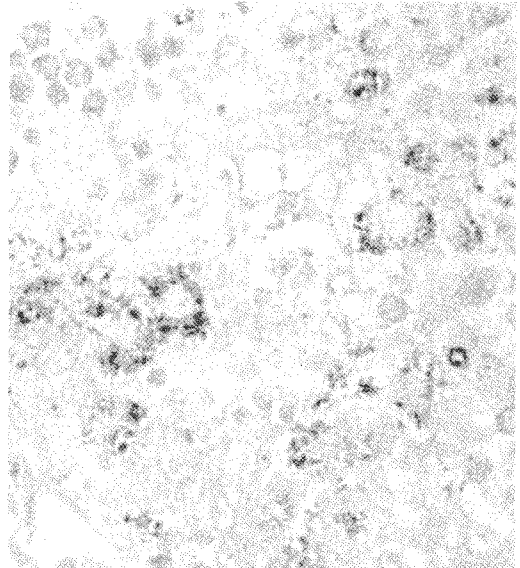


Figure 2. Section of ileum containing large numbers of *M. paratuberculosis* (Ziehl-Neelsen  $\times 400$ )

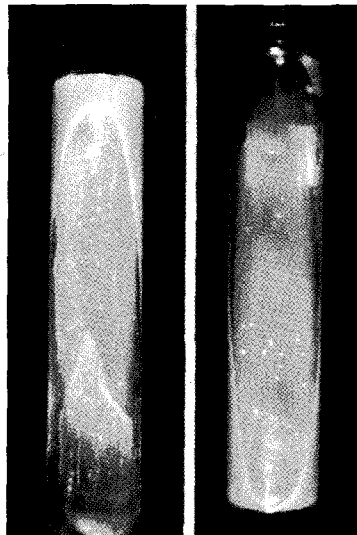


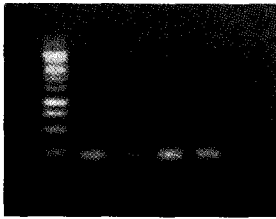
Figure 3. Colonies of isolated Mycobacteria on HEY medium

### Polymerase Chain Reaction

항산성세균 42주의 집락으로부터 genomic

DNA를 추출하고 PCR을 실시하여 3개 목장 21두로부터 229bp의 증폭산물을 확인하였다.

1 2 3 4



←229 bp

Figure 4. Detection

of IS900 gene from isolates by PCR assay: lane 1-3. isolates; lane 4. *M. paratuberculosis* 19698

### 분리주의 Mycobactin J 의존성 시험

Table 1. Effect of Mycobactin J on growth of *M. paratuberculosis* in Bactec 12B medium.

Strains	Mycobactin J	Growth Index by day after inoculation of the Mycobacterium						
		1	4	9	14	28	42	56
ATCC 19698	+	9	20	688	999	999	999	999
	-	12	8	9	9	0	6	4
350	+	31	74	999	999	999	999	999
	-	30	31	42	31	24	12	4
352	+	18	41	695	999	999	999	999
	-	23	25	33	26	18	10	5
202	+	49	191	999	999	999	999	999
	-	44	94	159	162	166	76	32
206	+	6	12	179	999	999	999	999
	-	6	7	9	8	9	9	4
354	+	17	55	981	999	999	999	999
	-	15	21	26	23	18	10	5
SH	+	24	29	60	133	999	999	999
	-	25	31	44	43	52	32	16

HEY배지에 형성된 집락을 MJ가 첨가된 Middlebrook 7H12와 첨가되지 않은 배지에 균주를 1차 접종하고, 이것을 다시 접종액으로 하여 동일한 배지에 2차 접종했을 때 6주의 분리 균주 모두 Mycobactin J 의존성을 나타내었다.

가검물로부터 *M. paratuberculosis*를 분리하기 위해서는 시료 중 오염세균의 효과적인 제거와 함께 mycobactin이 함유된 배지에 장기간 배양하는 것이 필요하다.

요네균에는 영향을 주지 않으면서 오염세균은 효과적으로 제거하기 위해 2% NaOH, benzalkonium chloride 등을 이용해 왔으나 최근에는 *M. paratuberculosis*중 일부 균주가 민감하게 반응한다는 것이 알려지면서 HPC를 이용하고 있다. 본 실험에서는 가검물을 1%HPC로 20~24시간 처리하여 배양하였다. 초대분리 배지를 Middlebrook 7H12로 사용할 경우에는 HPC만으로는 곰팡이로 인한 오염을 방지할 수 없었으나 HEY를 사용하는 경우에는 효과적으로 미생물의 오염을 방지할 수 있었다.

IS900 유전자는 *M. paratuberculosis*에 특이적으로 존재하는 것으로 알려져 있으며, 여러 연구자들은 요네균을 확인하는데 이 유전자의 검출을 이용하고 있다. 본 실험에서도 분리한 균주에 대하여 PCR기법을 수행하여 229bp를 증폭함으로써 21개의 분리주가 요네균임을 확인하였다.

*M. paratuberculosis*는 *Mycobacterium avium*에 속하는 일부 세균들과 함께 실험실에서 배양시 반드시 Mycobactin으로 알려진 iron-chelating agent를 첨가해 주어야 한다. 주로 사용되는 Mycobactin으로는 *M. phlei*로부터 추출한 Mycobactin P와 *M. paratuberculosis* P18로부터 얻어진 Mycobactin J가 있으나 일부 요네균은 Mycobactin P에 의해 성장이 촉진되지

않고, Mycobactin J가 Mycobactin P에 비해 요  
네균의 발육속도를 빠르게 하는 것으로 알려  
져 있다. 따라서 본 연구에서는 21주중 6개의  
분리균주에 대한 Mycobactin J 의존성 실험을  
실시하여 M. paratuberculosis임을 재확인할 수  
있었다.

ELISA에 의해 요네병으로 진단된 젖소 및 한  
우의 분변과 소장조직을 배양하여 21주의 M.  
paratuberculosis를 분리함으로써 특별한 임상  
증상 없이도 우유 및 분변 중에 요네균이 배  
설될 수 있음을 확인하여 이에 대한 예방대책  
이 필요한 것으로 생각된다.

**참 고 문 헌**

1. Cousins DV, Evans RJ and Francis BR. : Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for Mycobacterium paratuberculosis. Aus Vet Sci, 1995; 72(12) : 458-462
2. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, et al : Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol, 1991 ; 29(9) : 1804-1811
3. 진영화, 정운채, 권영방등 : 국내에서 발생한 한우 Johne's Disease의 병리학적 관찰. 대한수의사회지, 1984; 20(5) : 298-303
4. 김종만, 안중삼, 우승룡등 : 면역학적 방법에 의한 한우와 유우의 요네병 발생조사. 대한 수의학회지, 1994; 34(1) : 93-97

# 소동물 피부학 번역 발간

## (Muller & Kirk's SMALL ANIMAL DERMATOLOGY)


**□ 역 자 :** 이승진(부산 지동병, 이승진 동물병원)  
\* 김민희(소동물 정형외과, 소동물 정형외과 접근법)

**□ 특 소 기**

- 신개념적인 수의 피부학의 바이블
- 총 1,200여페이지(1,400여장의 컬러 및 흑백사진)
- 알기 쉽고 임상에 적용하기 쉬운 진단 및 치료법으로 임상수의사들이 의문스러워 하는 피부병에 관한 모든 대답을 드립니다.

**□ 판 매**

- 가격 : 110,000원
- 송금 : 주택은행 939702-01-097077 (예금주 : 이승진)
- 문의 : 부산지동병 · 이승진 애견종합병원(051-515-7450, 011-533-9711)



2000년 2월말을 목표로 소동물정형외과 개정판을 준비중입니다. 구입하실 분들의 문의를 받고 있습니다. 또 일요일마다 소동물 골절 및 정형외과 질환의 치료에 대한 실습위주의 세미나를 개최할 계획으로 있으며, 관심 있는 원장님들의 많은 문의를 바랍니다.