제 3차년도
최종보고서

우결핵 진단을 위한 PCR 기법의 개발

Development of polymerase chain reaction for diagnosis of bovine tuberculosis

전 남 대 학 교

농 림 부

최 종 보 고 서

1997년도 농림수산특정연구사업에 의하여 완료한 우결핵 진단을 위한 PCR 기법의 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1997. 12. .

주관 연구 기관 : 전 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 교 수 박 남 용

주관연구기관장 : 전남대학교 총장

농 림 부 장 관 귀하

제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “우결핵 진단을 위한 PCR 기법의 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 12. .

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 교수 박 남 용

요 약 문

I . 제 목

우결핵 진단을 위한 PCR 기법의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우결핵은 인수공통질병으로서 중요성이 지금까지 크게 대두되고 있으며, 국가적인 차원에서 다양한 방역대책이 이루어지고 있다. 대부분의 나라에서 실시하고 있는 우결핵 양성우에 대한 살처분은 근본적인 전파의 차단을 목적으로 수행하고 있지만 여전히 튜버쿨린 진단에 의한 양성반응율은 감소하지 않는 실정이며 최근에는 오히려 증가하는 추세이다.

특히 우리나라의 경우, 지난 1979년의 한 보고에 의하면 대체적으로 우결핵 검색율은 0.1%내외로 굳어지고 있는것 같다고 하였으나 1991년 부터는 우결핵 검색 양성율이 다시 증가하기 시작해 '93년에는 양성 발생 두수가 146두로 나타나 '92년도의 82두에 비해 1.8배 증가되었다고 보고되었다.

우결핵을 진단하는데 아직까지 튜버쿨린 검사방법이 우리나라를 포함해서 널리 사용되고 있는 면역학적 검사방법으로 1891년 로버트 코흐가 최초로 튜버쿨린 반응을 기술한 이래 사람과 동물의 결핵진단에 큰 공헌을 해 온 것이 사실이다. 그러나 어떤 상황에서는 튜버쿨린 반응의 민감성이 크게 저하되는 점이 문제점으로 지적되었다. 1978년 한 보고에 의하면 소에서 단독피내 튜버쿨린 접종검사(SIDT)의 민감성은 평균 72%에 불과하였으며, 보다 최근(1991)의 연구에 의하면 SIDT의 민감성은 65.5%로 나타났다.

튜버쿨린 반응검사에서 양성으로 판정된 결핵우의 부검소견에서 결핵의 특징적

인 병변인 폐문 림프절을 포함한 각 림프절과 기타 실질 장기에서의 육아종성결절이 존재하지 않는 예가 많이 나타난다. 이러한 위양성 반응은 다른 비정형 마이코박테리아와의 항원교차반응의 결과 등 여러 요인들에 의해 발생하는 것으로 사료되고, 이 진단 방법의 소요 기간은 튜버쿨린 접종 후, 3일 동안 기다려야 하는 점, 또 그 소는 60-90일 동안 재검사할 수 없는 점 등 우결핵 진단을 위한 새로운 정확한 기법의 개발이 요구되는 시점이다.

특히 경제성장과 더불어 국민 식생활에도 많은 변화가 나타나 식육이나 우유및 유가공품의 소비가 급격히 늘어가고 있는 추세여서 우결핵의 원인체인 Mycobacterium bovis가 사람에도 감염을 일으킬수 있다는 점은 우결핵으로 인한 생산성의 저하 등으로 막대한 경제적 피해를 입게 되는 점과 함께 우결핵에 특히 관심을 갖게되는 주된 이유가 되고 있다.

우결핵의 원인체인 M.bovis가 소에서 사람으로 전파되는 유형은 첫째 우유를 통한 감염으로써 지금은 이러한 사실이 너무나 잘 알려져 있어 그 방제대책으로 발생이 거의 없다고 볼수 있으나 지난 세기 중에는 모유를 먹인 어린이 보다 우유를 먹였던 어린이에서 결절성 경부림프선염이나 연주창의 발생이 훨씬 더 흔했던점 등, 우유가 어린이 결핵의 감염원이라는 역학적 증거들이 강력히 제시된 바 있다.

이와같이 우결핵균이 소에서 사람으로 전파되는 주요 양상이 밝혀짐에 따라 각 국가마다 이러한 전파를 차단시킬 강력하고 효과적인 대책들이 수립되므로서 M.bovis로 인한 사람의 결핵감염을 근절시키는데 많은 노력을 기울이고 있어 그 발생이 흔치는 않으나 영국, 미국등 선진국에서도 아직 완전한 박멸이 이루어지지는 않은 상태이다.

한편 우결핵의 감염으로 인한 경제적인 손실 또한 막대한데 우선 결핵에 걸린 동물들은 체중 감소, 생산연령이나 번식성 감소와 일반적인 생산성 감소가 있으며 사료효율이 떨어지고 함께 사육되는 송아지, 육성우, 돼지등에도 우유나 접촉을 통해 감염을 일으키기도 한다.

또한 결핵의 확진을 위해서는 결핵균의 배양검사가 필요한데 균분리 배양검사는 균종동정이 가능해 특이성이 높고 비교적 소수의 균도 검출이 가능하고 감수성도 높은 편이지만 검사 과정이 복잡해서 비용도 많이 들고 잘 훈련된 요원에

의해서만 행할수 있으며 검사결과가 5-8주 이상 걸려 조기진단방법으로는 부적합한 경향이 있다. 따라서 보다 민감하고 특이하면서 신속하고 정확한 진단법의 개발에 대한 필요성이 오래전부터 인식되어 왔으며 꾸준히 연구되어오고 있는 실정이다. 우리나라의 경우 인의에서는 이미 DNA증폭에 의한 PCR기법이 일상적인 진단 방법으로 응용되고 있으나 수의분야에서는 아직 그 개발이 실현되지 않고 있는 실정이다.

이러한 상황에서 본 연구에서는 인의에서 PCR기법을 응용하여 일상적인 결핵진단에 성공한 바, 수의·축산분야에서도 첨단 분자생물학적기법인 PCR기법을 확립함으로써 기존의 진단 방법에서 발생한 위양성에 의한 경제적 피해를 최소화할 수 있도록 함에있다.

또한 가축위생 시험소에서 튜버쿨린 피내 반응결과 양성으로 판정된 결핵우를 확인하기 위하여 각 림프절등을 비롯하여 기타 다른 장기와 분변, 오줌, 비루, 혈액 등 비교적 채취하기 편리하다고 인정되는 각종 시료를 채취하여 우결핵 진단방법으로 민감도와 특이도가 높은 유전공학적 기술인 in situ PCR기법을 실용화할 수 있게 하여 기존의 균배양 특성, 항산성 염색 및 생화학적 실험에 의한 동정법보다 신속하고 간편하게 M bovis를 확인하므로써 우리나라에서 우결핵의 박멸이 조기에 실현될 수 있도록 하고자 한다

III. 연구개발 내용 및 범위

우결핵균을 살균처리하여 여과액을 화학처리한 정제 항원인 PPD-T (Purified Protein Derivative Tuberculin)우결핵 진단액을 사용하여 피내접종을 실시하여 검진한 결과 최종 결핵 양성 판정되어 살처분된 소를 대상으로 폐문림프절, 악하, 이하, 장간막 및 상유방림프절등 5종의 림프절과 폐조직, 간, 신장 및 비장 등의 실질장기를 채취하여 육안소견 조사, 병리조직학적 검사, 균분리배양 및 액상 PCR용 실험재료로 사용하였다. 또한 림프절 및 실질장기 파라핀 포매조직과 유즙, 콧물, 혈액, 분변, 오줌 등의 체액을 채취하여 *in situ* PCR에 의한 우결핵의

진단을 위한 재료로 선택하였다. 이와 같은 실험재로를 가지고 우결핵 진단을 다음과 같이 수행하였다.

각종 림프절과 폐, 간장, 신장 및 비장등의 실질 장기를 통상적인 부검술식에 따라 면밀히 관찰하여 육안소견을 기록하였으며, 병리조직학적 검사를 위해 각 장기를 채취하여 중성 포르말린에 고정한 후 포매하여 마이크로톰을 이용 절편을 제작하고 염색을 실시하여 육아종성 염증의 특징적인 거대세포들이 침윤하고 있는 결핵결절 소견을 광학연구 현미경을 이용하여 관찰하였다.

폐 및 림프절의 병소부위 조직을 무균적으로 취하여 잘게 세절한 후, 멸균 생리식염수와 함께 완전 마쇄하여 균질액상으로 만들고, 전처리된 조직부유액은 희석하여 원액과 함께 BM배지에 접종하여 배양하여 항산성 결핵균의 발육을 관찰하였다.

조직을 세절하여 bead beater에서 진탕시킨후 원심시키고, 상층액을 조심스럽게 버린후, 중화시켜 bead beater에서 진탕시키고 원심시켜 세균이 상층액에 부유하게 하였다. 상층액을 eppendorf tube에 옮긴후 원심시켜 결핵균을 가라앉힌 후 Proteinase K를첨가하여 lysis시켰다. Proteinase K를 불활화한 후 원심하여 DNA를 준비하고 PCR전에 4℃ 또는 -70℃에서 보관하였다.

우결핵의 원인체로 알려진 *M. bovis, M. tuberculosis*등을 검출하기 위한 primer는 *M. tuberculosis*를 포함한 *M. bovis, M. microti, M. africanum*과 반응할 수 있는 IS1081과 또한, 특이적으로 *M. tuberculosis*에서만 증폭산물을 만드는 mpt40을 이용하였다. 이중 PCR을 위한 primer의 제조는 *M. bovis* IS 987의 염기서열을 참고하여 2쌍을 제조하였다. 각각의 Primer는 한국생공 (Korea Biotech, Korea)에 의뢰하여 합성하였으며 PAGE 법으로 정제한 후 사용하였다.

시료에서 추출한 DNA를 사용하여, 시험관에 미리 준비한 PCR용 반응액을 넣고 표준 결핵균 DNA와 검체 DNA를 각각 넣어 Mineral Oil을 가하여 반응액의 증발을 막았다.

음성 대조로 검체 DNA 대신 멸균 증류수와 용해 완충액을 각각 넣은 후 시행하였다. DNA Thermal cycler에 옮겨 preheating한 후, denaturation, annealing, extension 일련의 과정을 1주기(cycle)로 하여 반복하였으며, 마지막 1주기는

extension을 10분으로 연장하였다. 이중 중합효소 연쇄반응법의 검체 DNA로는 first PCR 산물을 사용하였으며, 일련의 과정을 1주기로 하고, 30주기 후 마지막 1주기는 extension을 연장하였다.

PCR산물의 검출 및 확인위해 수평형 잠수식 전기영동을 하였으며, 사진 촬영하여 DNA band 유무를 확인하였다.

DNA 양에 따른 PCR의 예민도를 측정하기 위하여 표준 결핵균주의 DNA 추출물을 이용하여 분광광도계로 농도를 측정하였고, 이를 희석하여, DNA size marker와 함께 전기영동하여 표준균주의 DNA를 확인한 후, DNA의 농도별로 PCR을 실시하여 전기영동으로 반응산물의 존재 유무를 관찰하였다. 또한 이중 PCR의 예민도 역시 증폭된 single PCR 산물을 취하여 관찰하였다.

PCR 검사에서의 오염이나 carry over등을 배제하기 위하여 검체 DNA의 추출 과정과 증폭과정은 서로 다른 장소에서 실시하였으며, 1회용 피펫 tip과 microcentrifuge tube등은 멸균하여 사용하였고, 반응에 사용된 시약은 검체 DNA와 primer를 제외하고 전반응액을 준비하였으며, 결과가 의심스러울 때는 DNA추출을 다시 시행하였다.

10% 중성 포르말린에 고정하여 파라핀포매한 조직을 일반조직 마이크로톰을 이용하여 절편하여 특수 표면처리된 *in situ* PCR용 슬라이드에 붙여 굳인 후 사용하였다. 유즙 및 비즙의 체액을 멸균생리적 식염수로 희석한 후 원심을 실시하여 침전된 하층의 세포를 수집하여 냉장에서 굳인 후 중성포르말린에 고정하여 파라핀 포매하였으며, 일부 체액은 시료채취 즉시 중성 포르말린과 혼합하여 고정한 후 원심, 멸균 PBS로 희석하여 동일 조건에서 원심하여 침전된 하층의 세포를 수집하여 파라핀 포매하여 조직을 5㎛ 의 두께로 절편하여 특수 표면처리된 *in situ* PCR용 슬라이드에 붙인후 사용하였다.

in situ PCR 전처리반응을 시킨 후, 조직을 Kimwipe를 사용하여 조직 주변부의 PBS를 제거하는데 조직의 수분이 마르지 않도록 주의를 요한다. 조직의 세포막, 핵막 단백질을 제거시키기 위해 Proteinae K를 분주한 후 coverslip으로 덮고 37℃에서 습도를 유지하며 1시간 반응 시킨 다음 95℃의 heat block에 1분간 처리하여 protease의 반응을 중지시켰다. 탈수과정으로 80% ethanol 5분, 95% ethanol 5분, 100% ethanol으로 처리 후 건조시켰다.

Protease처리된 슬라이드에 대하여 *in situ* PCR 반응을 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 모든 반응액의 최종량은 50㎕로 하였으며 PCR reaction 혼합액은 사용전 5분전에 70℃ 상태하에서 사용하였으며, 검사조건의 동질성을 유지하기 위하여 사전에 제조하고 분주하여 -70℃에 보관하고, PCR을 시행할 때마다 필요한 만큼 꺼내어 사용하였고 Amplicover Disc 와 Clips을 장착하여 *in situ* PCR 반응하였다.

음성 대조로 결핵에 감염되지 않은 소의 실질장기 조직과 primer 및 Biotin-11-dUTP를 넣지않으므로써 대조로 잡았다.

in situ PCR 산물의 검출 및 확인은 *in situ* PCR을 실시한 후 대조염색 시켜 Crystal mount액 으로 coverslip덮은 다음 현미경하에서 검경 하였다. 대조군에 대한 실험을 한 슬라이드상에서 똑같은 조건으로 반복실험을 시행하였다.

이상의 수행범위를 완료하므로써 현재까지 우결핵 진단에 이용되고 있는 튜버쿨린 진단방법의 문제점을 확인하고, 더 나은 진단기법인 PCR기법을 확립하였다.

우결핵 방제사업대책상 가장 중요한 부분인 실용적인 진단기법의 개발을 위해 본 연구과제의 최종목표인 민감도와 특이도가 높은 분자생물학적 진단 기법을 최근 전 세계적으로 각광을 받고 있는 *in situ* PCR기법을 확립하고자 하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

튜버클린 피내 접종 검사 결과 양성우로 판정된 69두의 부검시 육안적 소견은 33두에서 결핵 결절 등의 우결핵 병변이 관찰되었고 나머지에서는 결핵결절 등의 우결핵 병변으로 판단될 수 있는 병변이 관찰되지 않았다. 공시된 소의 육안적 병변의 출현 빈도는 폐문 림프절, 장간막 림프절, 폐, 악하 림프절, 이하 림프절 순으로 나타났다.

총 검사 두 수 69두를 대상으로 주로 폐조직과 림프조직에서 결핵결절 관찰목적으로 10% 중성 포르말린에 고정하여 절편을 제작, H&E 염색하고 현미경 소견을 관찰한 바 육안적으로 병변이 관찰되었던 33두에서는 전형적인 육아종성 염증인 결핵 결절 소견을 확인 하였다. 즉, 병리 조직학적 소견상, 결핵 결절 병소는 결절부의 중심부에 건락 괴사소견이 있고, 이 괴사소를 유상피 세포층으로 둘러싸여 있는 경우와 없는 경우 등 다양하게 나타났다. 또한 림프구가 많이 침윤되어 있고 다핵성의 랑한스 거대세포가 섞여서 출현하며 그 주위에는 섬유아세포가 증식하는 전형적인 결핵 결절성 육아종 형태를 보이는 병소도 관찰되었다.

각 검체의 조직 침사를 멸균 생리 식염수로 5배, 10배 희석한 후, 희석 전의 원액과 함께 BM배지에 접종하여 37℃에서 5-10주간 배양하면서 균 발육성상을 관찰하였다. 총 69두의 검체중 46두에서 항산성균을 관찰하였는데, 병소가 관찰된 33두에서는 모두 배양검사상 양성소견을 보였고 나머지 13두는 육안적으로 병변이 관찰되지 않았던 무병소우에서도 항산성균의 관찰이 확인될 수 있었다. 채취된 분변 30건의 우결핵균 배양결과 12건에서 결핵균이 검출되었다.

공시된 젖소 69두를 대상으로 IS1081 및 mpt40 유래 Primer와 IS987유래의 outer primer를 이용하여 결핵 병변이 관찰된 87개의 검체를 대상으로 단일 PCR을 수행한 결과 거의 모든시료에서 특이 DNA band를 확인할 수 있었다.

또한 튜버클린 양성우이지만 육안적 병소가 관찰되지 않은 무병소우의 검체에서도 PCR 산물을 관찰할 수 있었다. 단일 PCR 검사결과 40%의 검출결과를 관

찰 할 수 있었다. 이와 같이 무병소우에서도 PCR 반응상 양성의 결과가 나오는 것은 사체 부검시에 육안적으로 확인이 불가능한 병변이 존재할 수 있고, 현미경적 관찰 범위내의 적은 병변이 진행되는 도중에 튜버클린 양성우로 검출될 수 있는 등 여러가지 원인이 있을 수 있을 것이다.

각 장기를 이용하여 2쌍의 primer를 이용한 이중 PCR법(Two-step or nested polymerase chain reaction)을 실시한 결과 48%의 검출율을 보여 단일 PCR 보다 이중 PCR 이 우수한 것으로 관찰 되었다.

분변에서의 이중 PCR 결과는 총 30건의 시료중에서 23건의 양성 결과를 얻을 수 있었다.

PCR의 민감도를 확인하기 위해 표준 결핵균주인 H37Rv의 DNA 추출물(전남대학교 미생물학교실에서 분양)을 농도에 따라 PCR을 실시하여 검색한 결과, 특히 이중 PCR에 의해 미량의 증폭산물을 확인할 수 있었다.

단일 PCR을 위해 사용했던 IS 1081, mpt 40 유래의 Primer각각 1쌍과 IS 987 유래의 outer primer 1쌍 및 이중 PCR을 위해 사용했던 IS 987유래의 2쌍의 outer primer와 nested primer를 이용하여 각각 PCR 성적을 비교했다.

각종 림프절과 폐, 간, 신장등의 실질장기에 대한 *in situ* PCR를 실시한 결과 림프절에서는 폐문림프절에서 고빈도로 양성반응을 관찰할 수 있었으며, 다음으로는 장간막 악하, 이하, 상유방림프절순이었다. 이들 림프절에서의 양성반응은 림프구 및 대식세포의 세포질내에서 강하게관찰 되었고, 간질내에서도 유리된 결핵균에 대하여 경미한 양성반응을 관찰 할 수 있었다. 특히 이러한 림프절 병변내에서는 건락괴사의 주변부위에서 세포질내 양성반응이 뚜렷이 관찰 되었고, 유리된 결핵균에 대해서는 건락괴사의 중심부에서 주로 관찰되었다. 장기로서는 폐에서 고빈도로 양성반응이 관찰 되었고 간, 비장에서도 확인할 수 있었다. 폐에 대한 결과는 림프절에서 관찰되었던 반응과 유사하게 일부 폐포세포와 주위에서 강한 양성반응이 관찰 되었으며, 폐의 괴사부위를 중심으로 증폭된 반응 산물이 고빈도로 관찰 되었다. 또한 병리조직학적으로 호중구나 대식세포와 같은 결핵균에 대한 염증세포 침윤이 관찰 되지않았던 무병소우에 대한 대한 *in situ* PCR 결과 실질세포 및 간질부위에서 증폭된 반응산물이 관찰 되어 진단적 가치를 확인하였다.

육안적으로 결핵병변이 관찰된 검체를 이용한 액상 PCR결과와 이들 포르말린 고정 조직에 대한 *in situ* PCR결과를 비교한 결과 거의 일치된 조직에서의 양성 반응을 관찰 할 수 있었으며, 육안적 병변이 관찰되지 않은 각 장기의 액상 PCR 결과와 비교한 결과 거의 일치된 결과를 관찰 할 수 있었다.

유즙, 비즙, 혈액, 분변, 오줌 등의 체액을 대상으로 *in situ* PCR에 의한 세포학적 진단을 시도한 결과는 다음과 같다. 유즙내의 정상 탈락세포의 일종인 체세포에 대한 *in situ* PCR 기법을 적용한 결과 일부 세포에서 우결핵균의 증폭산물이 뭉쳐 양성으로 염색된 것을 관찰 할 수 있었으며, 이들 증폭산물들은 조직에서와는 약간 다른 양상으로서 세포질내에서 과립상으로 관찰되었다.

비즙에 대한 *in situ* PCR을 실시하기에 앞서 시료의 전처리로는 스라이드 도말법과 변형된 세포농축법을 사용하여 결과를 관찰하였으며, 그결과 도말표본에서 양성세포를 찾기는 어려웠으나 변형된 세포농축법을 사용하였을 경우에 양성으로 관찰되는 세포를 찾기 쉬웠다.

혈액, 분변, 오줌들의 세포학적 *in situ* PCR기법의 적용을 위해 많은 방법을 적용하였으나 결과 판독에 방해를 일으키는 인자가 많은 관계로 특이성과 민감성이 떨어졌으며, 가장 좋은 방법은 이미 개발된 액상 PCR방법을 활용하여 검출하는 것이 우수한 것으로 나타났다.

2. 활용 방안

결핵 감염의 가장 빠른 진단법으로 여겨져 현재 널리 사용되고 있는 피내 튜버쿨린 접종 반응 검사가 그 특이성이나 민감도에 있어 떨어지는 원인중의 일부는 사용되고 있는 항원(PPD)의 복합적인 성질 때문인 것으로 알려졌는데, 보고들에 의하면 in vitro 분석시 Mycobacteria성 항원에 대한 반응을 나타냈던 피부반응 음성우 3마리의 호흡기 분비액에서 *M. bovis* 가 분리되었고, 또 다른 피부반응 음성우도 in vitro로 Mycobacteria 항원에 대한 IFN - gamma 반응을 검사한 후 감염되었음이 나타났다.

이렇듯 전통적인 튜버쿨린 검사에 반응하지 않는 감염우가 존재한다는 사실이 결핵의 방제나 근절 대책에 대한 명백한 문제점이 되고 있다. 게다가 사람의 결

핵 예방에 널리 사용되어 오고 있는 BCG는 M. bovis의 희석균주로 만들어졌으며 이러한 백신을 송아지에 접종해도 효과적일 것 이라는 좋은 실험적 증거가 있음에도 불구하고 이 백신을 수의학적으로 이용하려 시도 했던 적은 거의 없었는데 그 이유는 BCG를 송아지에 접종하면 그 송아지들은 나중에 튜버쿨린 접종검사시 양성 반응을 나타내게 결핵우로 판정되기 때문이다.

이에 따라 숙주의 튜버쿨린 과민반응에 영향을 미치지 않는 백신을 개발하기 위한 시도들이 있어왔으나 그 실효를 거두지 못하고 있는 실정이다. 만일 PCR 기법을 이용하여 집단검사를 실시할수 있게 되면 큐버클린에 반응하지 않는 감염우의 색출도 가능할 뿐아니라 송아지에 BCG를 예방 접종하므로써 진단에 영향을 주지 않으면서 감염의 발생을 막을 수 있게 될 것이다.

또한 최근의 보고에 의하면 *M. bovis*에 의한 결핵이 사육장 사슴에 이환되는 가장 중요한 질병으로 대두되고 있는데, 이것은 보통 단 하나의 림프절에 병변이 있는 낮은 발생율을 보이기는 하지만 특히 스트레스에 노출된 동물에서 급속히 전파되며 전격적인 질병으로서 나타난다.

사슴 농장의 출현은 사슴류의 결핵질병을 증폭시켰으며 실질적으로 사슴농장이 있는 각 나라들은 산발적이긴 하나 심각한 결핵 발생을 경험한바 있는데, 이러한 독특한 사슴의 일반적인 마이코박테리움균에 대한 감수성은 사슴에서의 전통적 튜버큘린 피내 검사의 가장 민감한 부위가 경부이기 때문에 소에서 보다 기술적으로 더 많은 것을 요구하는데 감염되지 않은 사슴에서의 위양성 반응은 널리 발생하며 심히 감염된 사슴에서의 위음성 반응도 나타날수 있다.

우리나라에도 사슴을 집약적으로 기르는 농장들이 있기 때문에 사슴에서의 결핵병 발생을 소홀히 할 수 없는 것은 당연한데 상술한 바와 같은 문제점을 비추어 볼 때 역시 사슴에서의 결핵병을 진단하는데에도 PCR기법은 유용하게 이용될 수 있다고 본다.

본 연구의 결과의 효과적인 활용방안은 피내반응에는 양성을 보이면서 부검시 육안소견을 보이지 않은 무병소우의 질병상태를 정확하게 파악하기 위해서는 세균학적인 검사가 필수적이다. 따라서 결핵우의 가검물로부터 마이코박테리움류의 분리와 동정을 효과적으로 하기위해 여러 가지 잡균제거와 배지를 이용한 균분리 및 생화학적 시험을 통한 동정이 이루어져 왔다. 그런데 최근에는 M bovis를 보

다 신속하게 동정하기위해 단클론항체 및 DNA prove가 이용되고 있다. 한편 Mycobacterium spp.는 세포벽 성분중 다량의 지질성분이 존재하고 이들 균종중 결핵균은 사람에게도 고도의 위험성을 갖는 균으로서 이들로 부터 DNA를 추출하는데는 위험과 어려움이 이있다.

이러한 액상 PCR 기법과 *in situ* PCR 기법을 이용한 *M bovis* 검출로 기존의 균 배양 특징, 항산성 염색과 생화학시험에 의한 동정방법보다 신속하고 간편하게 우결핵의 원인균을 확인할 수 있을 것이며, 이를 바탕으로 진단 킷트화가 가능 할 것으로 사료된다.

SUMMARY

In the suspected bovine tuberculosis, it has been difficult to make an early and specific diagnosis with tuberculin test and even with specific staning and culture. The aim of this study was to establish specific diagnosis of bovine tuberculosis by polymerase chain reaction(PCR). To obtain a results, we collected the specimen in the tuberclin-positive cattle, observed pathological lesions, cultured *Mycobacterium bovis* in BM medium, and carried out PCR. The results obtained were summarized as follows: In the necropsy of total 69 tuberclin-positive cattle, we could observed the tuberculous lesions at the pulmonary, mesenteric, mandible, parotid, mammary lymphnodes, lung, and liver (i.e, tuberculous lymphadenitis, granulomatous pneumonia, and hepatitis) in the 33 cows, but not in the 36 cows. Total 87 organs had the tubercles. The rate of gross lesions in the 33 cows was from 23%, 18% in pulmonary and mesenteric lymphnodes to 9% in liver. The histopathological findings of this lesions showed typical granulomatous inflamation, which is composed of a caseous, necrotic center bodered by a zone of epithelial cells, some of which had formed multinucleated giant cells; and finally, an accumulation of lymphocyties, a few granulocyties, and an encapsulation of fibrous connective tissue of varying thickness.

The *M. bovis* successfully cultured in BM medium from the 46(67%) of total 69 specimens; i.e, in the 13 cows of 36 no visible lesion reactor(NVLR).

To detect *M. bovis*, PCR amplication using IS1081 and mpt40 primers was carried out in 87 tubercle containing samples and 534 samples of no lesions observed. PCR using IS1081 primers detected 85(98%) of tubercle containing samples, and 185(40%)of no lesion-observed samples.

Two-step PCR using both IS1081 and mpt40 primers deteted 197(48%) of 409 no lesion-observed samples.

These results suggest that the PCR amplication of *M. bovis* target gene(more sensitive by use of two-step PCR) was more sensitive and specific than tuberclin test and pathological diagnosis.

Technological developments have made possible extension of polymerase chain

reaction(PCR) analysis to individual cells to localize DNA/RNA with non-radioactive labels at the light microscopic level. This approach, *in situ* PCR, is paticulary useful in resolving low-frequency bacteria presents in the insidious bovine tuberculosis. We have established a working protocol for non-radioactive localization of nucleic acid by direct *in situ* PCR in pataffin-embedded sections and have utilized several controls to validate our results. In this report we outline the procedures for detecting the DNA of *Mycobacterium bovis* from naturally infected bovine casesin a rapid and reproducible manner. The processing of *in situ* PCR techniques required 11 hours. Positive signals were detected in the lung and mesenteric and pulmonary lymph nodes. Positive signal, appeared as a dark purple colour, were observed in the cytoplasm of macrophages, epithelioid cells and pnemocytes and interstitial tissues. From the present results, *in situ* PCR technique was very useful for a rapid, accurate diagnosis of bovine Tuberculosis.

In situ PCR for *Mycobacterium bovis* was applied to nasal discharge, pellet fractions of centrifuged whole cows' milk. This approach is particularly useful in resolving low-frequency of bacteria presents in the insidious bovine tuberculosis. We have established a working protocol for non-radioactive localization of nucleic acids by direct *in situ* PCR in cytology specimens and have utilized several controls to validate our results. In this report we established the procedures for detecting the DNA of *M. bovis* in cytology samples from naturally infected bovine cases in a rapid and reproducible manner. The assay is also useful for identifying the bacilli directly from uncultured biological samples, such as nasal discharge. Positive signals were detected in the cells of cytology specimens. Positive signals, appeared as a dark purple colour, were observed in the cytoplsam of exfoliated cells of nasal discharge, pellet fractions of centrifuged whole cows' milk, ets.. Positive signals were detected in not only insidious but also apparant bovine tuberculosis cases. The significance of these results for a diagnostic laboratory is enormous since insidious infection of *M. bovis* could be definitively diagnosed. From the present results, *in situ* PCR technique was very useful for a rapid, accurate diagnosis of bovine Tuberculosis.

C O N T E N T S

목 차

제 1 장 서 론

결핵은 포유류를 포함한 조류 등, 심지어는 어류에서도 그 발생이 보고 되어지고 있으며 선진국을 위시해서 저개발국에서도 결핵 발생율은 꾸준하게 유지되어 오고 있는 현실이다. 특히 우형 결핵균(Mycobacterium bovis)의 사람과 동물간 전파가능성에 관한 연구가 여러 연구 기관에서 꾸준히 이루어지고 있으며 사람의 감염이 사실 증명되기도 했다. 그러나 아직까지 우리나라에서의 우형 결핵균의 감염증례는 보고되어진 바가 없으나 그 위험성은 내포되어 있는 실정이다. 또한 우형 결핵균의 피해는 양축 농가에 더욱 심하다할 수 있다. 그동안 우결핵으로 검증된 소의 경우, 고능력우에서의 발병예가 많았으며 또 부검시 특이한 폐림프절등 다른 림프절이나 장기에 나타나는 결핵결절이 관찰되지 않은 경우가 많았다. 그러므로 양축 농가의 피해는 상대적으로 더욱 증가하게 되고 물질적인 손해와 함께 심적인 피해도 예외일 수는 없다. 더구나 각 일선 가축위생시험소에서 실시한 튜버쿨린 반응에서 양성으로 검색되는 소가 점점 증가추세에 있어 그 피해는 더욱 증가될 것으로 사료된다.

특히 경제성장과 더불어 국민 식생활에도 많은 변화가 나타나 식육이나 우유및 유가공품의 소비가 급격히 늘어가고 있는 추세여서 우결핵의 원인체인 Mycobacterium bovis가 사람에도 감염을 일으킬수 있다는 점은 우결핵으로 인한 생산성의 저하 등으로 막대한 경제적 피해를 입게 되는 점과 함께 우결핵에 특히 관심을 갖게되는 주된 이유가 되고 있다.

우결핵의 원인체인 M.bovis가 소에서 사람으로 전파되는 유형은 첫째 우유를 통한 감염으로써 지금은 이러한 사실이 너무나 잘 알려져 있어 그 방제대책으로 발생이 거의 없다고 볼수 있으나 지난 세기 중에는 모유를 먹인 어린이 보다 우유를 먹였던 어린이에서 결절성 경부림프선염이나 연주창의 발생이 훨씬 더 흔했던점 등, 우유가 어린이 결핵의 감염원이라는 역학적 증거들이 강력히 제시된 바 있다. 그러나 우결핵은 대부분 폐의 질병이기 때문에 사람으로의 전파는 거의 공기를 통해 이루어질 것이며 많은 연구자들이 M.bovis에 의한 폐결핵은 도시거주자 보다는 시골에 거주하는 사람들에게 흔하다는 사실을 지적한바 있다. 기타 피

부의 절개나 마찰을 통한 전파가 있는데 이는 식육업자나 해부,병리학자들이 감염되는 수가 많다.

이와같이 우결핵균이 소에서 사람으로 전파되는 주요 양상이 밝혀짐에 따라 각 국가마다 이러한 전파를 차단시킬 강력하고 효과적인 대책들이 수립되므로서 M.bovis로 인한 사람의 결핵감염을 근절시키는데 많은 노력을 기울이고 있어 그 발생이 흔치는 않으나 영국, 미국등 선진국에서도 아직 완전한 박멸이 이루어지지는 않은 상태이다.

그런데 몇몇 연구자들에 의하면 최근 방제대책이 성공적으로 이루어지고 있는 나라들에서 발생하는 우결핵의 주된 원천이 사람이라 생각되고 있으며, 실제로 독일에서는 우결핵이 드물지만 만일 발생하는 경우 그 주된 원인은 사람에서 소로 전파된 것임이 밝혀진바 있다.

이같이 전파는 사람결핵의 원인균인 Mycobacterium tuberculosis가 소에 전파되는 경우일수도 있으나 M.bovis가 소에서 소로, 소에서 사람으로 또 사람에서 소로도 자유로이 전파될수 있기 때문에 만일 사람에서 사람으로의 전파가 가능하다면 사람과 소와의 사이에 완전한 전파싸이클이 이루어질 것이며 이는 사람이 M.bovis의 중요한 보균자가 될 수 있음을 의미한다. 사실상 M.bovis의 사람에서 사람으로 전파에 대한 일화적 보고가 문헌상으로 많이 있다.

이러한 공중보건학적 이유 때문에 국가적으로 M.bovis의 양태에 대한 끊임없는 조사가 필수적이며 이질병의 사람에서 소로 전파위험도 간과 되어서는 안될 것이다.

한편 우결핵의 감염으로 인한 경제적인 손실 또한 막대한데 우선 결핵에 걸린 동물들은 체중 감소, 생산연령이나 번식성 감소와 일반적인 생산성 감소가 있으며 사료효율이 떨어지고 함께 사육되는 송아지, 육성우, 돼지등에도 우유나 접촉을 통해 감염을 일으키기도 한다. 그외에도 정신적인 부담, 사람감염시 의료비, 격리시는 격리사 비용, 돌보는 노동력등을 감안할때 그 정신적, 경제적 피해가 심각하기 때문에 미국, 영국, 유럽등 전세계적으로 강력한 박멸대책이 수립되어 오고 있으며 우리나라에서도 매년 1회 이상 결핵검색을 실시하고 있다.

세계각국의 우결핵 발생율을 살펴보면 미국이 0.003%(1994년 현재), 호주가 0.32%(1990)이며 유럽 여러국가들의 경우(1991년 현재) 덴마크와 네델란드는 완

전 근절된 상태이고 독일이 0.0024%, 프랑스 0.37%, 영국 0.15%이며 이탈리아, 스페인이 각각 3.71%, 10.8%등이다.

우리나라의 경우 지난 1979년의 한 보고에 의하면 대체적으로 우리나라 우결핵 검색율은 0.1% 내외에서 굳어지고 있는 것 같다고 하였는데, 농림수산부 통계에 의하면 그로부터 1990년까지는 양성율이 꾸준히 줄어들었음을 알수있다. 그러나 91년 부터는 우결핵 검색 양성율이 다시 높아지기 시작해 93년에는 우결핵 발생 양성두수가 146두로 나타나 92년도의 82두에 비해 1.8배 정도의 증가를 나타냈으며 94년 257두, 95년 268두, 96년엔 400두가 양성으로 판정되어 현저한 증가를 나타내고 있다.

이러한 우결핵 발생증가 추세는 오늘날 이미 근절이 된 듯한 착각속에서 방심하여 예방대책에 소홀한데다 에이즈등의 확산으로 인해 결핵환자의 발생이 증가하고 있는 세계적인 추세와도 어느정도 관련성이 있지 않을까 싶은데, 실제로 사람에서의 결핵발생상황을 살펴보면 몇몇 선진국에서는 수십년동안 결핵이 잘 감소되어 오다가 최근에 갑자기 감소 추세가 정지되었으며 미국의 경우, 결핵환자수가 1984년까지 32년간이나 계속 감소되어 오다가 현재는 증가 추세에 있음이 보고되었다. 특히 미국 극빈지역의 결핵발병률은 세계 후진국을 앞지르고 있는데 이는 무주택, 약물남용, 에이즈등으로 인해 수 많은 사람들이 결핵균에 무방비 상태로 방치된 결과로서 사회적으로 크나큰 문제로 대두되고 있다.

우리나라의 결핵감염율도 지난 1965년 처음으로 결핵실태조사를 실시한 이래 1990년대에 들어와 현저히 감소하기는 하였으나 아직도 72만명 이상(1990년 현재)의 결핵환자가 존재하며 전염병으로서는 아직도 유일하게 10대 사망원인에 남아 있는 실정이다. 이렇듯 세계적으로 증가 추세를 보이고 있는 결핵에 감염된 사람은 1992년 현재 세계 인구의 3분의 1에 해당하는 17억 가량이며 매년 800만명에 가까운 새환자가 생겨나고 있고 300만 가까이가 사망하고 있다고 한다. 이는 다른 전염병으로 인한 사망자수보다 훨씬 많은것으로서 만약 적절한 조치를 취하지 않으면 가까운 장래에 지구상의 희생자수는 급격히 증가할 것이라고 세계보건기구(WHO)가 최근에 분석,경고한바 있다. 한때 불치의 병으로 여겨졌던 결핵이 그간의 여러가지 노력으로 현저하게 줄어들어 가까운 장래에 근절될것 같은 나라도 있는 반면, 인구증가로 인해 결핵환자의 절대숫자는 인류역사이래 가장

많은 상태인데다 에이즈의 확산등에 의해 다시 고개를 들고 있는바 사람과 동물이 서로 감염을 주고 받는 인수공통전염병으로서의 우결핵의 발생도 점차 증가될 가능성은 충분하다 할수있겠다. 실제로 우리나라의 경우에도 앞서 기술한바와 같이 우결핵의 발생이 증가추세에 있으므로 결핵을 검색하여 양성우를 격리도태시키는등 결핵퇴치를 위한 박멸대책에 철저를 기해야할 것은 물론이고 보다 많은 조사, 연구등 관심을 기울여야 할 것이다.

결핵퇴치를 위해 무엇보다도 중요한 것은 신속하면서도 정확하게 결핵감염여부를 진단하는데 있다고 하겠다. 우결핵의 진단은 살아있는 동물에서는 주로 튜버쿨린 접종에 의한 지연형 과민반응으로서 진단하며 확진을 위해서는 결핵균의 배양 분리및 동정이 필요하다.

아직까지 널리 사용되고 있는 가장 오래된 면역학적 검사방법중의 하나인 튜버쿨린 검사는 1891년 Robert Koch가 최초로 튜버쿨린 반응을 기술한 이래 사람과 동물의 결핵병에 대한 면역학적 진단방법으로 사용되어오고 있는데 널리 사용되고 있음에도 불구하고 이 진단법에는 많은 문제점들이 존재한다. 우선 어떤 상황에서는 민감성이 크게 저하되는 점으로서 1978년의 한 보고에 의하면 소에서 단독피내 튜버쿨린 접종검사(SIDT)의 민감성은 평균 72%에 불과하였으며, 보다 최근(1991)의 연구에 의하면 SIDT의 민감성은 65.6%였다. SIDT의 특이성은 일반적으로 높다(98.8%. Francis et al. 1978)고 하더라도 어떤 집단 특히 어떤 나라에서는 비정형 mycobacteria와의 항원교차반응으로 인한 위양성반응문제가 심각하다. 이러한 문제점들이 튜버쿨린 접종후 판독을 위해 3일 동안 기다려야 하는점 및 그 소는 60-90일동안 재 검사할수 없는점 등과 아울러 우결핵 진단을 위한 다른 방법의 개발이 요구되는 이유이다.

또한 결핵의 확진을 위해서는 결핵균의 배양검사가 필요한데 균분리 배양검사는 균종동정이 가능해 특이성이 높고 비교적 소수의 균도 검출이 가능하고 감수성도 높은 편이지만 검사 과정이 복잡해서 비용도 많이 들고 잘 훈련된 요원에 의해서만 행할수 있으며 검사결과가 5-8주 이상 걸려 조기진단방법으로는 부적합한 경향이 있다. 따라서 보다 민감하고 특이하면서 신속하고 정확한 진단법의 개발에 대한 필요성이 오래전부터 인식되어 왔으며 꾸준히 연구되어오고 있는 실정이다. 우리나라의 경우 인의에서는 이미 DNA증폭에 의한 PCR기법이 일상적인

진단 방법으로 응용되고 있으나 수의분야에서는 아직 그 개발이 실현되지 않고 있는 실정이다.

이러한 연구의 일환으로서 최근 유전자 기술의 진보에 힘입어 진단적 세균학 분야에서는 DNA probe 기법을 응용한 미생물의 검출, 동정이 잘 확립되었다. 이와 동시에 고도로 민감성이 있는 DNA 증폭 기법(Polymerase Chain Reaction ; PCR)이 개발되어 여러분야에 응용되고 있다.

이와 같은 추세로 최근에는 이 PCR을 이용하여 결핵균의 선택적인 DNA sequence를 증폭시키므로서 결핵을 진단하기 위한 연구들이 외국에서는 활발히 진행되고 있는 실정이며 그 신속성과 민감도및 특이성이 인정되었다. 그러나 PCR의 기법이 매우 복잡하기 때문에 이를 얼마나 간편하게 할 수있느냐가 비용 및 실용성과 관련해 개선되어야 할 부분이며 실제로 임상에서 이 방법을 이용하여 결핵을 진단하려면 그 과정이 복잡하지 않을수록 효과적이다. 그러므로 보다 간단하면서도 효율적인 방법들을 계속해서 개발해 나갈것이 요구되었다.

만성질병인 결핵의 감염에 인한 직접적인 경제적 손실은 동물의 일반적인 생산성 감소외에도 사료효율의 저하, 번식률및 동물의 시장성 감소등이 있고 사람, 함께 사육되는 돼지, 송아지등 다른 가축에 전파가 일어날 수 있으므로 치료하기 위해 소요되는 비용과, 격리시킬 시설에 소요되는 비용등을 들 수 있다. 보다 구체적으로 살펴볼 경우 Denes(1981)는 결핵에 걸린 암소는 15Kg, 숫소는 25Kg 정도의 체중감소가 있고, 유량감소는 10-12% 정도이며 불임으로 인한 손실이 5%, 생산연령도 1,5 비유기정도 감소된다고 보고한 바 있다. 그리고 17년간 결핵박멸계획 성공의 성과는 투자대 수익이 1대 400이라고 분석하였다. 그만큼 결핵병은 양축가와 그 국가에 막대한 경제적 손실을 주는 원인임이 알려진지는 오래되었다고 Arthur Myers와 Steele도 보고한 바 있다.

세계적인 추세를 살펴보았을 때, 결핵은 그간의 여러가지 박멸대책으로 가까운 장래에 근절될것 같은 나라도 있는가 하면 우리나라 처럼 줄고는 있으나 아직도 큰 문제로 남아있는 지역도 있고 오히려 격증하고 있는 지역도 있다. 특히 최근의 후천성 면역결핍증의 전파와 더불어 아프리카와 미국에서 최근 1985년 이후 계속 다시 증가하고 있는 실정이어서 심각한 문제로 인의와 수의학 분야에서 중요한 전염성 질환으로 대두되고 있다.

게다가 인구의 폭발적인 증가로 인해 세계인구의 약 1/3정도인 17억가량이 결핵에 감염되있고, 2,000만명이 활동성 폐결핵을 앓고 있는데다 매년 800만명 가량의 새로운 환자가 발생하고 있는 등, 실제적인 결핵환자의 절대수는 인류역사이래 가장 많은 시점에 와 있다.

이러한 추세와 더불어 사람과 동물간에 서로 결핵균의 전파체로서 존재할 수 있는 인수공통전염병인 결핵감염 동물에서의 발병율도 높아질 가능성이 농후하며 실제로 우리나라에서 최근 3,4년간 계속 급속한 증가율을 보이고 있음이 드러난 상태여서 경제적측면은 차치하더라도 공중보건학적 측면에서 결핵의 박멸대책에 철저를 기해야 할 것이다.

이에 따라 감염동물의 검색및 격리, 도태를 위한 신속하고 정확한 진단방법의 개발이 다시금 요구되는 바이며, 관련된 조사및 연구도 보다 관심을 가지고 다양하게 수행되어야 할것이다.

그러므로 가축위생당국에서는 우결핵검진사업에 있어서 기존 사용되어 왔던 HCSM과 PPD에 의한 진단방법은 항상 양축가와 마찰을 일으킬 가능성이 있고 또한 경제적 피해를 줄 수 있으므로 더욱 신속하고 정확한 진단 기법인 우결핵 진단을 위한 PCR 기법의 개발이 절실히 요구되는 실정이므로 이를 연구하고자 한다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 실험재료

1995년과 1996년에 광주시, 전라남도, 전라북도 및 경기도에서 우결핵균을 살균처리하여 여과액을 화학처리한 정제 항원인 PPD-T (Purified Protein Derivative Tuberculin)우결핵 진단액을 사용하여 피내접종을 실시하여 검진한 결과 최종 결핵 양성 판정되어 살처분된 소 69두를 대상으로 폐문림프절, 악하, 이하, 장간막 및 상유방림프절등 5종의 림프절과 폐조직, 간, 신장 및 비장 등의 실질장기, 세균배양 시료 일부를 채취하여 10% 중성 포르말린 및 -70℃의 냉동보관하여 육안소견 조사, 병리조직학적 검사, 균분리배양 및 액상PCR 재료로 사용하였다.

1995년 부터 1997년 사이의 림프절 및 실질 장기 파라핀 포매조직을 *in situ* PCR용으로 사용하였으며, 또한 유즙, 콧물, 혈액, 분변, 오줌 등의 체액을 채취하여 장기 보관해두었던 시료와 부검 즉시 도말표본을 만든 시료를 가지고 *in situ* PCR에 의한 세포학적 진단을 위해 사용하였다.

제 2 절 육안소견 관찰 및 병리조직학적 검사

각종 림프절과 폐, 간장, 신장 및 비장등의 실질 장기를 통상적인 부검술식에 따라 면밀히 관찰하여 육안소견을 기록하였으며, 병리조직학적 검사를 위해 각 장기를 채취하여 10% neutral formalin에 고정한 후 paraplast에 포매하여 마이크로톰을 이용 3-4㎛의 절편을 제작하고 hematoxylin-eosin 염색을 실시하여 육아종성 염증의 특징적인 거대세포들이 침윤하고 있는 결핵결절 소견을 광학연구 현미경을 이용하여 관찰하였다.

제 3 절 결핵균의 분리배양

1. 검체의 전처리방법

폐 및 림프절의 병소부위 조직을 무균적으로 5g 정도 취하여 잘게 세절한 후, 5㎖의 멸균 생리식염수와 함께 tissue homogenizer로 4-5℃에서 완전 마쇄하여 균질액상으로 만들고, 이 균질액을 2% NaOH 동량으로 15분간 vortex mixer로 혼화하였다. 전처리된 조직부유액은 PBS(pH 7,3)로 10배 희석하여, 4℃, 7,000 X g 에서 30분간 원심한 후, 증류수로 2회 더 씻어 침사를 얻었다.

2. 배양방법 및 배지조성

전처리된 조직 침사시료를 멸균 생리식염수로 5배, 10배 희석하여, 희석전의 원액과 함께 glycerol이 제거된 BM배지(Table 1.)에 0.1㎖를 취하여 각각 2개씩 접종하여 37℃에서 5-10주간 배양하여 항산성 결핵균의 발육을 관찰하였다.

Table 1. BM 배지의 조성

Potassium phosphate, monobasic	9.0g
Sodium glutamate	3.0g
Sodium phosphate dibasic(anhydrous)	3.33g
Pyruvic acid	0.33g
D.W.	333ml
2% malachite green	20.0ml
Whole egg	667ml

제 4 절 장기 조직의 단일 및 이중 PCR

1. DNA 추출

가. Proteinase K- chloroform법

각 검체를 세절하여 3% NaOH로 전처리한 후에 부유액을 12.000 Xg 에서 2분간 원심한후에 TEN완충액으로 재 부유시켰다. 10% SDS와 Proteinase K를 가하여 진탕시킨후 37℃에서 2-14시간 동안 방치시켰다. 그 후에 석회산과 chloroform / Isoamyl alcohol을 첨가하여 12.000X g에서 5분간 원심시키고 상층액에 5M Nacl을 가한 후 -20℃에서 30분간 방치시킨후 10분간 원심하여 DNA를 얻었다. 이렇게 얻어진 DNA는 공기중에 건조시킨후 증류수에 녹여 PCR반응에 이용하기전 까지 -70℃에 보관하였다.

나. Bead-beating법

각 검체를 세절하여 3% NaOH로 전처리한 후에 부유액을 12.000 Xg 에서 2분간 원심한후에 TEN완충액으로 재 부유시켰다. 10% SDS와 Proteinase K를 가하여 진탕시킨후 37℃에서 2-14시간 동안 방치시켰다. 그 후에 석회산과 chloroform/Isoamyl alcohol을 첨가하여 bead에 주입하고 bead beater에서 2분간 진탕하였다. 12.000X g에서 10분간 원심시키고 상층액에 5M Nacl을 가한 후 -20℃에서 30분간 방치시킨후 10분간 원심하여 DNA를 얻었다. 이렇게 얻어진 DNA는 공기중에 건조시킨후 증류수에 녹여 PCR반응에 이용하기전 까지 -70℃에 보관하였다.

다. Modified Bead-beating법

조직을 세절하여 solution A (lysis buffer)를 첨가하여 bead beater에서 2분간 진탕시킨후 11,000-12,000 rpm에서 5분간 원심시키고, 상층액을 pippet을 이용하여 조심스럽게 버린후, solution B를 첨가하여 중화시킨후 bead beater에서 10초간 진탕시키고 4000 rpm에서 30초간 원심 시켜 세균이 상층액에 부유하게 하였

다. 상층액을 eppendorf tube에 옮긴후 12,000 rpm 에서 5분간 원심시켜 결핵균을 가라앉힌후 solution C(2X lysis buffer, 결핵균을 용해)를 첨가하고 Proteinase K를첨가하여 60℃ 에서 1시간 lysis시켰다. Proteinase K를 불활화하기 위해 94℃에서 10분간 denaturation 4,000rpm에서 30초간 원심하여 DNA를 준비하고PCR전에 4℃ 또는 -70℃에서 보관하였다.

2. Oligonucleotide primer 제조

우결핵의 원인체로 알려진 *M. bovis, M. tuberculosis*등을 검출하기 위한 primer는 *M. tuberculosis*를 포함한 *M. bovis, M. microti, M. africanum*과 반응할 수 있는 IS1081과 또한, 특이적으로 *M. tuberculosis*에서만 증폭산물을 만드는 mpt40을 이용하였다. 이중 PCR을 위한 primer의 제조는 *M. bovis* IS 987의 염기서열을 참고하여 2쌍을 제조하였다. 각각의 Primer는 한국생공 (Korea Biotech, Korea)에 의뢰하여 합성하였으며 PAGE 법으로 정제한 후 사용하였다.

Table 2. 단일 PCR을 위한 IS 1081과 mpt 40 primers

primer	Sequence	Product size
IS1081	–5' TCGCGTGATCCTTCG3'	300bp
	–5' CGCAGCTTGGGGATCGCGAC3'	
mpt40	–5' CAACGCGCCGTCGGTGG3'	396bp
	–5' CCCCCCACGGCACCGC3'	

Table 3. 이중 PCR을 위한 IS 987 primers

Primers		seqence	position	product size
outer primers	p1	5'ATCCTGCGAGCGTAGGCGTC3'	IS987 1350-1369	327bp
	p2	5'AGGAGCACATCAGCCGCGTC3'	IS987 1042-1061	
nested primers	p3	5'CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG3'	IS987 1348-1367	122bp
	p4	5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG3'	IS987 1245-1264	

3. 중합효소 연쇄반응(PCR)

시료에서 추출한 DNA 5㎕를 사용하여, PCR을 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 모든 반응액의 최종량은 50㎕로 하였으며 DNA중합효소 (Takara, Japan) 2Unit와 검체 DNA를 제외한 전 반응액 (premaster mix : 0.5 μM primer, 200 μM dNTPs, 500mM Tris-HCl [pH 8.0], 1.5mM MgCl2, 0.1% Triton X-100)은 검사조건의 동질성을 유지하기 위하여 사전에 제조하고 분주하여 -70℃에 보관하고, PCR을 시행할 때마다 필요한 만큼 꺼내어 사용하였다. 시험관에 미리 준비한 PCR용 반응액을 넣고 표준 결핵균 DNA와 검체 DNA를 각각 넣어 총 50㎕의 Mineral Oil을 가하여 반응액의 증발을 막았다.

음성 대조로 검체 DNA 대신 멸균 증류수와 용해 완충액을 각각 넣은 후 시행하였다. 이들 시험관을 12,000 X g에서 30초간 원심하여, 반응 well에 50㎕의 Mineral Oil을 넣은 후 DNA Thermal cycler(Model 2400, Perkin-Elmer Cetas, U.S.A.)에 옮겨 95℃에서 5분간 preheating한 후, 94℃에서 30초간 denaturation, 62℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension하는 일련의 과정을 1주기(cycle)로 하여 30주기를 반복하였으며, 30주기 후 마지막 1주기는 extension을 10분으로 연장하였다. 이중 중합효소 연쇄반응법의 검체 DNA로는 first PCR 산물 1㎕를 사용하였으며, 94℃에서 30초간 denaturation, 62℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension하는 일련의 과정을 1주기로 하고, 30주기 후 마지막 1주기는 extension을 10분으로 연장하였다.

4. PCR산물의 검출 및 확인

PCR을 실시한 후 반응 산물 10-15㎕와 여기에 2-3㎕의 gel loading buffer를 섞고, 1 ㎍/ml 의 ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에 점적한 후, 0.5 X Tris-boric acid, 0.001M EDTA［pH 8.0］)완충액으로 80V에서 2시간동안 수평형 잠수식 전기영동을 하였다. 이후 UV DNA transilluminator(파장 302nm : Vilber Leurmat, France)와 SL-5, GD-photographic system(Sealin, Korea)으로 사진 촬영하여 DNA band 유무를 확인하였다.

5. PCR의 예민도

DNA 양에 따른 PCR의 예민도를 측정하기 위하여 표준 결핵균주의 DNA 추출물을 이용하여 분광광도계로 260㎚에서 그 농도를 측정하였고, 이를 lysis buffer로 10배씩 희석하여, DNA size marker와 함께 2% agarose gel에 전기영동하여 표준균주의 DNA를 확인한 후, 0.23 ng에서 2.3fg 까지 DNA의 농도별로 PCR을 실시하여 agarose gel 전기영동으로 반응산물의 존재 유무를 관찰하였다. 또한 이중 PCR의 예민도 역시 증폭된 single PCR 산물 1㎕를 취하여 관찰하였다.

6. PCR의 정도관리

PCR 검사에서의 오염이나 carry over등을 배제하기 위하여 검체 DNA의 추출 과정과 증폭과정은 서로 다른 장소에서 실시하였으며, 1회용 피펫 tip과 microcentrifuge tube등은 멸균하여 사용하였고, 반응에 사용된 시약은 검체 DNA와 primer를 제외하고 전반응액을 준비하였으며, 결과가 의심스러울 때는 DNA추출을 다시 시행하였다.

제 5 절. 조직 및 체액성 세포의 *in situ* PCR

1. *in situ* PCR를 위한 시료준비

가. 실질장기 조직

10% 중성 포르말린에 고정하여 파라핀포매한 조직을 5㎛ 의 두께로 일반조직 마이크로톰을 이용하여 절편하여 특수 표면처리된 *in situ* PCR용 슬라이드에 붙인후 45 - 60℃의 hot plate에서 18-48시간 굳인 후 사용하였다.

나. 체액성 세포처리

유즙 및 비즙의 체액을 멸균생리적 식염수로 희석한 후 3,000rpm에서 10분간 원심을 2회 실시하여 침전된 하층의 세포를 수집하여 1% agarose gel에 1:1로 혼합하여 냉장에서 굳인 후 10% 중성포르말린에 고정하여 파라핀 포매하였으며, 일부 체액은 시료채취 즉시 10% 중성 포르말린과 1:1로 혼합하여 고정한 후 3,000rpm에서 10분간 원심 후 멸균 PBS로 희석하여 동일 조건에서 원심하여 침전된 하층의 세포를 수집하여 1% agarose gel에 1:1로 혼합하여 냉장에서 굳인 후 10% 중성포르말린에 고정하여 파라핀 포매하여 조직을 5㎛ 의 두께로 절편하여 특수 표면처리된 *in situ* PCR용 슬라이드에 붙인후 45 - 60℃의 hot plate에서 18-48시간 굳인 후 사용하였다.

2. *in situ* PCR 전처리

절편 슬라이드를 Xylene에 10분, 100% ethanol에 10분, 95% ethanol에 10분 적용시킨 후 공기중에서 건풍하고 반응조건을 중성으로 하기위하여 pH7.5 PBS에 5분간 반응하였다.

3. Protease Digestion 방법

전처리된 조직을 Kimwipe를 사용하여 조직 주변부의 PBS를 제거하는데 조직의 수분이 마르지 않도록 주의를 요한다. 조직의 세포막, 핵막 단백질을 제거시키

기 위해 Proteinae K 50㎕(20㎍/ml, proteinase K sol.)를 분주한 후 coverslip으로 덮고 37℃에서 습도를 유지하며 1시간 반응 시킨 다음 95℃의 heat block에 1분간 처리하여 protease의 반응을 중지시켰다. coverslip off를 위해 PBS에 1분처리하고, 탈수과정으로 80% ethanol 5분, 95% ethanol 5분, 100% ethanol 5분처리 후 3분이내에 건조시켰다.

4. *in situ* PCR용 primer 제조

액상 PCR에서 사용되었던 우결핵의 원인체로 알려진 *M. bovis*의 IS1081를 Primer로 사용하였으며, 이들 Primer는 한국생공 (Korea Biotech, Korea)에 의뢰하여 합성하였으며 PAGE 법으로 정제한 후 사용하였다.

5. *in situ* PCR 반응

Protease처리된 슬라이드에 대하여 *in situ* PCR 반응을 다음과 같은 방법으로 시행하였다.

모든 반응액의 최종량은 50㎕로 하였으며 PCR reaction 혼합액은 사용전 5분전에 70℃ 상태하에서 사용하였으며, 그 조성은 10X PCR buffer II 15㎕ (1X final), $MgCl_2$(25mM) 21㎕ (3.5mM final), dNTPs(10mM each) 12㎕ (3㎕ of each dNTP)(0.2Mm final), Primer 1 (50㎛M) 3㎕ (1㎛M final), Primer 2 (50㎛M) 3㎕ (1㎛M final), Biotin-11-dUTP(0.4mM) 0.15㎕ (2.5㎛M final), H_2O 96㎕, Total 150㎕ (3 samples)되게하여 assembly tool 위에서 물방울모양을 유지시킨 후 AmpliTaq DNA 0.5㎕(10U final) Polymerase, *IS*(20U/㎕)떨어뜨려 반응시켰다. 검사조건의 동질성을 유지하기 위하여 사전에 제조하고 분주하여 -70℃에 보관하고, PCR을 시행할 때마다 필요한 만큼 꺼내어 사용하였고 Amplicover Disc 와 Clips을 장착하여 *in situ* PCR 반응하였다.

음성 대조로 결핵에 감염되지 않은 소의 실질장기 조직과 primer 및 Biotin-11-dUTP를 넣지않으므로써 대조로 잡았다.

이들 슬라이드를 Perkin-Elmer사의 Gene Amp® *in situ* PCR system 1000 model를 사용하여 95℃에서 10분간 preheating한 후, 95℃에서 2분간 denaturation, 65℃에서 2분간 annealing, 72℃에서 2분간 extension하는 일련의

과정을 1주기(cycle)로 하여 40주기를 반복하였으며, 마지막 1주기는 extension을 10분으로 연장하였다.

6. *in situ* PCR 산물의 검출 및 확인

in situ PCR을 실시한 후 Amplicover Disc와 Clips 을 제거한 후, 2X SSC(at 40-60℃)로 5분 수세, 상온에서 TBS Buffer에 rinse , Streptoavidin-AP를 2-3 방울 떨어뜨리고 37℃에서 10분간 반응시킨 다음, TBS Buffer에 rinse, NBT / BCIP를 2-3 방울 떨어뜨린 후 37℃에서 5-15분간 반응, 멸균증류수에 2회 세척, fast green 으로 대조염색 시켜 Crystal mount액 으로 coverslip덮은 다음 현미경 하에서 검경 하였다.

7. *in situ* PCR의 정도관리

in situ PCR 검사에서의 오염이나 carry over등을 배제하기 위하여 1회용 피펫 tip과 microcentrifuge tube등은 멸균하여 사용하였고, 반응에 사용된 시약은 검체 DNA와 primer를 제외하고 전반응액을 준비하였으며, 결과가 의심스러울 때는 대조군에 대한 실험을 한 슬라이드상에서 똑같은 조건으로 반복실험을 시행하였다.

제 3 장　시험결과 및 고찰

제 1 절　우결핵 병변의 육안적 소견

튜버클린 피내 접종 검사 결과 양성우로 판정된 69두의 부검시 육안적 소견은 33두에서 결핵 결절 등의 우결핵 병변이 관찰되었고 나머지에서는 결핵결절 등의 우결핵 병변으로 판단될 수 있는 병변이 관찰되지 않았다 (Table 4). 공시된 소의 육안적 병변의 출현 빈도는 폐문 림프절, 장간막 림프절, 폐, 악하 림프절, 이하 림프절 순으로 나타났다. 5종의 림프절과 4종의 실질장기에서 병변이 관찰 되었던 33두중 병변의 관찰 빈도를 조사한 결과 3종의 장기에서 병변이 동시관찰된 경우가 9두로 나타 났으며, 1종, 2종의 장기에서 동시관찰이 각각 8두로 관찰되었다.

제2절. 우결핵 병변의 병리조직학적 소견

총 검사 두 수 69두를 대상으로 주로 폐조직과 림프조직에서 결핵결절 관찰목적으로 10% 중성 포르말린에 고정하여 절편을 제작, H&E 염색하고 현미경 소견을 관찰한 바 육안적으로 병변이 관찰되었던 33두에서는 전형적인 육아종성 염증인 결핵 결절 소견을 확인 하였다. 즉, 병리 조직학적 소견상, 결핵 결절 병소는 결절부의 중심부에 건락 괴사소견이 있고, 이 괴사소를 유상피 세포층으로 둘러싸여 있는 경우와 없는 경우 등 다양하게 나타났다. 또한 림프구가 많이 침윤되어 있고 다핵성의 랑한스 거대세포가 섞여서 출현하며 그 주위에는 섬유아세포가 증식하는 전형적인 결핵 결절성 육아종 형태를 보이는 병소도 관찰되었다.

육안적으로 병변이 관찰되지 않았던 36두의 각 장기의 병리조직학적 소견에서 전형적인 결핵병소는 관찰되지 않았지만 일부 폐문 림프절 및 장간막 림프절에서 단순히 단핵구의 침윤이 집적되어 있는 병소가 관찰되었다.

Table 4. **튜버크린 양성 판정 69두의 장기별 육안적 소견**

장기 / 개체번호	림프절					실질장기				합계
	폐문	장간막	악하	이하	상유방	폐	간	신장	비장	
1										
2										
3	+		+			+				3
4										
5		+	+	+		+				4
6										
7	+	+	+	+		+				5
8	+	+		+	+		+			5
9										
10	+	+								2
11										
12	+		+	+		+				4
13		+								1
14										
15										
16										
17					+		+			2
18	+	+				+				3
19										
20										
21	+	+				+				3
22										
23	+	+			+					3
24										
25	+		+		+	+			+	5
26		+		+			+			3
27	+									1
28	+		+			+				3
29										
30										
31	+		+							2
32										
33										
34										
35										

장기 / 개체번호	림프절					실질장기				합계
	폐문	장간막	악하	이하	상유방	폐	간	신장	비장	
36										
37	+		+			+				3
38							+			1
39	+	+								2
40										
41			+							1
42										
43		+								1
44										
45										
46	+	+	+			+	+			5
47										
48	+					+				2
49										
50										
51	+		+	+						3
52										
53	+			+		+				3
54		+					+			2
55	+					+				2
56	+									1
57										
58										
59	+	+					+		+	4
60			+							1
61										
62										
63										
64										
65	+									1
66										
67										
68		+					+			2
69	+	+	+		+					4
합계(%)	23(26)	16(18)	13(15)	8(9)	4(5)	13(15)	8(9)	0(0)	2(2)	87(100)

제 3 절 우결핵균의 분리배양 결과

각 검체의 조직 침사를 멸균 생리 식염수로 5배, 10배 희석한 후, 희석 전의 원액과 함께 glycerol이 제거된 BM배지 각 2개에 0.1ml씩 접종하여 37℃에서 5-10주간 배양하면서 균 발육성상을 관찰하였다. 총 69두의 검체중 46두에서 항산성균을 관찰하였는데, 병소가 관찰된 33두에서는 모두 배양검사상 양성소견을 보였고 나머지 13두는 육안적으로 병변이 관찰되지 않았던 무병소우에서도 항산성균의 관찰이 확인될 수 있었다. 채취된 분변 30건의 우결핵균 배양결과 12건에서 결핵균이 검출되었다.

균 배양상 양성 소견을 보인 장기로는 폐문 림프절, 장간막림프절, 폐 순으로 나타났다.

제 4 절 단일 및 이중 PCR을 이용한 우결핵균의 검출 결과

1. Modified Bead-beating법 이용하여 DNA 추출후 단일 PCR 수행 결과

DNA추출을 위해 Proteinase K-cloroform법, Bead-beating법 및 Modified Bead-beating법을 비교실험하여 추출이 가장 우수한 Modified Bead-beating법을 이용하여 공시된 젖소 69두를 대상으로 IS1081 및 mpt40 유래 Primer와 IS987 유래의 outer primer를 이용하여 결핵 병변이 관찰된 87개의 검체를 대상으로 단일 PCR을 수행한 결과 거의 모든시료에서 특이 DNA band를 확인할 수 있었다 (Table 5.).

또한 튜버클린 양성우이지만 육안적 병소가 관찰되지 않은 무병소우의 검체에서도 PCR 산물을 관찰할 수 있었다(Table 6.). 단일 PCR 검사결과 40%의 검출결과를 관찰 할 수 있었다. 이와 같이 무병소우에서도 PCR 반응상 양성의 결과가 나오는 것은 사체 부검시에 육안적으로 확인이 불가능한 병변이 존재할 수 있고, 현미경적 관찰 범위내의 적은 병변이 진행되는 도중에 튜버클린 양성우로 검출될 수 있는 등 여러가지 원인이 있을 수 있을 것이다.

채취된 30건의 분변에서의 PCR 결과 21건에서 특이 DNA band를 확인할 수 있었다.

Table 5. 육안적으로 결핵 병변이 관찰된 시료에 대한 단일 PCR 결과

	림 프 절					실 질 장 기				합 계
	폐문	장간막	악하	이하	상유방	폐	간	신장	비장	
육안소견 양성	23	16	13	8	4	13	8	0	2	87
PCR 검사 양성	23	16	13	8	3	13	7	0	2	85(98%)

Table 6. 육안적 병변이 관찰되지 않은 각 장기의 단일 PCR 결과

	림 프 절					실 질 장 기				합 계
	폐문	장간막	악하	이하	상유방	폐	간	신장	비장	
육안소견 음성	46	53	56	61	65	56	61	69	67	534
PCR 검사 시료수	46	53	56	61	65	56	40	46	44	467(100%)
PCR 결과 양성	32	30	28	18	13	36	13	1	14	185(40%)

2. IS987유래의 2쌍의 primer를 이용한 이중 PCR 결과

각 장기를 이용하여 2쌍의 primer를 이용한 이중 PCR법(Two-step or nested polymerase chain reaction)을 실시한 결과 48%의 검출율을 보여 단일 PCR 보다 이중 PCR 이 우수한 것으로 관찰 되었다(Table 7.).

분변에서의 이중 PCR 결과는 총 30건의 시료중에서 23건의 양성 결과를 얻을 수 있었다.

Table 7. 육안적 병변이 관찰되지 않은 각 장기의 이중 PCR 결과

(IS 987 유래의 2쌍의 primer 기준)

	림 프 절					실 질 장 기				합 계
	폐문	장간막	악하	이하	상유방	폐	간	신장	비장	
PCR 검사 시료수	46	53	37	43	44	56	40	46	44	409
PCR 결과 양성	39	38	21	7	5	44	18	3	22	197(48%)

3. 결핵균 표준주를 이용한 PCR 민감도 측정

PCR의 민감도를 확인하기 위해 표준 결핵균주인 H37Rv의 DNA 추출물(전남대학교 미생물학교실에서 분양)을 0.23 ng에서 0.023 fg 까지 10배 계단 희석하여 각각의 농도에 따라 PCR을 실시하여 검색한 결과, 단일 PCR은 2.3 pg 까지 이중 PCR은 2.3 fg까지 증폭산물을 확인할 수 있었다.

4. Primer 종류에 따른 결핵균의 검출 성적

단일 PCR을 위해 사용했던 IS 1081, mpt 40 유래의 Primer각각 1쌍과 IS 987 유래의 outer primer 1쌍 및 이중 PCR을 위해 사용했던 IS 987유래의 2쌍의 outer primer와 nested primer를 이용하여 각각 PCR 성적을 비교했다.

그 결과 IS987 유래의 2쌍의 primer를 이용한 이중 PCR에서는 51%의 높은 양성 반응을 얻을 수 있었으며, IS 987 outer primer, IS 1081, mpt40 순으로 높은 양성반응을 관찰 하였다.

Table 8. 장기별 primer의 종류에 따른 PCR 성적

primer / 장기	검사건수	IS1081	mpt 40	IS987 outer primer	이중 PCR (IS987 2쌍)
폐문림프절	46	34	32	34	40
장간막림프절	46	25	24	25	31
하악림프절	46	22	21	23	30
이하림프절	46	7	7	7	10
상유방림프절	46	3	3	4	7
폐	46	28	25	29	36
간	46	19	17	19	24
신장	46	1	0	1	3
비장	46	15	16	16	24
분변	30	21	20	21	23
계	444	175(39%)	165(37%)	179(40%)	228(51%)

5. DNA 분리 방법에 따른 PCR 기법의 민감도 비교

DNA의 분리는 Proteinase K - chloroform법과 bead- beating법 그리고 modified bead-beating법 3가지를 실시하여 IS 987 유래의 outer primer를 이용하여 각각의 결과를 비교하였다(Table 9.). 그 결과 Modified bead- beating법에서 가장 높은 민감도를 보였지만 3가지 방법의 민감도 차이는 별로 크지 않았다.

Table 9. DNA 분리 방법에 따른 PCR 민감도 비교(IS 987 outer primer 기준)

DNA분리방법 / 검체	검사건수	Proteinase K-chloroform법	Bead-Beating법	Modified bead-beating법
폐문림프절	46	34	34	34
장간막림프절	46	25	25	25
하악림프절	46	22	23	23
이하림프절	46	7	7	7
상유방림프절	46	3	4	4
폐	46	28	28	29
간	46	17	18	19
신장	46	1	1	1
비장	46	16	16	16
분변	30	20	20	21
합계	444	173(38%)	176(39%)	179(40%)

제 5 절 실질장기 조직의 *in situ* PCR 검사 결과

각종 림프절과 폐, 간, 신장등의 실질장기에 대한 *in situ* PCR를 실시한 결과 림프절에서는 폐문림프절에서 고빈도로 양성반응을 관찰할 수 있었으며, 다음으로는 장간막 악하, 이하, 상유방림프절순이었다. 이들 림프절에서의 양성반응은 림프구 및 대식세포의 세포질내에서 강하게관찰 되었고, 간질내에서도 유리된 결핵균에 대하여 경미한 양성반응을 관찰 할 수 있었다. 특히 이러한 림프절 병변내에서는 건락괴사의 주변부위에서 세포질내 양성반응이 뚜렷이 관찰 되었고, 유리된 결핵균에 대해서는 건락괴사의 중심부에서 주로 관찰되었다. 장기로서는 폐에서 고빈도로 양성반응이 관찰 되었고 간, 비장에서도 확인할 수 있었다. 폐에 대한 결과는 림프절에서 관찰되었던 반응과 유사하게 일부 폐포세포와 주위에서 강한 양성반응이 관찰 되었으며, 폐의 괴사부위를 중심으로 증폭된 반응 산물이 고빈도로 관찰 되었다. 또한 병리조직학적으로 호중구나 대식세포와 같은 결핵균에 대한 염증세포 침윤이 관찰 되지않았던 무병소우에 대한 대한 *in situ* PCR 결과 실질세포 및 간질부위에서 증폭된 반응산물이 관찰 되어 진단적 가치를 확인하였다.

육안적으로 결핵병변이 관찰된 검체를 이용한 액상 PCR결과와 이들 포르말린 고정 조직에 대한 *in situ* PCR결과를 비교한 결과 거의 일치된 조직에서의 양성반응을 관찰 할 수 있었으며, 육안적 병변이 관찰되지 않은 각 장기의 액상 PCR 결과와 비교한 결과 거의 일치된 결과를 관찰 할 수 있었다.

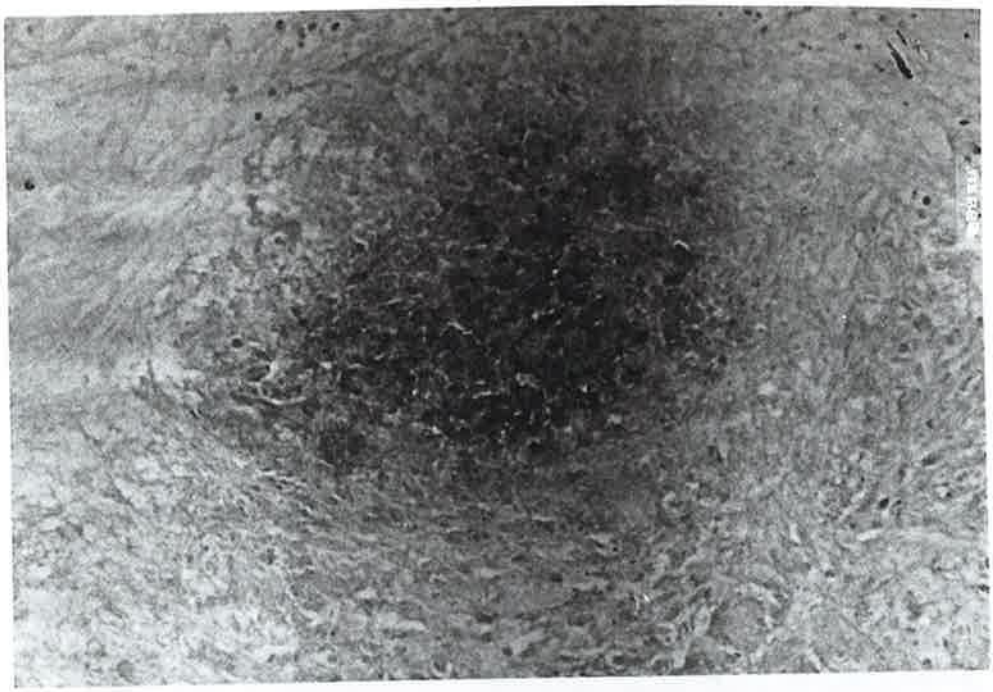

Fig 1. *M bovis* detected by *in situ* PCR in mesenteric lymph node from bovine. x100.

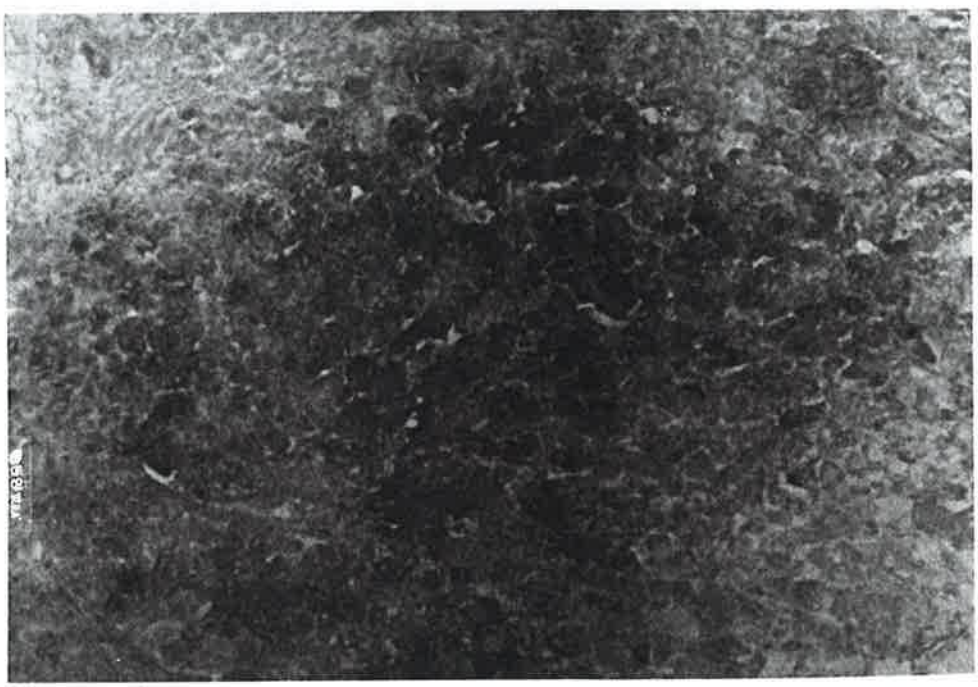

Fig 2. *M bovis* detected by *in situ* PCR in pulmonary lymph node from bovine. x200.

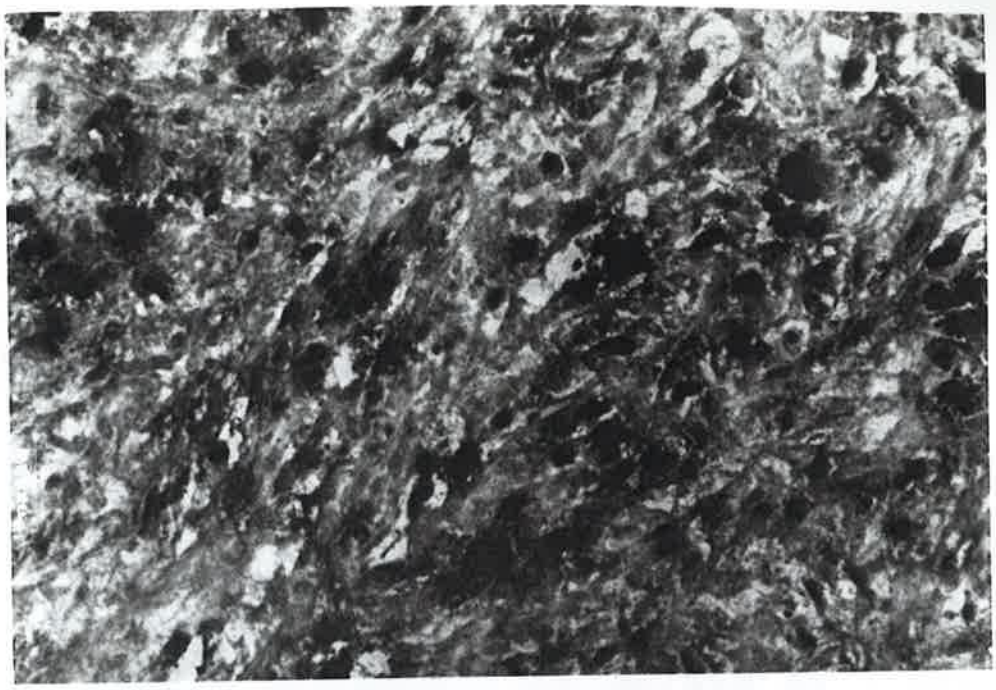

Fig 3. *M bovis* detected by *in situ* PCR in mesenteric lymph node from bovine. x400.

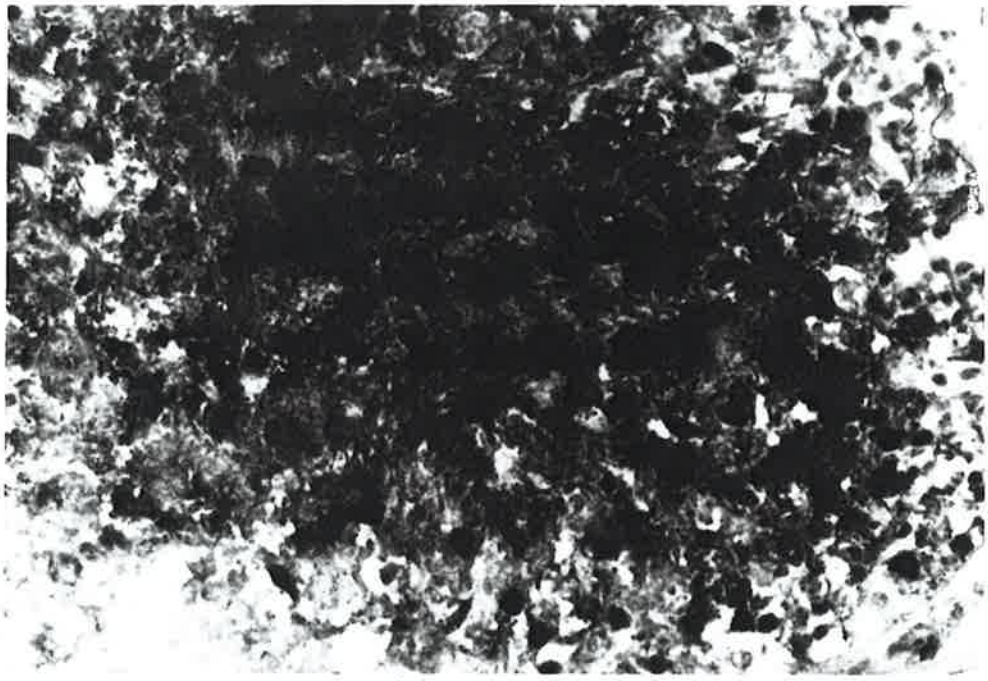

Fig 4. *M bovis* detected by *in situ* PCR in pulmonary lymph node from bovine. x400.

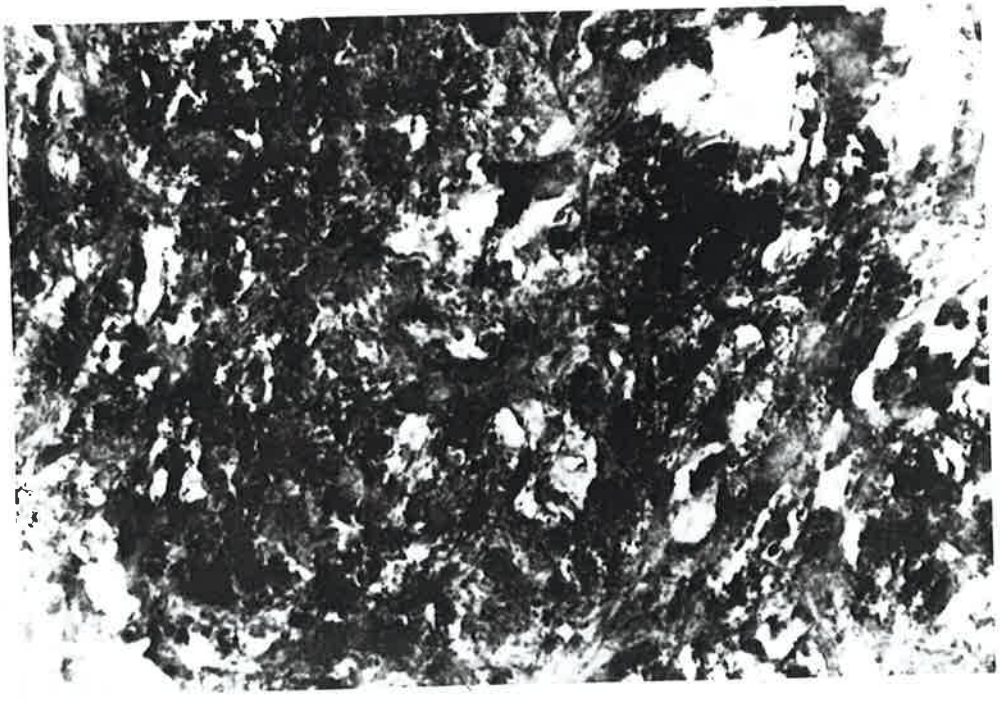

Fig 5. *M bovis* detected by *in situ* PCR in lung from bovine. x400.

제 6 절 *in situ* PCR을 이용한 세포학적 우결핵 진단

유즙, 비즙, 혈액, 분변, 오줌 등의 체액을 대상으로 *in situ* PCR에 의한 세포학적 진단을 시도한 결과는 다음과 같다

1. 유즙

유즙내의 정상 탈락세포의 일종인 체세포에 대한 *in situ* PCR 기법을 적용한 결과 일부 세포에서 우결핵균의 증폭산물이 뭉쳐 양성으로 염색된 것을 관찰 할 수 있었으며, 이들 증폭산물들은 조직에서와는 약간 다른 양상으로서 세포질내에서 과립상으로 관찰되었다.

2. 비즙

비즙에 대한 *in situ* PCR을 실시하기에 앞서 시료의 전처리로는 스라이드 도말법과 변형된 세포농축법을 사용하여 결과를 관찰하였으며, 그결과 도말표본에서 양성세포를 찾기는 어려웠으나 변형된 세포농축법을 사용하였을 경우에 양성으로 관찰되는 세포를 찾기 쉬웠다.

3. 분변, 혈액, 오줌

이들 체액의 세포학적 *in situ* PCR기법의 적용을 위해 많은 방법을 적용하였으나 결과 판독에 방해를 일으키는 인자가 많은 관계로 특이성과 민감성이 떨어졌으며, 가장 좋은 방법은 이미 개발된 액상 PCR방법을 활용하여 검출하는 것이 우수한 것으로 나타났다.

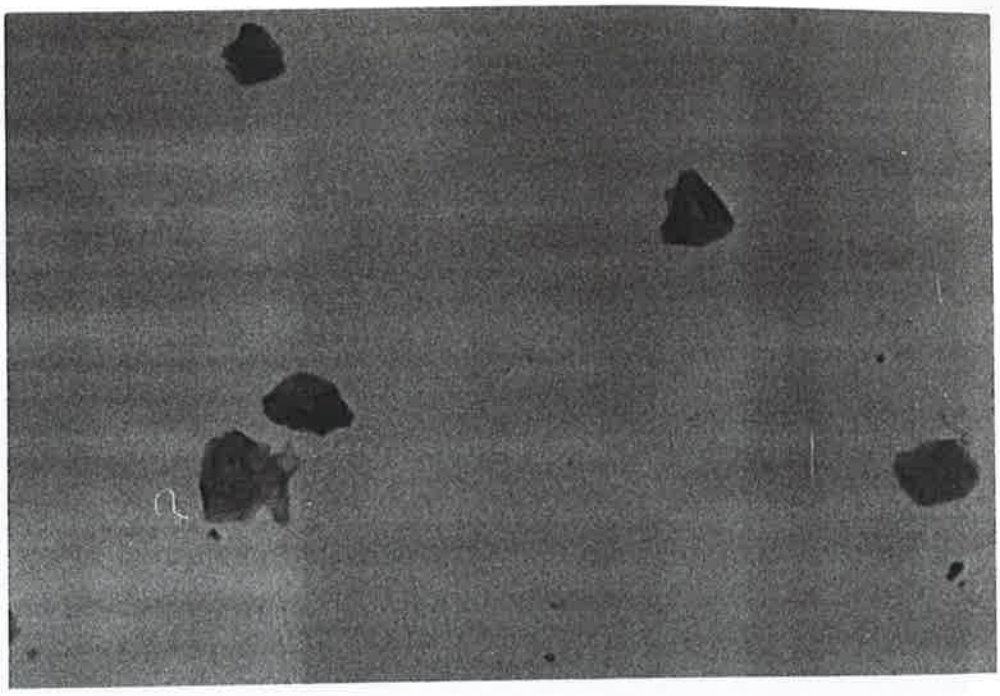

Fig 6. Negative control (primers for *M bovis* were excluded from amplication mixture). x100.

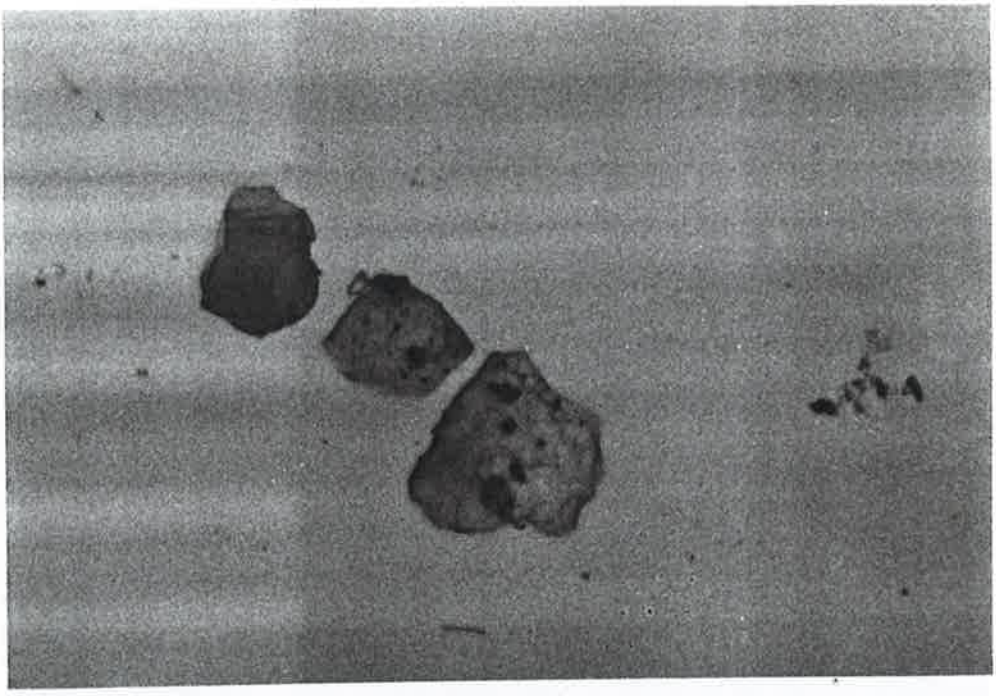

Fig 7. *M bovis* detected by *in situ* PCR in nasal discharge. x200.

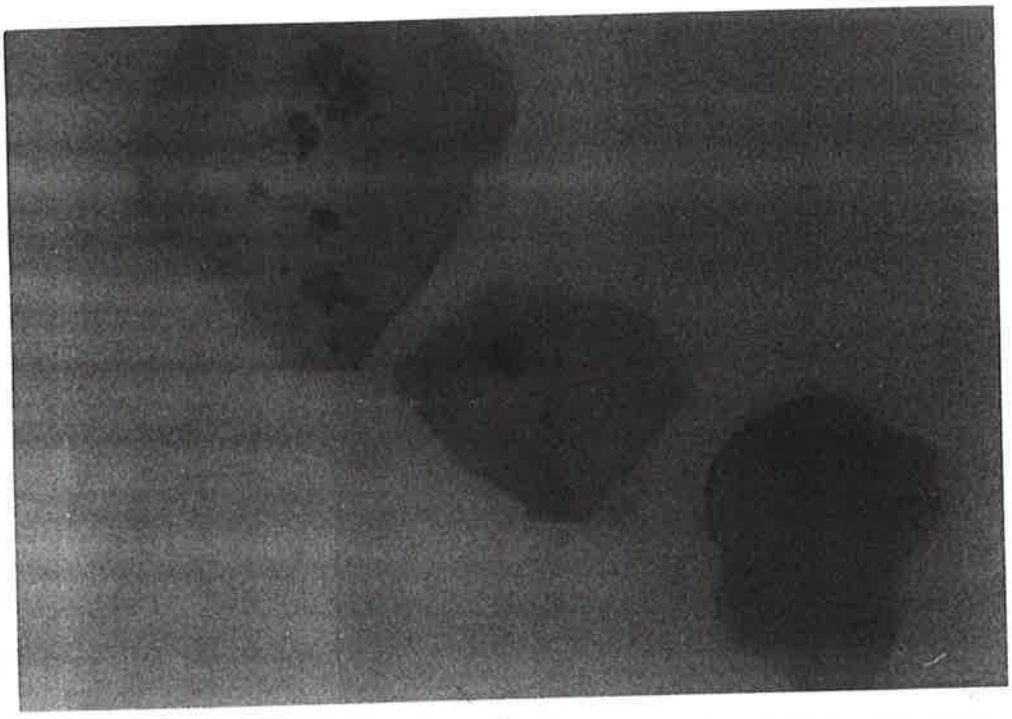

Fig 8. High power view of Fig 7. x400.

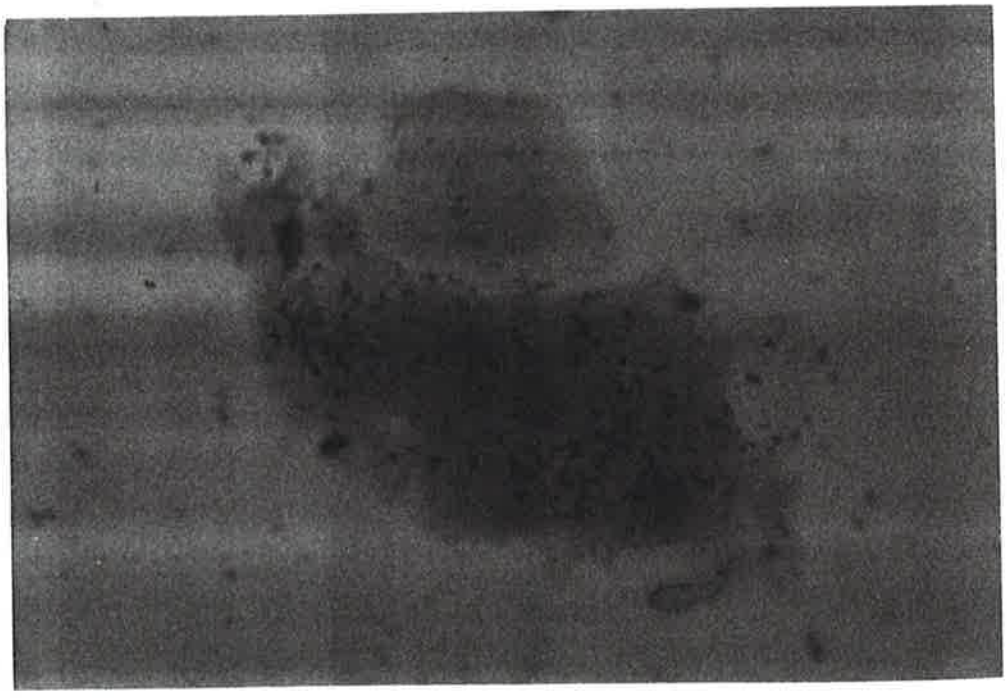

Fig 9. *M bovis* detected by *in situ* PCR in milk from bovine. x400.

참 고 문 헌

1 Ahn CH, McCarty JW, Ahn SS, Ahn SI and Hurst GA:Diagnosis criteria for pulmonary disease caused by Mycobacterium Kansasii and Mycobacterium intracellulare Am Rev Respir Dis 25:388-391,1982

2 American Thoracic Society: diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am Rev Respir Dis 142:940-953,1990.

3 April MM, Garelick JM, Nuovo GJ: Reverse transcriptase in situ polymerase chain reaction in atypical mycobacterial adenitis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122:11,1214-8,1996

4 B rutlag D, Schlehuber C, Bonner J : Properties of formaldehyde treated nucleohistones. Biochemistry 8:3214-3218,1977

5 Cave, MD, Eisenach K D, Salfinger M, Bates J H and Crawford J T: Usefulness of IS6110 in fingerprinting DNA of Mycobacterium bovis. Med. Microbiol Lett.1:96-102,1992.

6 Cho SN, Lee TY, Yoon KH, Chung DH, Chong YS and Kim JD: Detection of Mycobaterium tuberculosis in clinical specimens by polymerase chain reaction. J Korean Soc Macrobiol 25:491-499, 1990.

7 Collins, D.M.; Erasmusion, S.K.;Stephens, D.M.;Yates,G.F.;and de Lisle,G.W.1993. DNA fingerprinting of Mycobacterium bovis strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1088 and IS6110. J.Clin. Microbiol., 31:1143-1147

8 Crawford JT:Applications of molecular methods to epidemiolog of tuberculosis. Res Microbiol 144:111-116,1993.

9 Doran JL, Pang Y, Mdluli KE, et al., Mycobacterium tuberculosis efp encodes an efflux protein of the QacA transpoter family, Clin Diagn Lab Immunol, 4:1, 23-32, 1997

10 Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nicols PW, Jones PA : Southern blotan alysis of DNA extracted from formalin fixed pathology specimens. Cancer Res 1986;46:2964- 2970

11 Eisenach KD, Cave MD, Bates JH and Crawford JT:Polymerase chain reaction amplication of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium

12 tuberculosis. J Inf Dis 161:997- 981,1990.

13 Erlich, H. A (ed.) 1989. PCR Technology : Principles and Amplification for DNA Amplification. Stockton Press, New York.

14 Erlich, H. A Gelfand,D. H., and Saiki, R. K. 1988. Specific DNA amplification. Nature, 331:461- 462

15 Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embadded tissue. Biochem Biochem Biophys Res Commun ;130:118- 124,1985

16 Greer CE, Lund JK, Manos MM. PC : amplification from paraffin- embedded tissues:effects of fixative times Am J Clin Pathol ;95:117- 124,1991

17 Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin- embedded tissues:recommendation on fixatives for long- term storage and prospective studies. Cold Spring Harb Symp Quant Biol;1:46- 50,1991

18 Hence AJ, Grandchamp B, LevyFrebault V, Lecssier D, Lauzier J, Bocart D and Gicquel B:Detection and identification of mycobacteria by amplication of mycobacterial DNA. Mol Microbiol 3: 843- 847,1989.

19 Innis, M.A. Gelfand,D.H. Sninsky,J. J., and White, T. J. (eds.) 1990. PCR Protocols : A Guide to Methods and Amplification. Academic Press San Diego

20 Karlson,A.G.1962.Nonspecific or cross- sensitivity reactions to

tuberculin in cattle. Adv. Vet. Sci. 7:147-181

21 Kent PT and Kubica GP:Public health mycobacteriology. A guide for the level III labortary.U.S. Department of health and human Services, PublicHealth Center for Disease Control,Atlanta, GA.1985

22 Kim SJ, Hong YP and Jin BW: Tuberculous and nontuberculous mycobacterial infection in Korea. In Mycobacteria of Clinical Inter ,Elsevier Science Publishers B.V. 144-148, 1986.

23 Kim SJ, Park YK, Cho SH and Shim MS:Primer directed amplication of Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical specimens I.Primers and Reaction Conditions.J Korean Soc Microbio l27:35-44,1992.

24 Kwok,s.,and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positive with PCR, Nature, 339:237-238.2

25 Marterz A, Miller MJ, Quninn K, Unsworth EJ, Ebina M, Cutta F, Non-radioactive localization of nucleic acids by direct in situ PCR and in situ PT-PCR in paraffin-embedded sections, J Histochem Cytochem, 43:8 739-47,1995

26 Martin, W. J. 1991. Polymerase Chain Reaction : A Tool for the Modern Pathologist. In Molecular Diagnosis in Pathology(eds, Fenoglio-Preiser, C.M., and Williman, C.L.),21-46. Williams and Wilkins, Baltimore.

27 McAllister HA, Rock DL. Comparative usefulness of tissues fixatives for in situ viral nucleic acid hybridization. J Histochem Cytochem ;33:1026-1032,1985.

28 McFadden,J.J.;Kunze,Z.;and Seechurn,P.1990.DNA probes for the detection and identification. In Molecular Biology of the Mycobacteria. Ed.J.J. McFdden, 139-172. San Diego

29 Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T, Hermon-Taylor : IS900PCR to detect Mycobacterium paratuberculosis in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and ppl

Environ Microbiol, 62:9,3446- 52,1996

30 Nuovo GJ, Becker j, MacConnell P, Margiotta M, Comite S, Hochman H. Histological distribution of PCR- amplified HPV 6 and 11 DNA in penile lesions. AM J Surg Pathol 16:269- 275,1992

31 Nel, E. E.;Kleeberg, H. H.;and Gatner, E. M. S. 1980. Laboratory Manual of Tuberculosis Methods 2nd Revised Eddition. Capetown, s. Africa : South African Medical Resech Council

32 Nuovo GJ, MacConnell P, Forde A, Delvenne P. Detection of human papillomavirus DNA in formalin fixed tissues by in situ hybridization after amplification by PCR. Am J. Pathol ;139:847- 854,1991.

33 Nuovo GJ, Gallery F, MacConnell P, Becker J, Bloch W. Animproved technique for the detection of DNA by in situ hybridization after PCR amplification. Am J Pathol ;139:1239- 1244,1991.

34 Nuovo GJ, Silverstein SJ. Comparision of formalin, bufferd formalin, and Bouin's fixation on the detection of human papillomavirus DNA from genital lesions. Lab Invest ;59:720- 724,1988.

35 Nuovo GJ, Buffered formalin is the superior fixative for the detection of human papillomavirus DNA by in situ hybridization analysis. Am J Pathol ;59:720- 724,1989.

36 Nuovo GJ. Comparision of Bouin's solution and buffered formalin fixation on the detection rate by in situ hybridization of human papillomavirus DNA in genital tract lesion. J Histotech ;14:13- 18,1991.

37 Nuovo GJ. Detection of viral infections by in situ PCR : theoretical considerations possible value in diagnostic pathology, J Clin LAb Anal, 10:6,335- 49, 1996

38 Nuovo GJ. In situ PCR : protocols and applications, PCR Methods Appl, 4:4, S151- 67, 1995

39 Oste, C. Polymerase Chain Reaction. Biotechniques, 6:162- 167,1988.

40 Pao C, Benedict-Yen TS, You JB, Maa JS and Fiss EM:Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA amplication. J clin Microbiol 28:1877-1880,1990.

41 Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA, Species-specific identification of Mycobacterium bovis by PCR, Microbiology, 141:2131-8,1995

42 Sjobring U, Mecklenburg M and Anderson AB: Polymerase chain reatiofor detection of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 28:2200-2204,1990.

43 Special Technology Section : Methods and Materials. Amplification of nucleic acid sequences : The choices multify . J. NIH Reserch, 3:81-94,1991.

44 Thierry D, Brisson-Noel A, LevyFrebault V, Nguyen S, Guesdon JL and Gicquel B: Charaterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol 28: 2668-2673,1990.

45 Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B and Guesdon JL:IS6110, and IS like element of Mycobacterium tuberculosis complex. NAR 18:188,1990.

46 Thoen, C.O. Tuberculosis in wild and domestic mammals. In Tuberculosis: Pathogenesis protection and Control. Ed. B.R.Bloom,pp. 157-162,1994. American Society for Microbiology(in Press)

47 Thoen,C.O.;Karlson,A.C.;and Himes,E.M.Mycobacterial infection in animals Rev. Infec.Dis 3(5):960-972

48 Tsukamura M:Diagnosis of disease by M. avium complex. Chest 99(3):667-669,1975

49 Walker DA, Tayler IK, Mitchell DM and Shwa RJ: Comparison of polymerase chain reaction amplication of two mycobacterial DNA sequences, IS6110 and the 65 kDa antigen gene in diagnosis of

tuberculosis. Thorax 47:690-694, 1992.

50 White, T. J., Arnheim, N,. and Erlich, H. A. 1989. The polymerase chain reaction. TIG, 5:185-189

51 Winblad,B.,and Ducheck,M.1973.Comparision between microscopical methods, and cultivation for demonstration of tubercle bacilli in experimental tuberculous infection. Acta Pathol. Microbiol. Scnad. Sect. A81,824-830

55 Williams, J. F. 1989. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques. 7:762-768

56 Yamamoto M, Ogura Y, Sudo K and Hibino S:Diagnostic criteria for disease caused by atypical mycobacteria.Am Rev Respir Dis 96:773-778,1967

자 체 평 가 의 견 서

1) 우결핵의 육안소견과 PCR을 통한 양성률의 비교는?

: 투버클린 접종 검사 결과 양성우로 판정된 69두의 621개의 시료중에서 85개의 장기에서만 결핵병변이 관찰된 반면에 단일 및 이중 PCR결과 결핵병변이 관찰된 모든 장기에서는 특이 DNA band를 관찰할 수 있었으며, 결핵 병변이 관찰되지 않았던 장기에서도 각각 185(40%) 및 197(48%) 시료에서 특이 DNA band를 관찰할 수 있었다.

2) 단일 및 이중 PCR의 민감도의 비교 및 조건 확립은 되었는가?

: 우결핵 병변이 관찰되지 않았던 시료를 대상으로 단일 및 이중 PCR을 실시하여 각각의 민감도를 비교한 결과 이중 PCR에서 8%가 더 높은 양성 반응을 나타내어 이중 PCR이 민감도가 더 높고 우결핵진단을 위해서 보다 좋은 기법임을 알 수 있었다.

3) 각 장기별 양성률 검사에 의한 우결핵 진단을 위한 적합한 장기 선택과 그 결과는?

: 폐문 림프절 등 5개의 림프절과 폐, 간, 신장, 비장의 실질 장기를 대상으로 단일 및 이중 PCR을 실시하여 가장 높은 민감도를 보인 장기를 조사한 결과 폐문 림프절, 장간 막림프절, 폐, 간, 비장등의 장기순으로 민감도가 높은 것으로 나타났다.

4) Primer종류에 따른 PCR의 민감도를 측정하여 우결핵진단 PCR기법 확립을 위한 가장 적합한 primer의 선택은?

: 단일 PCR을 위해 사용했던 IS 1081, mpt 40 유래의 Primer각각 1쌍과 IS 987 유래의 유래의 outer primer 1쌍 및 이중 PCR을 위해 사용했던 IS 987유래의 2쌍의 outer primer와 nested primer를 이용하여 각각 PCR 성적을 비교한 결

과, IS987 유래의 2쌍의 primer를 이용한 이중 PCR에서는 51%의 높은 양성 반응을 얻을 수 있었으며, IS 987 outer primer, IS 1081, mpt40 순으로 높은 양성 반응을 관찰 하였다.

5) DNA 추출법에 따른 PCR의 민감도를 측정하여 우결핵 PCR 법 선택을 위한 가장 적합한 추출법은 개발되었는가?

: DNA의 분리는 Proteinase K - chloroform법과 bead- beating법 그리고 modified bead-beating법 3가지를 실시하여 IS 987 유래의 outer primer를 이용하여 각각의 결과를 비교하였다. 그 결과 Modified bead- beating법에서 가장 높은 민감도를 보였지만 3가지 방법의 민감도 차이는 별로 크지 않았다.

6) 각종 장기, 체액 및 점액의 검사와 우결핵 진단을 위한 가장 적합한 시료의 선택 과정이 적절한가?

: 장기의 PCR 검사는 유용하였으며, in situ PCR 검사에서도 우수한 결과를 얻을 수 있었으나, in situ PCR 상에서 유즙 및 비즙을 제외한 혈액, 분변, 오줌에서의 우결핵검진을 위한 방법으로 적당치 않은 것으로 판단되며, 이들 시료에 대해서는 액상 PCR의 방법이 적당할 것으로 사료되었다.

7) PCR기법의 약점인 cross contamination이나 carryover를 해결하기 위해서 한 단계 더욱 앞선 in situ PCR기법을 도입하고 있는가?

: 파라핀 포매조직이나 체액성 세포의 도말 표본에 대한 직접 in situ PCR 기법의 적용으로 기존 액상 PCR 기법에서 실험에서 주의를 요하는 단계가 축소되었으며, 기존 검사 시간을 단축하므로써 오염될 수 있는 가능성을 배재하였다.

.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림수산 특정연구사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가 과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.