

최 중  
연구보고서

**우결핵의 면역진단 및 우형결핵균 추적기술개발**

Immunodiagnosis of Bovine Tuberculosis and  
Molecular Typing of *Mycobacterium bovis*

**우결핵의 혈청진단 및 우형결핵균 추적기술**

세포매개 면역반응 기법에 의한 우결핵의 진단

**새로운 우결핵 진단기술의 응용성 평가**

연 세 대 학 교

경기도축산위생연구소

농 립 부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “우결핵의 면역진단 및 우형결핵균 추적기술 개발” 과제 (제1세부과제: 우결핵의 혈청진단 및 우형결핵균 추적기술; 제2세부과제: 세포매개 면역반응 기법에 의한 우결핵의 진단; 협동연구과제: 새로운 우결핵 진단기술의 응용성 평가)의 최종 보고서로 제출합니다.

1999년 10월 일

주관 연구기관 : 연세대학교

총괄연구책임자 : 조 상 래

연 구 원 : 최 인 흥

협동 연구기관 : 경기도축산위생연구소

협동연구책임자 : 박 유 순

# 요 약 문

## I. 제목

우결핵의 면역진단 및 우형결핵균 추적기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

### <연구의 목적>

본 연구에서는 우결핵의 실험실내 면역진단법을 개발하여 우결핵의 방역사업을 보다 효과적으로 수행하는 데 필요한 자료를 얻고자 하였으며, 그 세부목적은 다음과 같다. (1) 소의 결핵 진단방법으로 민감도와 특이도가 높은 실험실 면역진단기술을 확립하여 우결핵 퇴치에 기여하고자함. (2) 우결핵 발생실태를 조사하여 우결핵 방역대책에 필요한 자료를 제공함. (3) 우형결핵균주 감별기술을 확보하고 우형결핵균의 전파경로를 추적할 수 있는 감시체제를 확립함, (4) 본 연구과제를 수행하면서 축적된 기술개발 능력을 이용하여 다른 전염성 질병의 검진기술과 방역대책에 응용하고자함.

### <연구의 중요성>

우결핵(bovine tuberculosis)은 우형결핵균 (*Mycobacterium bovis*)에 의한 만성전염성 질병으로 소, 돼지, 사슴, 염소 등의 가축에 결핵을 일으켜 막대한 경제적인 피해를 입히고 있다. 또한 우형결핵균은 사람에게도 결핵을 유발하기 때문에 우결핵의 퇴치는 국민보건 증진을 위하여 중요한 국가방역사업이다. 한편, 우결핵은 국제수의기구(Office International des Epizooties: OIE)에서 분류한 질병 중 B급 질병으로 사회경제적인 면과 국민보건의 측면에서 볼 때 매우

중요하여 국제무역에 있어서 중요하게 다루고 있는 질병이다.

우결핵의 진단은 우형결핵균 배양액에서 준비한 PPD를 이용한 피내반응검사에 의존하고 있다. 비특이 반응에 의한 우결핵양성 판정을 최소화하기 위하여 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD를 동시에 이용하는 comparative cervical test (CCT)를 채택하는 나라가 증가하고 있으며, 최근에는 IFN- $\gamma$  test를 보조적인 검사로 채택하거나 표준검사로 도입하려는 연구를 활발히 진행하고 있다.

피내반응검사는 세포매개면역성을 측정하는 검사이기 때문에 일부 우결핵 감염우에서 감염초기나 세포매개면역반응이 억제된 경우에는 피내반응검사에 음성일 수 있다. 특히 감염말기에는 피내반응은 감소하나 항체반응은 높은 개체에서 항체검사를 우결핵의 진단에 보조적으로 이용하려는 연구를 진행하고 있다. 특히 사람의 결핵이나 나병에서처럼 항체가 높은 개체에서는 세포매개면역반응이 저하되어 활발한 세균의 증식으로 세균 전파의 주요 감염원이 될 수 있다.

한편, 분자생물학적 기법을 이용하여 우형결핵균을 감별하여 특정 지역이나 목장간에 우형결핵균의 전파양상을 파악하기 위한 역학조사에 응용하는 연구를 진행하고 있다. 이러한 연구결과는 소의 이동이나 도축장에서 발견되는 우결핵병변에서 분리한 우형결핵균의 감염원을 추적 조사하는 데 매우 유용하게 이용할 수 있다.

따라서 본 연구과제에서는 우리 나라의 우결핵 퇴치사업의 근간이 되는 우결핵 진단을 보다 정확하게 판정할 수 있는 보조적인 실험실 진단법을 도입하여 그 유효성을 평가하고 우결핵 감염우가 존재하는 목장을 보다 간편하게 검색할 수 있는 방법을 제시하고, 나아가 이러한 방법을 우결핵 퇴치사업을 수행하는 기관에서 적용하여 그 응용성을 평가하고자 하였다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구과제의 목적을 달성하기 위한 세부 연구내용은 다음과 같다. (1) 현재 우결핵 검진방법인 튜버큐린 피내반응검사에서 양성 반응을 나타낸 소에서 병변조직, 혈액 등 연구재료 채취함. (2) 튜버큐린 피내반응 양성우에서 채취한 연구재료에서 우형 결핵균 배양, 항체검사, 세포매개 면역반응 지표 등을 측정함. (3) 우형결핵균과 조형결핵균으로부터 피내반응 검사용 항원을 준비하고 그 항원성을 실험동물을 이용하여 평가함. (4) 우형결핵균과 조형결핵균으로부터 항체 검사에 유용한 항원을 분리하고 그 특성을 규명하며, 항체검사 기법을 확립함. (5) 튜버큐린 피내반응 검사에서 양성인 소와 음성인 소를 대상으로 항체검사를 실시하고 특이성과 민감도를 평가함. (6) 피내반응 검사용 항원을 이용하여 림프구증식반응과 IFN- $\gamma$ 의 측정기법 등 세포매개 면역반응 지표 측정기법을 확립함. (7) 튜버큐린 양성인 소와 음성인 소를 대상으로 우형결핵균 및 조형결핵균 항원에 대한 세포매개 면역반응 지표를 조사하여 진단적 가치를 평가함. (8) 병변조직에서 배양된 균체를 동정하고 분자생물학적 기법을 이용하여 우형결핵균 균주간의 차이를 감별하는 기술을 확립함. (9) 연구결과를 종합하여 소의 결핵병 퇴치를 위한 검진법의 개선책과 방역대책과 활용방안을 제시하고자 함.

### IV. 연구개발 결과 및 활용방안

#### <우결핵의 혈청진단>

현재 널리 이용되고 있는 우결핵의 피내반응은 우형결핵균 항원에 대한 세포매개면역반응을 측정하는 것이다. 그러나 일부의 감염우

에서는 세포매개면역반응이 억제되어 있고 항체가 높아지기 때문에 항체를 측정하는 진단법 즉 혈청진단법의 필요성이 제기되었다. 우결핵의 혈청진단법을 개발하는데 가장 중요한 요건은 항체검출에 이용하는 항원의 선정이기 때문에 본 연구에서는 우형결핵균 배양농축 항원 (culture filtrate: CF), 균 세포벽에서 추출한 당지질 항원 (glycolipid), 그리고 유전자재조합 기법으로 생산한 rMPB70항원을 준비하여 각 항원의 민감도와 특이성을 비교 분석하였다.

우형결핵균 CF항원을 사용할 경우 민감도는 높았으나, 비교적 특이도가 낮았다. 특이도를 높이기 위하여 혈청희석액에 *M. phlei* 균체를 첨가하였으며, 조형결핵균 (*M. avium*) CF항원에 대한 반응성을 비교하여 우형결핵균 CF항원에 대한 항체반응성이 높은 경우에만 양성으로 판정하는 것이 바람직하였다. 우형결핵균의 당지질 항원 2개를 분리하였으며, mycoside B를 포함하는 당지질 분획은 민감도가 비교적 낮았으며, 당성분이 높은 분획은 특이도가 비교적 낮아 우결핵의 면역진단에 만족스런 결과를 보이지 않았다.

반면에 유전자재조합기법으로 생산한 rMPB70항원은 민감도가 약 90%였으며 특이도도 100%나 되어 매우 만족스러운 결과를 나타냈다. 다만 지난 3년 이내에 우결핵이 발생하였던 목장의 젖소 가운데 약 7%가량이 rMPB70항원에 양성이기 때문에 피내반응 음성이면서 항체반응에 양성인 경우 우형결핵균에 감염여부에 대한 정밀검사가 이루어져야만 혈청진단의 유용성이 규명될 수 있다. 특히 최근 협동연구기관에서 평가한 결과에 의하면 피내반응 양성우 107두를 대상으로 rMPB70항원에 대한 항체검사에서 100두가 항체 양성반응을 나타내 민감도가 93.5%로 매우 높았다. 또한 전년도에 우결핵이 발생하였던 11개 목장 288두를 대상으로 정밀 검사한 결과 피내반응 양성

9두 모두 항체양성이었다. 피내반응 음성우 276두 가운데 34두 (12.3%)에서 양성반응을 나타내 특이도에 문제점을 제기하기도 하였으나 보다 정밀한 검사와 향후 수년간 우결핵 발생여부를 관찰해야 혈청반응검사의 유용성을 규명할 수 있을 것이다.

우결핵 혈청진단법 활용방안의 하나로 목장탱크 우유에서 항체검사를 시도하였다. 개체별 검사에서 혈청 항체가와 우유 항체를 비교한 결과 높은 상관관계를 나타냈다 ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.05$ ). 목장별 탱크에서 채취한 우유에서 항체양성인 목장에서 개체별로 우유항체검사를 실시한 결과 적어도 1두 이상에서 높은 항체반응을 나타내는 소가 있음을 확인하였다. 따라서 목장탱크우유를 분기별로 검사하더라도 우결핵 양성으로 의심되는 소가 있는 목장을 검색할 수 있음을 제시하였다.

이를 근거로 경기도내 3,800여 개 목장을 대상으로 항체검사를 실시한 결과 약 4%의 목장에서 우결핵 항원에 대한 항체가 발생하였다. 이는 수년간 1회 이상 발생한 농가가 전체 농가수의 약 3.5%인 점을 고려하면 항체반응 양성농가 수가 많은 것은 아니라고 생각한다. 또한 우결핵을 보다 효과적으로 근절하게 위해서는 민감도를 보다 높은 방법으로 검색하여 양성목장을 대상으로 특이도가 높은 검사법으로 정밀 검사하는 정책이 바람직하다고 가정할 때 목장탱크 우유를 대상으로 정기적으로 우결핵 항원에 대한 항체검사를 실시하는 것이 바람직하다.

#### <항체 검출 진단키트의 개발>

유전자재조합 rMPB70항원을 이용하여 혈청과 우유에서 우형결핵균에 대한 항체를 검출하기 위하여 효소결합 면역항체측정법(ELISA)을



이용한 항체검출 진단키트의 시제품을 제조하였으며, 협동연구기관과 동일한 혈청과 우유를 대상으로 재현성을 평가한 결과 만족스러운 결과를 얻었다.

#### <세포매개면역반응 검사에 의한 우결핵의 면역진단>

우결핵 진단을 위한 피내반응검사가 생체에서 세포매개면역반응을 측정하는 것으로 실험실에서 검사하는 방법으로 림프구 증식반응검사 (LTT)와 IFN- $\gamma$  검사를 시행하였다. LTT방법과 IFN- $\gamma$  검사는 높은 상관관계를 나타냈으며, 두 방법 모두 피내반응검사 결과와 높은 일치도를 보였다. IFN- $\gamma$  검사는 피내반응검사를 기준으로 할 때 민감도와 특이도가 95% 이상되었다. 그러나 최근 협동연구기관에서 현장 적용평가를 수행한 결과 피내반응검사 양성우 9두 가운데 6두 (66.7%) 만이 IFN- $\gamma$  검사에서 양성이었으며, 피내반응 검사에 음성인 276두 가운데 11두 (4.0%)에서 IFN- $\gamma$  검사 양성을 나타냈다. 이러한 차이는 IFN- $\gamma$  검사 키트간의 민감도 차이일 수 있으며, 검사대상 목장이 예년에 우결핵 발생목장인 점을 고려하면 피내반응검사의 민감도가 낮았기 때문으로 추정할 수 있다. 향후 조사대상 목장에서 우결핵 양성우의 발생 상황을 추적하여 항체검사와 IFN- $\gamma$  검사의 효용성을 분석하는 것이 바람직하였다.

#### <우형결핵균 추적기술 개발>

우형결핵균 균주감별기법으로 IS6110, IS1081, DR sequence, pTBN12 등의 probe을 이용한 restriction fragment length polymorphism (RFLP)기법을 확립하고 균주감별력을 비교하였다. 또한 polymerase chain reaction (PCR) typing 기법으로 variable

number tandem repeat (VNTR) typing과 outward PCR typing법을 확립하여 RFLP 기법과 우형결핵균 감별능력을 비교한 결과 PCR typing 기법이 균주 변별력은 비슷하면서 기법의 간편성의 장점이 있어 향후 우형결핵균의 감별기법으로 VNTR typing법과 outward-PCR기법을 적용하는 것이 바람직하였다.

### <경기도내 우결핵 발생실태의 분석>

지난 10여 년간 경기도의 우결핵 발생실태를 분석한 결과 우결핵 발생두수와 발생율이 점차 증가하고 있으며, 전국의 발생 두수의 약 3분의 2를 차지하고 있어 타 지역보다 3배 가량 높은 발생율을 나타내고 있다. 경기도내 31개 시군 가운데 약 20여개 시군에서 1두이상 발생하고 있으며, 화성군, 안산시, 시흥시, 평택시, 김포시, 남양주시 등에서 매년 10두 이상 발생하고 있다. 특히 1999년도에는 화성군에서 300여 두 이상 발생하여 시급하고 강력한 방역대책이 절실하다. 우결핵 발생농가 370여 개를 분석한 결과 34%인 128개 농가에서 2회 이상 발생하고 있으며, 그 발생 두수는 전체의 약 60%를 차지하고 있다. 따라서 우결핵의 근절을 위해서는 2회 이상 발생농가에 대해서는 전 두수의 도태처분 등 강력한 우결핵 방역정책을 수립하는 것이 바람직하다.

### <종합대책 및 활용방안 건의>

우결핵은 축산 농가에 경제적 피해와 국민보건 상 중요한 질병으로 국가사업으로 우결핵 근절을 위한 방역대책을 수립하고 많은 예산과 인력을 투입하여 방역사업을 집행하고 있다. 우결핵의 발생은 국가간 또는 지역간 동물의 이동에 제한을 받기 때문에 거의 모든

나라에서 양성우의 도태처분, 나아가 목장 전체 두수의 도태를 적극 장려하는 정책을 펴고 있다. 우리 나라에서도 지난 수 십여 년간 우결핵 방역사업을 수행하고 있으나 여러 가지 여건상 우결핵 발생 건수와 발생율이 증가하고 있는 추세이다. 이에 우리 나라에서 우결핵 방역사업을 보다 효과적으로 수행하고 궁극적으로 근절에 도달하기 위한 종합대책과 본 연구결과의 활용방안은 다음과 같다.

1. 우결핵 방역대책을 수립하고 추진하기 위한 자문위원회를 구성하고, 위원은 농림부 축산위생과, 수의과학검역원, 시도 축산위생연구소, 학계, 축산농가 대표 등으로 구성한다. 위원회의 주요 업무는 매년 방역사업의 추진사항을 점검하며, 우결핵 발생실태를 분석하고, 연구사업의 계획과 그 결과를 평가하여 새로운 방역사업을 추진하는데 필요한 자문을 한다.

2. 우결핵 발생이 비교적 많은 경기도의 일부 지역을 새로운 방역사업의 시범지역으로 지정하고 다음과 같은 정책을 집행하기 위한 자원을 확보한다.

가. 연례 우결핵 검진에서 연속적으로 2회 이상 음성인 목장을 "우결핵 음성목장"으로 지정하고 4년에 1회 전 두수를 검사한다. 단, 우결핵 음성목장에서부터 300 m 이내에 우결핵 발생 목장이 있는 경우에는 매년 검사한다.

나. 우결핵 검진에 양성우 발생목장은 전 두수의 이동을 제한하고 30일 이내에 다음의 정밀검사를 실시한다.

1) 피내반응 양성우에 대해서는 comparative cervical test를

시행한다. 경측피내에 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD를 접종하고 그 종창의 차이를 비교 분석한다.

- 2) 피내반응 음성 동거축에 대하여 IFN- $\gamma$  test와 우형결핵균 특이항원에 대한 항체검사를 실시한다. 말초혈액림프구를 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD로 약 16시간 자극시킨 다음 IFN- $\gamma$ 를 측정한다.

다. 정밀검사서 양성우가 있는 경우 다음의 조치를 취한다.

- 1) 전 두수의 도태를 장려하고 6개월간 입식을 금지한다.
- 2) 양성우만을 도태할 경우 매 2개월마다 피내반응 검사와 정밀 검사를 실시하여 양성우를 도태하고 연속 2회 음성일 때 6개월 후에 재검사를 실시한다. 재검사서 음성일 경우 매년 피내반응 검사를 실시하고, 5년간 계속해서 음성일 경우 “우결핵 음성목장”으로 지정한다.
- 3) 우결핵 음성 목장으로 지정될 때까지 보유 동물의 이동을 금지한다.

라. 우결핵 발생 감시 기능을 다음과 같이 강화한다.

- 1) 목장별 집유탱크 우유에서 우결핵 항원에 대한 항체검사를 분기별로 실시하고 2회 이상 양성인 목장의 전 두수에 대한 피내반응 검사와 정밀검사를 실시한다.
- 2) 우결핵 양성우 발생목장의 300 m 이내에서 사육하는 비육우, 사슴 등의 가축에 대하여 피내반응검사 또는 정밀 검사를 실시하여 젖소 이외의 우형결핵균 보유동물을 제거한다.

# 여 백

## <SUMMARY>

### **Immunodiagnosis of Bovine Tuberculosis and Molecular Typing of *Mycobacterium bovis***

Bovine tuberculosis, caused by *Mycobacterium bovis*, is one of the major zoonotic diseases in Korea affecting more than 500 dairy cattle each year. Due to its importance to dairy industry and to public health, the major control strategies include test and slaughter. However, only tuberculin test positive animals are removed selectively from the infected herds mainly due to lack of sufficient funds for compensation for slaughtering all animals. Therefore, sensitive and specific diagnosis of bovine tuberculosis is the most important factor for effective control of the disease. The single intradermal tuberculin test (SIDT) in the caudal fold is the standard diagnostic test for bovine tuberculosis in Korea, which has been reported as moderately sensitive and specific. As alternate methods, serodiagnostic tests and IFN- $\gamma$  test have been developed and evaluated in many countries, but their efficiency has been controversial. Therefore, this study was initiated to evaluate serological tests and in vitro cell-mediated immunity tests for diagnosis of bovine tuberculosis, and their results were compared with caudal fold tuberculin test in the Kyunggi province.

#### **<Serological tests using culture filtrate protein>**

*M. bovis* AN5 strain was grown in Sauton medium, and culture

filtrate (CF) protein was prepared from the culture supernatant and designated as "bovine CF." Likewise, CF protein was also prepared from *M. avium* serovar 2 and designated as "avian CF." Antibodies to CF antigens were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Seroreactivity to bovine CF in sera from tuberculin test positive cattle was compared to avian CF, and only serum sample with higher reactivity to bovine CF by >20% than to avian CF was considered *M. bovis* infection. In general, seroreactivity to bovine CF was much higher than that to avian CF in sera from tuberculin test positive cattle, thus indicating *M. bovis* infection. However, more than one third of tuberculin positive cattle had low seroreactivity to both bovine and avian CF proteins. This may imply that the serological test using the CF antigen is not a good method for detecting *M. bovis* infection.

#### <Glycolipid antigens of *M. bovis*>

Glycolipid antigens of *M. bovis* were also examined for serodiagnosis of bovine tuberculosis in this study. Total lipids were extracted from heat-killed and freeze-dried whole cells of *M. bovis* and fractionated through the Florisil column using increasing proportion of methanol in chloroform solution. The lipid fraction with 5% methanol and 40% methanol gave a higher seroreactivity with sera from tuberculin test positive cattle and rabbit anti-*M. bovis* BCG serum. However, both glycolipid fractions did not give greater sensitivity or specificity than bovine CF antigen.

### <Recombinant MPB70 protein>

MPB70 protein was described as the major secretory antigen of *M. bovis* and specific to the species and has been widely used for serodiagnosis of bovine tuberculosis. In this study, recombinant (r) MPB70 protein was prepared by cloning and expression of the gene encoded the MPB70 protein. The rMPB70 protein was purified and used in the ELISA for detection of antibodies to *M. bovis*. Of 57 tuberculin positive cattle, 51 (89.5%) were seropositive while none of 90 tuberculin negative cattle from farms with no history of bovine tuberculosis cases last three years had seroreactivity over the criteria. Thus, the ELISA using rMPB70 protein gave a sensitivity of about 90% and specificity of 100%. Interestingly, 9 (7.3%) of 124 tuberculin-negative cattle from farms with recent history of outbreak of bovine tuberculosis were seropositive. Careful monitoring such seroreactive cattle would be of great value in evaluating the significance of serological test results.

### <Serological test using milk samples>

In order to facilitate serological test as a screening test, milk samples which were collected from milk tank in each farm were used for detection of antibodies to *M. bovis* antigens. The seroreactivity to rMPB70 in milk was well correlated with that in serum from each cattle ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.05$ ). When individual cows from farms with anti-rMPB70 antibody positive were examined, at least one animal were seropositive, thus indicating that milk sample testing from milk collection tank would be effective in identifying farm(s) with



seropositive cows. Of over 3,800 farms examined, 153 (about 4 %) were seropositive to rMPB70 protein. The proportion was roughly matched with that of farms with history of bovine tuberculosis outbreak last ten years. Although the significance of antibodies to MPB70 still need to be determined, it would certainly be worth evaluating the serological screening test for identifying farms with *M. bovis* infected cattle.

#### <ELISA kit using rMPB70>

A prototype ELISA kit for detection of antibodies to rMPB70 protein was prepared and evaluated for reproducibility. The kit was satisfactory both for milk and serum samples between laboratories participated in the comparative analysis of the kit.

#### <*In vitro* cell-mediated immunity test>

Lymphocyte transformation test(LTT) and IFN- $\gamma$  test were employed for diagnosis of bovine tuberculosis. Both LTT and IFN- $\gamma$  tests were well correlated with tuberculin test results. Due to its simplicity, however, IFN- $\gamma$  test was preferred as *in vitro* cell-mediated immunity test for bovine tuberculosis. During the initial evaluation, the IFN- $\gamma$  test gave a sensitivity of over 90% and specificity of 100%. However, a recent field evaluation, only 6 (66.7%) of 9 cattle were positive by the IFN- $\gamma$  test, and 11 (4.0%) of 276 tuberculin test negative cattle from farms with recent bovine tuberculosis outbreak. Those cattle with IFN- $\gamma$  test positive need to be monitored for future tuberculin test

reactivity to verify the significance of IFN- $\gamma$  test.

#### **<Molecular typing of *M. bovis*>**

In order to employ in epidemiologic investigation, molecular typing methods of *M. bovis* were explored in this study. During the study, restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing methods were established using IS6110, IS1081, DR sequence, and pTBN12 probes from *M. bovis*. In addition, PCR-based typing methods such as variable number tandem repeat (VNTR) typing and outward-PCR typing were established, and their results were compared with those by RFLP analysis. Due to simplicity, however, PCR-based typing in combination of VNTR typing and outward-PCR typing were preferred for strain differentiation of *M. bovis*, which may be useful in tracing *M. bovis* infected herds and movement of the infected animals.

#### **<Bovine tuberculosis in Kyunggi Province>**

Bovine tuberculosis outbreaks in the Kyunggi Province last 10 years were analyzed. Tuberculin test positive rate increased from 0.02% in 1990 to over 0.2% recent years. The total of number of tuberculin test positive cattle in the Kyunggi Province accounted more than two-thirds, and incidence of the disease in the Kyunggi Province was about three times greater than that of the other provinces in Korea. Of 31 local districts in the Kyunggi Province, 13 (42%) had less than 5 tuberculin test-positive cattle last five years, while 11 (35%) districts had more than 30 tuberculin positive cattle. Particularly, there was an explosive

outbreak of bovine tuberculosis this year in the Hwasung district where more than 300 cattle were tuberculin test positive, which was about 5 times over the previous years. Of 370 farms with bovine tuberculosis outbreak, 128 (34%) farms had more than two outbreaks and accounted more than two-thirds of total number of tuberculin test positive cattle. This suggested the importance of slaughtering all animals in the infected farms.

#### <Recommendations>

The current bovine tuberculosis control programs in Korea are far from ideal. One example of the shortcomings is to take only tuberculin test positive cattle to slaughter house and to keep the rest of animals in the farm mainly due to lack of funds for compensation for each slaughtered animal. In addition, there was no concerted effort to mobilize the existing resources including funds and man powers for bovine tuberculosis control. Based on the findings from this study, the following recommendations were drawn for further effective control of bovine tuberculosis.

1. To form an advisory council overseeing bovine tuberculosis control programs. The council will examine the bovine tuberculosis activities each year and formulate and enforce new direction of the programs.

2. To designate an area for experimental implementation of new bovine tuberculosis control strategies below and to secure sufficient funds for the new programs.

a. To employ classification systems for bovine tuberculosis status such as bovine tuberculosis free farms or free area based on the testing records last five years. If a farm had no history of bovine tuberculosis last five years, the farm would be designated as bovine tuberculosis free farm and examined every four years. However, if there is a farm with *M. bovis* infection within 300 m, all animals in the free farm need to be examined every year until the infected farm reaches the free status.

b. To enforce restriction of movement of animals in the *M. bovis* infected farms and to retest all animals within 30 days.

(1) Comparative cervical test for caudal fold test positive animals.

(2) IFN- $\gamma$  and serological tests for all animals in the farm.

c. To slaughter all animals from the *M. bovis* infected farm and to disinfect soil and facilities and not to allow new animals for six months. If the owner of the farm does not want total slaughtering, all animals over six week old should be examined every two months and under restriction of movement. If all animals were tuberculin test negative in two consecutive tests, those animal need to be retested again after six months, followed by yearly testing. If the farm has no more tuberculin test positive animals for five years, it will be qualified for designation of bovine tuberculosis free status.

d. To enforce surveillance of bovine tuberculosis by screening farm using serological test for milk samples from collection tank each farm. Milk samples need to be tested four times a year. If a farm becomes seropositive twice, all animals need to be examined either by

caudal fold tuberculin test or IFN- $\gamma$  test. In addition, domestic animals such as beef cattle, farmed deer, and goats, etc. in the *M. bovis* infected farm and farms within 300 m need to be examined for bovine tuberculosis.

## <CONTENTS>

- Chapter 1. Introduction
- Chapter 2. Serodiagnosis of bovine tuberculosis and molecular typing of *Mycobacterium bovis*
- Chapter 3. In vitro cell-mediated immunity test of bovine tuberculosis
- Chapter 4. Field evaluation of serodiagnosis and IFN- $\gamma$  test for diagnosis of bovine tuberculosis
- Chapter 5. Recommendations for bovine tuberculosis control programs

# 목 차

제 1 장 서론 . . . . .	1
제 1 절 연구배경	
제 2 절 연구개발의 필요성	
제 3 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점	
제 4 절 연구개발의 목표 및 내용	
제 2 장 우결핵의 혈청진단 및 우형결핵균 추적기술 개발 . . . . .	19
제 1 절 서설	
제 2 절 재료 및 방법	
제 3 절 결과 및 고찰	
제 4 절 결과 요약	
제 3 장 세포면역반응 기법에 의한 우결핵 진단기술 개발 . . . . .	105
제 1 절 서설	
제 2 절 재료 및 방법	
제 3 절 결과 및 고찰	
제 4 절 결과 요약	
제 4 장 새로운 우결핵 진단기술의 응용성 평가 . . . . .	127
제 1 절 서설	
제 2 절 재료 및 방법	
제 3 절 결과 및 고찰	
제 4 절 결과 요약	
제 5 장 우결핵 방역에 대한 종합대책 및 활용방안 건의 . . . . .	153
제 1 절 우결핵 관리의 문제점	
제 2 절 종합대책 및 활용방안 건의	

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구배경

우결핵(bovine tuberculosis)은 우형결핵균 (*Mycobacterium bovis*)에 의한 만성전염성질병으로 소, 돼지, 사슴, 염소 등의 가축에 결핵을 일으켜 막대한 경제적인 피해를 입히고 있으며, 특히 소에서 경제적 피해가 크다. 또한 우형결핵균은 사람에게도 결핵을 유발할 수 있기 때문에(7, 33) 우결핵의 퇴치는 국민보건위생의 중진을 위하여 매우 중요한 국가방역사업이다 (1, 3, 34).

한편, 우결핵은 국제수의기구 (Office International des Epizooties: OIE)에서 분류한 질병 중 B급 질병으로 사회경제적인 면과 국민보건의 측면에서 볼 때 매우 중요하며, 국제무역에 있어서 중요하게 다루고 있는 질병이다(43). 즉 우결핵 발생국가나 지역에서 소의 이동이 매우 제한을 받고 있다. 따라서 OIE회원국에서는 우결핵의 발생여부와 우결핵 퇴치사업 정책에 대하여 매년 보고하도록 규정하고 있다.

우결핵은 국가간에 정도의 차이가 있으나 전 세계적으로 발생하고 있다. 그러나 미국, 캐나다, 호주, 유럽국가 등 주요 선진국에서는 대부분 우결핵의 발생이 없거나 매우 미미하여 더 이상 주요 문제가 되고 있지 않으나, 소 이외의 동물 즉 사슴(미국, 캐나다)(19, 44)이나 야생동물인 possum (뉴질랜드) (15) 또는 badger (영국) (45) 등이 우형결핵균의 감염원이 되는 나라에서는 지역적으로 계속해서 문제가 되고 있다. 그러나 우리 나라를 비롯한 신흥개발국가나 저개발국가에서는 우결핵에 의한 축산업에 막대한 피해를 주고 있음에

도 불구하고 경제력의 부족으로 우결핵 퇴치를 위한 종합적인 대책의 수립과 추진에 어려움을 겪고 있다.

우결핵의 퇴치정책은 각 국가별로 우결핵의 발생율과 경제력에 따라 독자적인 방법을 채택하고 있으나 대부분 튜버쿨린 피내반응검사를 시행하여 양성인 소를 살처분하는 정책을 도입하고 있다. 이 경우 선진국가에서는 목장내 모든 소를 도살처분하는 정책을 펴고 있으나 우리 나라를 비롯 전 두수 살 처분시 보상 비용을 조달하기 어려운 많은 나라에서는 우결핵 양성우만을 살 처분하는 정책을 펴고 있다. 이렇게 우결핵 양성우만 선별적으로 살 처분하는 경우에는 재감염율이 30%이상 되기 때문에 (46) 우결핵의 근절은 거의 기대하기 어려우며, 따라서 우리 나라에서도 현재의 우결핵 퇴치정책을 고수한다면 우결핵의 근절은 어려운 실정이다.

우결핵의 진단은 우형결핵균 배양액에서 준비한 purified proein derivaives (PPD)를 이용한 피내반응검사 (intradermal tuberculin test)에 의존하고 있으며(20, 26), 우리 나라에서도 caudal fold에 PPD를 주사한 후 72시간에 종창의 크기를 관찰하여 판정하는 피내반응검사를 채택하고 있다. 그러나 우결핵의 발생율이 낮은 경우 우형결핵균 이외의 항산균 즉 조형결핵균이나 기타 토양 또는 물에 존재하는 항산균에 감염되어 우형결핵균 PPD에 비특이반응 빈도가 증가한다 (47, 48). 이러한 비특이반응에 의한 우결핵 양성판정을 최소화하기 위한 정밀검사의 하나로 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD를 동시에 이용하는 comparative cervical test (CCT)를 채택하는 나라가 증가하고 있으며, 최근에는 IFN-r test를 보조적인 검사로 채택하거나 도입하려는 연구가 활발히 진행중이다 (6, 49).

또한 피내반응검사가 세포매개면역반응을 측정하는 검사이기 때문



에 일부 우결핵 감염우에서 세포매개면역반응이 억제된 경우에는 피내반응 검사에 음성일 수 있다 (50). 이러한 경우 대부분은 항체반응은 매우 강하기 때문에 항체검사를 우결핵의 진단에 보조적으로 이용하려는 연구도 여러 나라에서 진행하고 있다. 특히 사람의 결핵이나 나병에서처럼 항체가 높을 경우 대개는 세포매개면역반응이 저하되어 세균의 증식이 활발히 이루어져 세균을 전파하는 주요 감염원이 될 수 있다.

한편, 분자생물학적 기법을 이용하여 우형결핵균을 감별하여 특정 지역이나 목장간에 우형결핵균의 전파양상을 파악하기 위한 역학적인 조사 연구가 진행중이다(21, 22, 32). 이러한 연구결과는 소의 이동이나 도축장에서 발견되는 우결핵병변에서 분리한 우형결핵균의 감염원을 추적조사하는 데 매우 유용하게 이용할 수 있다.

따라서 본 연구과제에서는 우리 나라의 우결핵 퇴치사업의 근간이 되는 우결핵 진단을 보다 정확하게 판정할 수 있는 보조적인 실험실 진단법을 도입하여 그 유효성을 평가하고 우결핵 감염우가 존재하는 목장을 보다 간편하게 검색할 수 있는 방법을 제시하고, 나아가 이러한 방법을 우결핵 퇴치사업을 수행하는 기관에서 적용하여 그 응용성을 평가하고자 하였다.

## 제2절 연구개발의 필요성

본 연구과제를 도출할 당시 우리 나라의 소에서 우결핵 진단보고 현황은 86년에 85개 목장 120두에서 90년에는 31개 목장 38두로 감소하였으나 93년에는 82개 목장 146두로 증가하였으며, 94년도에는 200두 이상으로 점차 확산되고 있는 추세(1, 4)이어서 시급한 방역 대책이 요구되고 있다. 이상의 통계는 단지 검사법의 민감도가 비

교적 낮은 튜버쿨린 피내반응검사 (6, 11, 30, 39) 결과에 의한 것이며, 민감도가 월등히 높은 새로운 검사기법(6, 8, 9, 37)으로 검사를 시행할 경우 우리 나라의 소에서 결핵병 이환율은 더 높을 것으로 추정할 수 있다.

우결핵의 원인균인 우형결핵균(*Mycobacterium bovis*)(8, 13)은 우리나라의 주요 경제적 사육동물로 급성장하고 있는 사슴에게도 감염이 가능하다(8, 10, 19). 따라서 우결핵의 방역이 불완전할 경우 사슴, 돼지, 염소 등 다른 경제적 동물은 물론 사람에게 전파될 위험성이 있으며(7), 사회적인 민감성을 감안할 때 가축의 우형결핵균 감염 근절이 절실히 요청되고 있다.

사람의 평균 수명이 연장되고 면역결핍을 초래하는 여러 질병 예를들면 AIDS의 확산, 암, 장기이식, 당뇨병 등에 의하여 면역이 저하되는 경우 우형결핵균 등에 노출될 경우 결핵으로 이환될 확률이 높아지고 있다(35). 따라서 세계보건기구에서도 우형결핵균에 많은 관심을 가지고 전 세계의 우형결핵균에 대한 정보를 교환하는 체계를 구축하고 있다 (WHO, personal communication).

미국이나 호주등 주요 축산국가에서는 지난 수십여년간의 막대한 예산을 들여 이제 우결핵의 퇴치에 근접해 있으며(14-17, 28, 29, 36), 이들 나라에서 우결핵의 퇴치가 가능하였으므로 우리나라에서도 새로운 검사법의 도입등 체계적으로 우결핵 방역대책을 세운다면 우결핵의 퇴치가 가능하다. 특히 WTO의 체제하에 동물의 수출입시 우결핵이 퇴치되지 않고서는 검역의 기준설정 등에 논란이 있을 수 있게되어 국내의 우결퇴치는 시급히 달성되어야 할 것이다.

#### 1. 기술적인 측면

현재 우리나라에서 시행하고 있는 소의 결핵병 검사방법은 튜버큐

린 피내반응법으로 실시하며 튜버쿨린반응 시약은 PPD를 이용하도록 규정하고 있다(결핵병 및 부루세라병 방역실시 요령 제4조 2항). 그러나 자연계에는 우형결핵균과 유사한 항산균 (통칭 조형결핵균)이 널리 산재하여 있으므로 우형결핵균 PPD만을 피내반응 검사에 이용할 경우 비특이적인 반응으로 양성우가 될 수도 있다 (6, 11, 30, 37). 이를 확인하기 위하여 피내반응 검사에서 양성인 경우에는 도살처분 하도록 규정하고 있으며, 살처분 시에는 연구재료를 채취하고 균체 및 균형 등 기술적인 조사를 실시하도록 되어있다(2, 3, 5, 12, 13, 31). 그러나 여러 가지 여건상 연구재료 채취와 우형결핵균 배양을 통한 정확한 진단은 어려운 실정이다.

우형결핵균 PPD를 이용한 피내반응의 특이성을 확인하기 위해서 외국에서는 1차검사서 우형결핵균 PPD에 양성인 경우 2차검사서도 소의 경측피내에 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD를 동시에 접종하여 피내반응을 비교하여 판정한다(6, 11, 30, 37). 현재 널리 시행되고 있는 튜버큐린 피내반응 검사법은 특이성에서도 문제가 있으며, 더욱 문제시되는 점은 민감도가 만족스럽지 못한점이다. 우리나라에서는 자료가 충분하지 않으나 호주에서 실험한 바에 의하면 튜버큐린 피내반응검사의 민감도는 65.6%정도였다(6). 즉 우형결핵균에 감염된 소의 약 34%는 피내반응검사서 음성이다.

우결핵 진단방법의 민감도와 특이도를 높이기 위한 연구를 통하여 호주, 뉴질랜드, 미국등에서는 이미 면역진단방법으로 항체검사, 림프구 증식반응, 인터페론감마(IFN- $\gamma$ )의 측정 등을 이용한 검사법을 응용하고 있으며(6, 8, 18, 20, 25, 27), 이 검사법의 민감도는 95%내외, 그리고 특이도도 96%가량 되어 아주 만족할만한 검사로 그 이용빈도가 높아지고 있다. 따라서 우리 나라에서도 위와 같은 검사

방법을 확립하고 평가과정을 거쳐 야외에서 소의 결핵병검진에 이용할 수 있도록 기술을 개발하는 것이 절실하였다.

일반적으로 우결핵이 발생되었던 목장이나 우결핵의 유병율이 높은 지역에서는 매년 전 두수에 대하여 우결핵 검진을 실시하여야 한다. 그러나 우리 나라에서는 여건상 각 목장을 매년 검사하지 못하고 있으며, 검사의 부정확성으로 감염우를 모두 찾아내지 못할 경우 2년간 같은 목장내의 다른 소에게 감염시킬 수 있다. 또한 감염된 소의 목장간 이동이 있을 경우 다른 목장의 소에게도 감염시키게 되어 소의 결핵병퇴치가 어려운 실정이다.

한편, 그 동안 우형결핵균주의 감별이 어려워 지역별, 목장별로 분리되는 균주 간의 관련성을 비교할 수 없어 전파경로를 확인하기 어려웠다. 그러나 최근 분자생물학적 기법의 발달로 균주 간의 감별이 가능해짐(9, 21, 22, 32)에 따라 우형결핵균의 추적이 가능해 보다 효과적으로 우형결핵을 퇴치할 수 있게 되었다.

## 2. 경제적인 측면

우결핵은 가축전염병 예방법에 의하여 근절을 목표로 전국의 젖소를 대상으로 격년제로 피내반응 검사를 시행하고 있다. 1993년도에 약 250,000두에 대한 검진을 실시하였으며 146두의 양성우를 살처분하고 피해농가에 보상을 하였다(1). 1994년도에는 양성우가 200두가 넘었으며(4), 1995년도에는 더 많아질 것으로 예상하였다. 살처분되는 절대숫자는 그리 많지는 않더라도 매년 전국의 젖소를 대상으로 매년 검진을 하는데 필요한 경비를 두당 10,000원정도로 계산하더라도 25억원에 달할 것이며, 도살처분되는 소의 손비가 약 10억원 등 매년 35억원 정도의 국가적인 손실이 있을 것으로 추정되

었다. 한편 제한된 인적자원으로 다른 질병의 관리에도 문제가 발생하는 점을 고려한다면 경제적으로 계산할 수 없을 정도의 피해가 발생할 수 있으며, 우결핵퇴치가 지연되면 될수록 그 피해는 더 커질 것이다.

### 3. 사회적인 측면

우형결핵균은 사람에도 감염하여 결핵을 일으킬 수 있어 주요한 인수공통 전염병으로 보건분야 종사자들은 항시 이에 대한 관심을 가지고 있다(7, 33, 35). 만일 젖소에서 우결핵이 근절되지 않고 오히려 확산된다면 결국에는 우유제품에 대한 불신으로 인하여 축산업에도 크게 영향을 미칠 수 있다. 한편 현재는 가축전염병 예방법에는 방역대상동물로는 되어 있지 않으나 사슴에게 우형결핵균이 전파된다면 사슴피를 살균과정 없이 음용하는 일부 사람들에게는 위험성이 그만큼 높아질 수 있다. 따라서 이와 같이 예상되는 문제를 미연에 방지하기 위해서는 우결핵의 퇴치가 시급한 문제이며, 본 연구과제에서는 우결핵의 실태를 정확히 파악하고 체계적인 방역에 필요한 주요 자료를 제공하고자 하였다.

## 제3절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

### 1. 국내 관련 기술의 현황

본 연구과제의 협력연구기관인 경기도 축산위생연구소에서는 관련 규정에 따라 경기도 관내 약 200,000마리의 젖소 가운데 약 100,000마리의 소에 대하여 튜버큐린 피내반응검사를 시행하고 있다. 이때 시약은 우형결핵균의 PPD를 이용하고 있으며, 규정상 조형결핵균 PPD와 비교반응시험은 수행하고 있지 않다(3). 경기도 축

산위생연구소에서는 실험실 및 인력의 여건상 일부 피내반응 양성우에 대하여만 균체분리를 시도하고 있으나 균체의 동정 시험은 수의과학검역원에 의뢰하고 있다. 수의과학검역원에서는 우형결핵균의 분리 및 동정기술은 확립되어 있으나 아직 우형결핵균 균주간의 감별기법은 확립되어 있지 않았다.

## 2. 국외 관련 기술의 현황

주요 선진목축국가 즉 호주, 뉴질랜드, 미국, 캐나다 등에서는 소의 결핵병 진단시 튜버쿨린 피내반응검사 때 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD의 비교반응검사로 확진하고 있다(6, 8, 11, 14, 17, 37, 42). 새로운 실험실 검사법으로 우형결핵균 항원에 대한 항체검사, 세포매개면역반응검사로 림프구증식반응검사와 감마 인터페론(IFN- $\gamma$ )생산 시험등을 이용하고 있다(24, 37, 38, 40, 41). 이 경우에도 우형결핵균 항원과 조형결핵균 항원을 동시에 비교 실험하여 우형결핵균 항원에 대한 반응이 일정비율 이상 조형결핵균 항원보다 높을 때에만 확진하도록 규정하고 있다.

우형 결핵균 검출방법으로 중합효소연쇄반응(PCR)법이 널리 이용되고 있으며(23), 우형결핵균 균주간의 차이점을 규명하기 위하여 제한효소 절단을 이용한 pulse field gel electrophoresis, IS6110 또는 pTBN2의 probe를 이용한 RFLP법, ERIC-PCR 등의 기법이 이용되고 있다 (9, 21, 22, 32).

## 3. 현 기술상태의 취약성

현재 소의 결핵병 방역대책에 규정하고 있는 검진방법인 튜버쿨린 피내반응 검사는 우형결핵균 PPD를 이용하고 있으나, 조형결핵균항

원을 이용한 비교검사를 시행하고 있지 않기 때문에 비특이반응에 의한 양성일 경우가 종종 있을 것이다. 조형결핵균 등 자연계에 널리 존재하는 항산균에 감염된 경우에는 도살처분을 하지 않아도 되기 때문에 보다 특이적인 검사방법을 도입한 다면 불필요한 도살처분에 의한 경제적 손실은 막을 수 있을 것이다.

한편 튜버큐린 피내반응검사의 민감도가 낮기 때문에 목장별로 격년제로 검사하는 우리 나라의 현실에서는 소의 결핵병 근절이 매우 어려운 실정이다. 따라서 민감도가 높고 간편한 실험실 검사를 도입한 다면 우형결핵균에 감염된 소와 우결핵 양성우가 존재하는 목장을 보다 효과적으로 찾아내어 결핵병퇴치를 조기에 이룩할 수 있을 것이다.

## 제4절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발의 최종목표

가) 소의 결핵병 진단방법으로 민감도와 특이도가 90 ~ 95% 되는 면역진단기술을 개발하여 우리 나라에서 소의 결핵병 퇴치를 조기에 실현하고자 하였다.

나) 새로운 소의 결핵병 진단기술로 우리 나라의 소에 우형결핵균 감염실태를 조사하여 소의 결핵병 방역대책에 필요한 자료를 제공하고자 하였다.

다) 우형결핵균주를 감별할 수 있는 기술을 확립하여 우형결핵균의 전파경로를 추적할 수 있는 감시체제를 도입 소의 결핵병 방역대책을 수립하는데 필요한 자료를 제공하고자 하였다..

라) 본 연구과제를 수행하면서 축적된 기술개발 능력을 이용하

여 소의 다른 전염성 질병 예를 들면 부르셀라병등의 검진기술과 방역대책을 수립하는데 응용하고자 하였다.

## 2. 연구내용

가) 현재의 소의 결핵병 검진방법에 따라 튜버큐린 양성반응에서 양성반응을 나타낸 소에서 병변조직, 혈액 등 연구재료 채취하였다.

나) 튜버큐린 피내반응 양성우에서 채취한 연구재료에서 우형결핵균 배양, 균동정, 항체검사, 세포매개 면역반응 지표 측정, PCR 법을 이용한 균검출 등을 시행하였다.

다) 우형결핵균과 조형결핵균으로부터 피내반응 검사용 항원을 준비하고 그 항원성을 실험동물을 이용하여 평가하였다.

라) 우형결핵균과 조형결핵균으로부터 항체 검사에 유용한 항원을 분리하고 그 특성을 규명하며, 항체검사 기법을 확립하였다.

마) 튜버큐린 피내반응 검사에서 양성인 소와 음성인 소를 대상으로 항체검사를 실시하고 특이성과 민감도를 평가하였다.

바) 피내반응 검사용 항원을 이용하여 림프구증식반응과 IFN- $\gamma$ 의 측정기법등 세포매개 면역반응 지표 측정기법을 확립하였다.

사) 튜버큐린 양성인 소와 음성인 소를 대상으로 우형결핵균 및 조형결핵균 항원에 대한 세포매개 면역반응 지표를 조사하여 진단적 가치를 평가하였다.

아) 튜버큐린 양성인 소의 병변조직 또는 기타 연구재료의 병리조직검사 결과를 기준으로 한 판정과 새로운 기법 즉 항체검사, IFN- $\gamma$  측정검사 등의 검사결과를 비교하여 새로운 검사기법의 민감도와 특이성을 평가하였다.



자) 본 연구과제에서 개발한 새로운 검사기법을 야외에 적용하여 소의 우형결핵균 감염실태를 조사하고, 새로운 검사기법으로 양성판정을 받은 소의 연구재료에서 균배양검사, 병리조직검사를 시행하여 새로운 검사법의 유용성을 평가하였다.

차) 병변조직에서 배양된 균체를 동정하고 분자생물학적 기법을 이용하여 우형결핵균 균주간의 차이를 감별하는 기술을 확립하였다.

카) 연구결과를 종합하여 소의 결핵병 퇴치를 위한 검진법의 개선책과 방역대책을 제시하고자 하였다.

## 참고문헌

1. 축산신문. 1994. 가축방역: 현황과 대책. 한국수의연감.
2. 농수산부. 1990. 가축질병병성감정 실시요령. pp. 121-123
3. 농수산부. 1992 : 결핵병 및 부루세라병 방역실시 요령  
농수산부 예주 제 165 호
4. 농수산부. 1995. 가축전염병 발생통계 보고.
5. USDA. 1993. Laboratory Methods in Veterinary Mycobacteriology for the isolation and identification of Mycobacteria. National Veterinary Services Lab. USDA, Ames, Iowa.
6. Wood, P.R., and Rothel, J.S. 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 40:125-135.
7. Grange, J.M., and Yates, M.D. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Vet. Microbiol. 40:137-151.
8. Griffin, J.F.T., and Buchan, G.S. 1994. Aetiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. Vet. Microbiol. 40: 193-205.
9. Collins, D.M., Radford, A.J., Lisle, G.W., and Jacobs, H.B. 1994. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. Vet. Microbiol. 40: 83-94.
10. Morris, R.S., Pfeiffer, D.U., and Jackson, R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet. Microbiol. 40: 153-177.
11. Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.K., and Kazda,

- J.F. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40: 11-124
12. Corner, L.A. 1994. Post-mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 40: 53-63.
  13. Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., and Hanna, J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. 1994. *Vet. Microbiol.* 40: 41-52.
  14. Essey, M.A., and Koller, M.A. 1994. Status of bovine tuberculosis in North America. *Vet. Microbiol.* 40: 15-22.
  15. Tweddle, N.E., and Livingstone, P. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Vet. Microbiol.* 40: 23-39.
  16. Kantor, I.N., and Ritacco, V. 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: Current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.* 40: 5-14.
  17. Caffrey, J.P. 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. *Vet. Microbiol.* 40: 1-4.
  18. Collins, F.M. 1994. The immune response to mycobacterial infection: Development of new vaccines. *Vet. Microbiol.* 40: 95-110.
  19. Essey, M.A. 1991. Bovine tuberculosis in captive cervidae in the United States. Proceedings, Symposium on Bovine Tuberculosis in Cervidae, July 16-17, 1991, Denver, Colorado, pp. 1-5.
  20. Fifis, T., Rothel, J.S., and Wood, P.R. 1994. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their

- purification and immunological evaluation. *Vet. Microbiol.* 40: 65-81.
21. Van Embden, J., and D. Van Loolingen. 1995. Molecular genetic technique for typing *Mycobacterium bovis*. Proceedings in Tuberculosis in Wildlife and Domestic Animals. Otago Conference Series No. 3. 28 Aug-1 Sept. 1995, New Zealand, pp.15-19
  22. Gutierrez, M. C. Martin, J.A. Gavigan, S. Samper, and J.F. Garcia Marin. 1995, Differentiation by Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle and goats in Spain. *Ibid.* pp.57-59.
  23. Aranaz, A., E. Liebana, A. Mateos, D. Vidal, M. Domingo, and L. Domiguez. 1995, Direct detection of *M. bovis* from tissue samples, Improvement of DNA extraction methods for PCR amplification. *Ibid.* pp.60-63.
  24. Ostyn, A., M.A. Laneelle, I. Peiffer, and M.F. Thord. Glycolipid antigens for use in diagnostic analysis for bovine TB. *Ibid.* pp.64-66
  25. Pollock, J., J. McNair.K. Lightbody. 1995, Screening for the major antigens of *M. bovis* using T cells for experimental infected cattle. *Ibid.* pp.70-71.
  26. Mans, K. 1995. Culture filtrate antigens for virulent *M. bovis*. *Ibid.* pp. 76-78.
  27. Pollock, J., K. Pollock, K. Campbell. 1995. Cell-mediated immune responses to *M. bovis* infection in cattle: evidence

- for a dynamic change in the dominant T cell subpopulation.  
*Ibid.* pp. 105-107.
28. Clifton-Hadley, R., and J. Wilesmith 1995. An epidemiological outlook on bovine tuberculosis in the developed world. *Ibid.* pp. 178-182.
  29. Neil.S. 1995. *M. bovis* infection in cattle and its control in developed countries. *Ibid.* pp. 183-186.
  30. Griffin, F. 1995. TB immunology : from diagnosis to vaccination. *Ibid.* 193-197.
  31. De Lisle, G., G. Yates, B. Wards and D. Collins. 1995. The postmortum diagnosis of mycobacterial infections. *Ibid.* pp. 198-201.
  32. Collins, D. and G. de Lisle. 1995. *M. bovis* strains. *Ibid.* pp. 202-204.
  33. Daborn, C. 1995. TB in humans and dometic animals in the developing world. *Ibid.* pp.205-209.
  34. Morris, R., 1995. Epidemiological principles for tuberculosis control. *Ibid.* pp. 210-213.
  35. Cousins, D. and S. Williams. 1995. A study of *M. bovis* infection in Australia patients 1970-1994. *Ibid.* pp. 260-263.
  36. Carter, C., K. Crews, F. Hoyle, and T. Ryan. 1995. The movement of cattle from herds in which *M. bovis* has been diagnosed. *Ibid.* pp. 298-299.
  37. Neill, S., J. Hanna, A. Clements, J. Cassidy, J. Pollock,

- and D.G. Bryson. 1995. Diagnosing tuberculosis in animals  
*Ibid.* pp. 300-303.
38. Domingo, M., E. Liebana, M. Vilafranca, and A. Aranaz.  
1995. A field evaluation of the interferon-gamma assay and  
the intradermal tuberculin test in dairy cattle in Spain.  
*Ibid.* pp. 304-306.
39. Collins. D., and M. Monaghan. The tuberculin test: factors  
relevant to the diagnosis of *M. bovis* infection in cattle  
under Irish conditions. *Ibid.* pp. 307-312.
40. Monaghan, M., D. Collins, and K. McGill. 1995. Field trials  
of the gamma interferon assay for the diagnosis of bovine  
tuberculosis in the Republic of Ireland. *Ibid.* pp. 319-320.
41. Hanna, J., J.M. Pollock, R.A. Clements, E.G. Walton, and  
S.D. Neill. 1995. Post-skin test antibody responses in  
the diagnosis of bovine tuberculosis.. *Ibid.* pp. 321-324.
42. Ryan, T., and C. Cameron. 1995. The New Zealand cattle  
tuberculosis testing programme. *Ibid.* pp. 351-353.
43. Zanella, G. Control of animal tuberculosis: role of the  
Office International des Epizooties. Proceedings of the  
International Symposium on Mycobacterium bovis. Torino,  
Italy, Oct. 6-7, 1997, pp. 77-79.
44. Fanning. A. Bovine tuberculosis in captive cervidae in  
the United States. Proceedings, Symposium on Bovine  
Tuberculosis in Cervidae, July 16-17, 1991, Denver,  
Colorado, pp. 1-5.

45. Hutchings, M.R., and S. Harris. 1999. Quantifying the risks of TB infection to cattle posed by badger excreta. *Epidemiol. Infect.* 122: 167-73.
46. VanTiem, J.S. and M.A. Essey. Status of the State-Federal bovine tuberculosis eradication program: fiscal year 1994. *Proceedings of the 98th American Animal Health Association*.pp. 539-555.
47. Karlson, A.G. 1962. Non-specific or cross sensitivity reactions to tuberculin in cattle. *Adv. Vet. Sci.*, 7:147-181.
48. Corner, L.A. and C.W. Pearson. 1978. Response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria of bovine origin. *Aust. Vet. J.*, 54:379-382.
49. Adams, L.G., M. Fowler, R. Meyer, J. Payeur, C. Theon, and D. Whipple. Report of the scientific advisory of the committee on tuberculosis. *Proceedings of the 98th American Animal Health Association*.pp. 561-563.
50. Ritacco, V., B. Lopez, I.N. De Kantor, L. Barrera, F. Errico, and A. Nader. 1991. Reciprocal cellular and humoralimmune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 50:365-367.

여 백



## 제2장 우결핵의 혈청진단 및 우형결핵균 추적기술

### 제1절 서론

우결핵 퇴치사업에서 우형결핵균에 감염된 소를 정확하게 진단하는 것은 매우 중요한 요소이다. 현재 전세계적으로 널리 이용되는 방법은 우형결핵균 PPD를 이용한 피내반응 검사법이다 (1, 5). 그러나 피내 반응검사법은 두가지 커다란 문제점을 가지고 있다. 그 하나는 피내반응 검사법은 세포매개 면역반응 정도를 측정하기 때문에 우형결핵균에 감염된 동물일지라도 우형결핵균 항원에 반응하지 못하는 소들은 피내반응검사에 음성일 수 있다 (10). 이러한 현상은 다른 mycobacteria 감염질환 예를 들면 결핵이나 나병에서는 흔히 볼 수 있다 (11, 12). 실제로 소에 우형결핵균을 감염시킬 경우 일부의 소에서 감염 후기에 피내반응 음성이었으며 (5), 우결핵 발생 목장의 소를 대상으로 조사한 결과 우형결핵균이 검출되거나 병변조직이 있는 경우에도 피내반응 검사에 음성인 예가 많다 (5, 6). 따라서 피내 반응검사에 음성인 우형 결핵균 감염우를 진단하기 위한 방법으로 혈청검사를 이용하려는 많은 연구를 진행하고 있다(2, 3, 4, 9). 그러나 우형결핵균에 대한 항체는 감염 후 6개월 이후에 나타나기 때문에 피내 반응검사보다는 늦게 발견되는 단점이 있다 (5). 그러나 감염말기에 피내 반응검사가 감소되는 점과는 반대로 항체 반응성은 높아지기 때문에 항체 검출 검사는 피내반응검사와 상호 보완적으로 이용할 수 있다 (2, 10). 또한 사람의 결핵이나 나병에서는 높은 항체가 나타낼 경우에는 대부분 세포매개면역반응성이 낮아져 감염균의 증식을 억제하지 못하기 때문에 병변조직에서

균이 많이 발견된다 (6). 마찬가지로 우결핵균의 감염시에도 항체가 높을 경우 조직에 균이 많이 발견될 수 있으며, 다른 소에게 전염원이 될 수 있다. 따라서 우결핵 항원에 대한 항체의 검출은 역학적인 측면에서 볼 때 우결핵 퇴치사업에 유용하게 이용할 수 있다.

피내반응 검사의 두 번째 문제점은 검사에 이용하는 우형결핵균 PPD가 다른 mycobacteria 예를 들면 조형결핵균이나 토양이나 물 등 자연계에 널리 존재하는 수십여 종의 항원과 교차 반응하여 우형결핵균 이외의 mycobacteria 에 감염되었을 경우에도 비특이적으로 양성 반응을 나타낼 수 있다는 것이다 (2, 5, 8, 9). 이러한 문제점을 보완하기 위해서 미국과 유럽의 주요 목축국가에서는 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD를 동시에 접종한 다음 각각에 대한 종창의 크기를 비롯하여 우형 결핵균 PPD에 더 크게 반응할 경우에만 우결핵 양성우로 최종 판정하고 있다 (2, 5, 8, 9). 그러나 우리나라를 비롯 개발 도상국가에서는 이를 채택하지 않고 있어 비특이반응에 의한 양성판정으로 도살 처분되는 소도 상당수 있을 것으로 추정된다.

우형결핵균 PPD는 우형결핵균이 증식하면서 분비하는 여러 항원과 균체가 자가 분해되어 생산되는 수많은 균체 성분으로 구성된 복합 항원이므로 우형결핵균에 특이한 성분만을 정제하여 피내 반응에 응용하려는 연구를 진행하고 있다 (7). 반면에 항체의 검출은 우형결핵균에 특이한 항원을 선정하여 이용할 수 있으므로 비교적 우형결핵균에 감염된 동물만을 진단할 수 있는 장점이 있다. 이와 같이 우결핵 진단에 특이성을 제고시키기 위한 방법의 하나로 항체 검사를 이용하려는 연구를 활발히 진행하고 있다.

우결핵의 혈청진단 방법에서 가장 중요하게 고려해야 할 요소는

항원이다. 수많은 우형결핵균 성분 가운데 혈청진단의 민감도와 특이도를 모두 높일 수 있는 항원을 선정하는 것이 가장 이상적이거나 그 동안 만족스러운 항원이 제시되지 않았다. 가장 용이하게 확보할 수 있는 우형결핵균 항원으로는 피내반응검사에 이용하는 PPD 항원 일 것이며 조형결핵균 PPD 항원과 비교하여 판정할 수 있다. 또한 우형결핵균 세포벽 성분에는 많은 양의 지질이 있어 그 지질성분 특히 당지질 성분을 이용하려는 연구보고도 있다 (13, 14). 그리고 최근에 가장 널리 이용되는 항원은 MPB70 단백질 항원으로 우형결핵균에 특이한 부분이 있어 비교적 높은 특이도를 나타내는 장점이 있다 (7, 15, 16).

그 동안 문헌에 보고된 여러 항원에 대한 혈청 진단법의 유용성은 연구를 수행한 국가나 지역의 우결핵 발생 빈도, 자연 환경에 존재하는 mycobacteria 의 종류, 실험 방법 등에 따라 그 결과가 다양하게 나타날 수 있으므로 우리나라의 여건에서 여러 가지 항원에 대한 항체검사의 유용성 평가과정이 필요하다. 따라서 본 연구과제에서는 우형결핵균의 여러 가지 항원을 준비하고 우결핵 양성우와 음성우의 혈청과 우유에서 항체를 검출하고 결과를 분석하여 혈청진단의 유용성을 평가하고자 하였다.

한편 분자생물학적 기법을 이용하여 우형 결핵균을 감별하고 우결핵 발생을 추적 조사하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 우리나라와 같이 소의 매매가 자유로이 이루어지는 상황에서는 우결핵 발생 목장의 소가 다른 곳으로 이동하여 새로운 목장에 우결핵을 전파하더라도 균의 출처를 확인하기가 어려웠다. 그러나 최근 우형결핵균 균주를 감별하는 molecular typing 기법이 보고되어 객관적인 방법으로 균주의 동일성을 규명하는 것이 가능해 졌다. 그 동안 우

형 결핵균주의 감별은 IS6110 probe을 이용하는 RFLP, pTBN12 probe을 이용하는 PGRS, 그리고 VNTR 기법 등 다양한 방법이 알려졌다. 따라서 본 세부과제에서는 이러한 방법을 확립하여 우리나라의 우결핵 감염우에서 분리한 우형 결핵균의 균주의 type을 조사하고자 하였다.

## 제2절 재료 및 방법

### 1. 균주

본 연구과제에서 이용한 균주는 우형결핵균 (*Mycobacterium bovis*) AN5균주와 조형결핵균 (*Mycobacterium avium*) serovar 2 균주이며, 모두 국립수의과학검역원에서 분양 받아 Ogawa배지에 계대 배양하면서 사용하였다. 한편 *M. bovis* BCG(Pasterur)균주와 rapid grower인 *M. phlei*균주는 연세의대 미생물학교실에서 보존하고 있는 균주를 이용하였다.

### 2. 균의 배양

우형결핵균 감염의 면역진단을 위한 항원을 준비하기 위하여 Ogawa 배지에 계대배양 중인 우형결핵균 *M. bovis* AN5 균주와 조형결핵균 *M. avium*을 먼저 감자배지에서 1회 배양한 다음 Sauton 배지에서 약 4주간 진탕 배양하였다. *M. phlei*는 Ogawa 배지에서 배양하여 균체를 사용하였다.

### 2. 항원의 준비

가. 배양액 단백질 (culture filtrate protein) 항원의 준비

우형결핵균과 조형결핵균의 배양액을 여과멸균시킨 다음 배양액 단백질 성분을 ammonium sulfate로 침전시키거나 ultrafiltration 법을 이용하여 농축시켜 각각의 culture filtrate(CF) 항원으로 명명하였다.

#### 나. 당지질 (glycoprotein) 항원의 준비

우형결핵균의 당지질 항원을 준비하기 위하여 먼저 *M. bovis* AN5 균주와 BCG균주를 배양한 다음 균체를 모아 열처리하여 멸균시킨 다음 동결 건조하였다. 균체로부터 지질성분을 유기용매 (chloroform:methanol 2:1)로 실온에서 48시간 추출한 다음 Florisil column을 이용하여 chloroform과 methanol의 농도를 달리한 용매로 분획하였다.

#### 다. 유전자재조합 MPB70항원의 준비

##### 1) BCG genomic DNA의 분리

PCR을 위한 우형결핵균 genomic DNA는 freeze-boil method를 사용하여 수행하였다. Freeze-boil method는 배양된 *M. bovis* BCG 균의 집락을 몇 loop 긁어 100-200 ul의 멸균된 증류수가 들어있는 microcentrifuge tube에 넣은 뒤, vortex를 이용하여 잘 섞은 후 끓는 물에서 5분간 끓이다가 액체질소에 담가 얼리는 과정을 3-5회 반복하여 세포벽이 터지도록 함으로써 genomic DNA가 분리되어 나오게 하는 방법으로, PCR을 위한 genomic DNA에 분리에 사용되는 방법이다. 이어 5-10분간의 원심분리로 깨진 세포벽 성분 등을 가라앉힌 뒤 상층액 중 2-5 ul를 PCR에 사용하였다.

## 2) MPB70 항원 유전자의 PCR 증폭

*M. bovis* BCG의 MPB70 항원 유전자를 클로닝하기 위하여 MPB70 항원 유전자를 PCR을 이용하여 증폭하였다. PCR 반응의 조성은 KCl 50mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, gelatic 0.001% (w/v), dNTP each 200 uM, Taq 1.25U, primer 10 pmole이었다. PCR 반응은 denaturation 온도 95°C에서 5분동안 1 cycle, denaturation temperature 94°C에서 1분, annealing temperature 58°C에서 1분, elongation temperature 72°C에서 1분인 cycle을 35 번, 그리고 마지막으로 final elongation temperature 72°C에서 10 분간 수행하였으며, PCR 증폭에 사용한 primer의 sequence는 다음과 같다.

MPB70-5': 5'-GCGGATCCGGCATGAAGGTAAGAACAC-3'

MPB70-3': 5'-CCCAAGCTTAACGCCGGAGGCATTAGCAC-3'

PCR이 끝나면 5 ul 정도의 sample을 1.0 % agarose gel에 전기영동하여 PCR 증폭이 성공적으로 수행되었는지의 여부와 증폭된 PCR 산물의 크기를 확인하였다.

## 3) MPB70 항원 유전자 PCR 산물의 TA 클로닝 (19)

성공적인 증폭이 확인된 PCR 산물의 나머지는 다시 1.0 % agarose gel과 1X TAE buffer를 이용하여 전기 영동하고 DNA 밴드가 있는 부위를 깨끗한 면도칼로 절단한 후 GeneClean kit (Bio101)를 이용하여 DNA만을 정제하였다. 정제된 DNA를 15-20 ul의 멸균된 증류수에 녹인 후 이중 2-3 ul를 PCR 산물 클로닝용 벡터인 pT7-blue(Novagen)에 ligation하고 X-gal/IPTG color selection을 통하여 원하는 클론을 얻었다. 클로닝된 DNA의 염기서

열은 Automatic DNA sequencer (연세의대 임상의학 연구소)로 분석하여 PCR 수행중에 생길 수 있는 mismatched nucleotide의 존재 여부를 확인하였다.

4) MPB70 항원 유전자의 대장균 발현 벡터로의 subcloning(19)  
pT7-blue, 클로닝용 벡터에 클로닝 된 MBP70 유전자 항원을 대장균에서 과다발현하기 위해 재조합 단백질 발현 벡터인 pQE30의 *Bam* HI과 *Hind* III site로 다시 옮겨 클로닝하였다. TA vector에 cloning되어 있는 MPB 70 항원유전자의 ORF를 QIAGEN사의 pQE expression vector system으로 in-frame이 되도록 subcloning을 실시하였다(6). 이어, Restriction enzyme digestion mapping을 통하여 원하는 클론을 얻었음을 확인하였다.

#### 5) 대장균에서 발현된 MPB 70 재조합 단백질의 확인

만들어진 클론이 MBP70 단백질을 발현하는지의 여부를 확인하기 위해 재조합 단백질 발현을 위한 대장균주인 M15를 pQE30:MBP70 클론으로 형질변환하고 MBP70 단백질의 발현을 SDS-PAGE로 확인하였다. SDS-PAGE 방법은 Laemmli (17)의 방법을 변형한 SDS-PAGE 방법을 사용하였다. 이때, polyacrylamide gel은 농도가 7.5%-12.5%까지 gradient를 준 gel을 사용하였으며, 30 mA로 3시간 전기 영동한다. 전기 영동이 끝난 gel은 coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)으로 염색하여 발현된 단백질의 분자량을 확인하였다.

발현이 확인된 클론은 다양한 농도의 IPTG를 다양한 시간동안 처리하여 재조합 단백질의 발현이 최적화되는 조건을 확립하였다. 이어, MPB70의 다량생산이 확인된 이 M15 균주를 다량배양하여

Ni-NTA column을 사용하여 overproduce된 MBP70 단백질을 정제하였다. pQE30 발현 박테리의 N쪽 말단에는 6개의 histidine이 달려있어 Ni-NTA column을 이용하여 쉽고 빠르게 순도가 높은 단백질을 정제할 수 있다.

한편, 발현된 단백질의 확인을 위해 Western blot hybridization을 수행하였다. Western blot hybridization은 Towbin *et al.*의 방법(18)에 따라 단백질이 전기영동된 SDS-PAGE를 nitrocellulose membrane으로 옮긴 후 이에 skim milk가 5% 첨가되어 있는 TBST (10 mM Tris.Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)를 가하여 1시간 동안 상온에서 incubation하였다. 이후 각 1차 항체로 1시간, 2차 항체로 1시간 처리한 다음 기질을 첨가하여 발색시켰다. 이 때 과발현된 단백질을 anti-His antibody를 이용하여 western blot를 통하여 확인하였다.

#### 6) 대장균발현 MBP70 재조합 단백질의 정제 조건 확립

MBP70 재조합 단백질의 발현이 확인된 대장균 균주를 각각 100  $\mu\text{g}$  /ml Ampicillin, 25  $\mu\text{g}$  /ml Kanamycin의 20ml Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$  18시간 진탕 배양하였다. 이전 배양액을 1/50 부피로 100  $\mu\text{g}$  /ml Ampicillin, 25  $\mu\text{g}$  /ml Kanamycin의 400ml LB배지에 접종하여 A<sub>600</sub>에서 O.D.이 0.7-0.9가 되었을 때까지 배양한 후 isoprophyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 첨가하여서 재조합 단백질의 대량생산을 유도하기 위하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5시간 진탕배양하였다. IPTG로 유도한 진탕배양액을 원심분리하여서 균체만을 수집하고 수집된 균체를 인산완충용액으로 세척한 후 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 냉동시킨후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 녹여서 습윤중량 1g당 5ml Guanidine



HCl-인산완충용액 A(6M Guanidine HCl, 0.1M Na-phosphate, 0.01M Tris-HCl pH8.0)으로 현탁시킨후 1시간동안 저속반응시켜서 균체를 용균시킨 후  $10,000\times g$ 로 원심분리하여 균체 상등액만을 Guanidine HCl-인산완충용액 A로 포화된 8ml Ni-NTA (Quiagen) resin에 적하시킨후 10부피의 Guanidine HCl-인산완충용액A, 5부피 Urea-인산완충용액 B(8M Urea, 0.1M Na-phosphate, 0.01M Tris-HCl pH8.0)와 Urea-인산완충용액 C(8M Urea, 0.1M Na-phosphate, 0.01M Tris-HCl pH6.3)으로 세척한 후 250mM imidazole-Urea-인산완충용액 C로 재조합 단백질을 정하였다. 정제된 재조합단백질을 투석하여서 염류를 제거한후 SDS-PAGE로 확인하였다.

#### 7) MPB70 재조합 단백질의 대장균에서의 과대발현 및 정제

대장균에서 발현된 MPB 70 재조합 단백질(rMPB 70)을 다량준비하기 위하여 대장균 6 l를 배양하고 재조합 단백질을 과대발현 시킨 후 대장균 내에 형성된 inclusion body만을 분획하여 분리하였다. 분리된 inclusion body는 denaturation, renaturation, FPLC(fast preparative liquid chromatography)분획 등의 과정을 거쳐 rMPB 70 항원을 정제하는 기술을 확립하였다. FPLC를 이용하여 정제한 rMPB 70 항원의 순수도를 SDS-PAGE로 조사하였다.

#### 8) BCG에서 MPB70항원의 발현-pYMC 벡터로의 클로닝

위에서 사용한 rMPB70항원은 대장균에서 발현한 것이다. 그런데 MPB70항원은 원래 당단백질 항원이므로 대장균에서 발현된 것은 당성분이 없기 때문에 항체와의 결합반응에서 중요한 역할을 담당할 것으로 생각되는 당성분의 역할을 규명하기 위해서는 BCG등과 같은

항산균에서 MPB70항원을 발현시켜야 한다. 따라서 본 연구에서는 유전자 재조합 기법으로 MPB70항원을 BCG에서 발현시키기 위하여 BCG용 단백질 발현벡터이며 결핵균의 shuttle vector인 pYMC-His 벡터에 MPB70항원 유전자를 클로닝하였다. pYMC-His 벡터로 클로닝하기 위하여 TA vector에 cloning되어 있는 MPB70 항원유전자의 ORF를 pYMC-His shuttle vector와 ligation을 수행하고 CaCl<sub>2</sub> 방법을 통하여 대장균에 형질전환하고 DNA를 대량으로 얻었다. pYMC-His 벡터는 Ni-NTA resin을 이용하여 발현된 단백질의 정제가 가능하다.

#### 9) Mycobacteria 균주 및 배양 조건

*M. smegmatis*는 mc<sup>2</sup>155 substrain을 사용하였는데, 단일집락을 M-ADC-TW(0.05% Tween 80, ADC를 첨가한 Middlebrook 7H9 액체 배지; Difco Laboratories, Detroit, Mich., U.S.A.)액체 배지에서 37°C로 2일간 진탕 배양한 후 1/100 부피를 새로운 동일 배지에 접종하였고 다시 37°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 선택 배지는 M7H10배지에 25ug/ml kanamycin sulfate를 첨가하여 사용하였다.

*M. bovis* BCG는 BCG(1173P2) substrain을 사용하였으며, 단일집락을 M-ADC-TW 액체 배지에 접종한 후 37°C로 2주간 진탕 배양하였다. 선택 배지에는 M7H10 배지에 100ug/ml kanamycin sulfate와 100ug/ml cycloheximide를 첨가하여 배양하였다.

#### 10) Electroporation 조건

pYMC-His:MBP70 클론으로 형질전환된 대장균으로부터 다량의 plasmid DNA를 다량 준비하여 일단 fast growing mycobacteria인 *M. smegmatis*에 electroporation의 방법으로 형질전환하였다.

mycobacteria의 electroporation의 최적 조건은 본 연구팀에 의해 최적화된 조건을 사용하였다. *M. smegmatis*의 mc<sup>2</sup>155 균주에 electroporation은, 균주를 M-ADC-TW 액체 배지 1L에 접종하여 OD<sub>600</sub> 값이 0.5-1.0이 될 때까지 37°C에서 진탕 배양 한 후 얼음에서 90분간 정치하여 원심 분리 (6,000rpm, 4°C, 10분)하여 균체를 수집하였다. 수집된 균체는 4°C, 10% glycerol 250ml로 현탁하였고 동일 조건으로 다시 원심 분리하였다. 균체를 4°C, 10% glycerol 100ml로 현탁하여 동일 조건으로 다시 원심 분리하였고, 다시 균체를 10% glycerol 50ml로 세척한 다음 최종적으로 10% glycerol 2ml에 현탁하여 -70°C에 50ul씩 분주하여 보관하였다. Electroporation은 DNA (5pg-5ug: 최대 부피 5ul)와 농축된 세포 50ul을 혼합한 후 0.2cm pulser cuvette에 넣어 2시간 진탕 배양하여 선택 배지에 접종하였다. 배지에는 pYMC-His shuttle vector의 selection marker인 kanamycin을 넣어 형질전환된 클론을 선택하였다.

형질전환된 *Mycobacterium*을 얻은 뒤엔 pYMC-His 벡터의 promoter인 heat shock promoter를 유도하기 위하여 적당한 조건의 heat shock을 주어 MPB 70 항원 단백질의 발현을 유도하였다. 재조합 단백질의 발현이 유도되었는지는 SDS-PAGE로 확인하였다. 일단 *M. smegmatis*에서의 발현이 확인된 후엔, 균주를 *M. bovis* BCG로 바꾸어 MPB 70 항원 단백질을 발현하였다. *M. bovis* BCG는 (1173P2)의 electroporation은 균주를 M-ADC-TW 액체 배지 500ml에 접종하여 OD<sub>600</sub> 값이 0.5-1.0이 될 때까지 6-7일간 37°C에서 진탕 배양하였다. 수집된 균은 1시간 얼음에서 정치하여 원심 분리 (8,000rpm, 4°C, 15분)하여 1/10 부피의 완충 용액 (30mM potassium acetate, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycerol)에 혼탁 시켜 얼음에

서 15분간 정치한 후 원심 분리 (3,000rpm, 4°C, 15분)하여 균체를 수집하였다. 수집된 균체는 4°C, 10% glycerol로 세척하여 동일 조건으로 다시 원심 분리하였다. 최종적으로 10% glycerol 5ml(1/100 부피)에 현탁하여 50ul씩 분주하여 사용하였다. Electroporation의 DNA 농도는 500ng/cuvette으로 사용하며, 전압 12.5kV/cm, 저항은 1000Ω, 전장은 25uF를 사용한다. 37°C로 고정된 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3주간 배양하였다.

#### 11) 형질 전환 확인

Plasmid에 의한 형질 전환을 확인하기 위해서 형질 전환된 BCG와 *M. smegmatis*에서 plasmid를 분리하였다. 선택 배지에서 성장한 mycobacteria 집락을 M-ADC-TW 액체 배지 10ml에 접종하여 37°C에서 2주간 배양한 후 1ml을 microcentrifuge tube에 분주한 후, 원심 분리하여 균을 수집하였다. Pellet은 150ul의 solution I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA)으로 현탁하여 37°C에서 24시간 정치하였다. 300ul의 solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 첨가한 후 얼음에서 10분간 정치하고, 225ul의 solution III (3M potassium acetate, pH 4.8)를 첨가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 10분간 혼합 원심분리하였다. 상층액은 phenol/chloroform (1:1)을 혼합하여 단백질을 2회 추출하고 2배의 ethanol로 DNA를 침전시킨다. 원심 분리하여 수집한 DNA는 ethanol을 제거하고, RNase 20ug/ml가 함유된 TE 완충 용액 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) 50ul에 용해시켜 전기영동하여 DNA를 확인하였다.

#### 12) Western blotting

형질전환된 균주가 원하는 단백질을 발현하는지의 여부를 확인하

기 위하여 Ni-NTA-HRP conjugate를 이용한 Western blot을 수행하였다. 우선 각 균주 (*M. smegmatis*)의 형질전환 전과 후의 균체를  $O.D._{600}=2.0$ 이 될 때까지 배양한 후 각각 원심분리하여 수집하고, 생리식염수로 2회 세척한 후 현탁한다. Ultrasonicator (vibra cell, Sonics & Materials inc. Danbury, Connecticut, U.S.A.)로 20분간 처리하여 세포를 파괴한 뒤, 곧 원심분리 (15,000rpm, 4°C, 30분)하여 침전물을 제거한 후 상층액을 0.2um acrodisk (Millipore)로 여과한 다음 전기영동하였다. 전기영동 (SDS-PAGE) 방법은 Laemmli (17)의 방법을 변형한 SDS-PAGE 방법을 사용하였다. 이때, polyacrylamide gel은 농도가 7.5%-12.5%까지 gradient를 준 gel을 사용하며, 30mA로 3시간 전기 영동하였다. 전기 영동이 끝난 gel은 coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)으로 염색하여 발현된 단백질의 분자량을 확인한다. 발현된 단백질의 확인을 위해 Western blot hybridization을 할 SDS-PAGE는 Towbin et al. 의 방법에 따라 nitrocellulose membrane으로 옮긴 후 이에 skim milk가 5% 첨가되어 있는 TBST (10mM Tris.Cl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20)를 가하여 1시간 동안 상온에서 incubation하였다. 이후 각 1차 항체로 1시간, 2차 항체로 1시간 처리한 다음 기질을 첨가하여 발색시켰다.

### 3. 항체의 검출

#### 가. 단백질 항원에 대한 항체의 검출

소의 혈청에서 우형결핵균 항원에 대한 항체를 검출하기 위해서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하였다. 각 균주의 배양액 CF항원 또는 rMPB70항원일 경우 항원을 1 ug/ml로

carbonate/bicarbonate 완충용액 (pH 9.6)에 희석한 다음 100  $\mu$ l를 ELISA용 microtiter plate의 well에 분주하고 4°C에서 약 16시간 가량 항원을 흡착시켰다. 흡착되지 않은 항원은 0.05% tween 80이 포함된 인산완충용액(PBST, pH 7.4)으로 well을 세척하고 5% normal goat serum이 포함된 PBST 용액 (PBST-NGS) 200  $\mu$ l을 넣고 37°C에서 1시간 동안 blocking 시켰다. Blocking 용액을 제거한 다음 혈청을 *M. phlei*가 포함된 PBST-NGS용액에 1:300으로 희석하여 100  $\mu$ l씩 well에 넣고 37°C에서 90분간 반응시켰다. Well을 PBST를 4회 세척한 다음 PBST-NGS에 1:20,000으로 희석한 horse-radish conjugated goat anti-bovine IgG를 100  $\mu$ l 씩 첨가하여 1시간 동안 반응시키고 PBST용액으로 4회 세척하였다. 마지막으로 o-phenylenediamine 기질액을 100  $\mu$ l 씩 넣고 실온에서 15분 발색시킨 다음 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 반응을 정지시켰다. 흡광도는 490 nm에서 측정하여 항원이 첨가된 well의 평균 흡광도와 항원이 없는 well의 평균 흡광도의 차이를 결과분석에 이용하였다.

#### 나. 당지질 항원에 대한 항체의 검출

당지질 항원에 대한 항체의 검출도 ELISA법을 이용하였다. 그러나 당지질 항원은 세척용액이나 혈청희석 용액 등에 tween 80 성분이 포함되어 있을 경우 well에서 제거되기 때문에 모든 용액에 tween 80 성분을 첨가하지 않고 실험을 진행하였다.

#### 다. 우유에서 우형결핵균 항체의 검출

우유에 존재하는 우형결핵균 항원에 대한 항체의 검출은 혈청희석 용액에 우유를 1:5로 희석한 다음 위에서 기술한 ELISA법을 이용하

였다.

#### 4. 우형결핵균 감별기법

가. Southern Blot Hybridization 법에 의한 균주의 감별

##### 1) 박테리아 균주 및 배양방법

본 실험에서 사용된 *M. bovis* AN5 균주와 한국에서 분리된 임상 균주 2 균주는 국립수의과학연구소 (안양)에서 분양받았으며, *M. bovis* BCG 1173P2, Phipps는 대한결핵협회 결핵연구원에서 제공받았다. 한편, 멕시코에서 분리한 *M. bovis* 5개 균주의 DNA 추출물은 Dr. M. Salman(Colorado State Univ. Fort Collins, Colorado)으로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 각 균주의 배양은 egg-based Ogawa에서 배양하여 유지하였다.

##### 2) Genomic DNA의 분리

결핵균의 genomic DNA 분리는 Van Embden 등의 방법 (27)을 따라 사용하였다. 배양된 균 1 loop를 따서 400 $\mu$ l의 TE가 담긴 microcentrifuge tube에 담아 80 $^{\circ}$ C에서 20분간 가열하여 멸균하였다. 여기에 50 $\mu$ l의 10mg/ml lysozyme을 섞어 vortex하고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하고, 5 $\mu$ l의 proteinase K와 70 $\mu$ l의 10% SDS를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 다시 배양하였다. 다시 100 $\mu$ l의 5M NaCl을 넣어 섞은 후 100 $\mu$ l의 CTAB/NaCl을 첨가하고 액체가 흰색을 띠 때까지 섞어준 후 상온에서 65 $^{\circ}$ C에서 20분간 배양한후 상온에서 식혀주었다. 이어서 500 ul의 Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol(PCI)을 넣어 잘 섞는다. 12000rpm에서 9분간 원심분리한 뒤 상층액을 새로운 tube에 옮긴다. 여기에 500 ul의 CI를 넣어 섞은후 다시 1200 rpm에서

9분간 원심분리하였다. 상층액을 분리하여 0.6×의 isopropanol을 넣어 -20℃에서 30분간 배양하다가 12000rpm의 속도로 4℃에서 20분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 70% EtOH 1ml을 넣어 DNA pellet을 닦아주고 4℃, 12000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 공기중에서 말려 40 $\mu$ l의 TE를 넣어 DNA를 녹여 사용하였다.

### 3) Genomic DNA의 제한효소 처리

약 3.5 $\mu$ g의 genomic DNA를 2  $\mu$ l의 Pvu II (10u/ $\mu$ l)를 처리하여 37℃에서 2시간 동안 잘라준 다음 7 $\mu$ l의 6x DNA sample buffer를 DNA에 넣어 섞은 후, 0.8 %의 agarose gel로 밤새 전기영동한다.

### 4) Southern blot hybridization

결핵균의 genomic DNA 분리와 Southern blot hybridization은 Van Embden 등의 방법 (27)을 따라 사용하였다. IS6110 RFLP에 사용된 DNA probe는 IS6110 전장을 기존의 PCR 방법 (20)을 이용하여 증폭한 뒤 제한효소 Pvu II로 절단하여 사용한다. PCR에 사용된 primer sequence는 5'-GTTCTTGAAAGGATGGGGT-3'와 5'-CCAACTCGA CATCCTCGATG-3'(21)으로 (주) 바이오니아에서 제조하여 사용한다. PCR로 증폭된 1,160 bp 크기의 DNA fragment를 Pvu II로 절단하면 왼쪽 fragment는 410 bp, 오른쪽 fragment는 740 bp가 되는데 각각을 RFLP의 probe로 사용하는데, 증폭된 DNA fragment는 <sup>32</sup>P-dCTP (NEN, Boston, MA)를 이용하여 random priming reaction을 이용하여 labeling 하여 사용한다.

IS1081 probe RFLP에 사용된 probe도 같은 방법으로 PCR을 이용



하여 제조하였는데, primer sequence는 5'-AAGCGAGCTGAACGCGCACTG-3'와 5'-TGGATGCCAGGATCTCTCGG-3'으로 320 bp 크기의 DNA fragment를 증폭하였다 (22). 증폭된 DNA된 DNA fragment는 ECL kit (Amersham International plc, Amersham, United Kingdom)를 구입하여 사용하였다. DR probe는 36-mer인 oligonucleotide로, sequence는 5'-GTCGTCAGACCCAAAACCCCGAGAGGGGACGGAAAC-3' 이었고 (23) (주) 바이오니아에서 제조하여 사용하였다. Probe로 사용된 DR sequence는 3'-oligolabeling and detection system(Amersham International plc, Amersham, United Kingdom)을 구입하여 제조자가 추천한 방법에 따라 사용하였다.

pTBN12 (24)는 *M. tuberculosis*에 highly repetitive한 DNA sequence를 detection할 수 있는 probe로 M. Donald Cave (University of Arkansas, Little Rock, Arkansas U. S. A.)로 부터 받아 실험에 사용하였다. pTBN12도 결핵균주나 우형결핵균주의 감별에 매우 효과적인 probe로 알려져 있으며, 특히 IS6110을 probe로 사용한 RFLP 분석에 의해서 감별되지 않는 균주를 더 세밀하게 분류하는데 유용한 것으로 생각되고 있다. pTBN12를 사용한 RFLP도 우형결핵균주들의 genomic DNA를 *Alu I*으로 절단하여 이용하였다.

나. PCR 기법을 이용한 우형결핵균주 감별

#### 1) Genomic DNA의 분리

PCR에 사용된 genomic DNA는 앞서 설명한 바와 같은 freeze-boiling method를 이용하여 분리하였다.

#### 2) IS6110-based Outward-PCR typing

Ross(25)의 방법에 따라 IS6110 element 사이의 flank

sequences를 증폭하여 각 strain 간의 차이를 알아내는 방법인 outward PCR을 사용한다. 사용된 PCR primer는 5'-CIIICCGGGGCGGT-TCA-3'로 I는 inosine이다. IS6110의 3' PCR primer는 IS6110의 inverted repeats 부위에 annealing 하도록 고안하고 방향은 IS6110의 바깥을 향하도록 고안하여 IS6110 사이의 flanking sequences를 증폭하였다.

PCR은 대략 50-100 ng의 genomic DNA와 PCR buffer ([20 pmole primers, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U of *Taq* polymerase, 200 uM dNTPs)에서 시행한다. PCR 조건은 처음 94°C에서 10분간 반응하고, 그후 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 2분간 연쇄반응을 35회 되풀이하고 마지막 반응후, 72°C에서 7분간 반응하여 증폭을 종결한다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 결과를 확인하였다.

### 3) VNTR typing

VNTR 증폭을 위한 PCR 반응의 방법과 PCR primer sequence 등은 Frothingham과 Meeker-O'Connell (26)의 PCR 방법에 따라 시행하였다. PCR 조건은 처음 95°C에서 10분간 반응하고, 그후 94°C에서 1분, 60°C에서 1분 72°C에서 1분간 연쇄반응을 35회 되풀이하고 마지막 반응후, 72°C에서 7분간 반응하여 증폭을 종결한다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하여 결과를 확인하였다.

## 제3절 결과 및 고찰

### 1. 항원의 특성규명

#### 가. 배양단백질 (culture filtrate protein) 항원의 특성

우형결핵균과 조형결핵균을 배양하고 그 배양액에서 준비한 배양단백질 CF 항원의 구성 성분을 비교하기 위하여 SDS-PAGE 양상을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 우형결핵균인 *M. bovis*의 CF항원과 조형결핵균인 *M. avium*의 CF항원 그리고 인형결핵균인 *M. tuberculosis*의 CF항원간에 주요 단백질 성분과 상대적인 양에 상당한 차이가 있었다. 특히 동일한 균종의 균주일지라도 준비하는 lot의 차이나 열처리 하였을 경우 단백질의 구성 성분에 많은 변화를 나타냈다. 따라서 그 동안 우형결핵균의 배양액으로부터 PPD를 준비할 경우 주로 우형결핵균으로 감작한 기니픽에서 피내반응 정도만을 비교한 biological activity에 근거하여 항원을 희석하여 우결핵 검진 사업에 사용하던 것을 앞으로는 먼저 SDS-PAGE 양상을 비교관찰 한 다음 PPD의 제조하거나 제조 후에 그 양상을 비교한 다음 biological activity를 조사하여 사용하는 것이 PPD lot 간에 피내반응 정도를 표준화하는데 바람직하다고 생각한다. 본 세부과제에서는 우형결핵균 CF항원으로는 Fig. 1의 8번 lane의 항원을 이용하였으며, 조형결핵균 CF항원으로는 5번 lane의 항원을 이용하였다.

우형결핵균 CF항원과 조형결핵균 CF 항원의 항원성을 비교하기 위하여 우결핵검진에서 튜버클린 피내반응검사에 양성인 소 8두와 피내반응 음성인 소 13두에서 혈청을 채취하여 각 항원에 대해 항체검사로 ELISA를 시행하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 양성우 8두 중

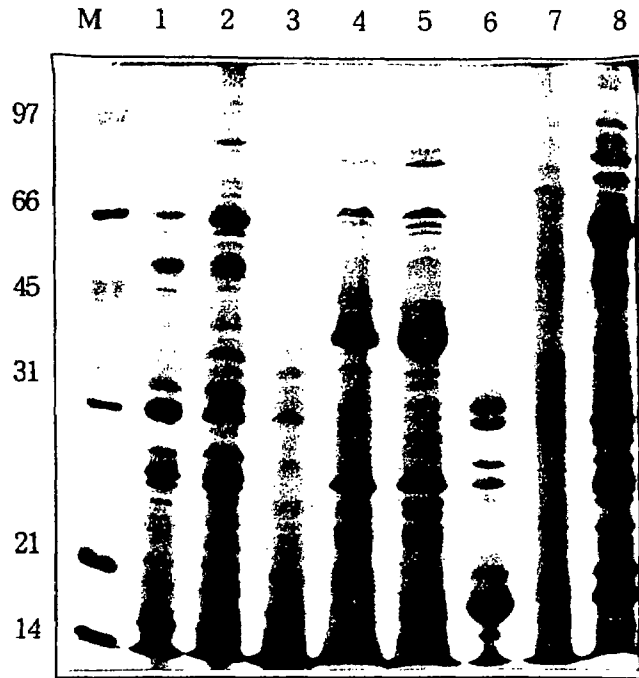


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of culture filtrate proteins from *Mycobacterium* species.

Lanes M: size markers, 1: *M. tuberculosis* YMC1, 2: *M. tuberculosis* YMC3, 3: *M. avium* heat inactivated, 4: *M. avium* batch 17, 5: *M. avium* batch 29, 6: *M. bovis* AN5 batch 2, 7: *M. bovis* AN5 heat inactivated, and 8: *M. bovis* AN5 batch 25.

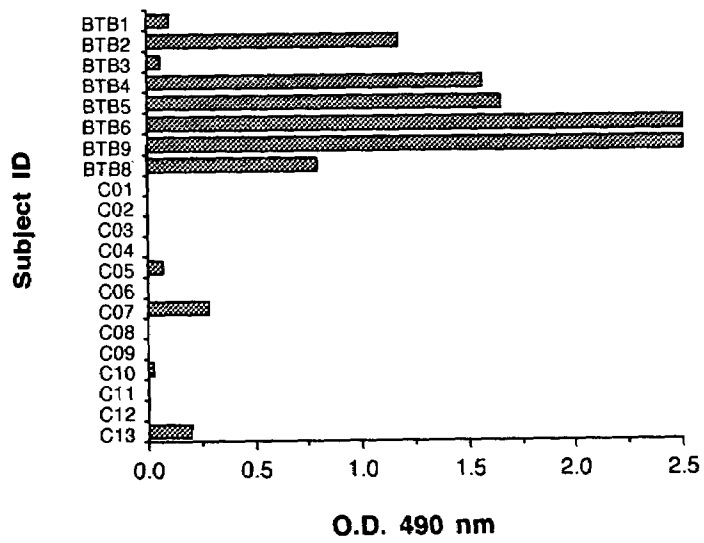


Fig. 2. Seroreactivity to *M. bovis* CF antigen.  
 BTB: bovine tuberculosis; C: control

6에에서 높은 항체반응을 나타냈으며, 음성우인 경우는 그 반응이 미미하였다. 이 결과에서 확인할 수 있는 것은 우형결핵균 PPD를 이용한 피내반응 양성우일 경우 대부분은 대조군에 비교하여 매우 높은 항체가를 보인다는 점과 일부 양성우에서는 항체반응이 매우 미미할 경우가 있다는 점이다. 항체반응이 낮은 현상은 우형결핵균 감염 초기이거나 균이 체내에서 충분히 증식하지 못하고 세포매개면역반응에 의하여 자연 치유되는 경우에 나타날 수 있다.

한편 우결핵 양성우의 혈청에서 조형결핵균인 *M. avium* CF 항원에 대한 항체는 모두 *M. bovis* CF에 대한 항체가 보다 현저히 낮아 *M. bovis*에 감염된 경우에는 *M. bovis* CF 항원이 특이적으로 높게 반응함을 알 수 있었다 (Fig. 3). 따라서 *M. bovis* CF항원을 항체검사에 이용하더라도 *M. avium* CF항원과 겸용하여 사용할 경우 마치 피내반응 검사의 comparative cervical test처럼 우형결핵균에 감염 여부를 특이적으로 진단할 수 있음을 제시하였다.

#### 나. 당지질 (glycolipid) 항원의 특성

균체로부터 유기용매를 이용하여 추출한 지질 성분을 Florisil column에 첨가한 다음 chloroform 용액과 methanol 용액의 비율을 달리하여 분획한 성분을 모아 건조시켜 각각에 대한 항원성을 조사하였다. 먼저 *M. bovis* AN5균주의 당지질 분획의 항원성을 우결핵 양성우의 혈청과 토끼에 *M. bovis* BCG균주와 나균 (*M. leprae*)을 각각 면역시킨 후 얻은 혈청과 반응시켜 조사하였다. Fig. 4에서 보여준 결과와 같이 우결핵 양성우 혈청과 가장 강하게 반응하는 당지질 항원은 5% methanol이 포함된 chloroform 용액으로 분획한 항원이며, 40-50% methanol 용액으로 분획한 당지질 성분은 *M. bovis*

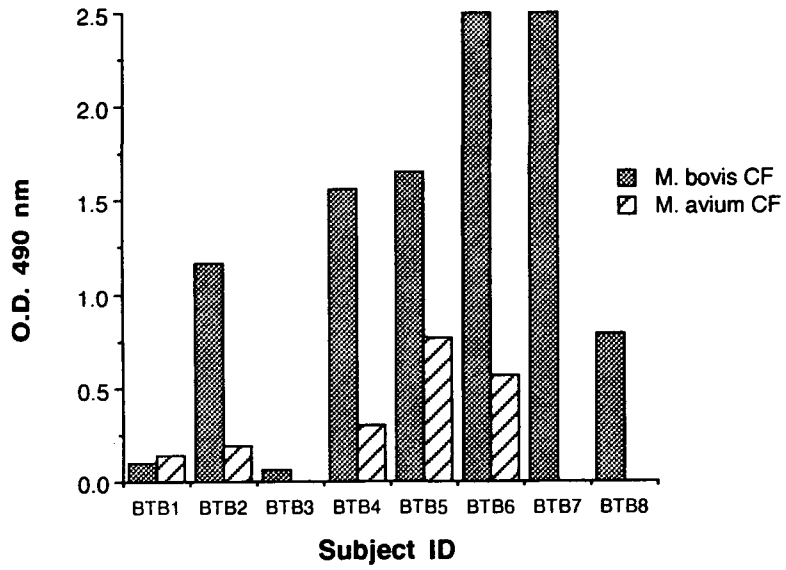


Fig. 3. Comparison of seroreactivity between *M. bovis* and *M. avium* CF antigens.

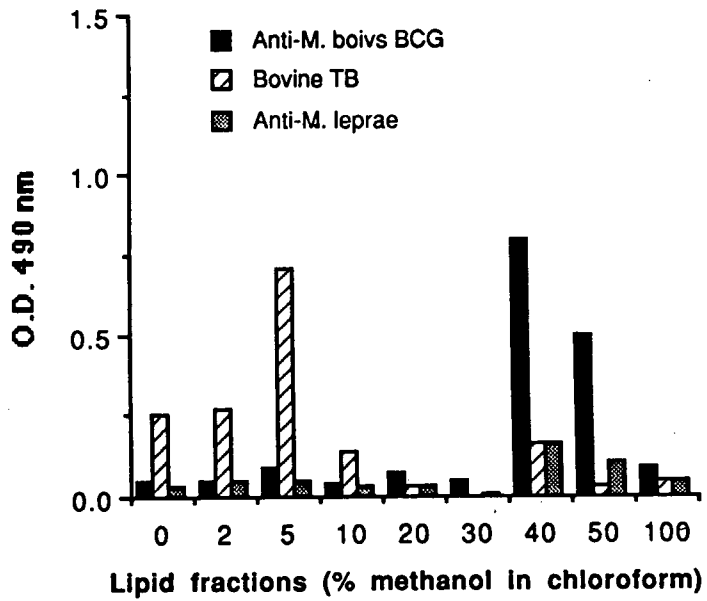


Fig. 4. Seroreactivity of lipid fractions from *M. bovis* AN5. Crude lipid extract was applied to a Florisil column and eluted with increasing percentage of methanol in chloroform. Seroreactivity was determined by ELISA.



BCG에 대한 면역혈청과 높은 반응성을 나타냈다.

반면에 *M. bovis* BCG균주에서 얻은 당지질 성분의 항원성을 조사한 결과 2-5% methanol 분획성분에는 비교적 낮은 반응을 나타냈지만 역시 우결핵 양성우의 혈청과 반응하였으며 (Fig. 5), 40-50% methanol 분획성분은 *M. bovis* BCG항체와 매우 높은 반응을 나타냈다. 이상의 결과를 종합하면 우형결핵균의 당지질 성분 가운데 비교적 지방산 성분이 많이 포함된 경우 즉 2-5% methanol 분획성분을 이용하는 것이 우결핵 양성우를 혈청진단하는 데 바람직할 것이다. 다만 비교적 당 성분의 비율이 높은 당지질 즉 40-50% methanol 분획성분이 항원성은 매우 높았으나, 야외에서 자연 감염된 우결핵 양성우의 혈청과는 반응이 상대적으로 낮아 그 유용성이 낮을 수 있다.

우형결핵균의 당지질 성분 가운데 비교적 항원성이 높았던 2-5% methanol fraction (GL5)과 40-50% methanol fraction (GL40)성분을 이용한 항체검사에 필요한 항원농도의 최적 조건을 정하기 위하여 각각의 항원의 농도에 따른 항체반응성을 조사하였다. Fig. 6에서 보여준 결과와 같이 GL5항원의 경우 그 농도가 5 ug/ml일 때 가장 적당하였으며, GL40항원의 경우 10 ug/ml 일 때 가장 적합하여 (Fig. 7), 이하의 항체검사에서는 각 항원의 농도를 달리하여 이용하였다.

위에서 분리한 당지질 항원을 우결핵의 혈청진단에 이용하기 위해서는 우형결핵균에 그 특이성을 확인하여야 한다. 이를 위하여 여러 종류의 mycobacteria에 대한 토끼 면역혈청을 미국 Colorado State University의 Dr. Patrick J. Brennan으로부터 제공받아 GL5항원과 GL40항원의 특이성을 조사하였다. Fig. 8에 보여준 결과와

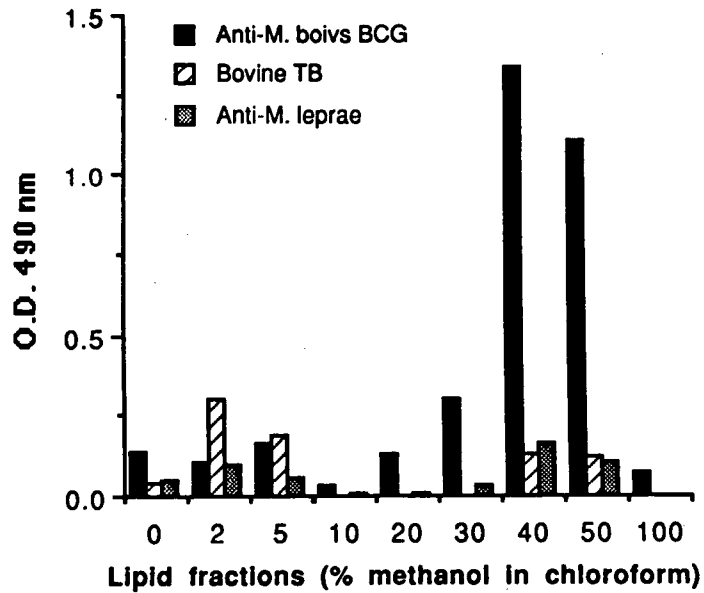


Fig. 5. Seroreactivity of lipid fractions from *M. bovis* BCG. Crude lipid extract was applied to a Florisil column and eluted with increasing percentage of methanol in chloroform. Seroreactivity was determined by ELISA.

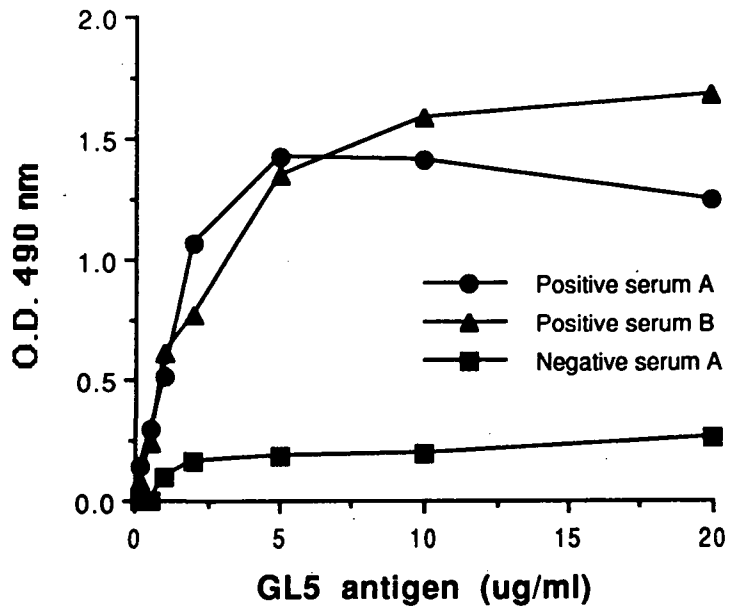


Fig. 6. Seroreactivity of the GL5 antigen with sera from tuberculin positive or negative cattle. Seroreactivity was determined by ELISA.

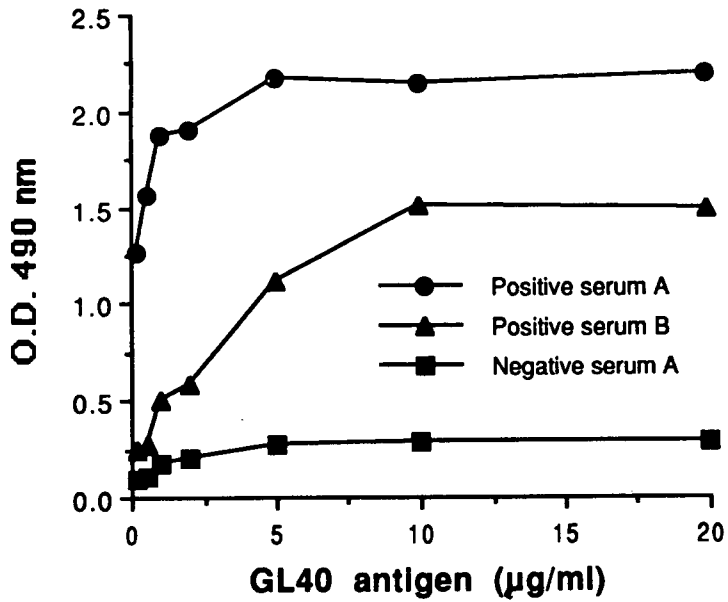


Fig. 7. Seroreactivity of the GL40 antigen with sera from tuberculin positive or negative cattle. Seroreactivity was determined by ELISA.

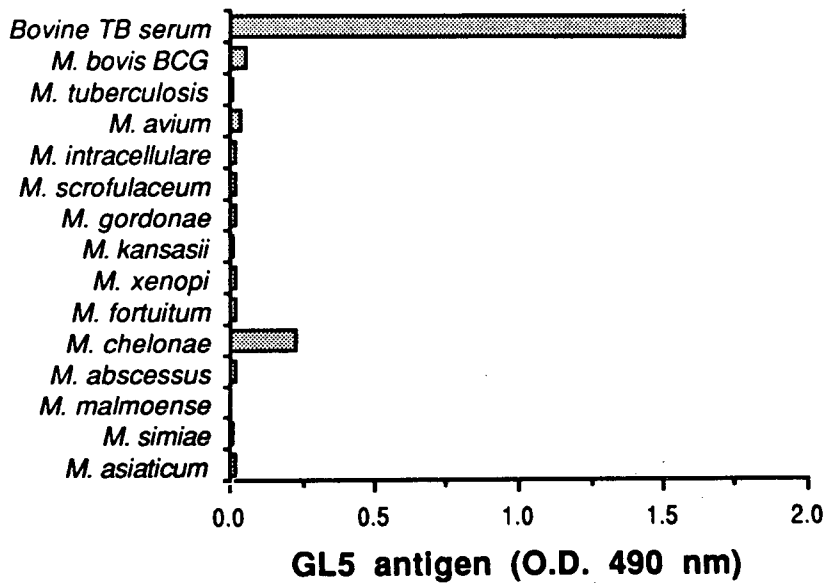


Fig. 8. Seroreactivity of the GL5 antigen in rabbit antisera against 14 *Mycobacterium* species and a serum from tuberculin positive cattle. Seroreactivity was determined by ELISA.

같이 GL5항원에 대해서는 우결핵 양성우의 혈청과 가장 높은 반응을 나타냈다. 대부분의 종류에 대한 면역혈청과는 반응하지 않아 특이성이 매우 높았으나 *M. chelonae* 면역혈청과는 비록 낮으나 반응이 하여 향후 GL5항원을 혈청진단 검사에 응용할 경우 이점을 고려하여 판정을 해야 할 것이다. 한편, GL40항원은 *M. avium*에 대한 면역혈청과 낮은 반응성을 나타냈으나 다른 mycobacteria에 대한 면역혈청과는 반응하지 않아 그 특이성이 비교적 높았다 (Fig. 9). 그러나 자연계에 널리 존재하는 *M. avium*과의 교차반응성 때문에 역시 우결핵 혈청진단의 판정에 유의를 해야 할 것으로 생각한다.

당지질 항원 가운데 GL5항원의 주요 성분은 아마도 이전의 연구보고에서 발표된 mycoside B항원일 것으로 예측되어 Dr. Brennan으로부터 제공받은 mycoside B항원과 그 항원성을 비교하였다. 우결핵 양성우와 음성우의 혈청을 대상으로 두 가지 항원을 이용한 항체검사를 실시한 결과 그 반응정도에 높은 상관관계를 나타냈다 (Fig. 10). 따라서 GL5의 주요 성분이 mycoside B임을 알 수 있었다. 이전의 보고에서 mycoside B항원이 오로지 *M. bovis*에만 존재하는 것으로 규명되었기 때문에 (13) Fig. 8에서 보여준 *M. chelonae* 면역혈청과의 반응은 GL5성분 가운데 mycoside B이외의 성분과 반응하였을 것으로 생각한다.

우결핵 양성우에서 두 가지 당지질 항원 즉 GL5항원과 GL40항원에 대한 항체가에 상관관계가 있는가를 조사하기 위하여 각 항원에 대한 항체 흡광도를 비교하였다. Fig. 11에서 보여준 바와 같이 GL5항원에 대한 흡광도와 GL40항원에 대한 흡광도 간에 상관도는 낮았으며, 두 가지 항원에 모두 양성인 경우와 어느 한 가지 항원에만 반응하는 혈청도 다수 존재하였다. 따라서 우결핵의 혈청진단에 당

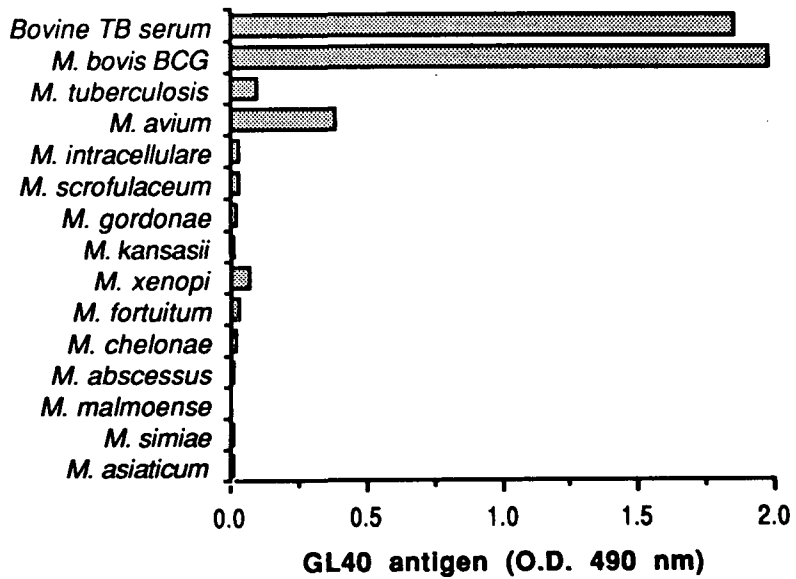


Fig. 9. Seroreactivity of the GL40 antigen in rabbit antisera against 14 *Mycobacterium* species and a serum from tuberculin positive cattle. Seroreactivity was determined by ELISA.

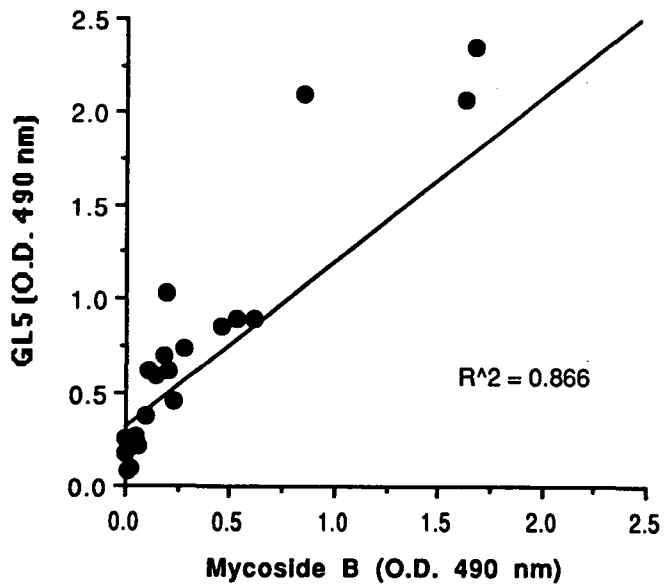


Fig. 10. Comparison of seroreactivity between the GL5 antigen and mycoside B with sera from tuberculin positive cattle. Seroreactivity was determined by ELISA.



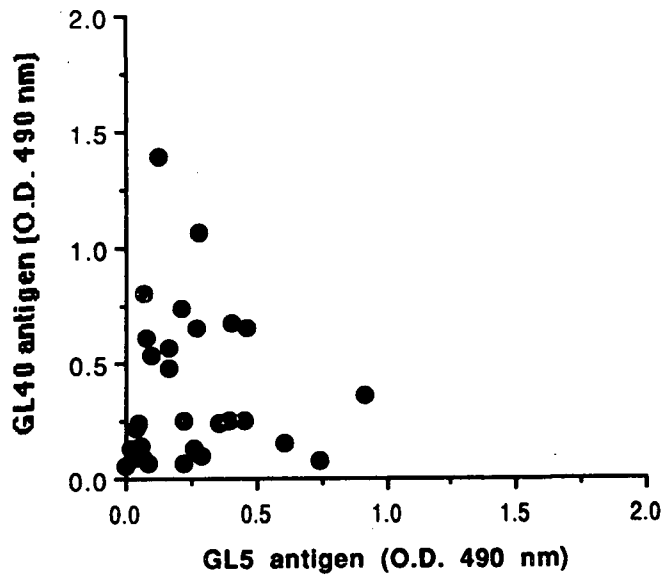


Fig. 11. Comparison of seroreactivity between the GL5 and GL40 antigens with sera from tuberculin positive cattle. Seroreactivity was determined by ELISA.

지질 항원을 이용할 경우에는 GL5항원과 GL40항원을 모두 사용하는 것이 바람직함을 제시하였다.

#### 다. 유전자재조합 MPB70항원의 특성

우형결핵균 MPB70 유전자를 유전자재조합기법으로 *E. coli*에 클론하고 발현시킨 다음 정제한 단백을 SDS-PAGE법으로 분석한 결과는 Fig. 12와 같다. 정제한 rMPB70 단백질은 약 25 kDa 크기(Fig. 12, lane 2)를 나타냈으며, 원래의 22 kDa 크기 (Fig. 12 lane 1)보다 3 kDa 정도 증가하였다. 이는 정제를 위하여 임의로 추가한 6 x histidine tag 때문으로 생각한다.

정제한 rMPB70 단백질 성분이 항원성을 나타내는가를 조사하기 위하여 우결핵 양성우의 혈청을 이용하여 western blotting 분석을 실시하였다. Fig. 13에서 보여준 바와 같이 우결핵 양성우 혈청은 모두 rMPB70 단백질에 반응하였으나 우결핵 음성우의 혈청과는 반응하지 않아 rMPB70 단백질이 항원성을 나타냈으며, 그 반응은 우형결핵균의 감염에 특이함을 제시하였다.

rMPB70 단백질을 항체검사에 이용할 때 그 최적 농도를 정하기 위하여 여러 단계의 농도와 우결핵 양성우의 혈청과 반응을 조사한 결과 항원농도가 1.0 ug/ml일 때 가장 적절하였다 (Fig. 14). 따라서 rMPB70 항원을 이용한 모든 항체검사는 1.0 ug/ml의 농도를 이용하였다.

유전자재조합 단백질 rMPB70 항원의 특이성으로 조사하기 위하여 위에서 사용한 여러 가지 mycobacteria에 대한 면역혈청과 rMPB70 항원과의 반응성을 검사하였다. Fig. 15에서 보여준 바와 같이 우결핵 양성우의 혈청만이 rMPB70항원과 높은 반응성을 나타냈으며,

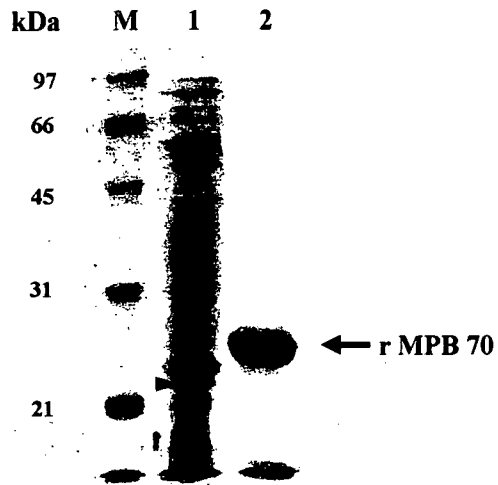


Fig. 12. SDS-PAGE analysis of the culture filtrate proteins (lane 1) and rMPB70 (lane 2) of *M. bovis* and molecular mass maker (lane M). The proteins in the gel were stained with Coomassie Blue. The arrow head in the lane 2 indicates the 22 kDa native MPB70 protein. The molecular mass of the purified rMPB70 was 25 kDa.

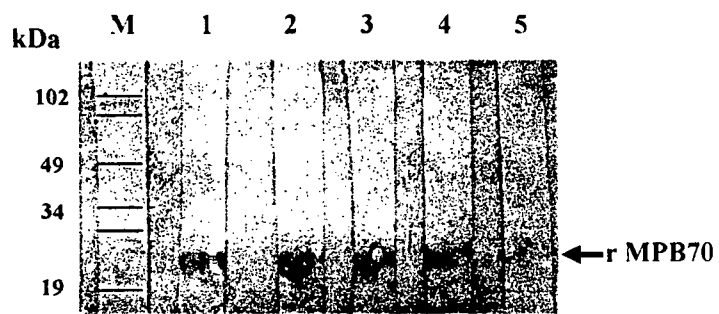


Fig. 13. Reactivity of the rMPB70 protein with sera from tuberculin-positive cattle (lanes 1-4) and negative cattle (lane 5) in Western blotting. The prestained molecular mass marker was in the lane M.

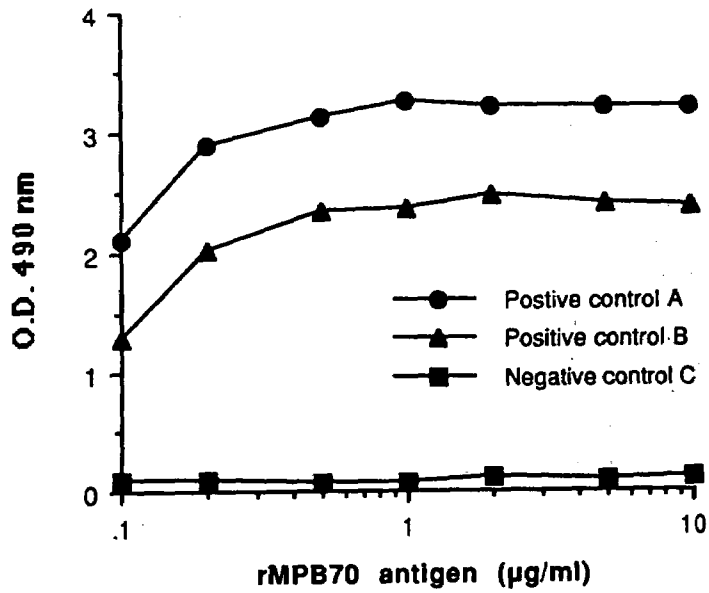


Fig. 14. Reactivity of the rMPB70 protein with sera from tuberculin-positive cattle or negative cattle. The seroreactivity was determined by ELISA.

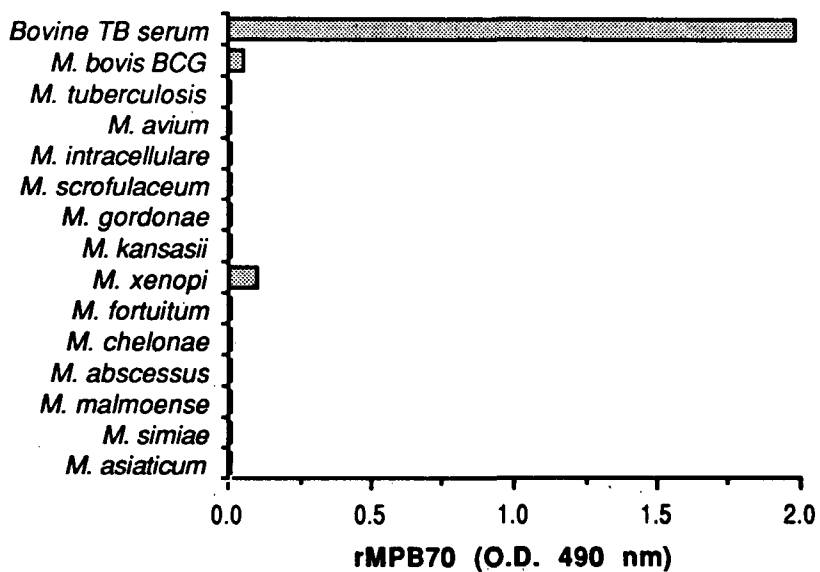


Fig. 15. Seroreactivity to the rMPB70 protein in rabbit antisera against 14 *Mycobacterium* species and a serum from tuberculin-positive cattle. The seroreactivity was determined by ELISA.

다른 mycobacteria에 대한 면역혈청은 반응하지 않았다. 따라서 본 실험의 결과 다른 연구자들이 주장한 rMPB70항원이 우형결핵균에 특이함을 확인하였다.

rMPB70 단백질 항원의 혈청진단 유용성을 평가하기 위한 예비실험으로 우결핵 양성우 혈청 29개와 음성우 혈청 30개로부터 항체를 검출한 결과 양성의 혈청 항체가는 대부분 높았으나(Fig. 16), 음성우는 모두 낮았다 (Fig. 17). 항체반응의 지표인 흡광도 0.30를 항체 양성기준으로 정하였을 때 rMPB70 항원을 이용한 혈청검사는 양성우 29두 중 26두에서 항체양성반응을 나타내 민감도는 89.7%였으며, 특이도는 100%였다 (Table 1). 이와 같은 결과는 비특 검체의 수가 적고 예비실험의 결과이지만 그 동안 다른 연구자들이 MPB70항원을 이용한 혈청진단 검사결과보다 우수하였다. 이렇게 민감도가 높은 이유의 하나는 아마도 우리 나라에서 피내반응 검사에 의하여 양성우로 판정되는 대부분의 소가 우형결핵균 감염이 오래 동안 경과한 후에 발견되어 항체가가 높아졌을 것으로 생각할 수 있다.

우결핵 양성우 혈청에서 우결핵균 CF항원과 rMPB70항원에 대한 항체반응성을 비교한 결과 Fig. 18에서 보여주는 바와 같이 CF 항원에 높은 반응을 나타내는 혈청은 모두 rMPB70 항원에도 매우 높은 반응을 나타냈다. 그러나 CF항원에 비교적 낮은 반응을 보인 혈청의 절반 이상에서 rMPB70 항원에 흡광도 1.0 이상의 높은 항체반응을 나타내 민감도가 더 높았다. 따라서 rMPB70항원 단독으로 혈청검사를 시행할 경우에도 대부분의 항체 양성우를 진단하는데 어려운 점이 없을 것으로 예상된다.

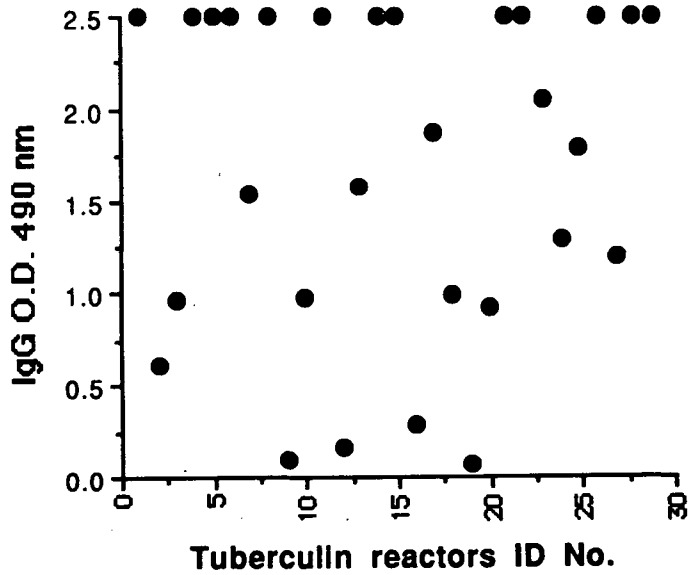


Fig. 16. IgG seroreactivity to the rMPB70 protein in sera from tuberculin positive cattle. The seroreactivity was determined by ELISA.



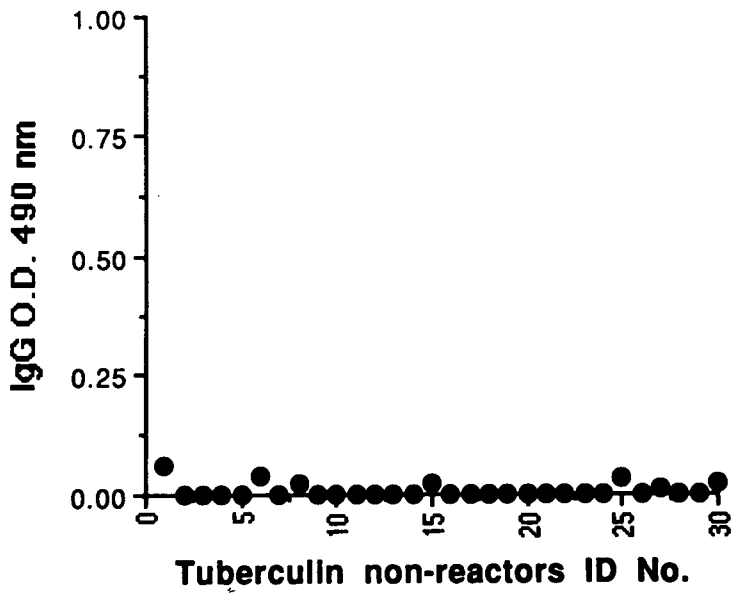


Fig. 17. IgG seroreactivity to the rMPB70 protein in sera from tuberculin-negative cattle. The seroreactivity was determined by ELISA.

**Table 1.** Seroractivity to rMPB70 in sera from tuberculin-positive and negative cattle

Tuberculin test	No. assayed	Seroractive* to rMPB70	
		No.	(%)
Positive	29	26	(89.7)
Negative	30	0	(0)

\* Criteria for seroreactive : O.D.490nm  $\geq$ 0.15

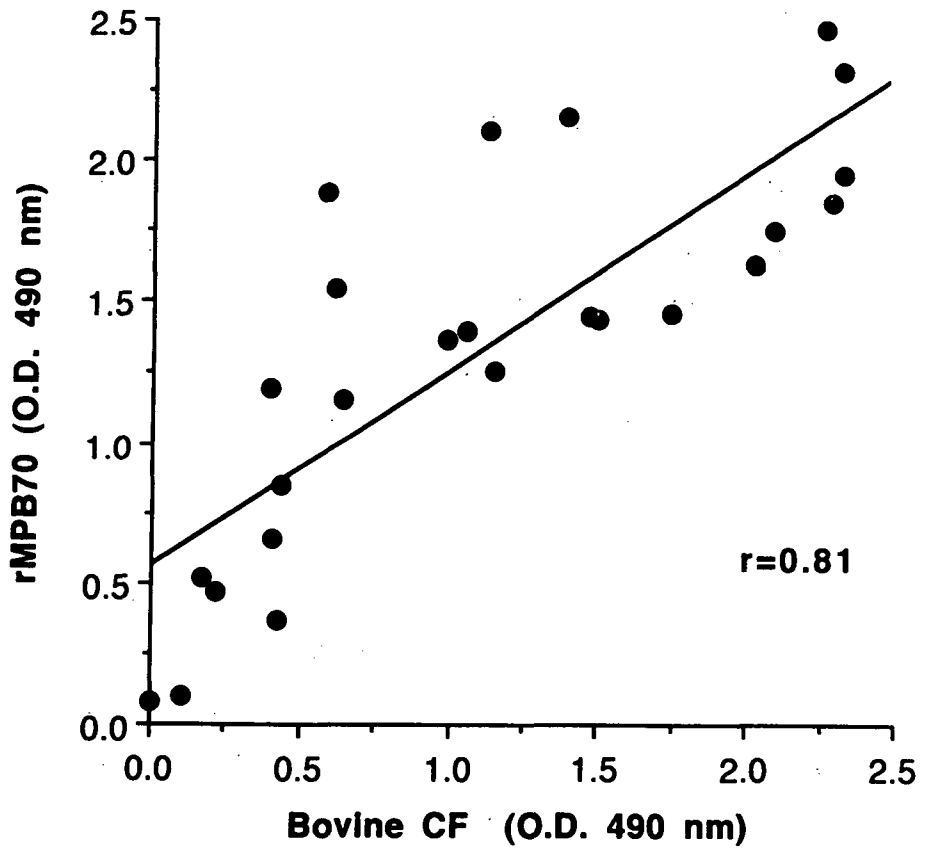


Fig. 18. Comparison of reactivity between *M. bovis* CF and rMPB70 antigens in sera from tuberculin-positive cattle. The seroreactivity was determined by ELISA.

## 2. 우형결핵 항원에 대한 항체 검출

### 가. 우형결핵균 항원에 대한 항체 분포

경기도내에서 사육되고 있는 유우에서 우형결핵균 항원에 대한 항체보유율을 조사하고자 위에서 준비한 항원을 이용하여 효소 결합면역분석법(ELISA)으로 항체검사를 시행하였다. 경기도 축산위생연구소에서 채취한 혈청 가운데 무작위로 518개를 선택하여 항체검사를 실시한 결과는 Table 2와 같다. 항체검사는 비특이적 반응을 최소화하기 위하여 혈청을 *M. phlei*로 흡착시킨 다음 검사에 이용하였으며, 흡광도 0.40를 항체 양성기준으로 정하였을 때 우형결핵균 CF항원에 대해서는 그 양성율이 8.3%나 되었으나 이들 대부분은 조형결핵균 CF항원에도 유의성 있게 반응하여 비특이 반응으로 간주되었다. 우형결핵균 CF항원에 0.40의 흡광도를 나타내며 조형결핵균 CF항원에 대한 흡광도보다 1.5배 이상인 경우는 8예(1.5%)로 이 경우에는 우형결핵균에 감염되었을 가능성이 매우 높았다. 한편 우형결핵균에 특이한 항원을 포함한 GL5 항원에 대한 항체분포율도 10.2%나 되고, 사람의 경우 활동성 결핵환자에서 높은 항체가를 나타내는 GL40 항원에 해당하는 우형결핵균 GL40 항원에 대한 항체 양성율도 10.4% 였다.

비록 항체분출은 간접적인 근거가 되어 우형결핵균에 의한 감염을 확신할 수 없으며, 본 과제에서 사용한 항원과 유사한 항원에 의해 생산된 항체와 교차반응일 가능성도 배제할 수 없어 높은 항체율이 반드시 우형결핵균 감염율과 일치하지는 않을 것이다. 그러나 조형결핵균 CF 항원에 대한 항체반응 정도가 우형결핵균 CF 항원에 대한 반응이 1.5배 이상인 경우 즉, 전체의 약 1.5% 정도는 비교적 우형결핵균에 감염되었을 가능성이 높으며, 이는 튜버쿨린 피내 반응 양성율보다 월등히 높은 것이다. 따라서 항체양성 유우를 보유한 축산농가를 대상으로 우형결핵 피내 반응을 실시하여 양성반응 여부를

Table 2. Seroreactivity to *M. bovis* antigens in sera from cows

항원	검사두수	항체양성*	
		No.	(%)
<i>M. bovis</i> CF (MB-CF)	518	43	(8.3)
<i>M. avium</i> CF (MA-CF)	518	94	(18.1)
$\frac{\text{O.D. (MB-CF)}}{\text{O.D. (MA-CF)}}$	518	8	(1.5)
<i>M. bovis</i> mycoside B	518	53	(10.2)
<i>M. bovis</i> GL 40	518	54	(10.4)

\* 항체양성기준 : O.D. 490  $\geq$  0.40

조사하면 항체검사의 유용성을 판정할 수 있을 것으로 생각한다.

#### 나. 유전자재조합 rMPB70항원에 대한 항체 분포

유전자재조합 rMPB70항원을 이용한 혈청진단법의 유용성을 보다 정밀하게 평가하기 위하여 그 동안 확보된 우결핵 양성우 57두의 혈청과 항체검사 결과의 신뢰성을 검증하기 위하여 우결핵 양성우가 계속 발생하고 있는 목장의 유우에서 채취한 124 개, 그리고 지난 수년간 우결핵 양성우가 없었던 목장의 유우에서 채취한 90 개의 혈청을 대상으로 rMPB70 항원에 대한 항체 검사를 실시하였다. Fig. 19는 각 혈청의 rMPB70 항원에 대한 항체 흡광도를 보여주고 있다. 수년간 우결핵이 발생하지 않았던 목장 유우의 혈청은 모두 낮은 흡광도를 나타내고 있으며, 반면에 우결핵 양성우의 혈청은 대부분 높은 항체반응도를 나타냈다. 흥미있는 것은 최근에 우결핵이 발생하였던 목장의 유우의 일부에서는 매우 높은 항체를 나타내 피내반응검사에는 음성이었으나 항체가는 높아 우형결핵균에 감염되었을 가능성이 매우 높았다.

우결핵 발생이 없었던 목장 유우의 혈청 항체가를 근거로 흡광도 0.40을 항체 양성기준 값으로 정하였을 때 우결핵 양성우 57두 가운데 51두가 양성이어서 민감도는 89.5%였으며 (Table 3), 최근에 우결핵이 발생하지 않았던 목장의 유우 90두는 모두 음성이어서 특이도는 100%였다. 그리고 최근에 우결핵 양성우가 발견된 목장의 유우 124두 가운데 항체 양성 기준치를 초과하는 경우가 9두로 7.3%의 양성율을 나타냈다. 따라서 피내반응검사와 아울러 rMPB70항원을 이용한 혈청검사를 병행한다면 보다 많은 우형결핵균 감염우를 진단할 수 있음을 제시하였다. 그러나 피내반응검사에 음성이면서

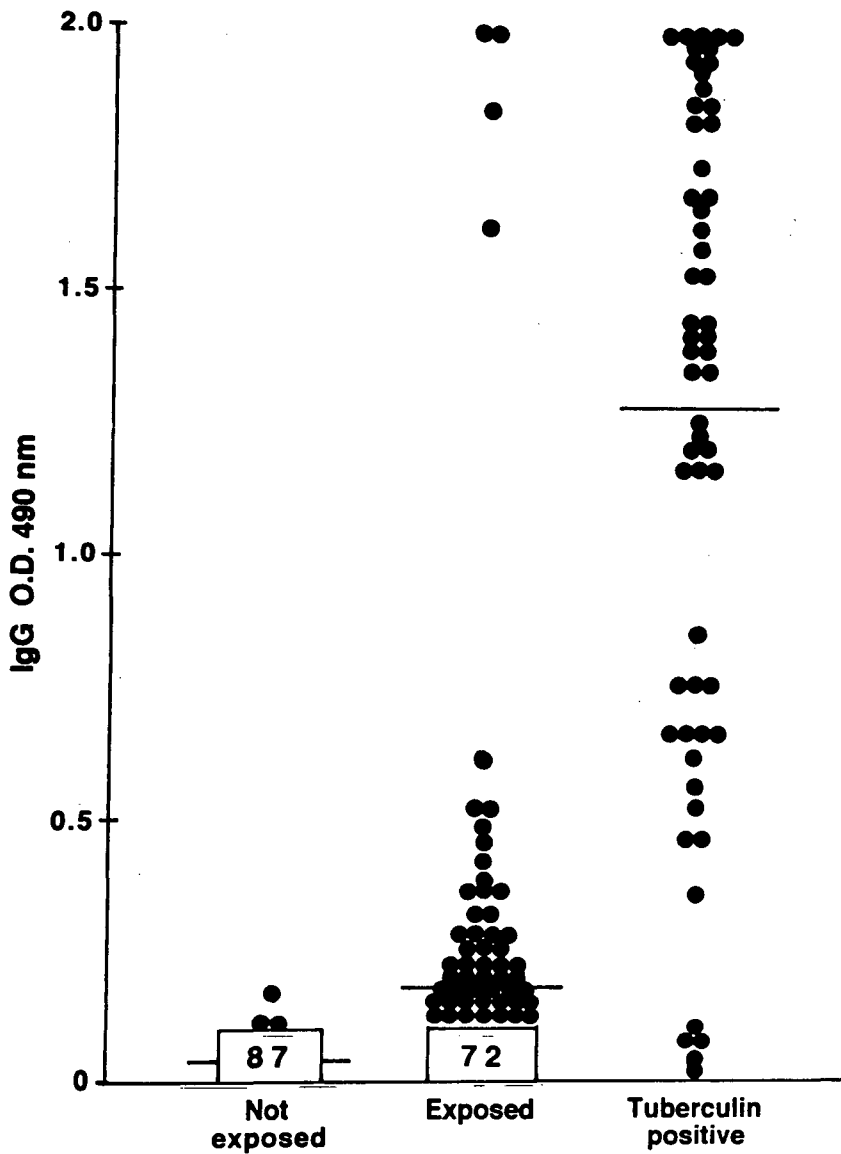


Fig. 19. IgG seroreactivity to rMPB70 in sera from tuberculin positive cattle and controls. Each dot indicates an individual serum samples, and numbers in the boxes represent the number of samples with O.D. readings under 0.10. The bars indicate the mean absorbance of each group.

**Table 3.** Detection of IgG antibodies to rMPB70 antigen in sera from dairy cattle

Groups of cattle	No. of cattle	Seroreactive <sup>*</sup>	
		No.	(%)
Tuberculin reactive	57	51	(89.5)
Farms with tuberculin reactors	124	9	(7.3)
Farms without tuberculin reactors	90	0	(0)

<sup>\*</sup> Criteria for seroreactive : IgG O.D. 490nm  $\geq$ 0.40



항체검사에 양성인 소를 도살 처분하여 우형 결핵균의 분리나 병리 조직 소견상 우결핵임을 확인하는 절차가 전제되어야 할 것이다.

#### 다. 우유에서 우형결핵균 rMPB70 항원에 대한 항체의 검출

우결핵 감염우가 있는 목장을 보다 효과적으로 찾아내기 위하여 현실적으로 적용 가능성이 있는 방법은 우유에서 우형결핵균 항원에 대한 항체를 검출하는 것이다. 이러한 방법은 이미 부르셀라병의 진단방법으로 우유에서 부르셀라 항원에 대한 항체검사를 이용하고 있는 것과 유사하다. 따라서 혈청채취가 어려운 점을 고려하면 우유를 이용한 항체검사는 축산위생연구소 등의 현장에서 적용하기가 매우 용이할 것이다. 따라서 본 세부과제에서는 우유에서 우형결핵균 항원에 대한 항체검사가 가능한 가를 조사하였다. 먼저 우결핵 양성우로부터 혈청과 우유를 동시에 채취하여 rMPB70항원에 대한 항체를 비교하였다. Fig. 20에서 보여주는 바와 같이 rMPB70항원에 대한 우유항체와 혈청항체가 사이에는 유의성 있는 상관관계 ( $R^2=0.610$ ,  $p<0.05$ )를 나타냈다. 따라서 우유에서 항체를 검출하더라도 마치 혈청에서 항체를 검출하는 것과 동등한 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

우유에서 우형결핵균 항원에 대한 항체를 검출하여 우결핵 양성우가 포함된 목장을 찾아내는 것이 가능한 가를 조사하기 위하여 경기도 축산위생연구소 관내의 목장에서 부르셀라 항체검사를 위하여 목장별로 채취한 우유에서 rMPB70 항원에 대한 항체를 검사하였다. 3개월 간격으로 2회에 걸쳐 A우유회사와 B우유회사의 집유목장별로 검사한 결과는 Table 4에 정리한 바와 같다. 목장탱크우유에서 우형결핵균에 대한 항체를 검사할 경우 우형결핵균에 감염된 소의 수

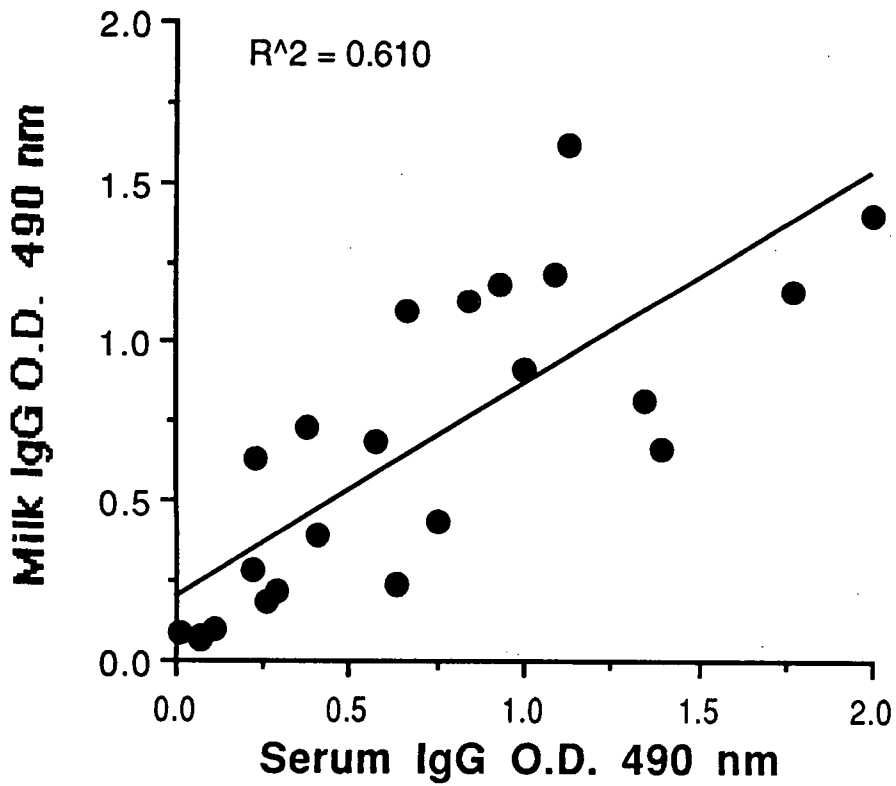


Fig. 20. Comparison of IgG seroreactivity to rMPB70 between serum and milk samples from tuberculin-positive cattle. The seroreactivity was determined by ELISA.

**Table 4. IgG seroreactivity to rMPB70 in milk from dairy cattle**

Dairy Plant	Batch	No. of farms examined	Seroreactive	
			No.	(%)
A	1st	294	11	(3.7)
	2nd	449	15	(3.3)
B	1st	369	13	(3.5)
	2nd	430	23	(5.3)

가 많지 않을 경우 항체가 희석되기 때문에 항체양성의 기준값을 혈청검사에서의 0.40보다 낮은 0.25를 기준 값으로 정하였다. 이러한 기준은 가능하면 우결핵 양성우가 한 마리라도 있을 경우 모두 양성으로 판정할 수 있도록, 즉 민감도를 최대한 높일 수 있도록 하기 위해서이다. A우유회사 집유목장의 경우 항체양성율은 1차검사에서 3.7% 그리고 2차검사에서 3.3%로 평균 3.5%의 양성율을 나타냈으며, B우유회사 집유목장의 경우 1차검사에서 3.5%, 그리고 2차검사에서 5.3%로 평균 4.5%의 양성율을 나타냈다. 이렇게 예상보다 많은 목장에서 rMPB70 항원에 대한 항체 양성율이 높은 것은 위에서 언급한 바와 같이 항체 양성기준 값을 현저히 낮추었기 때문일 것이다.

목장별 탱크우유에서 항체검사한 결과의 일부를 Fig. 21에 나타내었다. 목장K와 목장S의 항체가 다른 목장들에 비교하여 유의성있게 높았다. 이렇게 목장탱크 우유에서 높은 항체를 나타내는 목장의 개체별로 우유를 채취하여 항체를 검사한 결과 항체가가 매우 높았던 목장의 경우 20두 중 5두에서 높은 항체를 나타냈으며 (Fig. 22), 항체가가 비교적 낮았던 목장에서는 11두 중 1두에서만 높은 항체를 나타냈다. 이와 같이 목장탱크우유 항체검사에서 양성으로 의심되는 목장 가운데 8개 목장의 개체별 우유에서 항체를 검사한 결과 총 145두의 우유 가운데 14개에서 양성반응을 나타내 9.7%의 양성율을 나타냈다 (Table 5). 따라서 목장탱크 우유에서 rMPB70 항원을 이용한 항체검사가 높은 항체를 나타내는 소를 1두 이상 포함하는 경우에는 대부분 검출할 수 있을 것으로 예상되나 그 민감도가 어느 정도인가는 보다 면밀한 연구가 진행되어야 할 것이다. 즉 부르셀라 항체검사의 경우 50두에 1두의 양성우만 있더라도 항체검출이 가능한 것으로 알려져 있지만 우형결핵균 항원에 대한

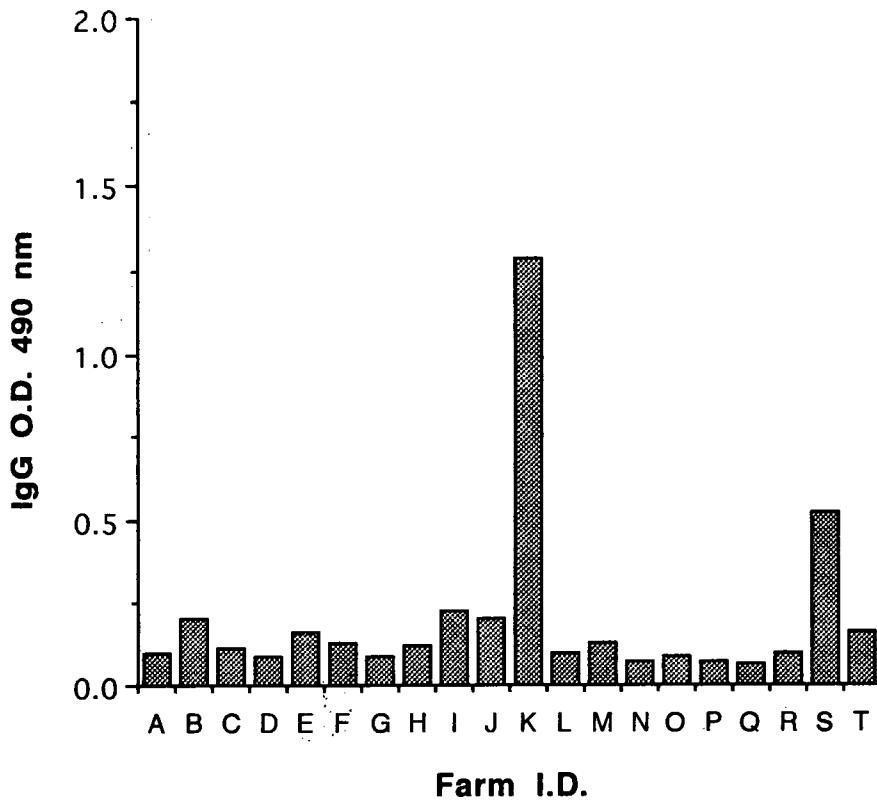
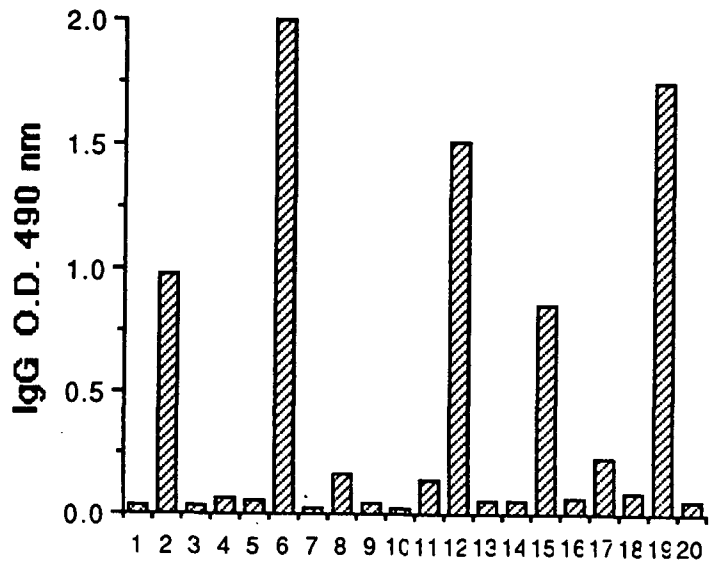
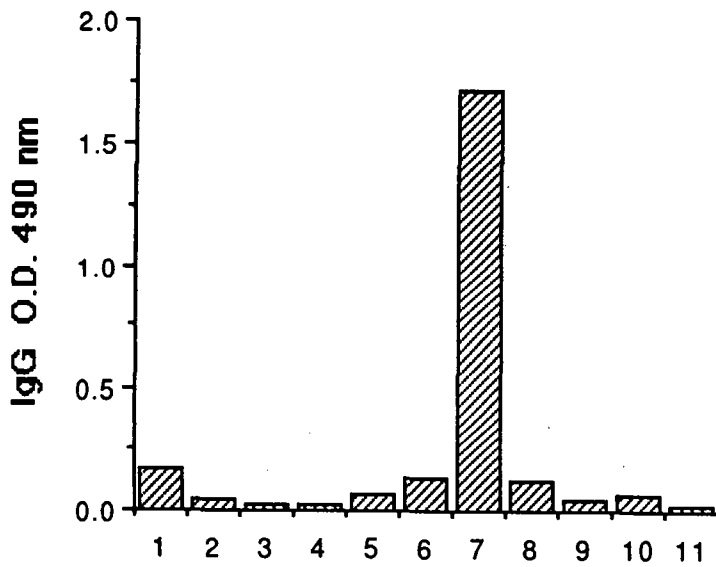


Fig. 21. Seroreactivity to rMPB70 in milk tank from dairy farms with cattle. The seroreactivity was determined by ELISA.



**Farm A - Cow No.**



**Farm B - Cow No.**

Fig. 22. Seroreactivity to rMPB70 in milk collected from each cow in the farms (A & B) with cattle suspected having bovine tuberculosis in screening test using bulk milk

**Table 5.** Detection of IgG antibodies to *M. bovis* antigens in milk from individual dairy cows.

Farm I.D.	No. Cows	Suspected cows	
		No.	(%)
A-D	52	6	(11.5)
E	20	3	(15.0)
F	28	3	(10.7)
G	25	1	( 4.0)
H	20	1	( 5.0)
<b>Total</b>	<b>145</b>	<b>14</b>	<b>( 9.7)</b>

항체는 이에 대한 명확한 근거를 본 연구에서는 제시할 수 없었다.

그러나 먼저 명확한 규명이 필요한 것은 과연 우유항체검사에서 rMPB70항원에 대한 항체가 검출되었을 때 우결핵 양성우일 가능성이 얼마나 되는 가 즉 특이도가 얼마인 가이다. 일반적으로 항체검사에 의한 전염성질병의 진단에는 한계가 있듯이 우결핵에 대한 항체검사도 그 결과는 감염의 가능성만 나타낼 뿐 확진을 하기에는 현상상태에서는 어렵다고 생각한다. 다만 항체검사를 통하여 우결핵 감염우가 있을 것으로 의심되는 목장을 찾아낸 후에 아마도 현재 공식적인 우결핵 진단검사인 피내반응을 시행하는 것이 타당할 것이다.

목장별 탱크우유에서 rMPB70항원에 대한 항체검사를 통하여 경기도내 몇몇 지역의 목장별 우형결핵균 항체 양성율을 조사하였다. 협동연구기관인 경기도 축산위생연구소를 통하여 확보한 3,800여 목장의 탱크우유에서 rMPB70항원에 대한 항체를 조사한 결과 153개 목장에서 항체 양성기준 값을 초과하여 양성율은 4.0%을 나타냈다 (Table 6). 이는 지난 수년간 경기도에서 1회 이상 우결핵이 발생하였던 목장의 수의 비율이 약 3.5%인 점과 크게 차이는 나지 않으나 우유탱크검사에서 항체양성인 목장 가운데 어느 정도가 우결핵 발생목장인 가를 확인하면 항체검사의 유용성을 확인 할 수 있을 것이다.

한 가지 특기할 사항은 그 동안 우결핵 양성우가 발견되지 않았던 용인군 지역의 목장들에서도 다른 우결핵 발생지역과 비슷한 항체양성율을 나타내 이에 대한 정밀검사가 이루어져야 할 것이다. 정밀검사 후에 목장별 항체검사에 양성인 목장의 개체별 항체검사에서 모두 음성으로 판정되거나, 또한 모든 소가 피내반응검사에 음성일 경우에는 우유에서의 항체검사는 우결핵 양성우 보유목장을 찾아내



Table 6. Prevalence of antibodies to rMPB70 antigen in dairy farms in Kyeonggi province

지 역	검사목장수	항체양성목장	
		No.	(%)
수원시, 안산시, 시흥시, 화성군	959	43	(4.5)
양주군, 포천군	1,020	27	(2.6)
용인군	279	16	(5.7)
평택시	304	17	(5.6)
이천군	512	25	(4.9)
안성군	485	12	(2.5)
남양주시	245	13	(5.3)
계	3,804	153	(4.0)

는데 이용할 수 없을 것이다. 반면에 항체검사에 양성인 목장의 전 두수에 대하여 정밀한 검사를 실시하여 항체검사에 양성인 소나 피내반응검사에 양성인 소가 발견될 경우에는 우유에서의 항체검사가 우결핵 양성우 보유목장을 매우 효율적으로 찾아낼 수 있을 것으로 생각한다.

### 3. 우형 결핵균 균주 감별기법의 확립 및 비교평가

가. Southern blotting 기법에 의한 우형 결핵균주의 균주감별  
우형결핵균에 감염된 가축의 이동사항을 파악하기 위하여 감염우에서 분리한 우형결핵균의 genomic DNA를 분리한 후 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 기법을 이용하여 우형 결핵균을 감별하였다. RFLP 기법이란, 균주의 genome 내에 존재하는 repetitive DNA elements가 genome내의 여러 다양한 장소에, 다양한 copy 수로 존재함을 이용하는 방법이다. Genomic DNA를 특정한 제한효소로 절단한 후 특정한 repetitive DNA element를 probe으로 사용하여 Southern blot hybridization을 수행하게 되면, genome 내에 존재하는 DNA element의 위치와 수에 따라 각 균주 마다 각기 다른 banding pattern을 나타내게 된다. 이런 RFLP를 이용하여 각 균주를 감별하는데 사용 할 수 있다.

본 연구에서는 *M. bovis* 균주에 한 개 내지 여러 개의 copy가 존재하는 것으로 알려져 있는 insertion sequence family인 *IS6110*과 *IS1081*를 각각 사용하여, 우형 결핵균주의 DNA polymorphism을 조사하고, 이를 우형 결핵균주 감별에 사용할 수 있는지의 여부를 조사하였다. 또한, insertion sequence 보다는 짧지만 더 많은 copy

수가 genome내에 존재하는 것으로 알려져 있는 direct repeat sequence (DR)와 결핵균내 존재하는 repetitive sequence를 detection할 수 있는 probe인 pTBN12 plasmid를 Dr. M. Donald Cave (Univ. Arkansas, AK, U.S.A.)로부터 얻어 이를 사용하여, IS6110과 IS1081로는 구분되지 않는 균주간을 감별할 수 있는지의 여부도 조사하였다. 실험을 위하여, 우형결핵균주로부터 genomic DNA를 분리하고, IS6110과 IS1081을 probe으로 하는 blot에 사용할 genomic DNA는 제한효소 Pvu II로, DR sequences와 pTBN12를 probe으로 하는 blot에 사용할 genomic DNA는 제한효소 Alu I으로 각각 절단하여 각각의 probe를 사용하여, Southern blot hybridization을 시행하였다.

#### 1) IS6110을 probe으로 사용한 RFLP 분석

IS6110 full-length DNA를 probe으로 사용하여 다양한 종류의 *M. bovis* genomic DNA에 대한 RFLP를 수행하게 되면 아래 Fig. 22과 같은 결과를 얻을 수 있다. 그런데, IS6110의 내부에는 PvuII 제한효소 자리가 있어 이 DNA를 PvuII로 처리하게 되면 오른쪽 fragment와 왼쪽 fragment로 나뉘게 된다. 그중 오른쪽 fragment를 probe으로 사용하는 경우에는 *M. bovis* genomic DNA 내에 존재하는 IS6110의 copy 수를 알아낼 수 있다. IS6110의 오른쪽 fragment를 probe으로 사용하여 시행한 Southern blot hybridization을 시행한 결과는 실험에 사용한 7 종류의 *M. bovis* 표준 균주나 우결핵에 감염된 5마리의 소로부터 분리된 5개의 임상균주의 경우, 한 개 내지 두 개의 band가 나타나, 이들 우형결핵균주의 genomic DNA내에 한 개 내지 두 개의 IS6110이 존재하는 것을 알 수 있었다 (Fig.

23). 이 결과에 의하면, 1, 3, 4번 균주에는 1개의 IS6110이, 2번과 5번 균주에는 2개의 IS6110이 존재하는 것을 알 수 있었다.

또한, 1번과 3번, 4번 균주와 2번과 5번과 균주는 서로 같은 균주로 감별됨을 알 수 있었다. 따라서, IS6110을 사용한 RFLP에 의해서 표준 우형결핵균주인 *M. bovis* BCG Japanese, *M. bovis* BCG Phipps, *M. bovis* BCG Danish 등이 서로 다른 균주로 감별되는 반면, *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG 1173P2 A, B, C와는 서로 차이가 없는 것으로 나타났다. 이들 세 균주 *M. bovis* BCG 1173P2 A, B, C는 France의 Pasteur Institute에서 *M. bovis* BCG 1173P2를 서로 다른 시기에 분양 받아 실험실에서 계대하고 있는 균주로 실상은 같은 균주로 볼 수 있다.

한편, IS6110을 *Pvu*II로 절단하여 얻은 왼쪽 fragment를 분리, 이를 probe으로 사용하는 경우에는 strain간의 차이가 더 잘 나타나는 것을 볼 수 있었다. 즉, 왼쪽 fragment를 probe으로 사용한 경우에는 한 개의 IS6110 element가 존재하는 균주라도 각기 다른 크기의 band가 나타나 균주를 감별할 수 있었다. 그러나, IS6110 전체 fragment를 사용한 경우에도 왼쪽 fragment나 오른쪽 fragment를 각각 사용한 경우와 거의 같은 정도의 감별력을 갖는 것으로 생각되었다. 즉, Fig. 23에서 보았듯이 IS6110 전체 fragment를 사용한 경우에도 *M. bovis* Japanese, Phipps, Danish 등의 균주는 서로 다른 균주로 감별이 가능하며, *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG1173P2 A, B, C, 그리고 임상균주 1, 3, 4번과 2, 5번이 서로 같은 균주로 생각되었다. 따라서, 하나 이상의 IS6110 fragment를 probe로 사용할 필요는 없을 것으로 결론지을 수 있었다.

IS6110

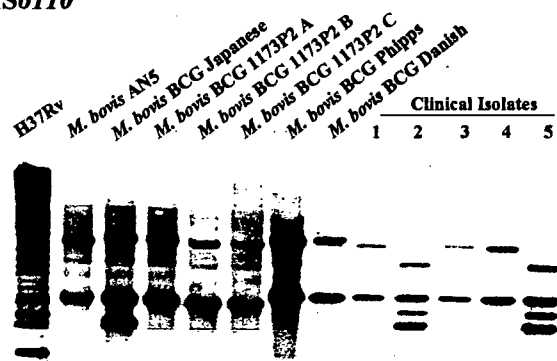


Fig. 23. RFLP analysis of *M. bovis* strains using full length fragment of IS6110.

## 2) IS1081을 probe으로 사용한 RFLP 분석

두 번째 insertion sequence인 IS1081을 probe로 사용하여 Southern blot hybridization을 수행하였다. 이 실험에서는 위에 사용하였던 같은 blot을 strip한 후 사용하였다. Fig. 24에 나타나듯이, IS1081은 IS6110에 비하여 우형결핵균 내에 많은 수의 copy가 존재하므로 균주간의 감별이 더욱 용이할 것으로 생각되었다. 앞서 사용한 IS6110 probe에 의해 감별되지 않았던 *M. bovis* AN5가 다른 균주와 대별되는 한편, 한국의 임상균주들과 동일한 pattern을 갖는 것을 볼 수 있었다. 그러나 앞서, IS6110으로는 구분되던 *M. bovis* Japanese, Phipps, Danish 균주 등이 서로 구분되지 않는 것을 볼 수 있었다.

## 3) DR을 probe으로 사용한 RFLP 분석

위에서 사용한 것과 같은 우형결핵균주들의 genomic DNA를 *Alu* I으로 절단하여 36-bp direct repeat인 DR sequence로 probe하였다. 그 결과에 의하면, *M. bovis* AN5의 banding pattern은 다른 균주와 크게 차이가 나며, 임상균주 1, 3, 4번과 2, 5번이 같은 pattern으로 구분되는 한편, 그 외 다른 표준 균주들은 감별되지 않는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 25). 따라서, IS6110과 IS1081을 병행한 Southern blot hybridization에 의한 변별력 이상의 변별력은 제공하지 못하는 것으로 결론 지을 수 있었다.

## 4) pTBN12를 probe으로 사용한 RFLP 분석

pTBN12는 *M. tuberculosis*에 highly repetitive한 DNA sequence

**IS1081**

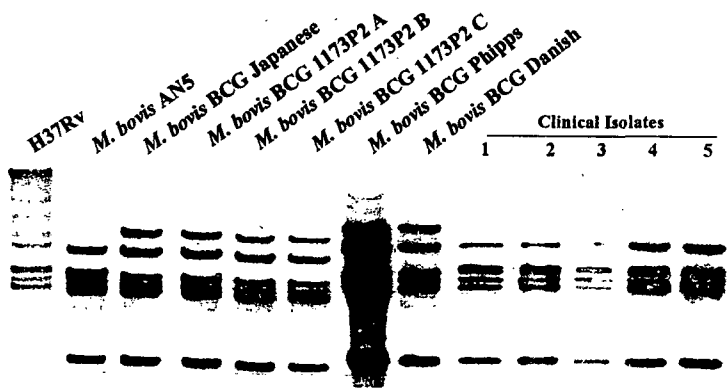


Fig. 24. RFLP analysis of *M. bovis* strains using *IS1081* sequences as a probe.

DR

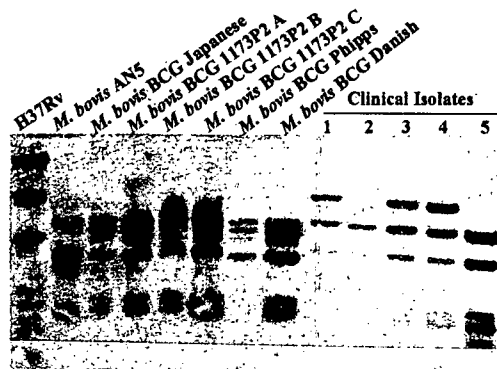


Fig. 25. RFLP analysis of *M. bovis* strains using DR sequences as a probe.



를 detection할 수 있는 probe로 M. Donald Cave (University of Arkansas, Little Rock, Arkansas U. S. A.) 로부터 받아 실험에 사용하였다. pTBN12도 결핵균주나 우형결핵균주의 감별에 매우 효과적인 probe으로 알려져 있으며, 특히 IS6110을 probe로 사용한 RFLP 분석에 의해서 감별되지 않는 균주를 더 세밀하게 분류하는데 유용한 것으로 알려졌다. pTBN12를 사용한 RFLP도 우형결핵균주들의 genomic DNA를 *Alu* I 으로 절단하여 이용하였다. 본 실험에서 사용한 우형결핵균주를 pTBN12를 probe으로 하여 RFLP 분석을 수행한 결과는 Fig. 26에서 보듯이, 앞의 IS6110을 probe으로 사용한 RFLP 분석에 의해서는 서로 다른 부류로 분리되지 않았던, *M. bovis* BCG 1173P2 A, B, C와, 임상균주1, 3, 5와 2, 4번은 pTBN12에 의해서도 식별되지 않는 것을 알 수 있었다. 그러나, *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG Phipps, Danish와 임상균주 1, 2, 4와 2, 5번이 서로 같은 균주로 달리 구분되지 않았으므로, pTBN12 probe 역시 IS6110과 IS1081을 병행한 Southern blot hybridization에 의한 변별력 이상의 변별력은 제공하지 못하였다.

#### 나. PCR 기법을 이용한 우형결핵균주 감별

한편 PCR을 사용한 균주감별기법은 RFLP 방법과 비교하여, 여러 가지 장점이 있다. 우선, 균주를 배양하는데 걸리는 시간이 단축되고, DNA를 분리하는 시간과 노력이 한결 단축된다. 또한 Southern blot analysis 등으로 소요되는 시간도 단축할 수 있다. 따라서 PCR을 이용한 균주 감별법에 의한 typing 결과가, RFLP 분석 결과와 유사하게 나온다면, 필요이상의 시간과 많은 노력이 요구되는

pTBN12

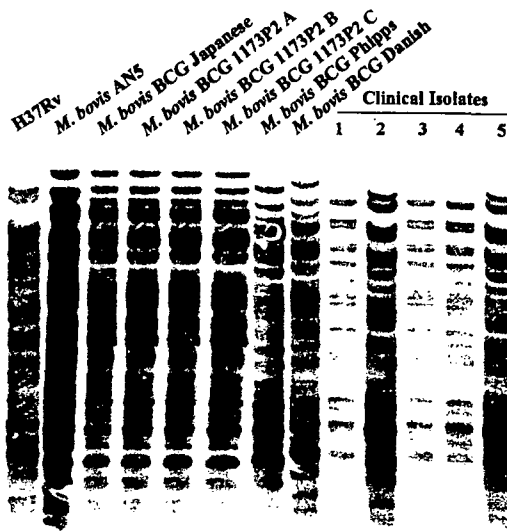


Fig. 26. RFLP analysis of *M. bovis* strains using pTBN12 sequences as a probe. The probe was prepared by digesting the plasmid pTBN12 with *Eco*RI and *Bam*HI.

Southern blot hybridization을 사용할 필요는 없을 것으로 생각된다. 따라서 PCR을 사용하는 우형결핵균 균주감별 실험을 시행하였다. 최근까지 알려져 있는 PCR을 사용한 우형결핵균주 감별법으로는 VNTR typing (Variable Number Tandem Repeats)과 IS6110을 기초로 하는 outward-PCR법이 있다.

### 1) VNTR typing

결핵균주의 유전자 내에 다양한 개수가 존재하는 tandem repeat를 PCR을 이용하여 증폭함으로써 각 균주를 감별하는 방법인 variable number tandem repeat (VNTR) typing 법을 이용하여 우형결핵균을 감별하였다. 이미 예비실험을 통하여 *M. tuberculosis* complex에 존재하는 것으로 알려져 있는 여섯 tandem repeat family (A-F)를 증폭할 수 있는 각 PCR primer를 제조한 바 있으며, 이를 이용하여 우형결핵균주 DNA와 함께 PCR을 시행한 바 있다. 위의 RFLP 실험에서 사용한 바 있는 BCG를 포함하는 7종의 표준 *M. bovis* 균주와 5종의 임상균주를 사용하여 VNTR typing을 실시한 결과를 Fig. 27에서 볼 수 있다. 그 결과를 요약해 보면, VNTR을 이용한 균주감별법에 의해서는 임상균주 1, 2, 5번 중, 1번이 2번, 5번과는 서로 다른 균주로 감별되는 것을 볼 수 있다 (Table 7). 또한, 표준 우형결핵균주인 *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG Japanese, Phipps 등이 서로 다른 균주로 감별되는 반면, *M. bovis* BCG 1173P2 A, B, C 등과 *M. bovis* BCG Danish는 서로 감별되기 힘든 것으로 나타났다. 이 실험의 결과로 볼 때, VNTR typing을 이용한 우형결핵균주 감별능력은 RFLP 분석과 비교할 때, 크게 차이가 없는 것으로 생각되었다. 따라서 RFLP 분석에 비하여 훨씬

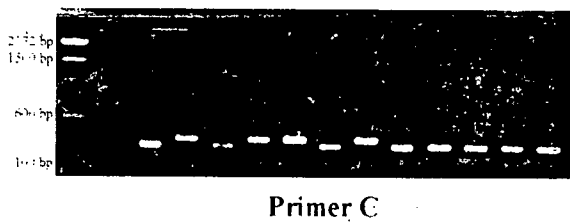
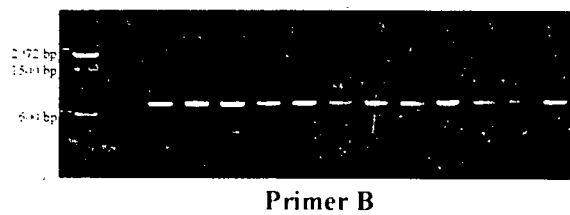
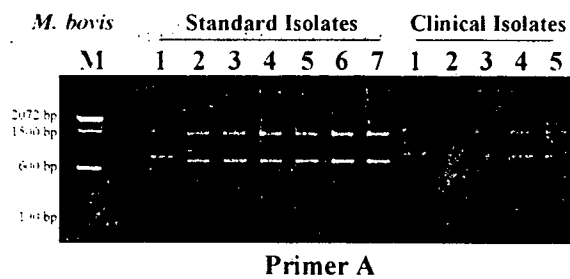


Fig. 27. VNTR typing of *M. bovis* strains: Primers A-C

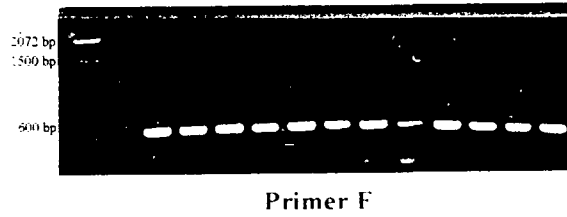
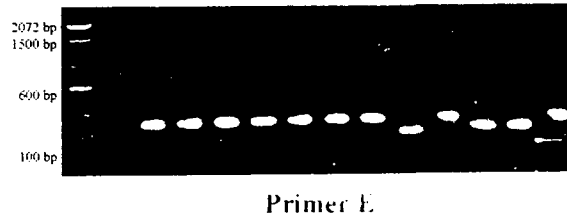
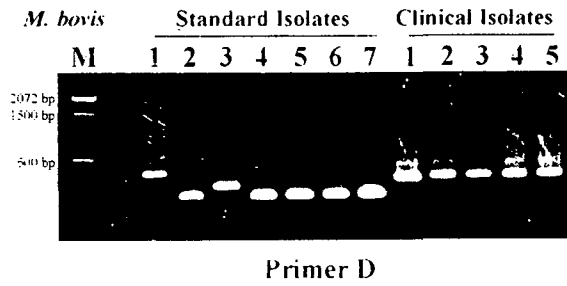


Fig. 27. VNTR typing of *M. bovis* strains. Primers D-F

**Table 7.** Number of VNTR repeats in *M. bovis* isolates.

<i>M. bovis</i> isolates	VNTR primers					
	A	B	C	D	E	F
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3	12	4	3	2	3
<i>M. bovis</i> AN5	6	12	5	5	4	3
<i>M. bovis</i> BCG Japanese	5	12	5	3	4	3
<i>M. bovis</i> BCG 1173P2 A	5	12	6	2	4	3
<i>M. bovis</i> BCG 1173P2 B	5	12	6	2	4	3
<i>M. bovis</i> BCG 1173P2 C	5	12	6	2	4	3
<i>M. bovis</i> BCG PIPPS	5	12	5	2	4	3
<i>M. bovis</i> BCG Danish	5	12	6	2	4	3
Clinical Isolate 1	7	12	5	5	3	3
Clinical Isolate 2	7	12	5	5	4	3
Clinical Isolate 3	7	12	5	5	3	3
Clinical Isolate 4	7	12	5	5	3	3
Clinical Isolate 5	7	12	5	5	4	3

용이한 PCR은 짧은 시간내에 우형결핵균을 추적할 수 있는 방법으로 현장에서 수행하기에 적합할 것이라는 결론을 얻을 수 있었다.

## 2) IS6110-based outward PCR

위에서 언급된 바 있는 insertion sequence인 IS6110 sequence의 양 끝에 존재하는 inverted repeat sequence를 이용하여 outward PCR을 수행하였다. Outward PCR이란, primer가 바깥방향을 향하도록 고안하여, IS6110을 flanking하고 있는 주위의 DNA sequence를 증폭해내는 방법으로 예비실험을 통하여, VNTR typing, IS6110-based outward PCR이 균주 typing에 유용한가를 알아본 바 있었다. 예비실험 결과를 토대로 하여, 다시 7종의 표준 우형결핵균주와 5종의 현장에서 채취된 우형결핵균주를 사용하여 outward-PCR을 이용한 typing을 수행하였다. Fig. 28에서 보여준 PCR의 결과 다른 균주와의 감별력은 VNTR typing과 비교하여 떨어지는 반면, 위의 방법들에 의해서는 감별이 어려웠던 *M. bovis* BCG 1173P2 B가 A나 B에는 존재하지 않는 별도의 band를 보임으로써 다른 균주로 분류되는 한편, 임상균주 1번과 2번 5번 가운데, 5번이 1, 2번 균주와 다른 band가 있어 다른 균주인 것으로 분류할 수 있었다. 따라서, VNTR 감별법과 더불어 IS6110-based outward PCR방법을 시행함으로써 우형결핵균주의 감별력이 보다 향상될 수 있을 것으로 생각되었다. 결론적으로, PCR을 이용한 우형결핵균의 추적 방법은 종래의 RFLP 분석법과 비교할 때, 더 쉬우면서도, 신속, 정확하며, 나아가서는 보다 다양한 균주로 감별할 수 있는 방법인 것으로 결론지었다.

### IS6110-based Outward PCR

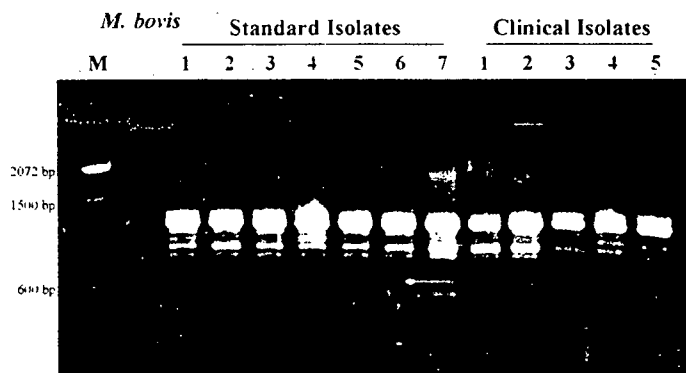


Fig. 28. Outward-PCR for molecular typing of *M. bovis* strains.



#### 4. 우결핵 혈청진단키트의 제조 및 평가

##### 가. 우결핵 혈청진단 키트의 제조

본 세부과제의 주요 목표중의 하나가 우결핵 항원에 대한 항체를 측정하는 키트를 개발하여 혈청 또는 우유에서 항체를 검출하여 우결핵 감염여부의 1차 검색 (screenting test)에 이용하는 것이다. 위에서 기술한 바와 같이 여러 종류의 우형결핵균 항원 가운데 유전자재조합기법으로 준비한 rMPB70항원이 민감도와 특이도에 있어서 가장 만족스러운 결과를 나타냈다. 따라서 rMPB70항원을 이용한 혈청진단키트를 준비하고자 하였으며, 수원시 우만동 소재의 한 중소기업체인 (주)에스디의 도움으로 항체검사용 ELISA kit를 34 set (약 3,400 두 검사분)를 제조하여 주관 연구기관과 협동연구기관에서 동시에 평가하였다.

ELISA kit 내의 구성은 다음과 같다.

- 1) rMPB70 항원이 흡착된 ELISA plate
- 2) 검체희석액
- 3) 농축세척액 (20X)
- 4) 농축접합체액 (100X)
- 5) 농축기질액 (100X)
- 6) 기질용완충액
- 7) 반응정지액

ELISA kit를 이용한 항체검사과정은 다음과 같다.

- 1) 모든 시약을 실험 시작 30분전에 꺼내 놓는다.
- 2) 항원흡착된 ELISA plate를 꺼내어 필요한 스트립만 빼고 나머지는 밀봉하여 냉장보관 한다.
- 3) 검체희석액으로 검체를 1:100배 희석한다.  
(예, 검체 5 ul + 검체희석액 500 ul)  
단, 검체가 우유일 경우에는 1:3배 희석한다.

- 4) 희석된 검체를 각 well에 100 ul 씩 넣고 37'C에서 1시간 반응시킨다.
- 5) 농축세척액을 증류수로 20배 희석한다.  
(예, 농축세척액 50 ml + 증류수 950 ml)
- 6) 반응플레이트를 희석된 세척액으로 5회 세척한다.
- 7) 농축접합세척액 (100배 농축액)을 접합체희석액으로 1:100배 희석한다.  
(예, 농축접합체액 200 ul + 접합체 희석액 20 ml)
- 8) 희석된 접합체액을 100 ul/well 씩 넣고 37'C에서 1시간 반응시킨다.
- 9) 반응플레이트를 희석된 세척액으로 5회 세척한다.
- 10) 농축기질액 (100배 농축액)을 기질용완충액으로 1:100배 희석한다.  
(예, 농축기질액 200 ul + 기질용완충액 20 ml)
- 11) 희석된 기질액을 100 ul/well 씩 넣고 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 12) 반응정지액을 50 ul/well 씩 넣고 450/620 nm에서 흡광도를 측정한다.

**항체검사 결과의 판정 :**

흡광도가 0.40 이상을 양성으로 판정하고 해당 소는 피내반응검사 등 우결핵 감염에 대한 정밀검사를 실시한다. 단, 검체가 우유일 때는 흡광도 0.25이상을 양성으로 판정한다.

**나. 우결핵 혈청진단키트의 평가**

위에서 준비한 우결핵 혈청진단 키트의 유용성을 평가하고자 혈청

과 우유검체를 이용하여 동일한 검체를 주관 연구기관과 협동연구기관에서 항체검출 진단키트를 이용한 검사 결과를 비교하였다. 먼저 우결핵 양성우와 음성우의 혈청을 무작위로 선정하여 주관 연구기관과 협동연구 기관에서 동시에 각각 검사한 결과 Fig. 29에서 볼 수 있는 바와 같이 매우 높은 상관관계 ( $R^2=0.944$ ,  $p<0.05$ )를 나타냈다. 또한 동일한 우유를 두 기관에서 검사한 결과 역시 매우 높은 상관관계를 나타내 ( $R^2=0.806$ ,  $p<0.05$ )(Fig. 30), 본 연구를 통하여 준비한 혈청진단키트는 그 재현성이 매우 높음을 알 수 있었다.

또한 H우유회사 집유목장 357개의 목장탱크우유를 검사한 결과 22개에서 양성을 나타내 양성율은 6.2%를 나타냈다. 이는 이전의 검사에서 ELISA kit를 사용하지 않고 rMPB70항원을 사용하였을 경우 4.5 - 5.8%의 항체양성율을 나타내던 목장들이어서 ELISA kit를 사용할 경우 민감도가 약간 더 높음을 알 수 있었다. ELISA kit를 사용하여 양성을 나타냈던 목장 22개 가운데 15개 (68.2%)는 이전의 검사에서 1회 이상 항체양성을 나타냈던 목장이므로, 본 연구에서 개발한 우결핵 검색용 ELISA kit는 우결핵 항원에 항체양성인 목장을 검색하는 데 매우 유용할 것으로 생각한다.

본 연구에서 개발한 ELISA kit에 의한 검사결과와 우형결핵균 CF 항원, 조형결핵균 CF 항원, 그리고 rMPB70항원을 이용한 검사에서 종합적으로 판단한 항체검사 결과를 279개 목장의 우유를 대상으로 비교한 바 Table 8에서 보는 바와 같이 검사간의 항체양성 또는 음성의 일치율은 97.1%로 매우 높았다. 물론 항체검사의 결과와 우결핵 감염과는 보다 명확한 규명이 이루어져야겠으나, 항체검사를 정기적인 목장검색용으로 이용할 경우 본 과제에서 개발한 ELISA kit를 이용하여도 무난할 것으로 생각한다.

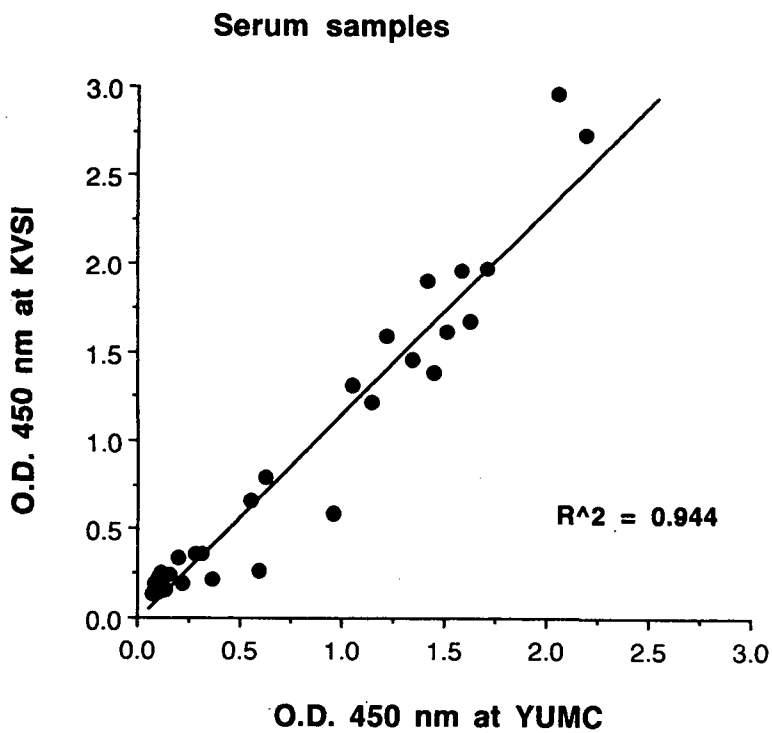


Fig. 29. Comparison of performance of ELISA kit for detection of antibodies to rMPB70 in serum samples between laboratories.

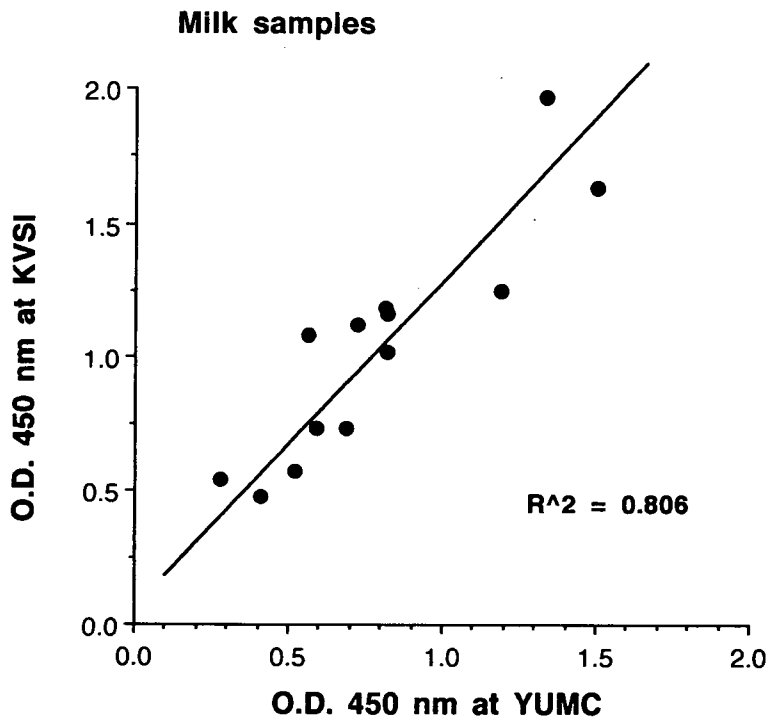


Fig. 30. Comparison of performance of ELISA kit for detection of antibodies to rMPB70 in milk samples between laboratories.

**Table 8.** Comparison between ELISA and kit for the detection of antibodies to rMPB70 in milk from dairy farms.

Kit	ELISA		Total
	+	-	
+	11	5	16
-	3	260	263
Total	14	265	279

Agreement rate = 97.1%

## 제4절 결과 요약

현재 널리 이용되고 있는 우결핵의 피내반응은 우형결핵균 항원에 대한 세포매개면역반응을 측정하는 것이다. 그러나 일부의 감염우에서는 세포매개면역반응이 억제되어 있고 항체가 높아지기 때문에 항체를 측정하는 진단법 즉 혈청진단법의 필요성이 제기되었다. 우결핵의 혈청진단법을 개발하는데 가장 중요한 요건은 항체검출에 이용하는 항원의 선정이기 때문에 본 연구에서는 우형결핵균 배양농축 항원 (culture filtrate: CF), 균 세포벽에서 추출한 당지질 항원 (glycolipid), 그리고 유전자재조합 기법으로 생산한 rMPB70항원을 준비하여 각 항원의 민감도와 특이성을 비교 분석하였다.

우형결핵균 CF항원을 사용할 경우 민감도는 높았으나, 비교적 특이도가 낮았다. 특이도를 높이기 위하여 혈청희석액에 *M. phlei* 균체를 첨가하였으며, 조형결핵균 (*M. avium*) CF항원에 대한 반응성을 비교하여 우형결핵균 CF항원에 대한 항체반응성이 높은 경우에만 양성으로 판정하는 것이 바람직하였다. 우형결핵균의 당지질 항원 2개를 분리하였으며, mycoside B를 포함하는 당지질 분획은 민감도가 비교적 낮았으며, 당성분이 높은 분획은 특이도가 비교적 낮아 우결핵의 면역진단에 만족스런 결과를 보이지 않았다.

반면에 유전자재조합기법으로 생산한 rMPB70항원은 민감도가 약 90%였으며 특이도도 100%나 되어 매우 만족스러운 결과를 나타냈다. 다만 지난 3년 이내에 우결핵이 발생하였던 목장의 젖소 가운데 약 7%가량이 rMPB70항원에 양성이기 때문에 피내반응 음성이면서 항체반응에 양성인 경우 우형결핵균에 감염여부에 대한 정밀검사가 이루어져야만 혈청진단의 유용성이 규명될 수 있다. 특히 최근 협동연

구기관에서 평가한 결과에 의하면 피내반응 양성우 107두를 대상으로 rMPB70항원에 대한 항체검사에서 100두가 항체 양성반응을 나타내 민감도가 93.5%로 매우 높았다. 또한 전년도에 우결핵이 발생하였던 11개 목장 288두를 대상으로 정밀 검사한 결과 피내반응 양성 9두 모두 항체양성이었다. 피내반응 음성우 276두 가운데 34두 (12.3%)에서 양성반응을 나타내 특이도에 문제점을 제기하기도 하였으나 보다 정밀한 검사와 향후 수년간 우결핵 발생여부를 관찰해야 혈청반응검사의 유용성을 규명할 수 있을 것이다.

우결핵 혈청진단법 활용방안의 하나로 목장탱크 우유에서 항체검사를 시도하였다. 개체별 검사에서 혈청 항체가와 우유 항체가를 비교한 결과 높은 상관관계를 나타냈다 ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.05$ ). 목장별 탱크에서 채취한 우유에서 항체양성인 목장에서 개체별로 우유항체검사를 실시한 결과 적어도 1두 이상에서 높은 항체반응을 나타내는 소가 있음을 확인하였다. 따라서 목장탱크우유를 분기별로 검사하더라도 우결핵 양성으로 의심되는 소가 있는 목장을 검색할 수 있음을 제시하였다.

이를 근거로 경기도내 3,800여 개 목장을 대상으로 항체검사를 실시한 결과 약 4%의 목장에서 우결핵 항원에 대한 항체가 발생하였다. 이는 수년간 1회 이상 발생한 농가가 전체 농가수의 약 3.5%인 점을 고려하면 항체반응 양성농가 수가 많은 것은 아니라고 생각한다. 또한 우결핵을 보다 효과적으로 근절하게 위해서는 민감도를 보다 높은 방법으로 검색하여 양성목장을 대상으로 특이도가 높은 검사법으로 정밀 검사하는 정책이 바람직하다고 가정할 때 목장탱크 우유를 대상으로 정기적으로 우결핵 항원에 대한 항체검사를 실시하는 것이 바람직하다.



유전자재조합 rMPB70항원을 이용하여 혈청과 우유에서 우형결핵균에 대한 항체를 검출하기 위하여 효소결합 면역항체측정법(ELISA)을 이용한 항체검출 진단키트의 시제품을 제조하였으며, 협동연구기관과 동일한 혈청과 우유를 대상으로 재현성을 평가한 결과 만족스러운 결과를 얻었다.

우형결핵균 균주감별기법으로 IS6110, IS1081, DR sequence, pTBN12 등의 probe을 이용한 restriction fragment length polymorphism (RFLP)기법을 확립하고 균주감별력을 비교하였다. 또한 polymerase chain reaction (PCR) typing 기법으로 variable number tandem repeat (VNTR) typing과 outward PCR typing법을 확립하여 RFLP 기법과 우형결핵균 감별능력을 비교한 결과 PCR typing 기법이 균주 변별력은 비슷하면서 기법의 간편성의 장점이 있어 향후 우형결핵균의 감별기법으로 VNTR typing법과 outward-PCR기법을 적용하는 것이 바람직하였다.

## 참고문헌

1. USDA. 1993. Laboratory Methods in Veterinary Mycobacteriology for the isolation and identification of Mycobacteria. National Veterinary Services Lab. USDA, Ames, Iowa.
2. Wood, P.R., and Rothel, J.S. 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 40:125-135.
3. Griffin, J.F.T., and Buchan, G.S. 1994. Aetiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. *Vet. Microbiol.* 40: 193-205.
4. Collins, D.M., Radford, A.J., Lisle, G.W., and Jacobs, H.B. 1994. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Vet. Microbiol.* 40: 83-94.
5. Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.K., and Kazda, J.F. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40: 11-124
6. Corner, L.A. 1994. Post-mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 40: 53-63.
7. Fifis, T., Rothel, J.S., and Wood, P.R. 1994. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation. *Vet. Microbiol.* 40: 65-81.
8. Griffin, F. 1995. TB immunology : from diagnosis to vaccination. *Ibid.* 193-197.
9. Neill, S., J. Hanna, A. Clements, J. Cassidy, J. Pollock,

- and D.G. Bryson. 1995. Diagnosing tuberculosis in animals  
*Ibid.* pp. 300-303.
10. Ritacco, V., B. Lopez, I.N. De Kantor, L. Barrera, F. Errico, and A. Nader. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 50:365-367.
  11. Ridly, D.S. and W.H. Jopling. 1966. Classification of leprosy. *Intl. J. Lepr.* 34:255-259.
  12. Lenzini, L., P. Rottoli, and L. Rottoli. 1977. The spectrum of human tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 27:230-237.
  13. Chatterjee, D., C.M. Bozic, C. Knisley, S.N. Cho, and P.J. Brennan. 1989. Phenolic glycolipids of *Mycobacterium bovis*: new structures and synthesis of a corresponding seroreactive neoglycoprotein. *Infect. Immun.* 57:322-330.
  14. MacLennan, A.P., H.M. Randall, and D.W. Smith. 1961. The occurrence of methylesters of rhamnose and fucose in specific glycolipids of certain mycobacteria. *Biochem. J.* 80:309-318.
  15. Harboe, M. and S. Nagai. 1984. Unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129:444-452.
  16. Harboe, M., S. Nagai, M.E. Patarroyo, M.L. Torres, C. Ramirez, and N. Cruz. 1986. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect.*

- Immun. 52:293-302.
17. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, 227:680-685.
  18. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76:4350-4354.
  19. Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T : *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
  20. Saiki R, Scharf, S, Falona, F, Mullis, KP, Horn GT, Erlich HA and Arnheim, N. 1995. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354.
  21. Otal, I, Martin, C, Vincent-Levy-Frebault, V, Thierry, D and Gicquel, B. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 1252-1254.
  22. Skume, RA, Brittain, D, Hughes, MS, Beck, LA and Neill, SD. 1994. Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 2387-2392.
  23. Collins, DM, Erasmuson, SK, Stephens, DM, Yates, GF and de Lisle, GW. 1993. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1143-1147.

24. Hermans, PWM, van Soolingen, D, Bik, EM, de Haas, PEW, Dale, JW and van Embden, JDA. 1991. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.*, 59, 2695-2705.
25. Ross, BC, Raios, K, Jackson, K, Sievers A and Dwyer B. 1991. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains by use of a nonradioactive Southern blot hybridization method. *J. infect. Dis.*, 163, 904-907, 1991.
26. Frothingham, R and Meeker-O'Connell, WA. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiol.* 144:1189-1196.
27. Van Soolingen, D.P.E., W. de Haas, P.W.M. Hermans, and J.D.A. Van Embden. 1993. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* 235:196-205

# 여 백

## 제3장 세포매개면역반응 기법에 의한 우결핵의 진단기술

### 제1절 서 설

일반적으로 우형결핵균을 비롯하여 mycobacteria에 감염된 사람이나 동물은 감염균의 항원에 대하여 세포매개면역반응이 지배적이다. 현재 널리 이용되는 사람의 결핵이나 소의 우결핵진단 방법은 세포매개면역반응을 생체에서 측정하는 PPD를 이용한 튜버쿨린 피내반응검사이며(1), 그 결과는 감염된 개체의 세포매개면역반응 능력에 따라 반응정도가 매우 다를 수 있다. 그러므로 우형결핵균에 감염된 소일지라도 피내반응검사에 음성일 경우가 많아 민감도는 연구보고자에 따라 66%에서 95%까지 변화가 매우 심하였으며, 평균 72%였다 (2, 3, 4). 이러한 결과는 우형결핵균 감염우의 약 30%정도가 피내반응검사에 음성 또는 의양성 반응을 나타낼 수 있으며, 이러한 소들은 도태되지 않고 다른 소에게 균을 전파하는 감염원이 될 수 있다.

튜버쿨린 피내반응은 delayed-type hypersensitivity 반응으로 우형결핵균 감염으로 항원에 감작된 일부 T세포가 관여하는 것으로 알려졌으며, 특이적인 요소와 비특이적인 요소가 모두 관여하고 있다 (1, 5, 6). 특이적인 요소는 감작된 CD4 T 세포가 항원공여세포의 MHC class II-항원복합체와 반응하여 나타나는 현상이며, 비특이적인 요소는 활성화된 T 세포들이 생산하는 cytokine에 의하여 야기되는 반응이다.

이와 같이 항원이 주입된 조직에서 일어나는 T 세포매개 면역반응

을 시험관내에서 측정하는 방법이 있다면 야외에서 실시하는 피내반응검사보다 정확하게 측정할 수 있을 것이다. 시험관내에서 우형결핵균 항원에 대한 T 세포활성을 측정하는 기법으로 초기에는 lymphocyte transformation test (LTT)가 시도되었다 (4, 7, 8). 그러나 최근에는 LTT검사보다 간편하여 현장에서 적용이 용이한 IFN- $\gamma$ 검사가 널리 응용되고 있다. 이는 T 세포가 항원 자극에 의하여 활성화될 경우 IFN- $\gamma$ 의 생산량이 증가하는 점을 이용하는 것으로 실제로 LTT검사와 IFN- $\gamma$ 검사의 결과는 서로 높은 상관관계를 보였다 (4, 9). 한 연구보고에 의하면 우형결핵균이 분리된 소를 기준으로 할 때 피내반응검사의 민감도는 65.6%였으나, IFN- $\gamma$ 검사의 민감도는 93.6%, 그리고 두 가지 검사를 병행할 경우 95.2%였다고 한다 (2, 4). 따라서 IFN- $\gamma$ 검사가 피내반응검사보다 민감도가 월등히 높았으며, IFN- $\gamma$ 검사의 특이도는 96.2%로 피내반응검사의 98.8%보다 다소 낮았으나 우결핵의 효과적인 퇴치를 위해서는 수용할 수 있는 수준이었다 (2, 4). IFN- $\gamma$ 검사의 또 하나의 장점은 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD를 동시에 자극항원으로 사용하기 때문에 조형결핵균이나 기타 자연환경에 존재하는 mycobacteria에 노출되어 나타나는 비특이반응에 의한 양성우 판정을 최소화할 수 있다는 점이다 (2, 4, 10). 특히 우리나라와 같이 우형결핵균 PPD만을 사용하는 single intradermal tuberculin test에 의존하는 경우에 IFN- $\gamma$ 검사의 도입은 특이도를 높이기 위하여 바람직하다고 생각한다. 따라서 본 세부과제에서는 LTT검사와 IFN- $\gamma$ 검사를 확립하고 그 결과를 피내반응검사의 결과와 비교하여 시험관내 세포매개면역반응검사를 우결핵의 면역진단에 적용할 수 있는가를 평가하고자 하였다.



## 제2절 재료 및 방법

### 가. 림프구 증식반응

#### 1) 림프구 분리

림프구는 말초혈액에서 분리하였다. Heparin 처리한 소 혈액을 얻어서 RPMI 1640 배지에 1:5로 희석한 다음 혈액 20 ml을 ficoll/hypaque (density 1.074-1.077, Pharmacia) 10 ml에 중첩하여서 2,000 rpm에서 20분간 원심하여 림프구 층을 얻었다. 얻어진 림프구는 RPMI 1640 배지에 2회 세척한 후 RPMI 1640 배지 (penicillin/streptomycin, L-glutamine, 10% FCS 포함)에 희석하였다.

#### 2) 림프구 증식반응

림프구를  $1 \times 10^6$ /ml의 농도로 희석한 후 96 well plate (Costar)에 100  $\mu$ l씩 배양하였다. 이때 우형결핵균 CF항원을 10  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가한 다음 5일간 배양한 후  $^3\text{H}$ -thymidine 1.0  $\mu$ Ci (specific activity 6.7 Ci/mmol, Amersham, UK)를 각 well에 첨가하고 18시간 더 배양한 후 세포를 cell harvester (Skatron, Norway)로 harvest하고 cocktail solution을 첨가한 후  $\beta$  counter로 radioactivity를 측정하였다. 림프구 증식 정도는 cpm이나 stimulation index로 표시하였다. 조형결핵균에 감염되어 항원간 교차반응에 의한 림프구 증식반응의 존재 여부를 확인하기 위하여 조형결핵균 CF항원과 우형결핵균 CF 항원으로 림프구를 자극시킨 다음 그 결과를 비교하였다.

### 나. IFN- $\gamma$ 검사

소의 말초혈액에서 우형결핵균 항원으로 자극할 경우 IFN- $\gamma$ 의 생산량을 측정하기 위해서는 whole blood assay를 채택하였다. 먼저 헤파린 처리한 우혈액을 잘 섞은 후 24 well, tissue culture tray에 1ml 씩 3 well에 분주하고 bovine PPD, avial PPD, 그리고 대조군으로 RPMI를 동량 첨가하였다. Avian PPD와 bovis PPD 실험 well에는 농도가 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 각 항원을 100 $\mu\text{l}$ 씩 넣어 최종농도가 각각 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 하였다. 항원과 혈액을 잘 섞은 후 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 16-24시간동안 배양하였다. Pipette으로 각 well에 있는 혈액을 1.5 ml tubes에 모으고, 2000rpm에서 10분 동안 원심한 후 혈장만 pipette으로 취하여 새로운 microcentrifuge tubes에 옮겨 담았다. IFN- $\gamma$  검사를 일주일 이내에 실험할 경우 혈장을 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하고, 오랜 기간 보관해야 할 경우 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

말초혈액 림프구를 PPD 항원으로 자극시킨 다음 그 상층액에서 IFN- $\gamma$ 의 측정은 상품화되어 있는 kit (IDEX Co., U.S.A. 또는 CSL Laboratories, Australia)를 사용하였다. 먼저 kit에 포함되어 있는 microtiter plate의 각 well에 Green Diluent를 50 $\mu\text{l}$ 씩 넣었다. IFN- $\gamma$  측정을 위한 sample은 각각 한 well에 넣어 주고 양성과 음성 대조군 혈장을 3 well에 마지막으로 넣어주었다. 뚜껑을 덮고 희석액과 혈장을 microtiter plate shaker에서 1분 동안 잘 섞어준 후 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. Kit에 포함되어있는 20배 농축 세척액을 희석하여 tray를 5회 세척하고 마지막 여섯 번째 세척 후 tray를 깨끗한 absorbent paper에 3-4회 가볍게 쳐서 가능한 남아있는 액을 제거하였다. Blue Diluent에 100배 conjugate 농축액을 희석하여 각 well에 100 $\mu\text{l}$ 씩 넣고 뚜껑을 덮어 상온에서 한시간

동안 반응시킨 다음 well을 희석한 세척액으로 6회 세척하였다. 기질 희석액에 100배 chromogen 농축액을 희석하여 각 well에 신선한 기질희석용액을 100 $\mu$ l씩 넣고 뚜껑을 덮어 빛이 차단된 곳에서 30분간 반응시켰다. 효소 반응 정지액을 각 well에 50 $\mu$ l씩 넣어 반응을 정지시키고 반응 정지 5분내에 450nm filter를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

IFN- $\gamma$  측정에 의한 우결핵감염의 판정은 kit의 제조회사에서 규정한 기준을 적용하였다. 먼저 실험의 유효성은 음성대조군과 양성대조군의 평균 흡광도 수용범위 내의 값을 나타내야 하고, 반복 검사의 경우 평균의 30% 이상을 벗어나지 않도록 하였다. 실험한 결과 대부분의 nil antigen plasma sample은 0.05이하의 흡광도를 보인다. 이 경우 bovine PPD sample의 흡광도가 0.10이상이면 양성으로 판정하였으나 만약 avian PPD sample의 흡광도가 bovine PPD sample의 흡광도 보다 같거나 높으면 그 동물은 조형결핵균에 감염된 것으로 판정하였다.

### 제3절 결과 및 고찰

#### 가. 림프구 증식반응에 의한 우결핵의 면역진단

현재 현장에서 시행되고 있는 튜버쿨린 피내반응은 생체내에서 세포면역반응검사를 실시하는 것이다. 이러한 검사를 실험실에서 시행할 수 있게 하기 위해 본 연구항목에서는 소의 혈액을 채취하여 림프구를 피내반응에 이용하는 우형결핵균 항원으로 감작시켜 그 증식반응을 조사하고, IFN- $\gamma$  생성정도를 측정하여 피내반응결과와 비교평가하고자 하였다. 우결핵 양성우 6예와 음성대조군 13두에서

혈액을 채취하여 예비실험을 시행하였다. 사용한 감작항원은 *M. bovis* CF 항원을 이용하였으며, Fig. 1에서 볼 수 있듯이 양성우 6예 중 3예에서 매우 높은 림프구 증식반응을 나타냈다.

그러나, 다른 3예에서는 림프구 증식반응이 미약하여 항원에 문제가 있는가를 조사하기 위해서 미국 USDA에서 생산하여 검사에 이용하고 있는 Bovine PPD 항원과 그 항원성을 비교한 바 오히려 본 연구에서 생산한 *M. bovis* CF 항원이 더 높은 림프구 증식반응을 나타냈다(Fig. 2). 따라서 *M. bovis* CF 항원을 림프구 증식반응이나 IFN- $\gamma$  생산에 충분히 이용할 수 있을 것으로 생각하며, 증식반응을 나타내지 않은 3예의 경우 혈액채취 후 실험실에 옮기는 동안에 문제가 있거나 알 수 없는 이유에서 피내반응검사와 시험관내 림프구 증식반응검사 결과가 차이가 있었다. 이는 앞으로 더 많은 수의 검사를 통하여 설명이 가능할 것으로 생각한다.

한편, 림프구 증식반응에서 *M. bovis* CF항원과 *M. avium* CF항원 간에 차이가 있는 가를 비교한 결과 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 우결핵 양성우에서는 *M. bovis* CF항원이 *M. avium* CF항원보다 림프구 증식반응을 보다 높게 유도하였다. 이는 항체반응검사에서 설명되었듯이 *M. bovis* CF 항원이 다른 mycobacteria항원에 대한 항체와 교차반응도 하지만 일부는 *M. bovis*에만 특이하게 존재하여 항체반응 및 세포매개면역반응을 유도하는 것으로 생각할 수 있다.

#### 나. IFN-r 검사에 의한 우결핵의 면역진단

림프구증식반응과 IFN-r 반응검사를 비교분석하기 위하여 우결핵 양성우 14두와 피내반응검사를 알 수 없으나 음성우일 것으로 예상되는 6두 등 모두 20두를 대상으로 말초혈액을 채취하여 실험에 사

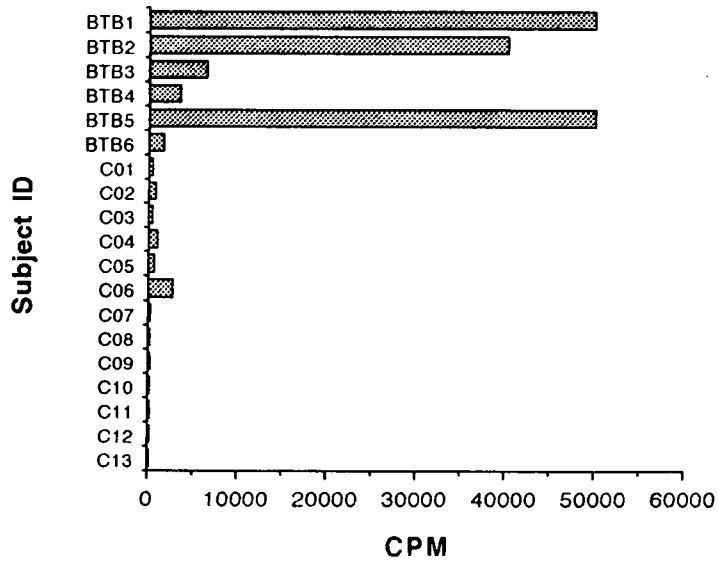


Fig. 1. Lymphocyte proliferation assay in the presence of *M. bovis* CF antigen.  
BTB: bovine tuberculosis; C: control.

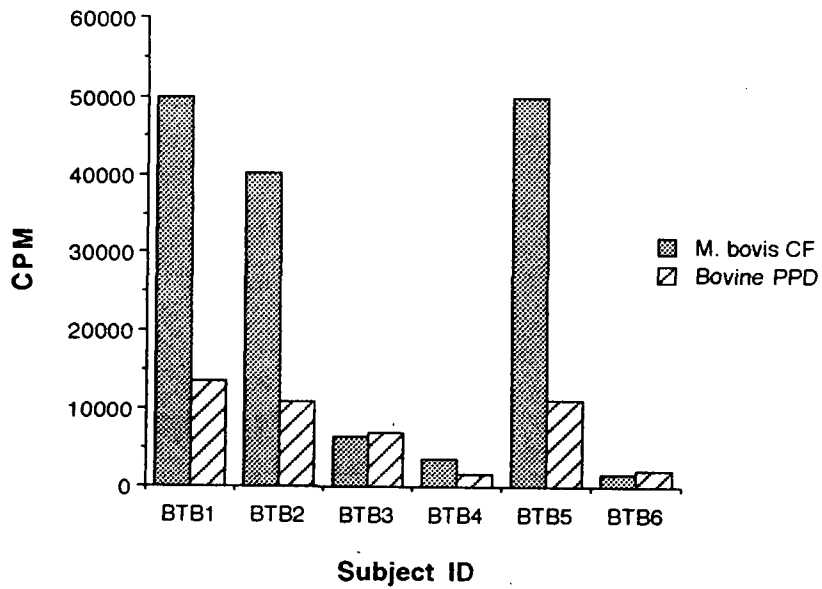


Fig. 2. Comparison between *M. bovis* CF and PPD antigens in lymphocyte proliferation assay. BTB: bovine tuberculosis.

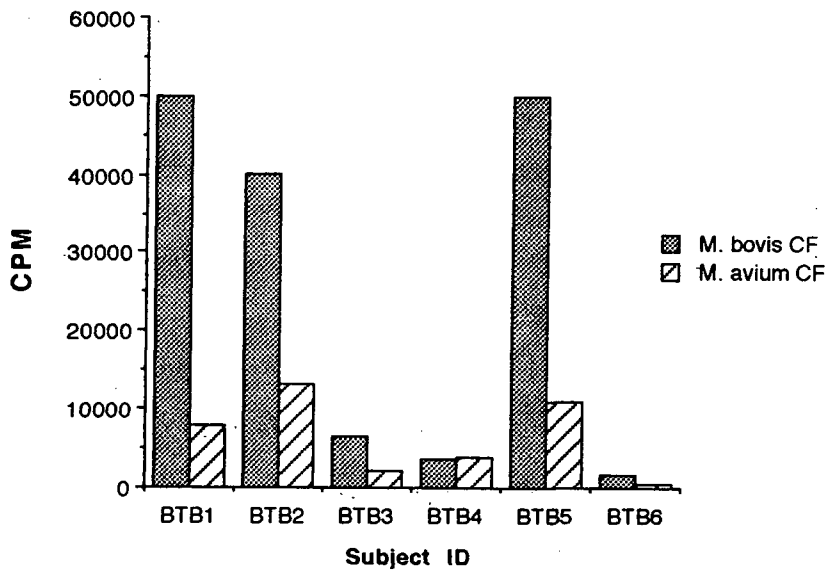


Fig. 3. Comparison between *M. bovis* and *M. avium* CF antigens in lymphocyte proliferation assay. BTB: bovine tuberculosis.

용하였다. 먼저 우형결핵균 CF 항원에 대한 림프구증식반응을 조사한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 우결핵 양성우에서 유의성 있게 높은 증식반응을 나타냈다. 이들을 대상으로 우형결핵균 CF 항원과 조형결핵균 CF 항원에 대한 림프구 증식 정도를 비교한 결과 1 예를 제외하고는 모두 우형결핵균 CF 항원에 높거나 같은 반응을 나타내 (Fig. 5), 우형결핵균에 감염되었음을 암시하고 있다. 조형결핵균 CF항원에 더 높은 반응을 보였던 경우에는 감염균을 분리하여 균종을 규명하면 림프구증식반응의 결과를 해석하는데 더욱 도움이 될 수 있을 것이다.

또한 각 항원으로 림프구를 자극시킨 후 IFN- $\gamma$ 의 생산을 측정한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 우결핵 양성우에서 IFN- $\gamma$ 의 생산이 매우 높게 나타나 튜버큐린 피내반응과 IFN- $\gamma$  생산 그리고 림프구 증식반응은 매우 밀접한 관련이 있음을 나타냈다. 그리고 IFN- $\gamma$ 의 생산은 주로 우형결핵균 CF 항원에 대한 반응임을 조형결핵균 CF 항원 자극과 비교한 실험을 통하여 확인할 수 있었다(Fig. 7).

일반적으로 림프구 증식반응의 결과나 IFN-r 검사의 결과는 피내반응 양성우 간에 커다란 차이를 나타냈다. 이는 개체간에 우형결핵균 감염시기나 개체의 특이한 세포매개면역반응 능력에 차이가 있기 때문일 것이다. 따라서 두 가지 검사 모두 양성 기준을 정할 때는 피내반응검사처럼 음성, 의양성, 그리고 양성으로 분류할 수 있을 것이다. 그러나 본 연구과제에서는 우결핵 양성우의 균배양검사 결과나 병리조직소견의 미비로 인하여 그 기준을 정할 수 없었다. 단지 IFN-r 검사의 경우 흡광도 0.10을 기준으로 정하고 있어 그 기준을 적용할 경우 음성일 것으로 예상되는 1두에서 양성기준 값을 초과하였다. 따라서 외국의 IFN-r 키트를 수입하여 사용할



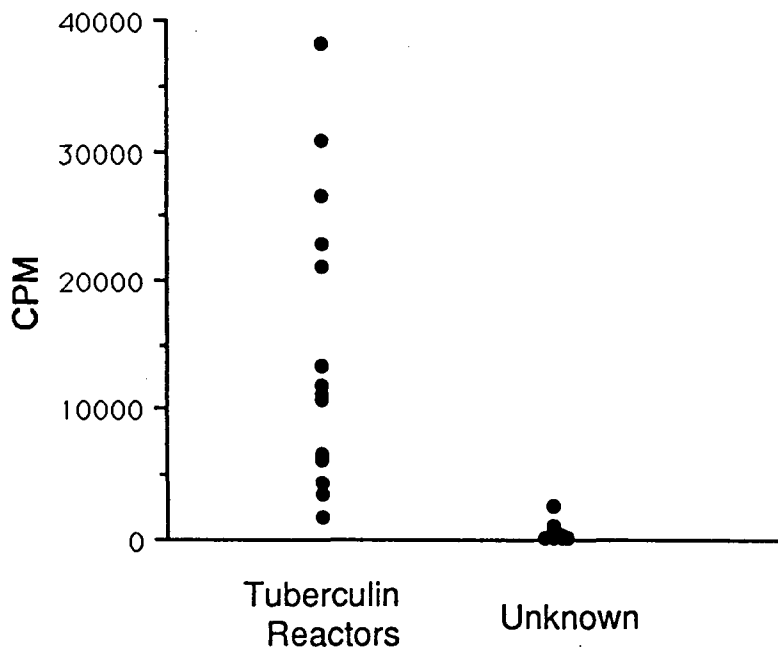


Fig. 4. Proliferation of peripheral blood monocytes from cows in response to *M. bovis* CF antigen.

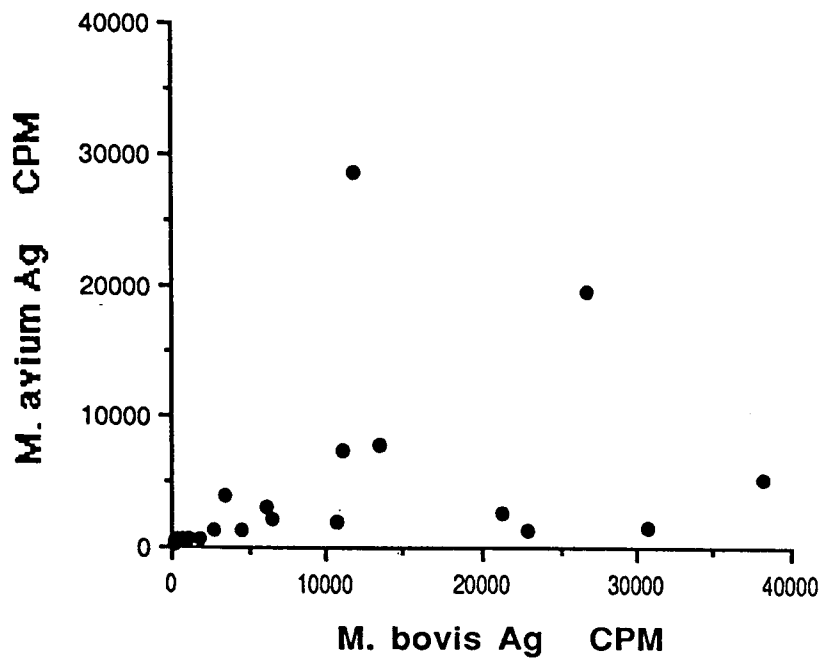


Fig. 5. Comparison of proliferation of peripheral blood monocytes from cows between *M. bovis* and *M. avium* CF antigens.

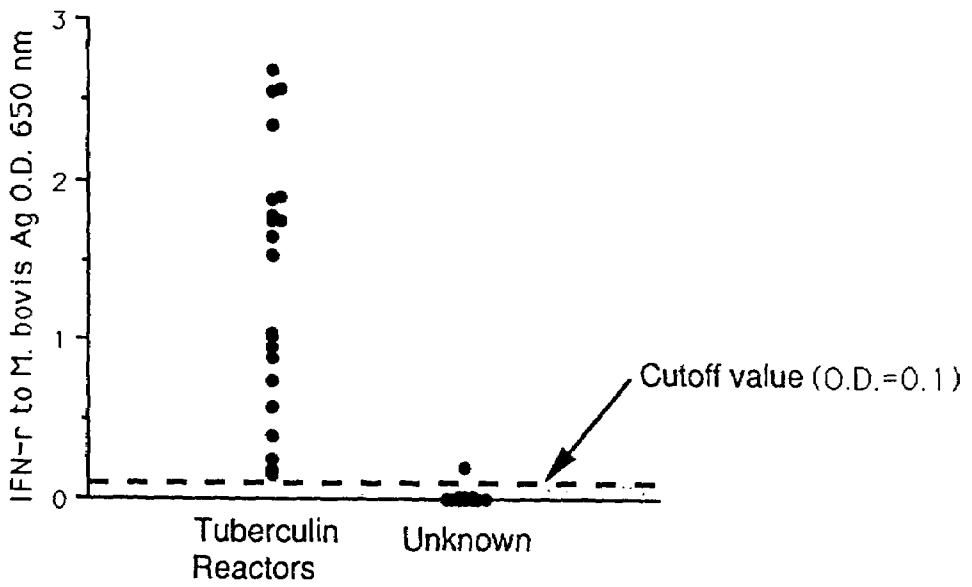


Fig. 6. IFN- $\gamma$  production of peripheral blood monocytes from cows in response to *M. bovis* CF antigen..

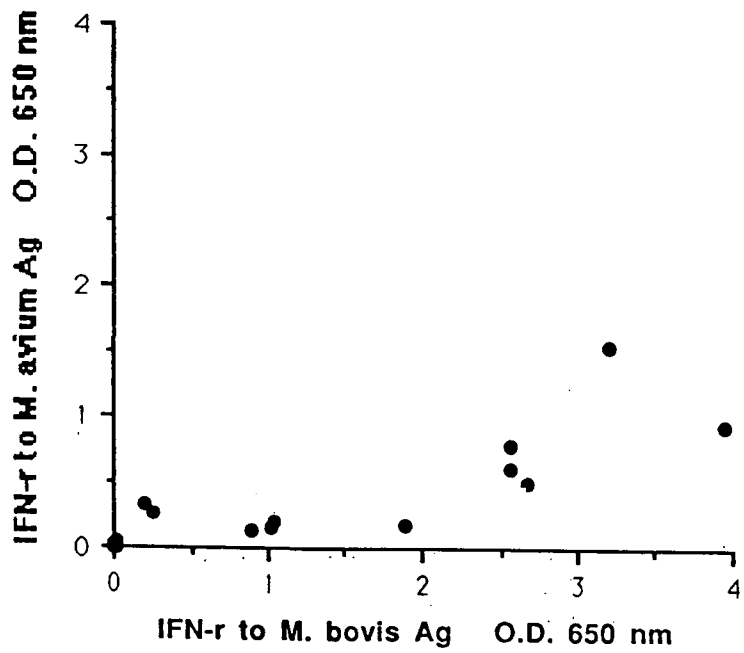


Fig. 7. Comparison of IFN- $\gamma$  production of peripheral blood monocytes from cows between *M. bovis* and *M. avium* CF antigens.

경우 우리 나라에서 적용하기 위한 새로운 기준을 정하는 것이 바람직할 것이다.

#### 다. 유전자재조합 rMPB70항원에 대한 세포매개면역반응

우결핵 항원에 대한 항체를 효과적으로 검출하는 데 사용한 유전자재조합 rMPB70항원을 피내반응 검사나 시험관내 세포매개면역반응 검사에 사용할 수 있는 가를 조사하였다. 먼저 시험관내 세포매개면역반응의 특이성을 조사하기 위하여, 우결핵균에 노출될 가능성이 희박한 비육우에서 도축하는 과정 중에 혈액을 채취하여 여러 항원으로 자극시켜 림프구 증식반응(lymphocyte transformation test: LTT)과 IFN- $\gamma$ 의 생산정도를 조사하였다. 총 32두의 한우에서 혈액을 채취하여 LTT와 IFN- $\gamma$  생산을 조사한바 우형 결핵균항원에 모두 음성반응을 나타냈으며, 1두에서 조형 결핵균 항원 자극시 IFN- $\gamma$ 량이 유의성 있게 증가하였다. 앞에서 실험한 튜버클린양성우 즉 우결핵 양성우에서 대부분 우형결핵균 항원 자극시 림프구 증식반응과 IFN- $\gamma$  생산 양성반응을 보인 것을 종합하여 볼 때 혈액 1 ml을 이용한 시험관내 세포면역반응검사 즉 림프구증식반응검사와 IFN- $\gamma$  생성검사로 우형결핵균 및 조형결핵균 감염 여부를 판정할 수 있음을 제시하였다.

시험관내 세포매개면역반응 검사 결과를 일부 요약하여 정리한 것은 Fig. 8와 같다. 대조군(Fig. 8-A)에서는 항원자극 시에도 림프구 증식반응이 일어나지 않았으나, 우결핵양성우군(Fig. 8-B)에서는 우형결핵균 PPD와 culture filtrate 항원에 자극을 보였으나 조형결핵균 및 인형결핵균 PPD항원에 대해서는 낮은 반응을 나타내 우형결핵균 특이반응성을 보였다. 흥미로운 것은 유전자재조합기법으

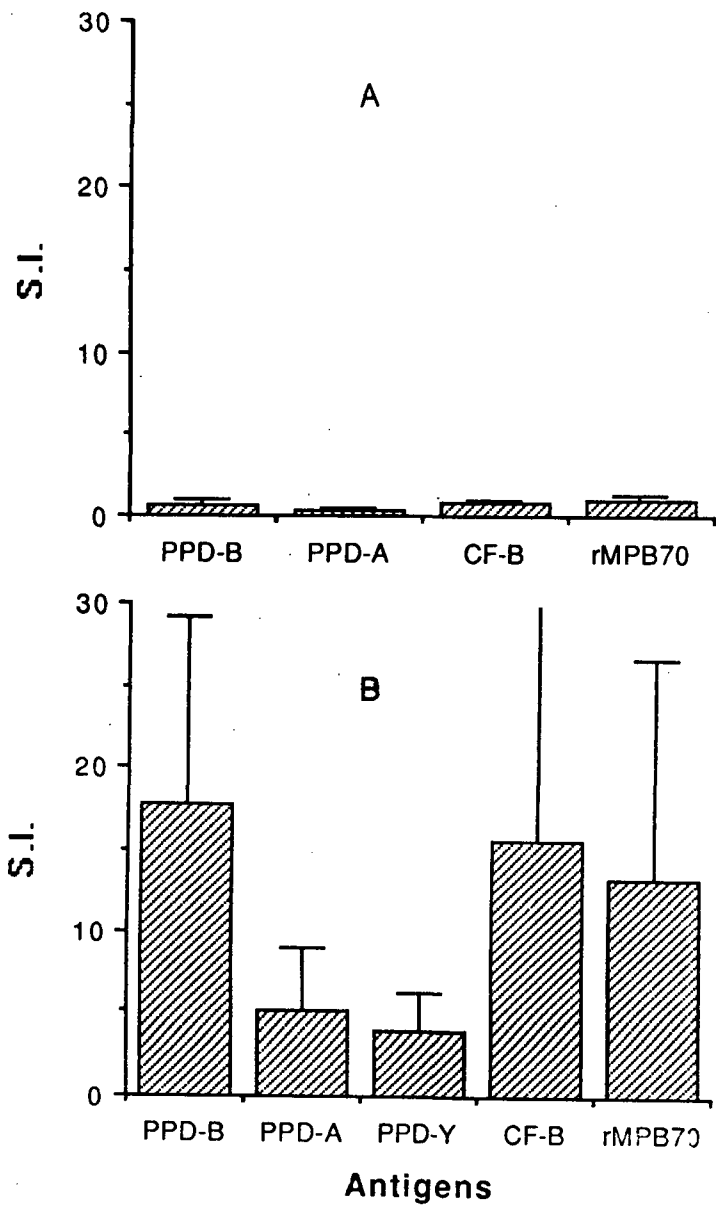


Fig. 8. Stimulation indices in PBMC from tuberculin negative cattle (A) and from tuberculin positive cattle (B) in response to various mycobacterial antigens.

로 준비한 rMPB70항원에 대해서도 PPD나 culture filtrate항원에서 처럼 높은 반응성을 나타내 rMPB70항원도 튜버클린반응검사에 이용할 수 있음을 제시하였다.

#### 라. 피내반응 진단시약 개발을 위한 기초연구

한편 본 연구에서 준비한 여러 CF 항원과 유전자재조합 rMPB70 항원의 튜버클린반응검사에 이용성을 조사하고자 실험동물 Guinea pig를 이용하여 피내반응검사를 시행하였다. 먼저 기니픽을 우형결핵균과 배양액농축항원을 혼합하여 면역시킨 다음 조형결핵균 PPD와 우형결핵균 PPD, 그리고 rMPB70 항원 등을 이용하여 피내반응 정도를 비교 관찰하였다. 우형결핵균으로 감작시킨 Guinea pig의 피내에 각 항원을 접종시킨 다음 48시간에 피부반응검사를 시행한 결과는 Fig. 9과 같다. 예상한 바와 같이 우형결핵균 culture filtrate항원에 대한 반응이 가장 높았으며, 인형결핵균 그리고 조형결핵균 항원 순이었다. rMPB70항원에 대한 반응도 양성기준치 5mm는 초과하였으나, 사균으로 감작시킨 관계로 감작항원에 상대적으로 적은 양이 함유된 MPB70항원이었기 때문에 반응정도는 비교적 미약하였으며, 좀더 실험방법을 달리하고 항원양을 조절한다면 rMPB70항원도 튜버클린반응 검사에 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 마. 우결핵 발생목장의 동거축에 대한 항체 및 IFN- $\gamma$ 검사

우리 나라에서 현재 시행하고 있는 우결핵 방역사업의 시행은 우결핵 양성우가 발생하면 양성우만 도태하고 다른 동거축은 그대로 살려두기 때문에 동일 목장에서 우결핵이 계속해서 발생하는 계기가 된다. 본 과제에서는 최근에 피내반응 검사에서 우결핵 양성우가

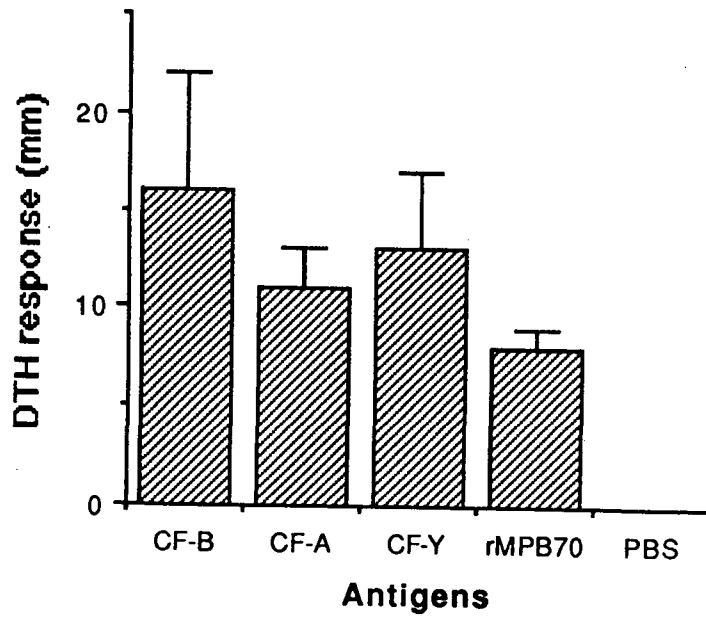


Fig. 9. DTH responses to mycobacterial antigens in guinea pigs sensitized with *M. bovis* antigens



발생하였던 3개 목장의 피내반응 음성인 동거축에 대한 항체검사와 IFN- $\gamma$  검사를 시행하여 그 결과를 비교하였다. 검사를 마친 총 30두 가운데 항체검사와 IFN- $\gamma$  검사 모두 양성인 경우와 음성인 경우 즉 두 검사결과가 일치한 경우는 20두로 일치율은 66.7%이었으며, 두 검사 결과가 일치하지 않는 경우는 10두로 33.3%이었다. 그리고 우결핵이 발생하였던 목장 3개의 동거축 가운데 적어도 1두 이상에서 항체와 IFN- $\gamma$  검사에 모두 양성인 동거 가축이 발견되어 비록 피내반응 검사에 음성이더라도 잔여 가축의 일부는 항체가 존재하고 또한 시험관내 세포매개 면역반응에서 우형결핵균에 감염되었다는 사실을 증명할 수 있었다.

따라서 현재 우리 나라 우결핵 방역정책의 근간이 되는 피내반응 양성우만을 도살 처분할 경우에는 우결핵을 근절하기 어려우며, 외국에서 시행하는 정책인 해당 목장 전 두수를 도축하는 것이 보다 빠른 시일에 우결핵 근절을 이룩할 수 있을 것으로 예상된다. 우결핵 감염 목장 여부를 가장 쉬운 방법으로 찾아내기 위해서는 최근 수년간 우결핵이 발생하였던 목장을 역학적으로 조사하고, 우유나 혈청 중 항체검사를 시행하는 것이며, 정밀검사에서 피내반응 검사와 IFN- $\gamma$  검사를 실시하여 우결핵균 감염우를 진다하는 정책의 변화가 필요하다고 생각한다.

## 제4절 결과 요약

우결핵 진단을 위한 피내반응검사가 생체에서 세포매개면역반응을 측정하는 것으로 실험실에서 검사하는 방법으로 림프구 증식반응검사 (LTT)와 IFN- $\gamma$  검사를 시행하였다. LTT방법과 IFN- $\gamma$  검사는 높은 상관관계를 나타냈으며, 두 방법 모두 피내반응검사 결과와 높은 일치도를 보였다. IFN- $\gamma$  검사는 피내반응검사를 기준으로 할 때 민감도와 특이도가 95% 이상되었다. 그러나 최근 협동연구기관에서 현장 적용평가를 수행한 결과 피내반응검사 양성우 9두 가운데 6두 (66.7%) 만이 IFN- $\gamma$  검사에서 양성이었으며, 피내반응 검사에 음성인 276두 가운데 11두 (4.0%)에서 IFN- $\gamma$  검사 양성을 나타냈다. 이러한 차이는 IFN- $\gamma$  검사 키트간의 민감도 차이일 수 있으며, 검사대상 목장이 예년에 우결핵 발생목장인 점을 고려하면 피내반응검사의 민감도가 낮았기 때문으로 추정할 수 있다. 향후 조사대상 목장에서 우결핵 양성우의 발생 상황을 추적하여 항체검사와 IFN- $\gamma$  검사의 효용성을 분석하는 것이 바람직하였다.

## 참고문헌

1. Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.K., and Kazda, J.F. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40: 11-124
2. Francis, J., R.J. Seiler, I.W. Wilkie, D. O'Boyle, M.J. Lumsden, and A.J. Frost. 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculin. *Vet. Rec.* 103:420-425.
3. Wood, P.R., L.A. Conor, J.S. Baldock, S.L. Jones, D.B. Cousins, B.S. McCormick, B.R. Francis, J. Creeper, and N.E. Tweddle. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 68:286-290.
4. Wood, P.R., and Rothel, J.S. 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 40:125-135.
5. Gorman, N.T. and R.E.W. Halliwell. 1989. Mechanism of immunological injury in hypersensitivity reactions. In: R.E.W. Halliwell and N.T. Gorman (ed.) *Veterinary Clinical Immunology.* Saunder Co., London, pp. 212-231.
6. Klein, J. 1990. Delayed-type hypersensitivity. In: *Immunology*, 1st ed. Blackwell Scientific Publications, Boston, pp. 451-459.
7. Outteridge, P.M. and A.W.D. Lepper. 1973. The detection of tuberculin-sensitive lymphocytes from bovine blood by

- uptake of radio-labelled nucleosides. *Res. Vet. Sci.*,  
14:296-305.
8. Theon, C.O., J.L. Jarnagin, C.C. Muscoplat, L.S. Cram,  
D.W. Johnson, and R. Harrington. 1980. Potential use of  
lymphocyte blastogenic responses in diagnosis of bovine  
tuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*,  
3:355-361.
9. Wood, P.R., L.A. Corner, and P. Plackett. 1990.  
Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for  
bovine tuberculosis based on the production of  
r-interferon. *Res. Vet. Sci.*, 49:46-49.
10. Rothel, J.S., S.L. Jones, L.A. Corner, J.C. Cox, and P.R.  
Wood. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine  
interferon-r and its use for the detection of tuberculosis  
in cattle. *Aust. Vet. J.* 67:134-137.

## 제4장 새로운 우결핵 진단기술의 응용성 평가

### 제1절 서 설

우결핵은 소의 가장 중요한 질병의 하나로서 가축전염병 예방법상 제1종 법정 가축전염병으로 규정하고 있으며, 가장 강력한 정책인 “검진후 양성우 도태” 방법을 이용하여 우결핵 근절 정책을 펼치고 있으나 최근 우결핵병의 발생을 살펴보면(1), 90년 38두에서 98년 577두로 15배 이상의 폭발적인 발생 증가를 보이고 있고, 이중 경기도가 50% 이상을 차지하고 있어 이에 대한 특별한 대책이 요구되고 있는 실정이다.

우결핵의 방역대책을 제한된 예산과 인적자원 내에서 보다 효과적으로 수행하기 위해서는 첫째 현재의 연도별 및 지역별로 우결핵 발생상황을 면밀하게 분석하여 방역대책을 수립하는 데 반영하는 것이 바람직하다. 두 번째로 현재 우결핵의 진단방법으로 이용하고 있는 피내반응법과 아울러 민감도와 특이도가 높은 새로운 검진 기법을 도입하여 가능하면 조기에 우결핵을 진단하여 동거축에게 전파하는 것을 최소화 하는 것이다.

튜버쿨린 피내반응검사의 민감도 (sensitivity)가 낮은 것은 이미 널리 알려진 사실이며(2), 이의 보완을 위하여 세계적으로 많은 학자들이 여러 가지 혈청학적 진단법을 개발하고 있는 중이다. 우결핵의 혈청학적 진단법에 대한 역사를 살펴보면 Thoen 등(3)이 1983년에 purified protein derivative(PPD) 항원을 이용 엘라이자

(ELISA) 검사방법에 이용하기 시작하여, 지금도 많은 과학자들이 계속 연구 중에 있으며, 1989년에는 Fifis 등(4)이 MPB-70 이라는 항원을 개발 우결핵의 혈청학적 진단법에 획기적인 전기를 가져오는 듯 했으나, Harboe 등(5)과 Wood 등(6)의 반복실험결과 특이도는 매우 높으나 민감도가 낮은 것으로 실험결과가 나타났다. 그후, 1990년에 Rothel 등에 의하여 IFN- $\gamma$  검사 방법이 개발되었고 이 당시 민감도와 특이도가 각각 100%로서 완벽한 결과를 보였으나(7) 이후 Wood 및 Whipple 등(6, 8)에 의한 실험결과 민감도가 80%수준으로 비특이 반응의 한계를 벗어나지 못하였다. 최근에는 여러 가지 항원에 대한 학계 보고가 따르고 있으나 기존의 방법에 비하여 탁월하다고 평가 되고 있지 않은 실정이다.

그러나 혈청학적 검사 방법은 우결핵의 발병율이 높은 지역에서는 농가 스크리닝(screening)을 하는 검사방법으로서 학술적 가치가 매우 높다고 판단되며, 특히 우리 나라와 같이 지난 30여년간 피내반응법을 이용하여 실시해온 우결핵 근절정책이 최근 계속적으로 증가되고 있는 우결핵 발생율을 감안하여 볼 때 절실하게 요구되는 검사 방법이라고 생각된다. 혈청학적 진단방법은 검사 비용이 싸고, 축산 위생연구소의 수의사 인력이 부족한 여건에서는 매우 개발이 시급하고도 필요한 사안이라 하겠다.

따라서 본 협동연구기관에서는 경기도내 우결핵발생 상황을 분석하여 우결핵 방역대책을 수립하는 데 필요한 자료를 준비하고, 시범 부락을 선정하여 우결핵 검사 방법에 의한 피내반응법, 그리고 동일 개체에 대한 ELISA법 및 IFN- $\gamma$  검사법을 동시에 실시하여 상호 검사 결과를 비교 분석하여 국내 우결핵 근절정책의 검사방법으로서 혈청학적 검사법의 국내 이용가능 여부를 타진코자 수행하였다.

## 제2절 재료 및 방법

### 1. 경기도내 우결핵 발생의 자료 분석

경기도내 시 군 관내에서 1994년부터 1999년도까지 우결핵 양성우 발생보고 자료를 연도별, 지역별로 분석하였다.

### 2. 우결핵병의 피내반응법과 실험실 진단법인 $\gamma$ -interferon 및 ELISA 진단법과의 상호 비교

#### 가. 실험재료

1998년도에 안산시 부곡동의 젓소사육 농가에서 우결핵병이 다발하였으며, 이후 재검에서 모두 음성판정 받았으나 우결핵균이 잠재되어 있을 가능성을 고려하여 12개 젓소 사육 농장을 검사 대상농장으로 선정하였다.

#### 나. 검사방법

혈청학적 검사를 위하여 검진대상우에 대하여 우선 혈액을 10ml씩 채혈한 후에 피내반응검사로 PPD를 caudal-fold에 접종하였다. 개체별로 채혈한 10 ml 중 5ml는 IFN- $\gamma$  검사를 위하여 헤파린튜브를 이용 전혈 처리하였으며, 나머지 5 ml는 ELISA검사를 위하여 비동화 처리 후 혈청을 분리하였다. 피내반응 검사 결과를 위하여 48-72시간에 목장에 출장하여 판정을 하였으며, IFN- $\gamma$  검사는 검사키트 (CSL Laboratories, Australia)를 구입하여 진단에 사용하였다.

ELISA 검사는 MPB-70항원을 사용하였으며 연세대학교 의과대학에서 (주)에스디로 하여금 제품화 시킨 엘라이자 키트를 사용하여 검사를 실시하였다. 이때 사용한 혈청 희석배수는 1:100이었다. 피내반응검사결과 양성우에 대하여는 도태처리하고, 양성우 판정 농가의 사육 전 두수와 IFN- $\gamma$  및 ELISA 검사 결과 양성 판정우에 대하여는 1개월 후 같은 방법으로 재검사를 실시하였다.

### 3. 양성우 해체검사

우결핵 피내 반응검사 결과 양성판정우에 대하여는 전두수 부검후 개체별로 5개 lymphnode (폐문, 하악, 상유방, 간, 장간막)을 샘플로 수거하여 육안검사와 동시에 실험실에서 조직병리학적 검사를 실시하였다. 정확한 조직학적 진단을 위하여 acid-fast 박테리아를 위한 Ziehl-Neelsen method를 이용하였다.

### 4. 통계처리

피내반응법, IFN- $\gamma$  검사법 및 ELISA 검사법에 대한 결과는 양성 과 음성으로 나타낸후 McNemar의 one-to-one matching 통계 처리 방법(9)을 이용하여 각 검사법을 비교 하였으며, 개체별로 확실한 양성 및 음성을 구별할 수 있는 gold standard 가 없기 때문에 자체 검사 결과에 대한 유의성만을 비교할 수 있어 양성 중복 판정 비율(중복된 양성수 $\times 2$  / 총양성수)을 함께 계산하여 비교 하였다. 이때 유의수준(significant level)은 5% 수준으로 계산 하였다.

또한 양성 판정우에 대한 정확한 조직 병리학적 검사 결과를 토대로 각 검사방법의 검사 일치도 또는 정확도를 나타내었다.



### 제3절 결과 및 고찰

#### 1. 경기도내 우결핵 발생실태 조사의 결과분석

경기도내에서 1990년부터 1998년까지 9년간 발생한 우결핵 양성우는 약 2,000두로 양성율은 1990년도의 0.02%에서 1996년도의 0.23%로 약 10배가량 증가하였다 (Table 1). 이러한 추세는 1997년도에 170두의 발생으로 약간 감소하는 경향이 있었으나, 1998도에는 278두가 발생하여 다시 0.28%대로 높아졌으며, 1999년도에는 10월말 현재 487두의 발생으로 0.3%대로 더욱 높아질 것으로 예상된다. 이렇게 우결핵 양성우의 수가 증가하는 이유를 설명할 수 있는 구체적인 증거는 없으나 우결핵 검진사업을 보다 강력하게 추진하는 노력의 결과로 볼 수 있다. 즉 우결핵이 발생하였던 목장을 집중적으로 재 검사하고 따라서 그 동안 발견되지 않았던 양성우를 진단하였기 때문으로 추정된다.

경기도에서 1990년부터 1997년도까지 발생한 우결핵 양성우의 수는 907두로써 전국 1,396두의 66.2%에 해당한다 (Fig. 1). 총 사육두수 규모에서 경기도가 차지하는 비율이 42%정도이므로 발생비율로 계산하면 경기도가 다른 지역의 약 3배 가량 된다 (Fig. 2). 이는 좁은 지역에 많은 소가 밀집되어 사육되기 때문에 우형결핵균에 감염될 기회가 많기 때문으로 생각한다. 따라서 경기도에서의 우결핵 방역사업은 우리 나라 전체의 우결핵 근절에 매우 중요한 역할을 차지하며, 그 반대로 우결핵을 보다 효과적으로 근절하지 못할 경우 다시 전국적인 문제로 확대될 수도 있다.

경기도내에서 우결핵 양성우 발생실태를 목장별로 분석한 결과

**Table 1.** 경기도내 연도별 우결핵 양성률

년 도	검진두수	양성두수	양성률
1990	87,228	21	0.02
1991	87,883	35	0.04
1992	88,008	54	0.06
1993	88,117	85	0.10
1994	107,579	198	0.18
1995	132,658	197	0.15
1996	132,426	300	0.23
1997	140,345	266	0.19
1998	98,249	278	0.28

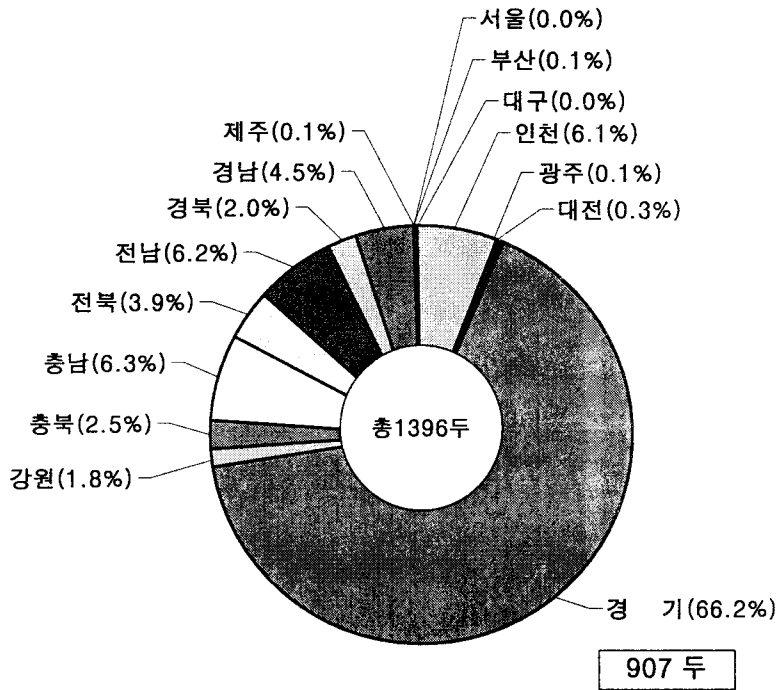


Fig.1. 전국 시도별 7년간우결핵 발생 두수 비교

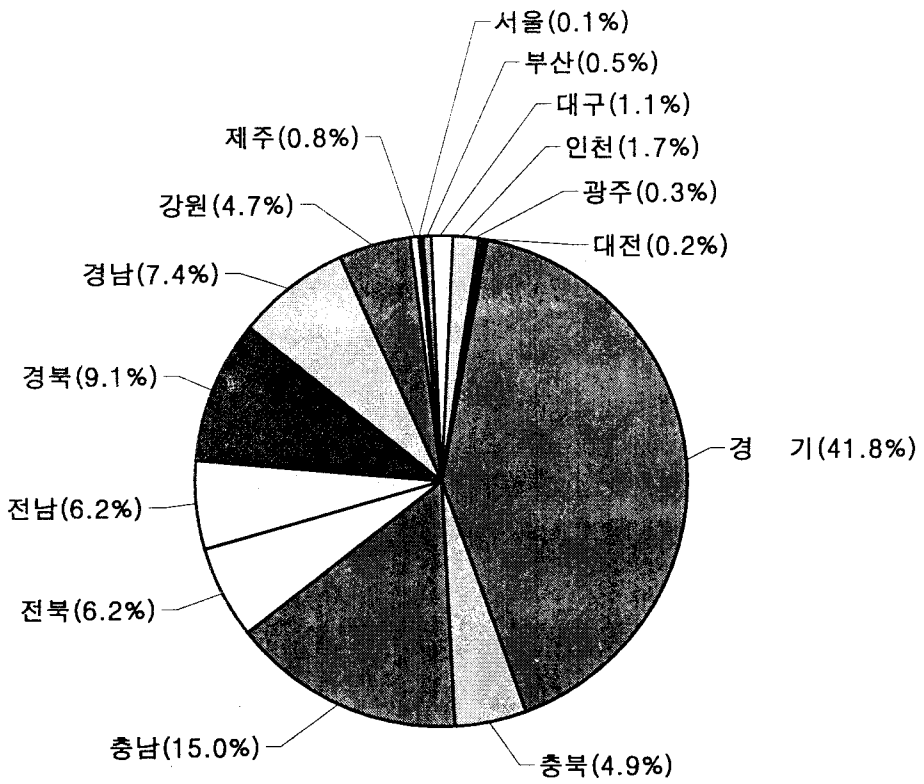
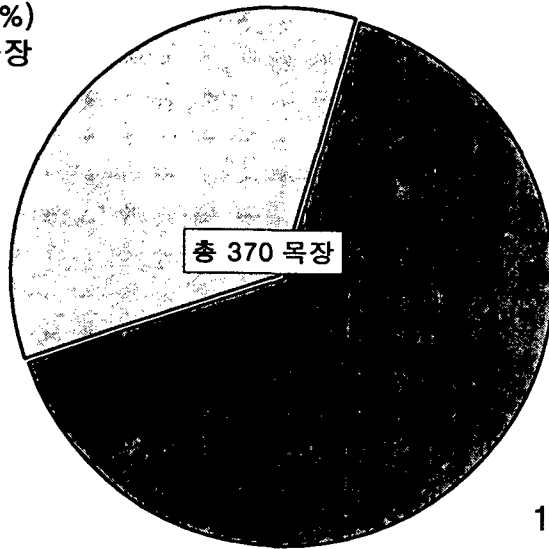


Fig.2. '95년 전국 젓소사육현황

1990년도부터 1996년까지 7년간 적어도 1회 이상 발생하였던 목장 370개 가운데 1회 발생 목장이 242개로 65.4%를 차지하며, 2회 이상 발생목장은 128목장으로 34.6%를 차지하고 있다 (Fig. 3). 그러나 2회 이상 발생한 목장에서 총 520두가 양성우로 판정되어 전체의 58.4%를 차지해 목장당 양성우 발생 수는 1회 발생목장보다 약 2.6배나 더 높았다 (Fig. 4). 따라서 우결핵 양성우가 2회 이상 발생한 목장을 전 두수 도태처분 등 강력하고 집중적인 방역대책을 세운다면 보다 효과적으로 우결핵을 근절할 수 있을 것으로 생각한다.

한편, 경기도내 시군별 우결핵 발생상황을 1994년부터 1999년까지 6년간 자료를 정밀하게 분석한 결과 1994년도에는 우결핵 검진사업을 실시한 31개 시군 가운데 12개 시군에서 1두 이상의 우결핵 양성우가 발생하였다 (Table 2). 특히 화성군, 평택시, 남양주시, 포천군, 강화군 등 6개 시군에서 176두가 발생하여 전체 198두 중 88.9%를 차지하였다. 이는 우결핵 발생이 특정지역에서 집중적으로 발생하고 있음을 제시하고 있으며, 이는 전염성 질병의 특성을 보여주고 있다. 그러나 1995년도에는 22개 시군에서 우결핵이 발생되어 1994년도에 비해 10개의 시군이 증가하였다. 이는 1994년도 검진사업에서 제외되었던 젖소가 1995년도 검진시 양성으로 판정되었거나, 1994년도 우결핵 발생목장의 감염우가 주위의 시군으로 이동되었음을 암시하고 있다. 따라서 우결핵을 보다 효과적으로 방역하기 위해서는 적어도 시군간에 우결핵 발생농가의 동거가축의 이동을 제한하는 것이 바람직할 것이다. 1996년도 우결핵 발생의 특기할 사항은 우선 우결핵 발생두수가 1995년도보다 100여 두가 증가하였다. 이는 화성군에서만 전년도에 비교하여 약 80두가 증가한 것

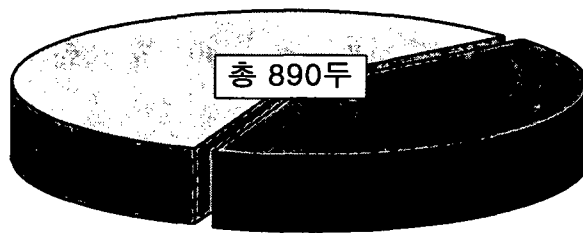
2회 이상발생  
(34.6%)  
128목장



1회 발  
생  
(65.4%)

Fig.3. 7년간 우결핵 발생목장의 발생빈도

2회 이상 발생 (58.4%)  
520두



1회 발생  
(41.6%)  
370 두

Fig.4. 7년간 우결핵발생 목장의 양성두수

Table 2. 경기도 시군별 우결핵 발생상황

시군별	94년도	95년도	96년도	97년도	98년도	99년10월
수원시	0	2	1	0	5	0
성남시	0	0	0	0	0	0
의정부	0	2	0	0	0	0
안양시	0	5	5	0	0	0
부천시	0	0	43	5	1	0
광명시	0	4	2	11	0	0
평택시	38	18	1	9	10	54
동두천시	0	0	0	0	0	0
안산시	7	6	22	0	46	14
고양시	2	1	2	5	10	18
과천시	0	0	0	0	0	0
구리시	0	1	0	0	0	0
남양주시	26	18	1	0	10	13
오산시	0	10	0	0	0	0
시흥시	0	22	8	16	32	4
군포시	0	3	0	0	0	0
의왕시	0	0	0	0	0	0
하남시	3	0	1	1	0	1
양주군	1	14	3	5	2	19
여주군	7	0	0	2	0	0
화성군	49	47	124	62	59	311
파주군	0	8	3	16	50	8
광주군	0	3	2	0	0	0
연천군	0	2	0	0	0	0
포천군	28	17	3	13	45	3
가평군	2	2	51	13	1	19
양평군	0	3	10	7	0	0
이천시	15	1	5	2	0	0
용인군	0	0	0	0	0	0
안성군	0	0	0	0	0	0
김포시	0	8	13	3	7	14
강화군	20	0	0	0	0	0
계	198	197	300	170	278	487



이 주요 원인이었다. 그리고 부천시에서 43두나 발생하였으며, 그 밖에 안산시, 가평군, 김포군 등에서도 10두 이상 우결핵이 발생하였다. 1997년도에 우결핵 발생수가 40%이상 감소되었으며, 이는 전년도에 감염우를 많이 도태하였기 때문으로 생각한다. 1998년도에 다시 증가하였으며, 안산시, 화성군, 시흥시, 파주군 등에서 다수 발생하였다 (Table 2).

경기도에서 1999년도 우결핵 발생에 특기할 사항은 화성군 지역의 목장에서 우결핵 발생이 폭발적으로 증가한 점이다 (Table 2). 화성군의 목장 농가 수는 1996년도의 1,300여 개에서 1999년 930여 개로 감소하였으나, 우결핵의 발생 목장의 수는 98년도의 11개 목장에서 1999년도에 26개 목장으로 증가하였으며 (Fig. 5), 발생두수도 1998년도의 59두에서 1999년도 10월말 현재 312두로 경기도 전체 발생두수 487두의 64.1%를 차지하고 있다 (Fig. 6). 이는 1996년도의 약 3배 그리고 1997년도와 1998년도 발생두수의 약 5배나 되기 때문에 그 원인분석과 방역대책이 시급한 실정이다.

## 2. 우결핵병의 피내반응법과 실험실 진단법인 IFN- $\gamma$ 및 혈청진단법의 상호 비교

### 가. 목장별 검사 현황

총 12개 목장에 대하여 검사를 실시하였으나 SBI 목장에서 채혈한 전혈의 실험실 처리 미숙으로 검사 대상에서 제외하였으며, 총 11개 목장 395두를 대상으로 실시하였고 1차에서는 착유우 237두, 2차에서는 양성목장 전두수와 의심우 51두를 각각 검사하였고 이중 중복되는 개체는 48두였다. 목장별 검사현황은 아래 Table 1과 같다.

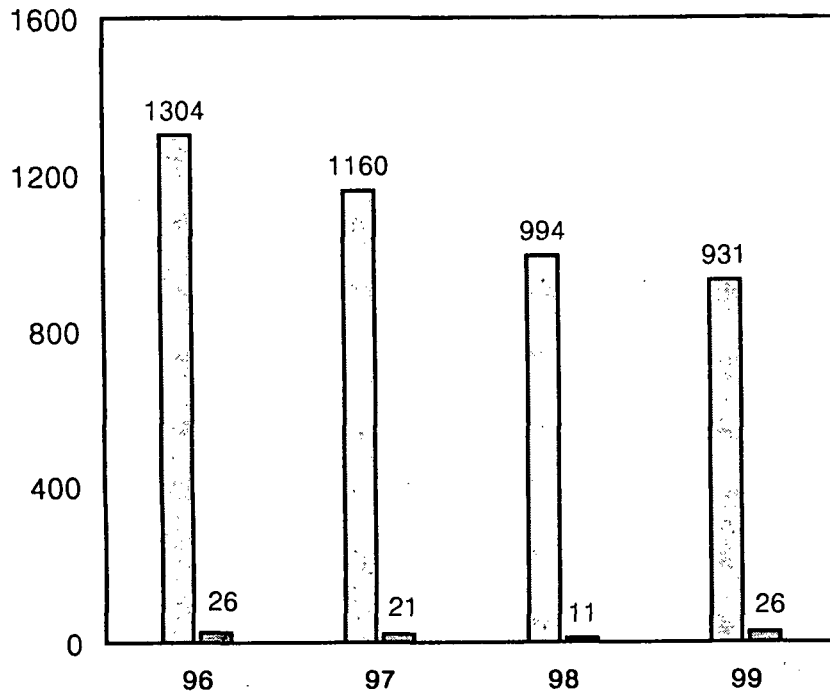


Fig.5. 화성군 농가와 화성군 발생 농가수의 비교

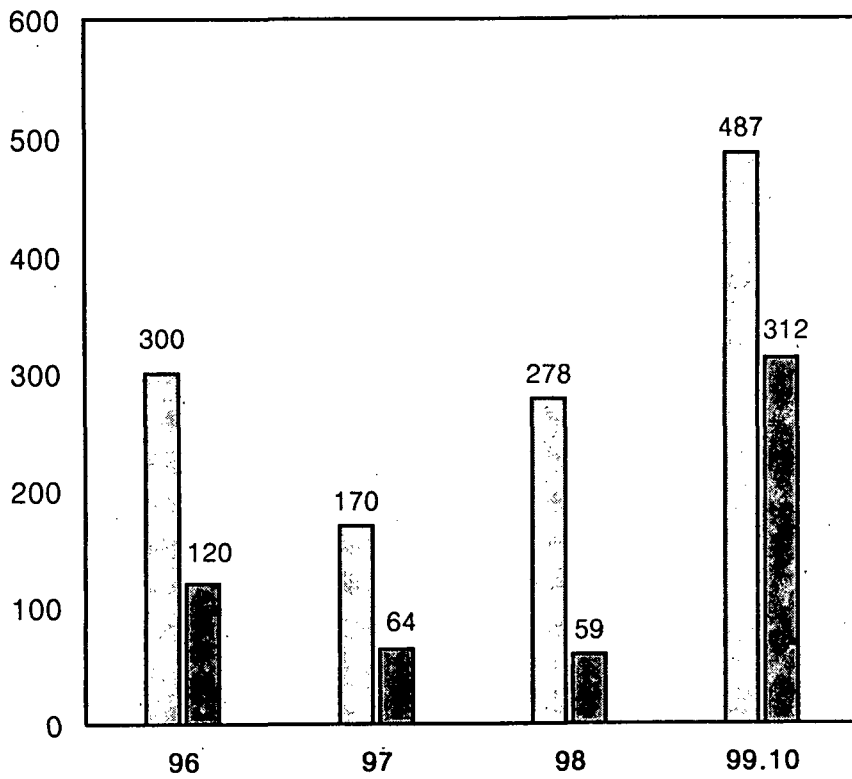


Fig.6. 경기도 총 발생두수와 화성군 발생두수의 비교

### 나. 검사 결과

첫 번째 검사는 착유우를 대상으로 검사를 실시 하였으며 동일한 개체에 3가지 방법을 이용 검사를 실시하였다. 피내반응법에 의한 검사결과 JC목장에서 양성 3두가 그리고 HD농장에서 의양성 1두가 발생하였다. IFN- $\gamma$  검사 결과 JS목장에서 1두, JC목장 6두, HD목장 3두, SH목장에서 1두가 각각 양성판정 되었다 (Table 3). ELISA에 의한 항체검사 결과 JH목장을 제외한 10개 목장에서 양성우가 발생 되었으며 총 양성두수는 24두였다. 개체별로 한가지 검사법 이상 양성 이 발생한 두수는 총 10개 목장에 33두였으며 목장별 검사결과는 Table 4와 같다.

두 번째 검사는 1차 검사결과 양성 및 의양성 목장인 JC와 HD목장의 사육 전 두수와 나머지 목장의 1차 검사 결과 중 IFN- $\gamma$  검사 또는 ELISA에 의한 항체검사 결과 양성우를 대상으로 1차 검사 때와 같은 방법으로 검사를 실시하였다. 검사결과 JC목장의 후보우 9두 중 7두에서 그리고 HD목장의 1차 검사 때 의양성 소가 다시 의양성으로 판정됨에 따라 양성우로 분류되어 총 2개 목장 중 8두에서 피내반응 양성우가 발생되었다. IFN- $\gamma$  검사 결과 JC, HD 및 SJ목장에서 5두가 양성으로, ELISA에 의한 항체검사결과 JH, 목장과 DS목장을 제외한 9개 목장에서 총14두가 양성우로 판정되었다. 총 51두 검사 중 12두가 양성으로 판정되었으며 목장별 2차 검사 결과는 Table 5과 같다.

### 3. 양성우 부검 및 조직학적 소견

피내검사결과 양성우 11두에 대한 부검을 실시하였으며, 임파절 5개부위 (폐문, 안하, 장간막, 간문, 상유방)와 내부장기의 이상유

Table 3. Total cattle and test numbers by each farm

farm name	total number	cattle producing milk	cattle non-producing milk	test number		test - duplicate number
				1st	2nd	
Total	395	237	158	237	51	48
JD	80	38	42	38	3	3
JS	32	18	14	18	3	3
JC	21	12	9	12	19	18
HD	14	14	-	14	15	13
SJ	70	47	23	47	3	3
SMH	44	32	12	32	1	1
JH	12	4	8	4	1	1
DS	14	13	1	13	2	2
SG	24	16	8	16	2	2
SC	37	20	17	20	2	2
KHS	47	23	24	23	-	-

Table 4. The results for the 1st test

Farm name	1st Test result									
	Total			Caudal fold			$\gamma$ -interferon		ELISA	
	sum	P*	N*	P	S*	N	P	N	P	N
Total	237	33	204	3	1	233	11	226	24	213
JD	38	3	35			38	-	38	3	35
JS	18	4	14			18	1	17	3	15
JC	12	7	5	3		9	6	6	1	11
HD	14	6	8		1	13	3	11	4	10
SJ	47	3	44			47	1	46	3	44
SMH	32	3	29			32	-	32	3	29
JH	4		4			4	-	4	-	4
DS	13	1	12			13	-	13	1	12
SG	16	2	14			16	-	16	2	14
SC	20	2	18			20	-	20	2	18
KHS	23	2	21			23	-	23	2	21

\* P is Positive

\* N is Negative

\* S is Suspect

Table 5. The results for the 2nd test

	2nd Test result										Remark
	Total			Caudal fold			IFN- $\gamma$		ELISA		
	SUM	P	N	P	S	N	P	N	P	N	
Total	51	12	39	7	1	43	5	46	16	35	
JD	3	1	2			3		3	1	2	
JS	3	1	2			3		3	1	2	
JC	19	8	11	7		12	2	17	1	18	
HD	15	4	11		1	14	2	13	3	12	
SJ	3	2	1			3	1	2	2	1	
SMH	1	1	-			1		1	1	-	
JH	-	-	-			-		-	-	-	
DS	1		1			1		1		1	
SG	2	2	-			2		2	2		
SC	2	1	1			2		2	1	1	
KHS	2	2				2		2	2		

※The suspected cow at HD farm was regarded as positive due to double-suspect test results continuously.

무를 검사하였다. 육안검사결과 6두의 폐문임파절에서 육아종 소견을 관찰하였다. 동 가검물을 항산성염색(Ziehl-Neelsen Method)을 하여 관찰한 결과 육아종 소견을 보인 6두와 나머지 5두중 3두의 폐문임파절에서 우형결핵균이 관찰되었다. 이로서 총 피내반응 양성우 11두 중 9두에서 결핵균을 관찰 확인하였다.

개체 중복 검사에 관계없이 총 검사두수는 1차와 2차 합쳐서 288두였으며, 이중 양성우는 피내반응검사에서 11두, IFN- $\gamma$  검사에서 16두 ELISA 항체검사에서 40두로 판정되었다. 앞서 기술한 바와 같이 정확히 양성우와 음성우를 판정할수 있는 gold standard 가 없으므로 여기서는 McNemar의 one to one matching 방법과 양성우 중복 비율 (positive - duplicated ratio = PDR)을 계산하였다.

(A) Caudal fold vs IFN- $\gamma$

		Caudal fold			
		+	-		
IFN- $\gamma$	+	5	11	16	$\chi^2 = 0.89$ PDR = 35.7%
	-	7	265	271	
		12	276	288	

(B) Candal fold vs ELISA

		Caudal fold			
		+	-		
ELISA	+	2	34	36	$\chi^2 = 13.1$ PDR = 8.3%
	-	10	242	252	
		12	276	288	



(C)  $\gamma$ -interferon vs ELISA

		IFN- $\gamma$			
		+	-		
ELISA	+	4	34	38	$x^2 = 23.7$
	-	12	238	250	PDR= 14.8%
		16	272	288	

피내반응 검사법과 IFN- $\gamma$  검사법은 5% 유의수준에서 오차의 범위 내에서 있는 것으로 나타났으나 ( $x^2 = 0.89 < 3.84$ ) 이것은 단순 양적 비교이고, PDR을 볼 때 35.7%의 낮은 수준으로 두 검사법의 차이가 우연의 차이라고 간주하기가 어려웠다 (A). B와 C에서와 같이 다른 두 검사법의 비교는 chi-square 값이 모두 13.1 및 23.7로서 매우 높게 나타났으며, 이것은 비교되는 검사법의 결과가 다르다는 것을 알 수 있었다. 또한 PDR은 8.3% 및 14.8%로 매우 낮았다.

목장별 양성우 보유 측면에서 볼 때 Table 4 및 5에서와 같이 피내반응법에 의한 양성농가 수는 2농가, IFN- $\gamma$  검사법은 4농가 그리고 ELISA 검사법은 10농가였으며, 피내반응법의 2농가는 IFN- $\gamma$  검사법의 양성 4농가에 포함 서로 중복되었으며, 이것으로 볼 때 ELISA 검사법 보다는 피내반응검사법과 IFN- $\gamma$  검사법이 좀더 비슷한 결과를 나타냈다.

조직학적소견으로는 앞서 기술한 바와 같이 11두 양성우중 9두에서 결핵균을 확인하였으며, 이를 gold standard로 볼 때 IFN- $\gamma$  검사에서는 6두가 양성으로 양성 일치율 67%를 나타냈고, ELISA에 의한 검사에서는 1두만이 양성으로 나타나 양성 일치율 11%를 나타냈다. 이것으로 볼 때, IFN- $\gamma$  검사법이 ELISA 항체검사법보다 피

내반응법과 많이 유사함을 알 수 있었다. 그러나, 음성 대조군에 대한 False positive ratio를 알 수가 없어 민감도와 특이도를 계산할 수가 없고, 이로 인하여 세가지 검사법의 절대 비교 우위를 가름하지는 못하였다.

한가지 특기할 사항은 MPB-70 항원을 이용한 ELISA 검사에서 피내반응검사전에 채혈한 혈청과 피내반응검사 7-10일 후 살처분시 채혈한 혈청에 대한 검사 결과가 매우 다르다는 점이다. 즉, MPB-70 항원을 이용한 ELISA검사에서 피내반응검사 이전의 혈청 11두 중 1두에서만 항체 양성반응을 나타냈으나, 피내반응검사 후 7-10일 경에 채취한 혈청 10개 모두에서 양성반응을 보였다 (Table 6). 이러한 현상은 이미 문헌에도 보고된 바 있으며(2), 우형결핵균에 감염되지 않은 소에서는 피내반응 검사에 후 7-10일 경에 항체가 높아지지 않기 때문에 피내반응 검사 후 항체가의 상승은 우형결핵균에 감염되었음을 제시한다. 따라서 항체검사의 민감도를 높이기 위해서는 피내반응검사 후 7-10일에 혈청을 채취하여 검사하는 것이 바람직하다.

본 연구에서는 세 가지 검사방법의 일치성 또는 우월성을 판단하기 위해 이미 연구된 방법을 야외에 적용하여 데이터를 수집 연구하였고, 그 결과 IFN- $\gamma$  검사방법이 ELISA에 의한 항체검사방법보다는 피내반응검사법과 조금 더 유사하다는 결론을 내렸으며, 앞서 언급한 바와 같이 각 검사법의 민감도와 특이도는 산출하지 못하였다. 앞으로 이를 위해 gold standard용의 양성 및 음성혈청이 수집되어야 하고, 이를 바탕으로 각종 검사법의 민감도와 특이도를 검사한 후 좋은 방법을 연구 선택하여 국내 우결핵 근절사업에 활용되어야 할 것으로 생각된다.

Table 6. Comparison of seroreactivity to rMPB70 before and after intradermal tuberculin test in tuberculin reactor cattle

Cow ID No.	Seroreactivity (O.D. 490 nm)	
	Before tuberculin test	After tuberculin test
ii	0.16	0.85
12	0.21	0.81
23	0.23	NT
5889	0.04	0.78
6334	0.03	0.69
6462	0.02	0.81
9274	0.05	0.75
9275	0.02	0.76
9276	0.09	0.65
9327	0.02	0.87
2	0.63	0.92

NT : not tested.

## 제4절 결과 요약

지난 10여 년간 경기도의 우결핵 발생실태를 분석한 결과 우결핵 발생두수와 발생율이 점차 증가하고 있으며, 전국의 발생 두수의 약 3분의 2를 차지하고 있어 타 지역보다 3배 가량 높은 발생율을 나타내고 있다. 경기도내 31개 시군 가운데 약 20여개 시군에서 1두이상 발생하고 있으며, 화성군, 안산시, 시흥시, 평택시, 김포시, 남양주시 등에서 매년 10두 이상 발생하고 있다. 특히 1999년도에는 화성군에서 300여 두 이상 발생하여 시급하고 강력한 방역대책이 절실하다. 우결핵 발생농가 370여 개를 분석한 결과 34%인 128개 농가에서 2회 이상 발생하고 있으며, 그 발생 두수는 전체의 약 60%를 차지하고 있다. 따라서 우결핵의 근절을 위해서는 2회 이상 발생농가에 대해서는 전 두수의 도태처분 등 강력한 우결핵 방역정책을 수립하는 것이 바람직하다.

우결핵 검사방법중 피내반응법, IFN- $\gamma$  검사법 그리고 ELISA 검사법을 상호 비교할 목적으로 실제 야외 적용시험을 실시하였으며, 검사대상은 98년도에 우결핵 양성 다발지역인 안산시 부곡동 일원 12농가를 대상으로 하였다. 검사결과 IFN- $\gamma$  검사법이 ELISA 검사법보다 피내반응검사와 유사한 것으로 연구되었으나 ( $X^2 = 0.89$ ), 양성 중복일치율은 35.7%로 낮았다. 피내반응검사결과 양성우는 11두였으며 이중 육안병변 소견은 6두에서 나타났고(54.5%), 조직병리학적 소견으로는 9두가 양성으로 판정되었다(81.8%). 양성 확정우 9두에 대한 실험실 검사결과는 IFN- $\gamma$  검사법이 67% 일치율을 ELISA 검사법이 11% 일치율을 나타냈다. 그러나 항체검사를 피내반응검사 후 7-10일 경에 실시할 경우 민감도는 90%이상 되었다.

## 참고문헌

1. 농수산부, 1992, 결핵병 및 부루세라병 방역실시요령 농수산부 예주 제 165호
2. Wood P R, Rothel J S. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 40, 1994; 1-2: 125-135.
3. Thoen C O, Hall M R, Petersburg T A, Harrington R, Pietz D E. Application of a Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Mycobacterial Antibodies in the sera of Cattle from a Herd in which *Mycobacterium bovis* Infection was diagnosed. *Proceeding 87th US Anim. Health Assn.* 1983:603-610
4. Fifis T, Plackett P, Corner L A, Wood P R. Purification of a Major *Mycobacterium bovis* Antigen for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 1989;29:91-101.
5. Harboe M, Wiker H G, Duncan J R, Garcia M M, Dukes T W, Brooks B W, Turcotte C, Nagai S. Protein G-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Anti-MPB70 Antibodies in Bovine Tuberculosis. *J. Clin. Micro.* 1990;28:913-921.
6. Wood P R, Corner L A, Rothel J S, Ripper J L, Fifis T, McCormick B S, Francis B, Melville L, et al. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for

- bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 31. 1992; 1: 71-79.
7. Rothel J S. Jones S L. Corner L A. Cox J C. Wood P R. A Sandich Enzyme Immunoassay for Bovine interferon- $\gamma$  and its use for the Detection of Tuberculosis in Cattle. *Aust. Vet. J.* 1990;67:134-167.
  8. Whipple D L. Bolin C A. Davis A J. Jarnagin J L. Johnson D C. Nabors R S. Payeur J B. Saari D A. Wilson A J. Wolf M M. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *American Journal of Vet. Re.* 56. 1995; 4: 415-419.
  9. Fleiss J L. *Statistical methods for rates and proportions.* John Wiley and Sons Inc. 1981; 2nd edition : 1-18, 112-118.

## 제5장 우결핵 방역에 대한 종합대책 및 활용방안 건의

### 제1절 우결핵 관리의 문제점

우결핵이 주요 가축질병의 하나로 지난 수 십여 년간 국가 방역사업으로 양성우의 도살처분이라는 강력한 방역정책을 펴고 있음에도 불구하고 우결핵의 발생은 오히려 확대되고 있는 양상이다. 지금과 같은 방역대책을 앞으로 계속한다면 10년 또는 20년 후에도 우결핵은 현재와 같은 문제일 수밖에 없다. 현재 우리 나라에서 우결핵의 근절이 어려운 이유를 몇 가지로 나누어 정리하면 다음과 같다.

첫째, 우리 나라에서 우형결핵균에 감염되어 있는 가축이나 야생동물의 빈도와 분포에 대한 자료가 부족하다. 현재 우결핵 방역의 초점은 젖소 특히 착유우에 대하여 우결핵 검진사업을 실시하고 있으나 전염병관리의 측면에서 볼 때 목장 주위의 우형결핵균 보유동물을 모두 제거하지 않고는 젖소에게 계속해서 감염될 수밖에 없다. 예를 들면 미국과 캐나다의 경우 야생사슴이 문제이고, 뉴질랜드의 경우 야생동물인 possum이 문제이며, 영국의 경우 야생 badger가 우형결핵균을 보유하며 인근 목장의 소에게 감염시키고 있다. 우리 나라에서는 젖소 이외의 가축 예를 들면 비육우, 돼지, 사슴, 염소 등의 가축은 물론 야생동물에 대한 우형결핵균 감염에 대한 자료가 거의 전무하여 종합대책을 세우기가 어려운 실정이다.

둘째, 우리 나라에서는 우결핵이 발생할 경우 양성우만 도태하고 동거축에 대해서는 아무런 조치를 취하지 않고 있다. 주요 선진국

에서는 감염목장 내 모든 동물을 도태하고 대지와 시설물을 소독하고 일정기간 새로운 동물의 입식을 금지하는 정책을 펴고 있다. 전두수 도축의 근거는 양성우만 도태할 경우 우결핵 발생목장의 약 30%에서 다시 우결핵이 발생하기 때문이다. 이는 피내반응검사의 민감도가 높지 못하고, 감염초기에는 피내반응 음성이며, 말기에는 세포매개면역반응이 오히려 억제되어 있어 검사에 음성으로 나타날 수 있기 때문이다. 따라서 감염목장 전체 동물을 도태하지 않고는 근본적으로 우결핵을 근절하기 어려운 실정이다.

셋째, 우리 나라에서 현재 수행하고 있는 우결핵 방역사업은 우결핵 발생목장에 대한 보다 집중적인 관리가 필요하다. 매년 시도별로 검진 두수에 대한 할당하는 것 이외에 검진에 필요한 수의사 인력을 보다 효율적으로 운용하는 정책이 바람직하다. 예를 들면 목장의 95%이상은 매년 검사에서 음성임에도 불구하고 매년 검사를 하는 경우가 있다. 외국에서도 이러한 경우 “우결핵 음성목장” 또는 “우결핵 음성지역”으로 선정하고 4년에 한번씩 24개월 이상인 소에 대한 검사를 시행하여 음성목장에 대한 검진을 대폭 축소하고 여유가 생기는 인력을 우결핵 발생목장에 집중적으로 검진하도록 규정하고 있다. 따라서 우리 나라에서도 지난 5년간 우결핵 발생 여부를 면밀히 검토하여 “우결핵 음성지역” 또는 “우결핵 음성목장” 지정제도를 도입하고 음성목장과 양성목장에 대한 우결핵 검진회수에 차등을 두어 수의사 검진인력의 융통적이고 효율적인 운용이 필요하다. 또한 우결핵 양성목장으로 분류될 경우 동물의 이동을 강력히 제한하는 정책을 수립하는 것이 바람직하다.



## 제2절 종합대책 및 활용방안 건의

우리 나라에서 우결핵 문제를 근본적으로 해결하기 어려운 점을 위에서 열거하였으나 이를 해결하기 위해서는 막대한 예산과 인력이 필요하다. 따라서 제한된 경비와 인력으로 가장 효과적인 방역대책을 수립하고 실행하기 위해서는 본 연구과제의 결과를 일부 활용하는 새로운 접근 방법이 필요하다. 그러나 현재의 가축전염병예방법 시행령의 테두리 안에서 새로운 방법의 시도는 매우 어렵기 때문에 일부지역을 시범사업지역으로 지정하여 수년간 시행한 후 개선효과가 있을 경우 전국적으로 확대 실시 하는 것이 바람직 할 것이다. 이에 본 연구결과를 토대로 시범사업지역에서 수행할 우결핵 방역사업의 종합대책과 연구결과의 활용방안은 다음과 같다.

1. 우결핵 방역대책을 수립하고 추진하기 위한 자문위원회를 구성하고, 위원은 농림부 축산위생과, 수의과학검역원, 시도 축산위생연구소, 학계, 축산농가 대표 등으로 구성한다. 위원회의 주요 업무는 매년 방역사업의 추진사항을 점검하며, 우결핵 발생실태를 분석하고, 연구사업의 계획과 그 결과를 평가하여 새로운 방역사업을 추진하는데 필요한 자문을 한다.

2. 우결핵 발생이 비교적 많은 경기도의 일부 지역(예, 경기도축산위생연구소 본소 관할 지역)을 새로운 방역사업의 시범지역으로 지정하고, 시범지역에서는 가축예방법 시행령의 일부 규정 (예, 양성우를 일정기간 내에 도살처분하는 규정)에 예외를 인정하고, 우결핵 발생목장의 전 두수를 도태처분할 때 보상비용과 일정기간 새로운 동물의 입식을 금지할 경우 그 보상비를 확보한다.

3. 시범사업지역에서는 우결핵 진단방법으로 caudal fold 피내반응검사이외에 comparative cervical test, IFN-r 검사를 표준 검사로 인정하고, 보조검사로서 항체검사를 도입하며, 그 결과에 따라 도살 처분할 경우 보상비를 지원한다.

4. 시범사업지역 이외의 경우 최근 5년간 우결핵 양성우가 발생하지 않은 목장이나 지역은 “우결핵 음성목장” 또는 “우결핵 음성지역”으로 지정하고, 4년에 1회씩 24개월 이상의 소에 대해 전 두수에 대한 피내반응검사만을 실시한다. 반면에 나머지 목장은 우결핵 발생목장으로 분류하여 매년 6주 이상 된 전 두수에 피내반응 검사를 실시한다. 단, 우결핵 음성목장으로 분류하였더라도 300 m 이내에 우결핵 양성목장이 있는 경우 우결핵 양성목장에 준하여 피내반응 검사를 실시한다.

5. 우결핵 검진에 양성우 발생목장은 우선 전 두수의 이동을 제한하고 30일 이내에 다음의 정밀검사를 실시한다.

가) 피내반응 양성우에 대해서는 comparative cervical test를 시행한다. 경측피내에 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD를 접종하고 그 종창의 차이를 비교분석한다.

나) 피내반응 음성 동거축에 대하여 IFN-r test와 우형결핵균 특이항원에 대한 항체검사를 실시한다. 말초혈액림프구를 우형결핵균 PPD와 조형결핵균 PPD로 약 16시간 자극시킨 다음 IFN-r를 측정한다.

6. 정밀검사에서 양성우가 있는 경우 다음의 조치를 취한다.

가) 전 두수의 도태를 장려하고 6개월간 입식을 금지한다.

나) 양성우만을 도태할 경우 매 2개월마다 피내반응 검사와 정밀 검사를 실시하여 양성우를 도태하고 연속 2회 음성일 때 6개월 후에 재검사를 실시한다. 재검사에서 음성일 경우 매 년 피내반응 검사를 실시하고, 5년간 계속해서 음성일 경우 “우결핵 음성목장”으로 지정한다.

다) 우결핵 음성 목장으로 지정될 때까지 보유 동물의 이동을 금지한다.

7. 우결핵 발생 감시 기능을 다음과 같이 강화한다.

가) 목장별 집유탱크 우유에서 우결핵 항원에 대한 항체검사를 분기별로 실시하고 2회 이상 양성인 목장의 전 두수에 대한 피내반응 검사와 정밀검사를 실시한다.

나) 우결핵 양성우 발생목장의 300 m 이내에서 사육하는 비육우, 사슴 등의 가축에 대하여 피내반응검사 또는 정밀 검사를 실시하여 젖소 이외의 우형결핵균 보유동물을 제거한다.