

PCR기법을 이용한 젖소 결핵균 검색 분리 조사

공신국¹, 이건택, 임종묵, 양승민, 이요안나, 문순화

충청남도축산위생연구소 통합지소
(접수 2002. 4. 2, 게재승인 2002. 5. 7)

Detection of *Mycobacterium bovis* in cattle by PCR

Shin-Koog Kong¹, Gun-Taek Lee, Jong-Mook Lim,
Seung-Min Yang, Jho-An-Na Lee, Sun-Hwa Moon

Tonghab branch, Chungnam Livestock and Veterinary Research Institute, Dangjin, 343-803, Korea
(Received 2 April 2002, accepted in revised from 7 May 2002)

Abstract

The purpose of this study was to detect *Mycobacterium bovis* in cattle (serum, milk, lung, lymph node) by PCR.

Nineteen samples from 7 skin test-positive cattle were analyzed. The amplified band of *IS6110* by PCR was detected from 2 samples in lung and lymph node. But the sensitivities of the present methods for detecting *M bovis* in milk and serum are deficient. Because the PCR sensitivity has been shown to be hindered by the method used to isolate the nucleic acid target.

PCR-based methods have the potential to be faster, more accurate, and the most efficient means of detecting *M bovis*. The detection of *M bovis* by PCR will contribute to the more efficient detection and control of tuberculosis.

Key words : *Mycobacterium bovis*, PCR

서 론

소결핵은 *Mycobacterium*속의 감염에 의해 발병하는 만성 소모성 질환으로 숙주범위가 광범위하여 사람을 위시한 모든 동물에 중요한

인수공통전염병이다. 특히 소에 발생하는 소결핵은 접촉, 공기, 우유를 통해 소 뿐만 아니라 사람에도 전염될 가능성이 크기 때문에 수의공중보건학적으로 중요한 방역대상 질병이라고 할 수 있다¹⁻⁵⁾.

¹Corresponding author
Phone : 041-352-4056, Fax : 041-352-4055
E-mail : kinkong@hanmail.net

수의공중보건학적으로 중요한 결핵은 크게 인형결핵, 우형결핵, 조형결핵으로 구분되는데, 각각의 원인균은 *M tuberculosis*, *M bovis*, *M avium complex*로 알려져 있고 서로 교차감염도 일어난다고 보고되고 있다⁶⁾.

Grange JM 등⁵⁾의 보고에 따르면 *M bovis*는 주로 소 및 여러 가축에서 결핵병을 일으키는 세균으로 사람에도 감염되어 결핵증상을 일으키는 인수공통전염병의 원인체이다.

결핵의 원인균인 *Mycobacteria*는 항산성 세균으로 세대기간이 18시간으로 다른 균들에 비해 많은 배양시간이 소요되는 배양하기 어려운 세균으로 감염동물의 탐식세포내에 기생하기 때문에 강한 세포성 면역반응과, 항생제 등의 영향을 받지 않고 만성 감염상태를 유지한다는 보고 등이 있으며, 치료와 방역이 어려운 질병으로 전세계에 걸쳐 발생하고 있으며, 우리나라를 비롯한 각국에서는 가축에 대해 예방접종은 허용하지 않고 감염축을 색출하여 살처분하는 "Test and slaughter" 법으로 방역을 실시하고 있다⁷⁻⁹⁾.

국내에서는 소결핵병이 1913년 처음 보고된 이후 매년 계속 발생하고 있으며, 2000년 185농가 532두 발생이 있었고, 2001년 9월까지 154농가 678두 발생이 있었으며, 충남의 경우 2001년 1월부터 9월까지 24농가 143두가 발생하여 점차 증가하는 감염률을 보이고 있어 축산농가 및 국가예산에 커다란 경제적 손실을 일으키고 있는 질병이다¹⁰⁻¹²⁾.

현재 우리나라 결핵병 및 부루세라병 방역실시요령에 따르면 소결핵의 진단은 우형결핵균 배양액에서 추출한 purified protein derivatives (PPD)를 이용한 피내반응검사법(intradermal tuberculin test)에 의존하고 있으며, 우리나라에서도 미근부(caudal fold)에 PPD를 주사한 후 48~72시간 내에 종창의 크기를 관찰하여 판정하는 피내반응검사를 채택하고 있으나 실제 야외에서의 검진업무에 있어서는 상당한 어려움이 있는 것이 현실이다.

그리고 소결핵의 발생률이 낮은 경우 우형결핵균 이외의 기타 항산성균에 감염되어 우형결핵균 PPD에 비특이반응 빈도가 증가한다고 보

고하고 있으며, 피내반응검사가 세포매개면역 반응을 측정하는 검사이기 때문에 일부 소결핵 감염우에서 세포매개면역반응이 억제된 경우에는 피내반응 검사에 음성일 수 있다.

이에 본 연구자는 현재 각종 가축전염병의 진단에 보조적 수단으로 사용되어지고 있는 PCR방법을 응용하여 빠르고 신속한 검진방법을 활용하는 자료로 제공하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

충남에서 결핵병 및 부루세라병 방역실시요령에 따라 우결핵 양성판정을 받은 농가의 착유우를 대상으로 하였다.

샘플채취 : 양성판정 젖소를 매몰전 부검하여 림프절, 폐 등을 채취하여 냉동실에 보관, 사용하였다.

가검물 내역 : 샘플채취 가검물은 Table 1과 같다.

Table 1. The list of specimens

No of milk cow	Specimens			
	Serum	Milk	Lung	Lymph node
1	T*	T	T	T
2	T	T	T	T
3	T	T	T	T
4	T	T	T	T
5	T	NT**	NT	NT
6	T	NT	NT	NT
7	T	NT	NT	NT

*T : Test, **NT : Not test.

방법

DNA extraction : DNA 추출은 Thierry D 등¹³⁾의 방법에 따라 응용 실시하였으며, 요약하면 다음과 같다. DNA extraction을 위해 DNA prepmate-M(bioneer, K-3020)을 이용하였으

며, 다음과 같은 조건으로 실시하였다.

Milk 5ml 또는 serum 1ml을 13,000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 제거한 후 아래의 과정으로 DNA를 추출하였으며, 폐조직과 림프절의 적정량을 sea sand를 이용하여 균질화 시킨후 500 μ l를 취하여 300 μ l의 hydrolysis buffer와 혼합한 후, 이중 500 μ l를 13,000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하여 아래와 같은 방법으로 DNA를 추출하였다.

Pellet에 500 μ l의 1 \times washing buffer를 가하여 현탁시킨 후 13,000rpm에서 원심분리하였으며, 위의 washing과정을 3회 반복하였다. 상층액을 완전히 제거한 후 pellet을 50 μ l의 lysis buffer에 현탁시킨 후 적당량의 mineral oil을 가한 뒤 microwave oven(750w)에서 10분간 처리한 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취하여 PCR에 template로 사용하였다.

제 1차 및 2차(nested) PCR

PCR에는 20 μ l reaction의 accupower PCR Premix(Vioneer, K-2012)와 *Mycobacterium tuberculosis* complex(*M tuberculosis*, *M bovis*)에 특징적으로 존재하는 insertion sequence(*IS6110*)의 특정부위만을 특이적으로 증폭하기 위해 제작된 TB primer set(Bioneer, N-5821)를 사용하였다^{13,14}. 20 μ l reaction을 위해 준비된 PCR premix(Taq DNA polymerase 1U, dNTP 250uM, Tris-HCl 10mM, KCl 40mM, MgCl₂ 1.5mM)에 KBN5와 KBN6

primer(10 pmol/ μ l)를 각각 2 μ l 가한 tube에 추출된 DNA 16 μ l를 가한 후 94 $^{\circ}$ C 10분의 denaturation을 실시하였고, 94 $^{\circ}$ C 1분 30초(denaturation), 60 $^{\circ}$ C 2분(annealing), 72 $^{\circ}$ C 2분(polymerization)의 조건을 50 cycles 실시하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 10분(extended polymerization)의 조건으로 1st PCR을 실시하였다.

새로운 PCR premix tube에 KBN7와 KBN8 primer(10 pmol/ μ l)를 각각 2 μ l 가한 후 1차 PCR 반응액 4 μ l와 8-MOP(carry-over contamination) solution 12 μ l를 가한 후 1st 1차 PCR과 같은 조건으로 2차(nested) PCR을 실시하였다^{15,16}.

증폭된 PCR products는 1.0% agarose(with EtBr)에 각각 5 μ l 용량으로 전기영동하여 UV transilluminator로 관찰하였으며, 양성판정은 285bp에서 증폭된 band를 나타내는 샘플을 양성으로 판정하였다.

결 과

1차 PCR을 실시한 후 5 μ l를 전기영동 하였으나 특정 band(547bp)를 확인할 수 없었으며, control DNA에서도 증폭된 band를 관찰할 수 없었다.

2차(nested) PCR을 실시한 PCR products를 전기영동한 결과 control DNA 외에 2개의 lane에서 증폭된 band를 확인할 수 있었다.

Control DNA에서 증폭된 *IS6110*의 특정부

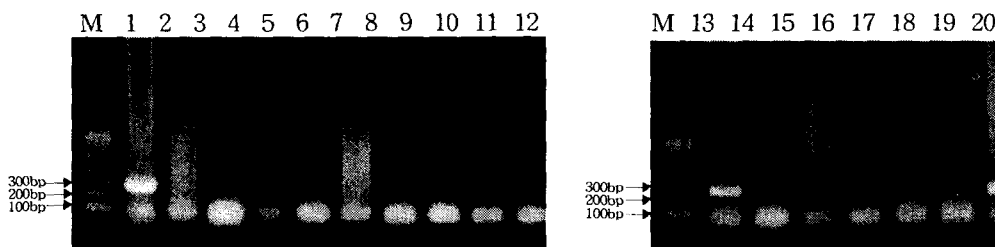


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of *IS6110* (insertion sequence of *Mycobacterium tuberculosis* complex) PCR products of 19 clinical specimens.

Lane M : PCR low ladder. Lanes 1 to 20 represent control, 1-serum, 2-serum, 3- serum, 4-serum, 5-serum, 6-serum, 7-serum, 1-milk, 2-milk, 3-milk, 4-milk, 1-lymph node, 2-lymph node, 3-lymph node and 4-lymph node, respectively.

위(285bp)의 band는 7개체의 serum과 4개체의 milk에서는 전혀 증폭되지 않았으며, 1번 개체의 lung과 3번 개체의 lymph node에서 추출한 DNA의 1차 및 2차 PCR products에서 증폭된 285bp의 band를 EtBr에 염색된 agarose gel에서 전기영동한 후 확인할 수 있었다(Fig 1).

고 찰

현재 전세계적으로 발병되는 우형결핵은 수의공중보건학적인 측면과, 경제적 손실에 있어서 매우 중요한 의미를 지니고 있다¹⁷⁾. 보고에 따르면 전세계인구의 1/3이 결핵에 감염되어 있으며, 매년 3백만명의 사람들이 결핵과 관련하여 사망하고 있다^{18,19)}. 또한 현재 소결핵 발생은 지속적으로 증가추세에 있는 것으로 보고되어지고 있다.

우리나라의 경우 농림부 가축질병발생 통계에 따르면, 1986년에 85개 목장 120두가 발생하였으나, 2000년에 이르러서는 532두의 발생을 보이고 있다. 이와 같은 통계는 단지 검사법의 민감도가 비교적 낮은 튜버클린 피내반응검사 결과에 의한 것이며, 민감도가 월등히 높은 새로운 검사기법으로 검사를 시행할 경우 우리나라의 소에서 결핵병 이환율은 더 높을 것으로 추정할 수 있다. 지속적인 발생원인으로는 이환개체의 불완전한 제거나 이동에 의한 전파 등을 들 수 있다. 비록 *M bovis* 감염의 차단을 위해 파스퇴르 살균법을 우유에 적용하지만, 사람이 *M bovis*에 노출되는 것을 근원적으로 차단하지는 못한다¹⁹⁾.

현재 전세계적으로 사용되어지는 소결핵 검사법인 PPD 피내반응검사법은 false-positive나 false-negative 개체를 산생하고 있다고 보고되어지고 있다. 또한 대개의 목장의 경우에 보정틀이 미비되어 있으며, 전국 가축위생시험소 인력 부족으로 인한 검진업무의 어려움 등 PPD 피내반응검사를 야외에서 추진함에 있어서의 많은 문제점이 있다. 이러한 문제점들을 보완하고자 젖소의 우유에서 ELISA방법을 응용하거나 PCR을 기초로 한 소결핵 진단법에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다¹⁹⁾.

이 중 내부장기를 대상으로 한 실험의 경우 매우 양호한 결과를 얻었던 것으로 알려지고 있으며, 본 실험에서도 4두를 대상으로 한 내부장기를 사용한 PCR 실험에서 2두에서 특이적인 band를 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 내부장기를 이용하는 것은 PPD 피내반응검사법에서 양성을 보인 개체를 살처분한 후 부검 후에 사용되어질 수 있으므로 소결핵 false-positive 개체의 경제적 손실을 야기할 수 있으며, 소결핵 false-negative 개체의 색출에는 도움이 되지 못한다.

현재 이러한 문제점에 대한 보완으로 우유에 대한 direct PCR 검사법이 선진국을 중심으로 많은 연구가 진행되어지고 있다. 본 실험에서는 혈청 및 우유를 사용한 PCR에서는 극히 일부에서 특이적인 band가 증폭되었으며, 이는 세포의 구조적 특징과 DNA 추출 한계 등의 원인으로 앞으로 연구해야할 대상으로 평가하고 있다.

Cornejo 등¹⁹⁾의 보고에 따르면 우유에서 소결핵균을 PCR 검사법에 의해 검색한 결과 glass bead DNA extraction을 실시한 경우 58.8%의 민감도를 보인 반면, C₁₈-carboxypropylbetaine DNA extraction을 실시한 경우 94.1%의 민감도를 나타내었다.

현재까지의 연구결과를 토대로 볼 때 소결핵 검진에 PCR 검사법을 즉시 적용하기에는 문제점이 있는 것으로 보이지만, 근시일 내에 소 부루세라 검진의 MRT 검사와 마찬가지로 집합유를 대상으로한 소결핵 PCR 검사법이 사용되어 인력, 시간 및 검진의 위험도 등을 경감시키게 될 것으로 사료된다.

결 론

PCR 기법을 이용한 젖소 결핵균 분리조사를 위한 연구시험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 폐 및 림프절 가검물 4두 8종에 대한 PCR 실험결과 2두 2종에서 목적인 285bp의 증폭된 band를 확인할 수 있었다.
2. 혈청 및 우유 가검물 7두 11종에 대한 PCR 실험결과 모두에서 증폭된 band를

관찰할 수 없었다.

3. 폐 및 림프절에 대한 실험결과는 PCR 기법을 이용한 젖소 결핵균 조사에 가능성을 나타내 주고 있으며, 혈청 및 우유 가검물에 대한 실험결과는 세포의 구조적 특징과 DNA 추출의 한계 등의 원인으로 앞으로 연구해야할 과제로 사료된다.

참고문헌

1. Van Soolingen D, de Hass PE, Haagsma J, et al. 1994. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 32(10) : 2425~2433.
2. Collins DM, de Lisle GW, Gabric DM. 1986. Geographic distribution of restriction types of *Mycobacterium bovis* isolates from brush-tailed possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand. *J Hyg* 96 : 431~438.
3. Cousins DV, Francis BR, Gow BL, et al. 1990. Tuberculosis in captive seals: bacteriological studies on an isolate belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Res Vet Sci* 48 : 196~200.
4. Moda G, Daborn CJ, Grange JM, et al. 1996. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tuber Lung Dis* 77(2) : 103~108.
5. Grange JM, Yates MD. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol* 40 : 125~135.
6. 가축위생연구소. 1968. 우형결핵병의 병리학적 연구. 농사시험연구사업연보 : 194.
7. 결핵병 및 부루세라병 방역실시요령. 농림부고시. 제2001-67호
8. Essey MA, Koller MA. 1994. Status of bovine tuberculosis in North America. *Vet Microbiol* 40 : 15~22.
9. Caffrey JP. 1994. Status of bovine tuberculosis eradication program in Europe. *Vet Microbiol* 40 : 1~4.
10. 손봉환. 1987. 우결핵병에 대한 종합검토. 대한수의사회지 23(9) : 577~590.
11. 손봉환, 홍종순, 정길생. 1979. 경기도지역 우결핵병의 역학적 조사 연구. 대한수의사회지 15(9~10) : 497~504.
12. 배길한, 황영순, 손봉환. 1994. 우결핵 병리조직으로부터 우형결핵균의 분리 및 신속동정법. 한국수의공중보건학회지 18(3) : 183~190.
13. Thierry D, Cave MD, Eiseach KD. 1990. *IS6110*, an *IS*-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 18(1) : 188.
14. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, et al. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, *IS6110*, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 28(12) : 2668~2673
15. Sellner LN, Coelen RJ, Mackenzie JS. 1992. Reverse transcriptase inhibits *Taq* polymerase activity. *Nucleic Acids Res* 20(7) : 1487~1490.
16. Cimino GD, Metchette KC et al. 1991. Post-PCR sterilization : a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 19(1) : 99~107.
17. Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, et al. 2000. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol* 38(7) : 2602~2610.
18. Kochi A. 1991. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 72 : 1~6.

19. Cornejo BJ, Sahagun-Ruiz A, Suarez-Guemes F, et al. 1998. Comparison of 18-carboxypropylbetaine and glass bead DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium bovis* in bovine milk samples and analysis of samples by PCR. *Appl Environ Microbiol* 64 : 3099~3101.