

Purified protein derivatives (PPD) tuberculin 피내반응검사와 ELISA 항체가를 이용한 *Mycobacterium bovis* 진단에 관한 연구

추금숙* · 조범준 · 조영숙 · 강미선 · 오진식¹ · 이정원

전라북도축산위생연구소 정읍지소, ¹애니멀제네틱스

(접수 2009. 3. 20, 게재승인 2009. 6. 23)

Studies on the diagnosis of purified protein derivatives (PPD) tuberculin intradermal tuberculin test and ELISA to antibodies of *Mycobacterium bovis*

Keum-Suk Chu*, Bum-Jun Cho, Young-Suk Cho, Mi-Seon Kang,
Jin-Sik Oh¹, Jeong-Won Lee

Jeongeup-Branch, Jeonbuk Institute of Livestock & Veterinary Research, Jeong-eup 580-814, Korea

¹Animal Genetics, Gyeonggi-do Suwon 443-823, Korea

(Received 20 March 2009, accepted in revised from 23 June 2009)

Abstract

SBovine tuberculosis is a chronic bacterial disease of animals and humans caused by *Mycobacterium bovis*. Besides the classical intradermal tuberculin test, a number of blood and serum tests have been used. The purpose of this study was to establish seroprevalence of *M. bovis*. The sera were screened using the ELISA technique. A total seroprevalence of 65.8% in positive cattle, suspect 36.0%, negative 5.9% in TB-infected herds by PPD and dairy cattle is 3.0%, Hanwoo is 1.6% in TB-free herds. The deer of seroprevalence is 55.0% in TB-infected herd and 7.7% in TB-free herds.

Key words : *Mycobacterium bovis*, Intradermal tuberculin test, ELISA

서 론

결핵은 *Mycobacterium*속의 감염에 의해 사람과 동물에서 발생하는 만성 소모성질환으로 수의공중보건학적으로 중요하며 인형, 우형, 조형으로 구분되고 원인균은 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* complex로 나뉘어 사람과 사람, 사람과 동물, 동물과 동물간 전염된다고 보고된 바 있다(김, 2001; 공 등 2002). 특히 동

물에서 발생하는 결핵 중 소 결핵은 접촉, 공기, 우유를 통한 소 및 사람에게 전염될 가능성이 높은 인수공통 전염병으로 국내에서도 제2종 가축전염병으로 분류되어 있다(강 등, 1996).

소결핵은 *M. tuberculosis* complex에 속하는 *M. bovis*가 원인체로 *M. tuberculosis*와 99.95% 이상의 상동성을 가지며 개체간의 감염은 기침에 의한 호흡기 감염, 배설물과 분비물, 태반, 오염된 물과 사료 등의 섭취로 감염 된다(조, 2007).

결핵은 1882년 독일의 Robert Koch에 의해 원인체

* Corresponding author: Keum-Suk Chu, Tel. +82-63-290-6540,
Fax. +82-63-290-6568, E-mail. chuks@korea.kr

가 밝혀지면서 연구가 활발히 진행되기 시작했으며 1890년 치료약제를 개발할 목적으로 연구하던 중 tuberculin (Koch's old Tuberculin, KOT)을 발견하게 되어 사용 되었으나 KOT는 육즙을 이용한 tuberculin으로 자체 함유된 단백질로 인해 비특이 반응이 발생하여 단백질을 제거한 heat concentration synthetic medium (HCSM) tuberculin을 개발하였으나, 가열시 단백질이 화학적으로 변화되기 때문에 화학약품을 이용한 정제방법을 사용한 purified protein derivatives (PPD)가 사용되고 있다. Tuberculin 피부반응 검사법은 처음 피하 주사법으로 고안되었으나 1937년에 피내주사법으로 바뀌었으나 숙주의 감수성, 주사량, 주사부위, 주사방법, 반응판독 등 일관 적용과 정확성을 유지하기 어려운 진단법이지만 시술자와 판독방법의 철저한 기준적용이 혼란되어 진단법 중 야외에서 쉽게 이용할 수 있다(국 등, 1998).

국내에서 우결핵 검진은 1913년부터 1960년까지는 OT에 의한 열반응법으로, 1961년에서 1973년 사이에는 HCSM으로 1차 검사를 실시하고 양성우의 경우는 PPD로 2차 검사를 실시하였으며, 1994년부터 현재까지 PPD로 실시하고 있다. 현재 사용되는 피내검사는 우형 tuberculin을 이용하여 소 미근부 추벽과 경측부에 접종하는 단일 피내검사법(single intradermal test, SIT)과 우형(bovine PPD, PPD-B) 및 조형(avian PPD, PPD-A) tuberculin을 경부에 나란히 접종하는 비교피내검사법(single intradermal comparative cervical tuberculin test, SICCT)이 있다(조 등, 1999; 최 등, 1978; Monaghan 등, 1994). 그러나 피내검사법은 특이성 측면에서 환경 *Mycobacteria* 및 우형 결핵균과 항원구조가 비슷한 세균과의 비특이반응과, 민감도 측면의 결핵양성우의 음성반응에 의한 결핵전파의 방지 차단에 문제점을 안고 있다(김, 1976; 김 등, 1993). 또한 우결핵균 감염 후 3~6주 후에 정확한 진단이 이루어질 수 있으며 우결핵균의 중감염시 세포성 면역을 측정하는 피내검사법에서는 가음성으로 판정될 수도 있는 문제점도 있다. SIT법의 민감도는 평균 83.9%, 특이도는 평균 96.8%이며 SICCT 법은 민감도 평균 85.0%, 특이도는 평균 99.5%로 농장 단위 검사법으로 적합하나 단독 개체 진단법으로는 사용하기는 어렵다. 이러한 단점을 보완하기 위해 γ -interferon test (γ -IFN)법이 호주에서 1980년대 후반 SIT 법과 병용하기 위해 개발되었으며 우결핵균에 감염되었는지 환경성 결핵균에 감염되었는지 감별 진단이 가능하며 민감도는 평균

87.7%, 특이도는 평균 96.6%이며, 초기 감염 동물을 진단할 수 있어 SIT법에 의해 검출되지 않은 동물도 검사 대상이 될 수 있다. 결핵은 감염이 진행됨에 따라 체액성 면역이 관여하므로 항체를 진단하는 ELISA법이 특이성은 높으나 피내검사법과 비교 민감도는 부족하여 더 많은 조사와 연구가 필요한 실정이다(Wood 등, 1991; 정 등, 1999).

국내의 소결핵 검진은 결핵 및 브루셀라병 방역실시요령에 의거 12개월 이상의 젖소에 PPD 진단액을 미근부의 추벽 피내에 접종하며, 다만 미근부 추벽의 상처 등으로 접종이 부득이한 경우 경측부 피내에 접종하여 48~72시간 사이에 접종부위 종창이 5mm 이상 일 때 양성으로 판정하고 있다. 유럽은 경측부에 복미, 호주, 뉴질랜드는 미근부에 접종하며 아일랜드와 영국을 제외한 유럽연합과 복미, 호주, 뉴질랜드 등에서는 1차 검사로 실시하고 아일랜드, 영국은 비교검사법을 1차, 이외의 유럽연합, 복미, 호주, 뉴질랜드는 2차 검사로 실시한다(정 등, 1999; 구, 2007; 유, 2007). 국내의 PPD 검사법은 1994년부터 적용되었으므로 사육형태의 변화에 따른 대단위 농장의 증가와 결핵 발생 양상을 분석하여 농장별 발생에 따른 다양한 검사방법의 적용이 필요한 실정이다.

본 연구는 관내 우결핵 발생농장과 음성농장, 사슴에서 PPD 피내접종법과 혈청을 이용한 ELISA 검사법과의 적용을 검토하여 방역의 기초 자료로 사용하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

2008년 1월부터 2009년 2월까지 정읍시소 관내 젖소 결핵병 양성 29농가 987두, 음성 5농가 197두, 한우 29농가 1,036두, 또한 전북지역의 사슴 결핵 발생농장의 혈청 40두와 음성농장의 사육중인 사슴 78두를 대상으로 채혈하여 혈청 분리 후 56°C에서 30분간 비동화 한 후 검사 전까지 -20°C에 냉동실에 보관 후 검사를 실시하였다.

피내 접종

결핵검진은 결핵 및 브루셀라방역실시요령에 의거 미근부 추벽에 우결핵 진단액(중양백신, PPD-T) 0.1ml

을 피내 접종하여 48~72시간 후에 접종부위 피부두께를 측정하여 종창차이가 5mm 이상이면 양성, 3~5mm를 의양성으로 판정하였고 젖소 양성농장 987두, ELISA 검사 양성 젖소 6두와 한우 16두, 사슴 40두를 대상으로 하였다.

ELISA 검사

Antigen BTB Ab ELISA kit를 사용하여 검사를 실시하였으며 순수 분리된 BTB 항원을 플레이트에 흡착하여 MPB70 효소를 접합시켜 소 혈청과 혈장에서 동시에 소결핵 항체를 검사할 수 있도록 고안되었다. 가검 혈청 50 μ l와 음성, 양성 대조를 항원이 코팅된 플레이트에 분주하여 37°C에서 60분 반응시킨 후 세척액으로 6회 세척하여 기질액 100 μ l씩 분주하여 빛을 차단한 후 15분간 실온에서 반응시킨 후 반응 정지액 100 μ l를 넣고 잘 혼합하여 청색이 노란색으로 완전히 변하면 흡광도 450nm에서 측정하여 S/P value 0.3이상을 양성으로 판정하였다.

결 과

소 결핵 피내반응과 ELISA 검사 결과

결핵발생 경력이 있는 젖소 29농가 987두를 피내접종 검사하여 양성농가로 판정된 14농가 114두 중 ELISA 검사결과 75두(65.8%)가 양성, 39두(34.2%)가 음성이었으며 피내접종 의양성축 8농가 25두 중 9두(36.0%)가 양성, 16두(64.0%)가 음성이었다고, 피내접종

Table 1. Result of the serum ELISA and tuberculin skin test in TB-infected herds

No. of tested (Farms)	Tuberculin skin test (%)			ELISA (%)	
	Positive	Suspect	Negative	Positive	Negative
987 (29)	114	25	848	75 (65.8)	39 (34.2)
				9 (36.0)	16 (64.0)
				50 (5.9)	798 (94.1)
Total	114 (11.6)	25 (2.5)	848 (85.9)	134 (13.6)	853 (86.4)

Table 2. Result of the serum ELISA and tuberculin skin test in TB-free herds

Species	Farms	ELISA (%)			Tuberculin skin test (%)		
		No. of tested	Positive	Negative	No. of tested	Positive	Negative
Dairy cattle	5	197	6 (3.0)	191 (97.0)	6	0	6 (100.0)
Hanwoo	29	1,036	16 (1.6)	1,020 (98.4)	16	0	16 (100.0)
Total	34	1,233	22 (1.8)	1,211 (98.2)	22	0	22 (100.0)

음성축 19농가 848두 중 50두(5.9%)가 양성, 798두(94.1%)가 음성이었으며 총 987두 검사하여 134두(13.6%)가 양성이었으나 결핵발생 경력이 없는 젖소 사육 5농가 197두를 검사하여 6두(3.0%)가 양성으로 조사되었다(Table 1, 2).

또한, 한우 사육 29농가 1,036두를 ELISA 검사하여 16두(1.6%)가 양성, 1,020두(98.4%)가 음성으로 조사되었으며 ELISA 검사 양성축 16두를 피내접종결과 모두 음성으로 판정되었고, 결핵 발생경력이 없는 젖소 5농가 197두와, 한우 29농가 1,036두 총 1,233두를 검사하여 22두(1.8%)가 양성, 1,211두(98.2%)가 음성으로 조사되었다(Table 2).

사슴 ELISA 검사 결과

결핵발생 농장의 사슴 40두를 ELISA 검사하여 22두(55.0%)가 양성, 18두(45.0%)가 음성으로 조사되었고, 이중 피내접종 반응을 실시한 36두 중 14두(38.8%)가 양성, 22두(61.2%)가 음성으로 확인되었다. 또한 결핵 검진이 실시되지 않은 사슴 혈액 78두에서 6두(7.7%)가 양성, 72두(93.5%)가 음성으로 나타났다.

고 찰

농림수산식품부의 가축통계에 의하면 2008년 젖소의 전국 사육은 7,000호, 445,754두로 농가당 평균 사육은 63.6두이며 2005년 8,923호, 478,765두 평균 사육 53.6두보다 농가당 사육두수가 18% 증가하였고 전북은 농가당 평균 사육두수가 2005년 61.4두에서 2008년 76.6두로 24% 증가된 것으로 조사되었다. 농가당 평균 사육두수의 증가는 낙농의 전업농화와 인건비 및 사료값의 인상 등으로 인해 경영이익을 위한 사육형태의 변화는 앞으로 더욱 증가할 것으로 사료된다. 이러한 추세는 여러 가지 경영상의 이익을 창출하기 위해 HACCP 인증과 브랜드화 등으로 체계적인 사양관리가 동반될 것으로 예상되나 질병예방을 위한 방역이 소홀하여 질병이 발생하면 대단위 발생이 우려되므로

농장별 번식우에 대한 정기적인 질병검사와 인수공통 전염병에 대한 검진의 중요성을 인식하고 농가 스스로 방역사항 등을 점검해야 할 것이다.

국내의 결핵 검진은 주로 젖소를 위주로 이루어져 왔으나 2009년부터 한우의 안정성 확보와 축산물의 경쟁력 강화 및 인수공통전염병의 근절을 위한 한·육우 결핵 ELISA 방역사업이 번식농가의 암소를 위주로 시행된다. 최근 국민의 식품안전성에 대한 관심의 고취와 더불어 축산물 검사가 강화되어 축산물작업장의 해체검사 과정에서 질병이 검출되어 농장의 사육에 도움을 주는 피드백 사업이 일부 이루어지고 있지만 간혹 결핵이 축산물 작업장에서 확인되어 농가에 통보되는 경우가 발생하고 있다. 이러한 농가는 병변이 확인된 경우로 동거축에 대한 피내접종을 실시하면 결핵이 많은 개체에서 확인되어 젖소 뿐 아니라 한우에서의 결핵 검진도 방역상 중요한 부분으로 인식 할 수밖에 없을 것으로 사료된다. 가축전염병발생 통계에 의하면 우결핵은 2005년 229호, 726두에서 2008년 257호, 1,194두로 다소 증가하였으며 2005년 익산에서 사슴 결핵이 확인된 이후 산양, 개에서 결핵이 확인되었고, 박 등(1996)은 결핵 환자에서 이환된 개 결핵을 확인하여 보고하였다. 그러나 국내에서는 사람에서 *M. bovis*가 분리된 사실은 없으나 외국에서의 사람 감염예가 보고되고 있으며 또한 감염축의 살균하지 않은 우유를 통해 균이 배출됨으로 축주 및 관련업자의 감염 가능성을 전혀 무시할 수 없어 일관성 있는 소결핵 근절 정책과 사람에 대한 지속적인 조사와 관심이 요구된다.

본 ELISA 검사결과를 보면 우결핵 피내접종 양성축에서 65.8%, 음성농가의 경우 한우는 1.5%, 젖소는 3.0%의 양성율로 나타나 심 등(1997)의 피내반응 양성축에서 84.3%, 음성축에서 3.9%로 낮게 조사되었다. 또한 사슴에서도 38.8%의 양성율을 보였으며 한우에서 ELISA 양성축 16두를 피내접종하여 전두수 음성으로 개체별 진단을 위한 ELISA 혈청검사의 적용은 신중한 검토가 필요하며 발생 경력의 농가는 혈청을 통한 항체검사와 피내접종을 병행 실시하여 질병 근절을 위한 다양한 검사법의 적용이 적합할 것으로 사료된다. 또한 조 등(1999)의 조사에 의하면 피내접종 양성축 10두를 검사하며 γ -IFN 검사에서 9두가 양성으로 확인되어 높은 일치율을 보였다. 또한 피내반응과 γ -IFN은 세포성면역에 의한 검사로 질병초기 검출, 항체검사는 체액성면역에 관계되어 질병 후반기의 검출이 적

합한 것으로 조사되고 있다(구, 2007). 특히 사슴과 같은 야생동물은 검진이 이루어지기 힘든 여건이므로 피내 접종 이외의 다른 검사법의 적용이 절실한 실정으로 혈청을 통한 ELISA 검사법 및 γ -IFN 검사 등의 적용과 우결핵과 사슴결핵과의 연계성에 대한 조사와 야생동물의 질병 전파의 매개체에 대한 연구 등 다양한 근절 접근 방향을 위한 근본적인 대책이 필요하다. 또한 국내 사슴에서의 녹혈 섭취와 녹용의 소비형태 등을 고려할 때 사슴의 결핵검진은 무시할 수 없는 국민 보건에 중요한 요인 중의 하나임으로 인수공통전염병에 대한 검진이 확대 시행되어야 할 것이다.

국내에서의 우결핵 진단은 피내접종이 고전적으로 사용되고 있으나 최근 γ -IFN 검사, ELISA 법과 조기 진단을 위한 PCR 방법 등이 이루어지고 있으므로 현장에서의 우결핵 검진도 사육두수의 1/3 이상 다두 발생 시 피내접종 이외 검사방법의 병행 실시 의무화와 조기근절을 위해서는 태반감염 등을 고려할 때 송아지를 포함한 전두수의 혈액검사가 필요할 것으로 사료된다. 또한 2009년부터 시행되는 한·육우를 대상으로 하는 결핵 ELISA 검사는 우선 한우 농가를 대상으로 인수공통 전염병인 결핵에 대한 홍보를 실시하면서 브랜드 한우 농장과 HACCP 인증추진 농장을 대상으로 우선 검사를 추진하여 한우 안정성에 대한 인식을 확대시킨 후 검사법에 대한 충분한 검증 후 점차적인 확대실시를 검토해야 할 것이며 더불어 집단 사육지역에서 질병 발생시 축종별, 지역별 결핵발생에 대한 역학적 연구를 기반으로 한 방역대책의 수립이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

*M. bovis*의 피내접종 양성축과 혈청을 통한 ELISA 항체가 검사 결과 젖소의 결핵병 피내접종 양성축 114두 중 75두(65.8%)가 양성, 음성축 848두에서 50두(5.9%)가 양성으로 판정되었으며 피내접종 의양성 25두 중 9두(36.0%)가 양성으로 나타났다. 또한 결핵 음성농가 젖소 197두 중 6두(3.0%)가 양성, 한우는 1,036두 중 16두(1.6%)가 양성이었으며 이를 결핵 피내접종한 결과 전 두수 음성이었다. 또한 사슴은 피내접종 양성축 40두 중 22두(55.0%)가 양성, 음성농가 78두 중 6두(7.7%)가 양성 결과를 보였다.

참 고 문 헌

- 강종구, 김창기, 권영방. 1996. 결핵 감염원에 대한 역학적 연구. 대한수의학회지 36(1): 31-38.
- 공신국, 이견택, 임종복, 양승민, 이요안나, 문순화. 2002. PCR기법을 이용한 췌소 결핵균 검색 분리 조사. 한국가축위생학회지 25(2): 135-140.
- 구혜정. 2007. 산업동물에서 zoonosis 연구동향. 소 결핵병 진단 기법의 최신 연구동향. 대한수의공중보건학회지 31(2): 83-90.
- 국정희, 심항섭, 고태오, 우종태, 조중현, 박유순. 1998. 경기지역의 우결핵 발생에 관한 역학적 고찰(1987~1996). 한국가축위생학회지 21(1): 1-12.
- 김용환, Al-Haddawi MH, 조호성, 강성귀, 조경오, 박형선, 이봉주. 2001. 소의 임상병리 가검물에서 *Mycobacterium* species 감별진단을 위한 multiplex PCR 기법. 대한수의학회지 41(4): 535-542.
- 김순복, 문운경, 서정향. 1993. 소 결핵균의 면역세포화학적 동정. 대한수의학회지 33(1): 119-123.
- 김종면. 1976. Tuberculin 양성 무병소유우의 감별진단에 관한 실험적 연구. 대한수의학회지 16(2): 151-158.
- 박응복, 김대용, 손용성, 서일복, 김재훈, 최철순, 이창우. 1996. 결핵환자로부터 이환된 개 결핵의 발생보고. 수의공중보건학회지 30(2): 135-140.
- 심항섭, 국정희, 박병욱, 김성열, 박유순. 1997. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 혈청 및 원유 중의 *Mycobacterium bovis* 항체 검출에 관한 연구. 한국가축위생학회지 20(2): 133-142.
- 유한상. 2007. 산업동물에서 zoonosis 연구동향. 소 결핵병의 국제 연구 동향. 대한수의공중보건학회지 31(2): 69-82.
- 조운상. 2007. 산업동물에서 zoonosis 연구동향. 국내 소결핵의 발생 및 연구동향. 대한수의공중보건학회지 31(2): 61-67.
- 김종만, 우승룡, 박용호, 유한상, 정석찬, 조운상, 김종엽, 안중삼. 1999. 비교 피내검사와 감마 인터페론 검사에 의한 우결핵의 진단. 대한수의학회지 39(6): 1119-1125.
- 최철순, 김재학, 이현수, 전윤성. 1978. Bovine tuberculin 개량에 관한 연구. 1. 저온살균 처리된 우결핵균 배양여액 및 균질세포질 유래 PPD's 특이성. 농시연보 17: 101-108.
- 정병열, 허문, 조동희, 조성근, 정석찬, 손동수. 1999. 우결핵 브루셀라병 검색 및 역학조사. 1. 우결핵의 진단법 연구. 수의과학검역원 연구보고서. 정인사: 142-171.
- Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. 1994. The tuberculin test. *Vet Microbiol* 40(1-2): 111-124.
- Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweddle NE. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J* 68(9): 286-290.