

## PCR 기법을 이용한 도축 소의 결핵병 신속진단

고바라다\*, 김현중, 박덕웅, 박성도, 김재익, 박종태, 김용환

광주광역시 보건환경연구원  
(접수 2007. 8. 16, 게재승인 2007. 9. 18.)

## Rapid diagnosis of bovine tuberculosis in slaughter cattle using PCR

Ba-Ra-Da Koh\*, Hyun-Joong Kim, Duk-Woong Park,  
Seong-Do Park, Jae-Ik Kim, Jong-Tae Park, Yong-Hwan Kim

Gwangju Metropolitan Health & Environment Research Institute, Gwangju, 500-210, Korea  
(Received 16 August 2007, accepted in revised from 18 September 2007)

### Abstract

Bovine tuberculosis is an important zoonosis worldwide. *Mycobacterium bovis*, the causative agent of this disease in cattle, is also a pathogen for humans and several economically important animals.

The cases of tuberculosis are reported in two cow found at slaughter house located in Gwangju city. Histopathologically, in the lymph nodes, granulomas consisted of large areas of necrosis surrounded by variable thick bands of cellular infiltrate containing macrophages, Langhans-type multinucleated giant cells and lymphocytes. Lesions in the lung followed the same developmental pattern as did lesions in the lymph nodes with some exceptions. With the acid-fast staining, numerous mycobacteria were revealed in the lung and lymph nodes.

*M bovis* was confirmed as a causative agent in these cattle using bacterial isolation and PCR and restriction fragment length polymorphism method based on a unique 12.7 kb fragment insertion sequence from the *Mycobacterium tuberculosis* genome and the *pncA* polymorphism. The insertion element IS6110 and IS1081 were present *M bovis* isolated from lungs and lymph nodes of cattle using PCR assay.

---

\*Corresponding author

Phone : +82-62-571-0498, Fax : +82-62-571-0496

E-mail: barada@hanmail.net

These cases are interesting and important in public health aspect that *M bovis*-infected cattle were found during a routine post-mortem inspection at slaughter house.

Key words : *Mycobacterium bovis*, IS6110, IS1081, PCR, *pncA*

## 서 론

*Mycobacterium bovis*는 우결핵의 원인체이며, 감염경로는 주로 감염된 동물의 분비물에 의하며, *M bovis*에 감염되면 호흡기 삼출물, 분변, 우유, 뇨 및 정액을 통해서 균체가 배출된다<sup>1)</sup>. *M bovis*는 이례적으로 소 이외에 넓은 숙주범위를 가지고 있어 염소, 고양이, 개, 돼지, 사자, 사슴, 영양류, 그리고 사람에서 감염을 일으킨다<sup>2)</sup>.

몇몇 연구에 의하면 선진국에서 *M bovis*에 의한 사람 감염률은 0.3~1.5% 정도라고 추정하고 있다<sup>3-7)</sup>. *M bovis*는 가축내, 야생동물내, 그리고 가축과 야생동물 사이에서 뿐만 아니라 동물에서 사람으로 또는 역으로 전파된다<sup>2)</sup>. 오염된 식품 특히, 주로 살균하지 않은 유제품 또는 감염동물과 직접 접촉에 의해 사람이 감염되는 주요 경로로 간주되고 있다<sup>6,8)</sup>. 사람 간의 전파례는 극히 드물어 몇 건에 불과하며 주로 면역결핍 환자 사이에서 확인되었다<sup>2,6,9)</sup>.

우리나라 농림부 자료에 의하면 2005년 229두, 2006년 160두, 2007년 8월까지 161두가 결핵 감염동물로 보고되었다. 영국, 아일랜드와 같은 일부 국가는 우결핵의 발생건수가 여전히 증가하고 있으며, 더욱이 개발도상국에서 가축의 *M bovis* 감염이 매우 빈발하고 있다<sup>3)</sup>. 이처럼, 여러 국가에서 *M bovis*는 경제적 손실을 일으키고 공중보건학적으로 심각한 피해를 일으키고 있다.

현재, 대부분 국가에서 우결핵 진단은 튜버쿨린 피내반응검사 (intradermal tuberculin test, ITT)을 이용하고 있으며, 우리나라에서도 젖소를 포함한 한우와 사슴에 대해 ITT를 이용한 결핵 검진과 박멸정책을 추진해 오고 있다.

*M bovis* 확인은 Ziehl-Neelsen (ZN) 염색방법과 4~6주가 소요되는 세균배양 등을 통해 이루어진다. 우결핵 검사에 가장 신뢰할 만한 "gold standard" 방법은 세균배양방법으로 여겨지고 있으며, 일반적으로 글리세롤을 함유한 Lowenstein-Jensen배지를 사용한다. ZN 염색방법은 신속하지만 특이성이 결여되고 민감도가 50% 정도로 낮다. ITT의 민감도는 보고자에 따라 차이는 있지만 약 70% 정도이며, 결핵 양성중 단지 19%에서만 *M bovis*가 분리되었다<sup>10)</sup>. 이렇게 민감도가 낮은 진단방법 때문에 인수공통질병의 대책마련을 위해 우결핵의 신속하고 정확한 진단법 개발이 요구되고 있다.

Polymerase chain reaction (PCR)은 수많은 *M tuberculosis* complex를 검출하는데 민감도와 특이도를 높이면서 검사기간도 단축할 수 있는 방법으로, 소의 조직시료에서 *M bovis*의 직접적인 검출에 특히 유용하였다. *M bovis* 확인을 위한 PCR 방법에 흔히 사용된 primer의 증폭산물은 결핵균에 특이한 삽입서열 (insertion sequence, IS)인 IS6110이었다<sup>11-15)</sup>. 이 유전자는 *M tuberculosis*의 유전자에서 일반적으로 5 copy 이상이며 *M bovis* (대부분 분리주는 1 copy만 보유)는 5 copy 이하이다<sup>16,17)</sup>. PCR 방법에 의한 결핵균의 검출한계는 1에서 100 균체 사이로 다양하다. IS6110은 1,358 bp로 양말단에는 30 bp의 대칭 반복배열 (inverted repeat)이 존재하고 *M tuberculosis* complex에서만 발견되는 특징을 가지고 있다<sup>17)</sup>. 한편, *M tuberculosis* complex에서 IS6110과는 매우 다른 삽입서열 IS1081이 5~6 copy가 발견되었으며, 크기는 1,324 bp이다<sup>18-20)</sup>. 최근, 소 림프절 육안병변에서 *M bovis*의 IS1081 유전자를 신속 검출하는데 신뢰할만

한 방법으로 PCR이 사용되었다<sup>21)</sup>.

Barouni 등<sup>22)</sup>은 pyrazinamidase (Pzase) 활성을 지령하는 *pncA* 유전자의 점돌연변이에 기초하여 *M tuberculosis*와 *M bovis*을 감별할 수 있는 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 방법을 개발하였다. 대부분의 *M bovis* 균주는 pyrazinamide (PZA) 약물에 대해 자연적으로 내성이 있지만, *M tuberculosis*는 PZA 내성이 거의 없다<sup>23-25)</sup>. 한편, *M tuberculosis*에만 삽입된 12.7-kb 절편 때문에 병원성과 숙주 범위의 차이가 생긴 것으로 추측되는 이 유전자를 기초로 하여 *M bovis*와 감별 진단할 수 있는 PCR 방법이 개발되었다<sup>26,27)</sup>.

축산물의 위생관리가 엄격히 시행되는 도축장에서 해체 검사과정중 발견된 도축금지 에 해당하는 결핵감염 의심 소에 대한 효율적인 처리절차를 위해서 신속한 실험실 진단이 요구됨에 따라 본 연구에서 결핵병 의심 소에 대해 실시한 항산성 염색, 병리조직학적 검사 그리고 PCR 방법 등을 이용하여 확립한 감별진단 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

2007년 광주지역에 소재한 도축장으로 출하된 소 2두 (한우 4세, 젖소 8세 각 1두)에서 발견된 폐결핵 병변으로부터 폐조직과 림프절내의 결절조직을 채취하여 병리조직검사, 미생물 배양, 항산성 염색, 그리고 우결핵 확인을 위한 PCR 검사를 하였다.

### 표준 mycobacterial DNA

본 실험에 사용된 *M bovis* AN5, *M bovis* BCG, 그리고 *M tuberculosis* 균주의 DNA 추출물은 국립수의과학검역원과 대한결핵협회로부터 받아 실험에 사용하였다.

### 병리조직학적 검사

폐조직은 병리조직검사를 위하여 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후 통상적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매 조직을 3 $\mu$ m 두께로 박절한 다음 hematoxyline & eosin (H&E) 염색을 하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

### 항산성 염색과 결핵균 분리배양

균분리를 위해 폐병변부위 조직 3g 정도를 세절하여 적당량의 sea sand와 5ml 멸균 생리식염수를 넣어 균질화시켰다. 균질액을 원심관에 넣고 4% NaOH 용액 5ml를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 15분간 반응시키고, 0.5% phenol red 1방울을 점적한 후 2% HCl 6.8 ml를 첨가하여 혼합한 후 용액이 노란색으로 변화할 때까지 소량씩 더 첨가하여 중화시켰다. 원심관을 4,000 rpm에서 10분 동안 원침하여 상층액은 버리고 침전물은 멸균 인산완충액(pH 7.4) 1ml를 첨가하여 부유시켜 ZN 염색과 균배양에 사용하였다. 균질액 0.1 ml를 slide에 얇게 도말하여 ZN 염색하여 검경을 통해 항산성균 유무를 확인하였다. 결핵균 배양을 위해서 균질액 0.1 ml를 Lowenstein-Jensen 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 3주 동안 배양하면서 균 발육을 관찰하였다.

### Polymerase chain reaction 검사

PCR을 위한 DNA 추출은 Miller 등<sup>28)</sup>의 phenol/chloroform 추출방법 일부를 변형하여 실시하였다. 폐병변 조직 (10~20 mg) 또는 조직침사원액 0.2 ml를 채취하여 nuclei lysis 용액 (Promega<sup>TM</sup>, USA) 500  $\mu$ l, proteinase K (20 mg/ml) 30  $\mu$ l를 포함한 MagNA Lyser Green Bead tube에 넣고 MagNA lyser 기기로 6,000 G에서 20초간 분쇄하여 65 $^{\circ}$ C에서 30분 반응시키고, phenol/chloroform/

isoamylalcohol (25:24:1, pH 8.0; Bioneer, Korea) 용액 300  $\mu$ l을 사용하여 단백질을 제거한 후 상층액을 isopropanol 600  $\mu$ l와 혼합하여 12,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 추출된 DNA는 70% ethanol 700  $\mu$ l로 2회 세척 후 65°C에서 5분 동안 건조하여 멸균 증류수 100  $\mu$ l에 용해하여 PCR 실험 전까지 냉동 보관하였다.

본 실험에 사용된 primer 염기서열과 PCR 반응조건은 표 1과 같다. PCR 반응을 위해 Prime Taq Premix (Genet Bio, Korea)를 사용하였다. 반응액은 추출한 주형 DNA를 1  $\mu$ l, 각 10 pmol/ $\mu$ l의 primer 1  $\mu$ l를 첨가하고 최종 부피는 멸균된 증류수로 20  $\mu$ l로 조정하였다(Table 1).

Table 1. Oligonucleotide primers used in PCR

Primer name	Sequence (5' to 3')	Locus	Annealing temp (°C)	Product (bp)	Reference
INS-1	CgT gAg ggC ATC gAg gTg gC	IS6110	72 → 65	245	29
INS-2	gCg TAg gCg TCg gTg ACA AA				
B1081F	AAg CgA gCT gAA CgC gCA CTg	IS1081	60	320	15
B1081R	TgA TgC CCA ggA TCT CTC gg				
CSB1K*	TTC CgA ATC CCT TgT gAA gTA gTA AT**	pncA	60	169	27
CSB2K	C**gg AgA gCg CCg TTg TA		60	339	
Mtuber***	CAA TgT TCg TCT gAA ATC gTT g		68	726	
P1	gTC ggT CAT gTT CgC gAT Cg	pncA	68	726	22
P6	gCT TTg Cgg CgA gCg CTC CA				

\* : CSB1K is common forward primer for two reverse primers, CSB2K and Mtuber.

\*\* : The attach oligonucleotides to primers by previously reported paper to improve PCR reaction conditions in this study.

\*\*\* : Mtuber primer was newly designed for *M tuberculosis* in this study.

PCR 반응은 T-Gradient Thermocycler (Whatman, Germany)와 PTC-200 (MJ Research, USA) 기기를 사용하였다.

IS6110 확인을 위해 Hermans 등<sup>29)</sup>이 개발한 primer를 이용하여 Zumarraga 등<sup>14)</sup>이 수정한 touch-down PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 1차 반응시킨 다음, 95°C 40초, 시작 annealing 온도 72°C 50초(반복회차마다 1°C씩 내림), 및 72°C 40초씩 8회 반복 후, 95°C 40초, 65°C 50초, 및 72°C 40초씩 30회 반복하여 반응시킨 후 최종 72°C에서 5분간 반응시켰다<sup>14)</sup>.

Bakshi 등<sup>27)</sup>이 보고한 *M bovis*와 *M tuberculosis* 감별을 위한 multiplex-PCR 반응과 IS1081 유전자와 PZA 내성을 확인하기 위한 PCR 반응조건은 표 1과 같다. PCR을 수행한 후 ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml)가 함

유된 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 자외선을 조사하여 band의 유무를 확인하였다.

#### pncA gene의 PCR-RFLP

분리균주의 PZA에 대한 자연내성과 관련된 pncA 유전자의 돌연변이를 확인하고자 증폭된 726 bp의 PCR 산물을 BstEII (New England Biolabs, UK)로 처리하여 절단하였다. 반응액 조성은 PCR 증폭산물 10  $\mu$ l, bovine serum albumin(10  $\mu$ g/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, BstEII (10 u/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l, 10× NE Buffer 3을 2.0  $\mu$ l를 첨가한 후 멸균 증류수로 총 부피를 20  $\mu$ l로 조정하여 60°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 절단된 DNA 단편을 확인하고자 실시한 전기영동은 상기 내용과 같다.

## 결 과

### 육안소견

광주지역 소재 도축장에 출하된 소 2두의 폐에서 결핵병변양 육아종이 폐조직과 림프절에서 관찰되었다 (Fig 1). 폐조직내에서 다양한 크기의 결절이 관찰되었으며, 절단면은 황색으로 단단한 경도를 나타냈으며, 치즈양 물질이 흘러나왔다 (Fig 2). 육아종성 병변 절단할 때 모래를 자르는 느낌과 황색으로 단단한 경도를 보였다.

특히 한우의 경우 우폐 상엽 흉막의 파열로 인해 흉강 내 지방조직의 표면에 다양한 크기의 수많은 육아종성 병변이 관찰되었다.

### 병리조직학적 소견

대부분 폐 절단면에서 결핵양 육아종과 수많은 결절이 발견되었다. 폐포벽과 세기관지 부위에 섬유소로 피막화된 수많은 결절, 림프구, 그리고 단핵구들이 관찰되었다. 대부분 육아종의 중심부는 석회화된 괴사, 주변부는 염증세포들의 혼재 그리고 얇은 결합조직으로 둘러싸여 있었다. 염증세포는 수많은 호중구, 림프구, 대식세포, 상피모양세포 그리고 다핵거대세포들로 구성되었다. 소엽사이막과 흉막은 결합조직의 증식과 염증세포의 침윤으로 비후되었다.

우형결핵에 감염된 림프절에서 일반적으로 네 가지로 분류될 수 있는 육아종성 병변 단계가 관찰되었다.

‘초기단계’의 육아종성 병변에는 림프구가 산재해 있고 약간의 호중구와 함께 불규칙하고 피막이 없는 상태의 상피모양 대식세포들이 관찰되었다. 랑한스 거대세포가 가끔 존재하지만 괴사는 관찰되지 않았다 (Fig 3A).

두 번째인 ‘경화단계’에서 육아종은 주로 상피모양 대식세포가 침착되어 있었으며, 얇은 피막에 의해서 일부분 또는 완전하게 들

러 쌓여 있었다. 림프구, 호중구 그리고 랑한스 거대세포가 침윤되어 있었으며, 가끔 출혈 부위도 관찰되었다. 괴사부위도 종종 존재했으며, 일반적으로 괴사성 염증세포들로 구성되었다 (Fig 3B).

완전히 피막화된 육아종을 가진 ‘괴사초기 단계’에서의 중심부는 건락화와 광물질화된 괴사부위가 존재하였다. 상피모양 대식세포와 랑한스 거대세포가 괴사부위의 주변부위를 둘러싸고 있었다. 림프구와 혼재된 대식세포의 주변부위는 림프구의 침윤도 관찰되었다 (Fig 3C).

두꺼운 피막, 크고, 불규칙하며, 여러 개의 중심부, 그리고 석회화된 부위가 있는 ‘괴사와 광물화된 단계’인 육아종이 관찰되었다. 상피모양 대식세포와 여러 개의 핵을 지닌 거대세포가 괴사부위 주변부에 존재하였으며, 특히 섬유화된 피막의 주변부 근처에 림프구의 침윤이 관찰되었다 (Fig 3D).

### 항산성 염색 및 결핵균배양 결과

세균배양을 위해 처리된 조직침사원액에 대한 항산성 염색 결과 붉은색의 긴 간균들이 현미경하에서 관찰되었다 (Fig 4).

Lowenstein-Jensen 배지에서 3주째부터 소수의 집락이 관찰되기 시작하였으며, 균주는 담황색으로 표면이 약간 거친 집락을 형성하였다 (Fig 5). 분리된 결핵균의 동정을 위해서 PCR 검사를 실시하였다.

### PCR 결과

도축장에 출하된 2마리 소에서 발견된 폐 육아종성 병변과 이들로부터 분리된 균주와 양성대조인 *M bovis* AN5, *M bovis* BCG 그리고 *M tuberculosis* 균주로부터 추출된 DNA에 대해 PCR을 실시하였다. *M tuberculosis* complex에 특이적으로 존재하는 IS6110과 IS1081 삽입 유전자 확인을 위한 PCR 실험결과 각각 245 bp (Fig 6A)와 320 bp



Fig 1. Granulomatous inflammation and caseation of the lymph node. The enlarged mediastinal lymph node with granulomatous lesions (inset).



Fig 2. The cut surface of the granulomatous lesions was white encapsulated nodule and yellowish cheese-like pus (inset) in the lung.

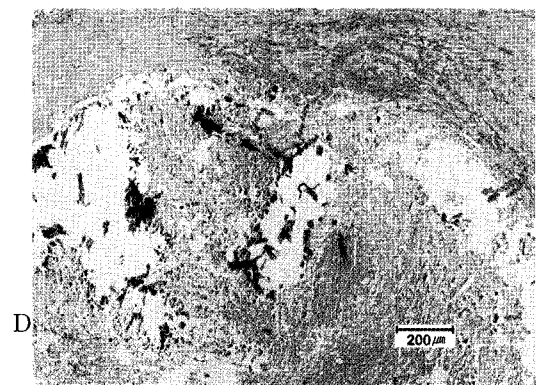
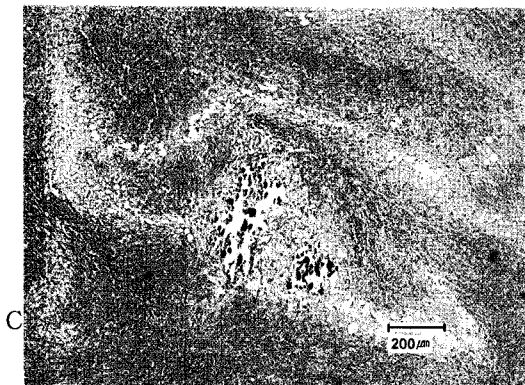
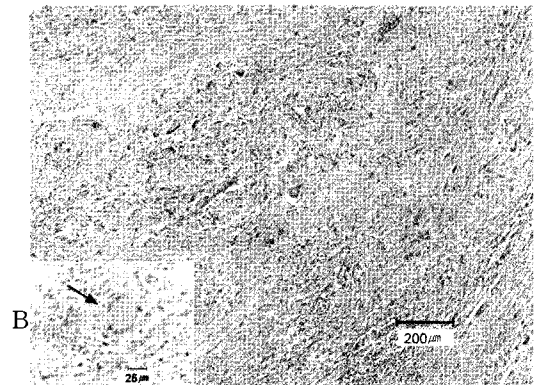
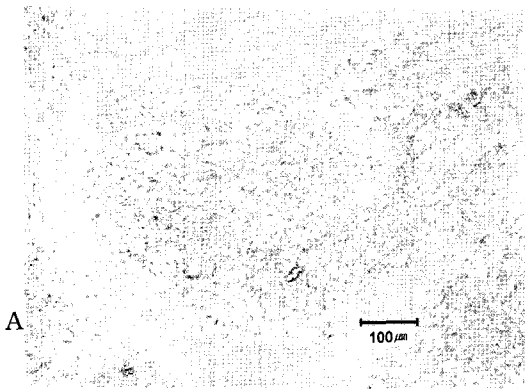


Fig 3. Four stages of granulomas in lymph nodes from cattle infected with *M bovis*. (A) Initial stage. Irregular unencapsulated clusters of epithelioid macrophages were seen. there was no necrosis. (B) Solid stage. Granulomas were composed primarily of epithelioid macrophages including Langhans' giant cell (arrow) and were enclosed partly by a thin capsule. (C) Minimal necrosis stage. The central necrotic areas of granulomas were caseous and mineralized. (D) Necrosis and mineralization stage. Thickly encapsulated, large, irregular granulomas with caseous necrosis and extensive islands of mineralization were seen. HE.

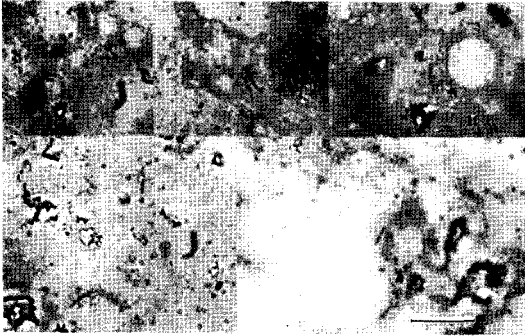


Fig 4. *Mycobacterium bovis* bacteria using acid-fast Ziehl-Neelsen stain; Magnified 1000 ×. bar=20μm.

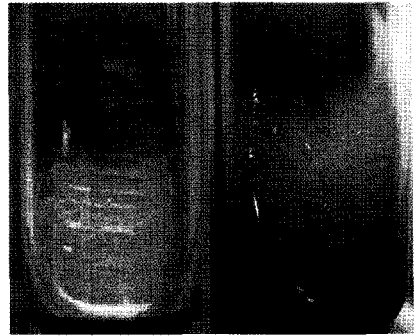


Fig 5. Colonies of *Mycobacterium bovis* on Lowenstein-Jensen medium.

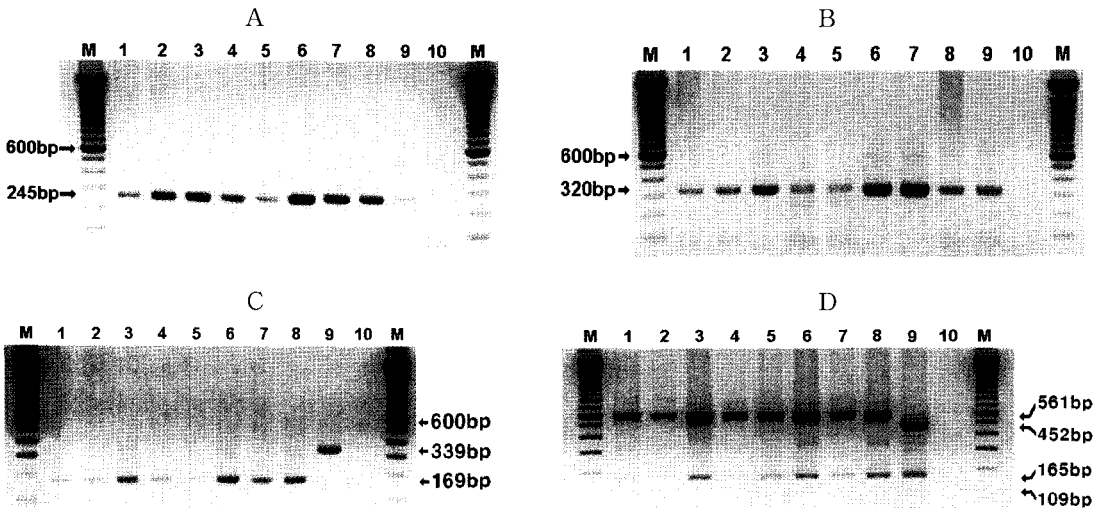


Fig 6. (A, B) Gel electrophoresis of PCR products of the IS6110 (panels A) with INS1-INS2 primers and IS1081 (panels B) with B1081F-B1081R primers run on 1.5% agarose gel. (C) Ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel showing PCR products amplified from different samples and mycobacterial species by multiplex-PCR assay with CSB1K-CSB2K-Mtuber primers. (D) Identification of polymorphism at *pncA* nucleotide 169. RFLP after digestion with BstEII of PCR products amplified with P1-P6 primers. The 561 bp and 165 bp products obtained for *M bovis*, while three fragments of 452 bp, 165 bp and 109bp were obtained in *M tuberculosis*. Lanes: (M)100 bp molecular size marker; (1)lung from Hanwoo; (2)lymph node from Hanwoo; (3)*M bovis* isolate from Hanwoo; (4)lung from Holstein; (5)lymph node from Holstein; (6)*M bovis* isolate from Holstein; (7)*M bovis* AN5; (8)*M bovis* BCG; (9)*M tuberculosis* positive control; (10)negative control.

(Fig 6B) 크기의 증폭산물이 확인되었다. 따라서 결핵양 육아종이 발견된 2마리 소 모두 결핵 감염 소로 판정되었다.

*M tuberculosis*에만 삽입된 12.7-kb 절편이 *M bovis*에서는 결여된 염기서열을 기초로

하여 Bakshi 등<sup>27)</sup>이 보고한 multiplex-PCR 방법을 표 1과 같이 수정하고 본 연구에서 새롭게 설계한 primer를 이용하여 우결핵 의심된 개체에 대해 감별진단을 실시한 결과 한우와 젓소의 육아종성 병변과 분리균주 그

리고 *M bovis* AN5, *M bovis* BCG 모두에서 *M bovis*에 특이적인 169 bp 크기의 증폭산물이 관찰되었으며, *M tuberculosis* 양성대조에서는 339 bp 크기의 증폭산물만 관찰되었다 (Fig 6C). 따라서 감염 소에서 IS6110과 IS1081 유전자의 확인뿐만 아니라 *M bovis*의 감염으로 진단되었다.

### *pncA* gene의 PCR-RFLP 결과

소에서 분리된 *M bovis* 균주들의 PZA에 대한 자연내성과 관련된 *pncA* 유전자의 돌연변이를 이용하여 *M tuberculosis*와 *M bovis*를 감별하기 위해 PCR-RFLP 실험을 하였다. 육아중성 병변과 양성대조 균주 모두에서 726 bp 크기의 *pncA* 유전자가 증폭되었으며, 이들 증폭산물에 대해 점돌연변이 유무를 확인을 위해 BstEII 제한효소로 처리한 결과 *M tuberculosis*는 452 bp, 165 bp, 그리고 109 bp 크기로 절단되었으며, 분리된 *M bovis*와 *M bovis* AN5, *M bovis* BCG 양성대조에서는 561 bp와 165 bp 크기로 절단되었다 (Fig 6D). 따라서 분리된 *M bovis*는 PZA에 대해 내성을 가진 것으로 확인되었으며 *M bovis*로 감별 진단되었다.

## 고 찰

우결핵병은 인수공통전염병 중 공중보건학적 측면과 경제적 손실에서 중요한 질병으로 취급되고 있으며, 우리나라에서도 오래전부터 국가 정책적으로 박멸프로그램을 수행해오고 있다. 농림부 가축방역협의회 통계자료에 의하면 2002년 이후부터 매년 평균적으로 430,000여 두의 젖소에 대해 ITT 방법으로 결핵검진을 실시하여 매년 210여 두의 결핵 감염 소를 색출하였으며, 검색률은 0.03~0.07% 수준이 유지되고 있다.

Collines 등<sup>30)</sup>은 우형 결핵균이 사람에게도 감염되어 질병을 일으킨다고 언급하였고, 선진국에서 *M bovis*의 사람 감염률 0.3~

1.5% 수준이라고 추정하고 있다<sup>3-7)</sup>. 하지만 현재까지 우리나라에서는 우형결핵균에 의한 사람결핵 발생 예가 아직 보고된 바 없다고 할지라도 그 위험성을 간과할 수는 없다.

육아중성 병변에 대한 병리조직학적 검사 결과 결핵병변의 특징인 대식세포, 상피모양 대식세포, 다핵 거대세포 그리고 림프구가 피사부위와 주변부에서 관찰되었으며, 섬유화, 건락화, 광물화된 피사부위가 역시 관찰되었다. 육아중성 병변으로부터 결핵균 분리와 배양은 매우 느리고 실험실 진단을 위해서 시료 속에 질병의 중증기에 약 10-100 cfu의 생존균체가 존재하는 정도로 요구된다<sup>31,32)</sup>. 더욱이 이런 과정은 배양하는데 2-3개월이 소요되고 분리주의 생화학 동정을 위해 2-3주가 더 소요된다. 또한, 배양 민감도가 100%가 아니며, 위음성의 결과도 나타난다<sup>33)</sup>. PCR방법은 10 fg 정도의 DNA를 검출할 수 있으며, 약 2개 균체에서 추출된 양에 해당한다<sup>34,35)</sup>.

이처럼 전통적인 결핵 진단법 단점을 보완하고자 분자생물학적 기법들이 시도되었는데 그중 민감도와 특이도가 우수한 PCR 방법이 현재 널리 사용되고 있다. PCR 기법에 이용되는 IS6110의 경우 *M tuberculosis*는 copy 수가 대부분 6개 이상 되나 *M bovis*는 이보다 적거나 대부분 한 copy만 존재하지만, IS1081은 *M tuberculosis* complex에 대한 copy 수가 6개 이상 존재한다고 보고되었다<sup>16,17)</sup>. 역학조사와 분리균주들간의 구별을 위해 IS6110과 IS1081을 표적으로 이용하여 RFLP 방법으로 *M bovis*를 검사한 결과 IS6110보다 IS1081이 copy 수는 더 많았으나, 다형성에 의한 변별력은 IS6110이 더 크게 뛰어나다고 보고하였다<sup>15)</sup>. 본 실험에서는 IS6110과 IS1081 유전자를 이용한 이전 연구자<sup>15,29)</sup>들의 PCR 기법을 사용하여 육아중성 병변과 분리균주로부터 이들 유전자를 확인할 수 있었다.

과거, *M tuberculosis* 특이적인 mtp-40 유전자와 *M bovis*에 특이적인 500 bp DNA 절편을 이용한 PCR 방법으로 이들 두 병원체를 감별해 왔지만<sup>34-36)</sup>, 이들 mtp-40 유



전자는 일부 *M tuberculosis*에서 발견되지 않아 *M bovis*와 감별진단에 유용하지 않지만 이 유전자절편은 *M bovis*에는 존재하지 않는다고 보고하였다<sup>37,38</sup>). 최근, Zumarraga 등<sup>26</sup>)은 12.7 kb 절편이 *M tuberculosis* 균주들에만 유일하게 존재하며, *M bovis* 균주들에는 결여되어 있다고 보고하였으며, PCR 기법으로 이들 병원체를 감별하였다. *M bovis*에서 12.7 kb 부위의 결여 때문에 숙주 세포내로 침입과 매우 밀접하게 관련된 4개의 operon중 한 개인 *mce-3* operon의 대부분이 제거됨으로써 두 균종에서 병원성과 숙주 범위에 특성이 달라진 것으로 추측하고 있다.

한편, Bakshi 등<sup>27</sup>)은 multiplex-PCR 방법으로 *M bovis*는 168 bp, *M tuberculosis*는 337 bp를 특이적으로 증폭시켰으며, 다양한 비결핵 항산균에 대해서는 PCR 증폭산물이 생성되지 않았다고 보고하였다. 하지만, 본 연구에서는 안정적인 실험결과를 얻기 위해서 Bakshi 등<sup>27</sup>)이 보고한 2종의 primer의 annealing 온도가 유사하도록 수정하였고, 1종은 새롭게 설계하였다. 본 연구에 사용된 *M bovis*와 *M tuberculosis*의 공통 forward primer인 CSB1에 9개 뉴클레오타이드, *M bovis*에 특이적인 CSB2 primer에 뉴클레오타이드 1개를 표 1과 같이 추가하였다. Bakshi 등<sup>27</sup>)이 보고한 *M tuberculosis*에 특이적인 CSB3 primer는 Gene bank에 보고된 Z79701의 염기서열과 정확하게 일치하지 않았을 뿐만 아니라 *M tuberculosis*에 특이적인 337 bp가 증폭되지 않고 250 bp가 증폭되었다 (자료 미제시). 따라서 본 연구에서 새롭게 설계한 *M tuber* primer와 multiplex PCR 반응조건을 일부 수정하여 실험한 결과 *M bovis* AN5와 BCG 균주 그리고 검사대상물에서는 *M bovis*에 특이적인 169 bp가 증폭되었으며, 대조로 사용된 *M tuberculosis*에서는 339 bp가 특이적으로 증폭되었으며 (Fig 6C), 이 방법은 소에서 실제적인 우형 결핵균의 존재를 증명하기 위한 신속하고 정

확한 진단에 유용할 것으로 생각된다. 그러나 좀 더 많은 *M tuberculosis* complex에 대해서 특이성과 민감도에 대한 추가적인 검증 실험이 요구될 뿐만 아니라 *M bovis*와 *M tuberculosis* 이외의 결핵균에 감염되었을 때 위음성 결과를 예방하려면 copy 수가 대부분 1개인 IS6110보다는 copy 수가 많은 IS1081 유전자와 병행하여 검사하는 것을 추천한다.

사람에서 결핵병 치료제로 사용되는 PZA에 대한 일반적인 감수성 시험은 이 약물의 존재하에 결핵균의 성장에 의존하기 때문에 시간이 많이 소요되며, PZA 활성을 위해 강산성 배지를 사용하기 때문에 결핵균의 성장이 영향을 받아 시험 결과의 신뢰성이 떨어진다<sup>39,40</sup>). 약물 저항성과 관련된 돌연변이 검출을 위한 DNA 염기서열분석 등의 유전자검사가 분리된 결핵균에 적용되어 왔다<sup>41</sup>). PZA는 전구약물이며 Pzase에 의해서 독성형인 pyrazinoic acid로 대사되며 대부분의 결핵 균종들이 이 효소를 생산한다<sup>25</sup>). Pzase 활성과 관련된 *pncA* 유전자에 발생한 돌연변이 때문에 *M bovis*는 PZA 약물에 저항성을 지니고 있지만, *M tuberculosis*는 PZA에 내성이 거의 없다<sup>23-25</sup>). PZA에 자연내성을 지닌 거의 모든 *M bovis*는 *pncA* 유전자에 발생한 독특한 점돌연변이(C169G) 때문이며, 이 때문에 histidine이 aspartic acid로 치환됨으로써 불활성 효소를 생산하여 PZA에 저항성을 가진다<sup>25,42</sup>). *M bovis* (C169G)의 *pncA* 유전자에 자연적으로 발생한 다형성은 *M tuberculosis*와 *M bovis*를 감별하는 수단으로 이용되었으며<sup>42</sup>), Barouni 등<sup>22</sup>)은 *pncA* 유전자의 점돌연변이에 기초하여 *M tuberculosis*와 *M bovis*를 감별할 수 있는 PCR-RFLP 방법<sup>22</sup>)과 Allele-specific PCR 기법<sup>43</sup>) 등이 개발되었다. 본 연구에서 검사대상물로부터 분리된 *M bovis*에 대한 *pncA* 유전자의 점돌연변이 확인을 위해 PCR-RFLP를 실시한 결과 다른 연구자들이 보고한 것과 같이 726 bp 크기의 *pncA* 유전자가 561

bp와 165 bp 크기의 절편으로 절단되어 169번째 뉴클레오티드가 guanine임을 알 수 있었으며, 대조실험으로 사용된 *M tuberculosis*는 452 bp, 165 bp, 그리고 109 bp의 세 가지 크기의 절편이 확인되었다 (Fig 6D).

*pncA* 유전자에서 169번째 뉴클레오티드에 대한 다형성의 연구결과 모든 *M bovis* 균주들이 이 위치에서 같은 뉴클레오티드(guanine)를 가진 것은 아니었다.

Sreevatsan 등<sup>44)</sup>은 *pncA* 유전자에서 169번째가 guanine이 아닌 cytosine을 가진 두 개의 *M bovis* 분리주를 발견했는데 홍미롭게도, 염소에서 분리된 *M bovis*에서 이런 치환이 발견되었다. 하지만, PZA에 감수성이 있는 *M tuberculosis*에서는 *pncA*의 169번째에 cytosine이 guanine 염기로의 돌연변이는 존재하지 않았다<sup>43)</sup>. 따라서 Niemann 등<sup>45)</sup>은 정상숙주가 소이며 PZA에 저항성을 가진 *M bovis* subtype *bovis*로, 양과 염소가 정상숙주이며 PZA에 감수성이 있는 *M bovis* subtype *caprae*로 *M bovis*를 두 개의 아형으로 분류하자고 제안하였다.

광주지역에 출하된 2마리의 소에 대해 해체 후 도축과정중 육안검사에 의해서 결핵감염소로 추정되는 폐결핵병변이 발견되어 병리조직검사와 PCR 방법 등의 정밀검사를 통해 우결핵 감염 소로 판정되었다. 2마리의 결핵감염소 중 한우 출하농가에 대한 가축방역기관의 역학조사결과 농장 내 사육중인 29두에 대해 ITT 방법으로 결핵검진을 한 결과 감염 소 10두를 추가적으로 색출하였다. 따라서 도축장 출하 소에 대한 해체검사과정에서 우결핵 감염 소의 색출이 공중보건학적 측면과 역학조사의 중요성 그리고 농가의 막대한 경제적 손실의 사전예방 측면에서 좋은 예가 될 것으로 생각된다.

최근, 도축장에 출하된 한우의 혈액시료로부터 ELISA방법으로 *M bovis*의 항체검출 그리고 multiplex PCR 기법으로 *M bovis*의 유전자를 확인하였다고 김<sup>46)</sup>이 보고한 결과와 본 연구에서 도축장 출하 소에 대한 결핵

감염소 발견은 공중보건학적 측면에서 매우 중요한 문제가 아닐수 없다. 즉, 도축장의 해체검사과정에서 결핵 감염 소를 발견하지 못했을 때 우려되는 문제점을 고려한다면 현재 ITT 방법으로 젖소에 한하여 결핵검진을 시행하고 있는 우리나라의 우결핵 검사제도의 획기적인 개선, 도축장 해체검사의 인력보강, 그리고 새로운 결핵검사법 적용이 절실히 요구되고 있다.

## 결론

2007년 광주지역에 소재한 도축장에 출하된 소 2두에서 발견된 폐결핵 병변에 대한 병리조직검사, 결핵균 배양, 항산성 염색, 그리고 우결핵 확인을 위한 PCR 검사결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 병리조직학적으로 육아종성 병변은 다핵 거대세포, 광범위한 건락괴사, 피막화, 그리고 광물질화된 괴사부위가 관찰되었다.
2. 폐와 림프절의 육아종성 병변에서 항산성 염색성을 나타내는 간균이 관찰되었으며, 이들 재료를 Lowenstein-Jensen 배지에 접종하여 담황색의 집락을 관찰하였다.
3. 폐병변조직과 분리된 균주에 대한 *M tuberculosis*의 특이적인 12.7-kb 절편에 기초한 PCR 검사결과 *M bovis*로 동정되었으며 IS6110과 IS1081 유전자도 동시에 확인되었다.
4. 분리된 *M bovis*에 대해 *pncA* 유전자의 돌연변이 검사결과 169번째 뉴클레오티드가 guanine으로 확인되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 연구에 사용된 PCR 기법 등은 도축과정중에 발견된 결핵 의심 소에 대한 신속하고 정확한 실험실 진단을 위한 유용한 방법이며, 특히 사람에서 *M bovis* 전파감염을 감시하는데 필요한 역학적 도구로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, et al. 1994. *Mycobacterium* species. In *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby Wolfe, London : 156.
2. O'Reilly LM, Daborn CJ. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 76 (Suppl 1) : 1-46.
3. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, et al. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4(1) : 59-70.
4. Cousins DV, Williams SN, Dawson DJ. 1999. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: DNA typing of isolates, 1970-1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 3(8) : 722-731.
5. Cowan LS, Diem L, Monson T, et al. 2005. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 43(2) : 688-695.
6. Gibson AL, Hewinson G, Goodchild T, et al. 2004. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 42(1) : 431-434.
7. Robert J, Boulahbal F, Trystram D, et al. 1999. A national survey of human *Mycobacterium bovis* infection in France. Network of Microbiology Laboratories in France. *Int J Tuberc Lung Dis* 3(8) : 711-714.
8. Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, et al. 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 8(8) : 924-937.
9. Blazquez J, Espinosa de Los Monteros LE, Samper S, et al. 1997. Genetic characterization of multi-drug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 35 (6) : 1390-1393.
10. McIlroy SG, Neill SD, McCracken RM. 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet Rec* 118(26) : 718-21.
11. Fisanotti JC, Alito A, Big F, et al. 1998. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 28 : 2051-2058.
12. Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, et al. 1991. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 29 : 712-717.
13. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, et al. 1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 18 : 188.
14. Zumarraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, et al. 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J Vet Diagn Invest* 17(3) :

- 232-238.
15. 방혜은, 이해영, 이진희, 등. 1998. 우결핵의 역학조사를 위한 *Mycobacterium bovis*의 분자생물학적 감별기법. 한국수의공중보건학회지. 22(2) : 123-130.
  16. Cousins DV, Williams SN, Ross BC, et al. 1993. Use of a repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 37 : 1-17.
  17. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (18) : 9869-9874.
  18. Collins DM, Stephens DM. 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett* 67(1) : 11-15.
  19. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, et al. 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 30(7) : 1772-1777.
  20. Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, et al. 1993. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *J Clin Microbiol* 31(5) : 1143-1147.
  21. Taylor GM, Worth DR, Palmer S, et al. 2007. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res* 3:12.
  22. Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MTP, et al. 2004. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes* 18(3) : 167-170.
  23. Konno K, Feldmann FM, McDermott W. 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis* 95 : 461-469.
  24. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, et al. 2000. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44 : 2291-2295.
  25. Scorpio A and Zhang Y. 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 2 : 662-667.
  26. Zumarraga MJ, Big F, Alito A, et al. 1999. A 12.7-kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. *Microbiology* 145 : 893-897.
  27. Bakshi CS, Shah DH, Verma R, et al. 2005. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Vet Microbiol* 109 : 211-216.
  28. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure

- for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 : 1215.
29. Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, et al. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 28(9) : 2051-2058.
  30. Collins GH, Grange JM. 1983. The bovine tubercle bacillus. *J Appl Bacteriol* 55 : 13-29.
  31. Barry T, Glennon M, Smith T, et al. 1993. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. *Vet Rec* 132(3) : 66-67.
  32. Bates J, Brennan P, Dougals WG, et al. 1986. Improvements in the diagnosis of tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 134 : 415-417.
  33. Duffield BJ, Norton JH, Hoffman D. 1989. An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic mycobacteria from cattle in Northern Queensland. *Aust Vet Res* 103 : 420-425.
  34. Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, et al. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 9 : 2131-2138.
  35. Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. 1991. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 29(10) : 2163-2168.
  36. 김용환, Al-Haddawi MH, 조호성, 등. 2001. 소의 임상병리 가검물에서 *Mycobacterium* species 감별진단을 위한 multiplex PCR 기법. *대한수의학회지* 41 : 535-542.
  37. Shah DH, Verma R, Bakshi CS, et al. 2002. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 214(1) : 39-43.
  38. Weil A, Plikaytis BB, Butler WR, et al. 1996. The mtp40 gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 34: 2309-2311.
  39. Davies AP, Billington OJ, McHugh TD, et al. 2000. Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 38 : 3686-3688.
  40. Hewlett D Jr, Horn DL, Alfalla C. 1995. Drug-resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. *JAMA* 273 : 916-917.
  41. Piatek AS, Tyagi S, Pol AC, et al. 1998. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotechnol* 16 : 359-363.
  42. Scorpio AD, Collins D, Whipple D, et al. 1997. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol* 35 : 106-110.
  43. Espinosa de los Monteros LE, Galan JC, Gutierrez M, et al. 1998. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing

- Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis* *pncA* sequence polymorphism. *J Clin Microbiol* 36 : 239-242.
44. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, et al. 1997. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 41 : 636-640.
45. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. 2000. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M bovis*. *J Clin Microbiol* 38 : 152-157.
46. 김용환. 2002. 소의 임상가검물에서 *Mycobacterium* species 감별진단을 위한 multiplex PCR과 *in situ* hybridization의 활용. 전남대학교 박사학위논문. 36-55.