

한우 결핵의 신속 감별진단을 위한 등온증폭법 개발

황은숙 · 이태욱¹ · 정대영¹ · 조호성*

전북대학교 수의과대학 및 생체안전성연구소, ¹전라남도축산위생사업소

(접수 2011. 11. 24; 수정 2011. 12. 2; 게재승인 2011. 12. 5)

Development of loop-mediated isothermal amplification method for the rapid and sensitive detection of bovine tuberculosis in Korea native cattle

Eun-Suk Hwang, Tae-Uk Lee¹, Dae-Young Jung¹, Ho-Seong Cho*

College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
¹Jeollanam-do Livestock Sanitation Office, Gangjin 522-822, Korea

(Received 24 November 2011; revised 2 December 2011; accepted 5 December 2011)

Abstract

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was developed to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and non-tuberculous mycobacterium (NTM) genomic DNA in blood samples of Korea native cattle. A set of four primers, two outer and two inner, were designed from *M. bovis* and *M. avium* genomic DNA targeting the IS6110 and 16S rRNA gene, respectively. Based on 85 Intradermal Tuberculin Test (ITT) positive blood sample and using conventional PCR and LAMP, the agreement quotient (κ), which measures agreement beyond chance were 0.93 (conventional PCR) and 0.97 (LAMP), respectively. The detection limit of the LAMP method was 2.0×10^2 copy/ml *M. bovis* and *M. avium* cells, compared to 2.0×10^3 copy/ml *M. bovis* and *M. avium* cells for conventional PCR. These results suggest that the LAMP is a powerful tool for rapid, sensitive, and practical detection of MTC and NTM in blood samples of Korea native cattle.

Key words : Bovine tuberculosis, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Mycobacterium bovis*

서 론

결핵은 *Mycobacterium*속 균의 감염에 의해 전신 장기에 결핵결절을 형성하는 만성 소모성 질환으로 사람을 포함한 많은 동물에서 발생하는 인수공통전염병이다(LoBue 등, 2010). 결핵을 일으키는 결핵균은 인형 결핵균군(*Mycobacterium tuberculosis* complex; MTC, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*를 포함)과 한센병을 유발하는 *M. leparae* 및 이 둘을 제

외한 모든 항산성균인 비결핵성 마이코박테리움(Non-tuberculous mycobacterium, NTM)으로 분류되고 있다(Ryoo 등, 2008).

소 결핵(Bovine tuberculosis)은 *M. bovis* 감염에 의해 유발되는데 우리나라를 포함한 많은 나라에서 오랫동안 퇴치를 위한 노력을 하고 있음에도 불구하고 전 세계적으로 연간 30억만 달러의 경제적 피해를 주는 것으로 추정되고 있다(Schiller 등, 2010). 소 결핵 박멸을 위해 대부분의 나라에서 양성우 살처분 정책 및 도축장 예찰방법을 적용하고 있다. 그러나 근절이 쉽지 않은데 이는 한우, 사슴 같은 동물들에 대한 체

*Corresponding author: Ho-Seong Cho, Tel. +82-63-270-4872, Fax. +82-63-270-3780, E-mail. hscho@jbnu.ac.kr

계적인 검진이 시행되지 않은 문제와 함께 야생동물에 의한 재감염, 동물의 이동증가, 진단법의 한계성, 우군의 크기 증가 등 다양한 원인이 있는 것으로 파악되고 있다(유, 2007; Cho 등, 2006b; Schiller 등, 2010).

국내에서는 결핵 및 브루셀라 방역 실시 요령에 따라 젖소에서는 단일 피내 검사법을 통해 양성인 개체에 대해 살처분이 의무화 되어 있다. 그러나 단일 피내검사법(Intradermal tuberculin test, ITT)의 경우 양성에 대한 특이성의 문제점이 종종 야기되고 있는데 이는 *M. paratuberculosis*와 *M. avium* 감염이나, 소 결핵균과 항원구조가 유사한 세균(*Norcardiae*, *Corynebacteriae*, *Actinomyces*) 등에 의하여 튜버클린의 교차반응으로 비특이 반응에 의해 양성으로 판정되기 때문이다. 따라서 이러한 비특이 양성 반응우가 살처분됨으로써 축산 농가의 경제적 손실을 가져오고 있다(Ryoo 등, 2008).

이에 반해 국내 한우에서의 결핵검진은 젖소와는 달리 의무화되어 있지 않고 농가의 자율적인 요청에 의해 수행되고 있다. 그러나 국내 한우에서의 결핵 발병 증례는 도축장에서 도축 검사시 결핵 결절이 확인된 예로 2007년 광주에서 1두, 충북에서 8두가 보고된바 있다(고 등, 2007; 변 등, 2007). 이와는 대조적으로 2009년 경기도의 총 2,693농가 한우 32,385두에 대해 ITT 결핵 검진 결과 전 두수에서 음성 결과를 얻었다고 보고(신 등, 2011)한 바 있어서 한우에서의 결핵에 대한 연구는 지속적으로 수행되어야 하며 기존의 진단법과 병용할 간편하고 현장에서도 활용이 가능한 진단법의 개발도 필요할 것으로 생각된다.

등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)은 기존의 중합효소 연쇄반응법과 유사하지만 기존의 중합효소 연쇄반응이 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension)의 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, 일정한 단일 온도에서 접합 및 신장이 가능하다는 특징이 있는 방법으로 원리는 Fig. 1과 같다(Notomi 등, 2000). 이 방법은 일정한 단일 온도만 유지시켜 주면 주형 DNA의 증폭이 가능하기에 기존의 PCR 증폭법보다 진단 소요시간도 1시간 이내로 줄일 수 있으며 무엇보다 고가의 PCR 장비가 아닌 등온 유지가 가능한 항온 수조나 오븐, 온장고 등 저가의 간이 장비만으로도 유전자 증폭이 가능하기 때문에 현장 중심의 진단이 가능하다는 장점을 갖고 있다(Cho 등, 2006a).

따라서, 이번 연구에서는 국내 한우의 혈액 시료에서 현장 상황에서도 결핵을 감별진단할 수 있는 등온증폭법을 개발하고 이를 활용하여 현재 시행하고 있는 결핵 검진 프로그램과 접목하여 방역 대책 수립하는데 일조하고자 하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

공시재료

이번 연구에서는 2010년부터 2011년까지 전남지역에서 우형결핵균 배양액에서 준비한 purified protein derivaives (PPD) 항원을 이용한 피내반응 검사(intraderal tuberculin test, ITT)결과 소결핵 양성으로 진단된 38마리와 한우와 음성으로 진단된 47마리 동거 한우의 혈액 시료를 대상으로 하였다. 또한, 실험에 이용된 균주는 농림수산검역검사본부에서 *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294), *M. bovis* (ATCC 19210), *M. avium* subsp. *avium* (ATCC 25291) 및 *M. intracellulare* (ATCC 13950), *Escherichia coli* (ATCC 10536)를 분양받아 사용하였다.

DNA 추출

실험 재료로부터 DNA의 추출은 QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Germany)을 이용하여 제시된 방법을 따라 수행하였다. 추출된 DNA는 LAMP와 PCR에 이용할 때까지 -20°C 에 보관하였다.

Primer

LAMP와 PCR에 이용한 primer는 Table 1과 같다. 각각 4개의 primer (F3, B3, FIP 및 BIP)와 2개의 loop primer를 LAMP primer design 프로그램(<http://primer-explorer.jp/e/index.html>)을 이용하여 제작하였고 PCR primer는 DNA star 프로그램(Dnastar Inc., USA)을 이용하여 디자인하였다.

LAMP 반응

등온증폭반응은 Cho 등(2006a)의 방법을 이용하여 시행하였다. DNA 각각 2 μl , 각각 1.6 μM 의 FIP와 BIP, 0.2 μM 의 F3와 B3, 0.8 μM 의 LF와 LB, 1.4 mM

Table 1. Sequences of LAMP and PCR primers used in this study

Name	Primer	Sequence (5'-3')	Length
LAMP			
M_common	F3	TTTGCGGTGTGGGATGG	17
	B3	GCGTCGCTGCATCAGG	16
	FIP (F1c+F2)	CTCTCAGGCCGGCTACCCGT-CGCGGCCTATCAGCTTGT	38
	BIP (B1c+B2)	GTGTCCGGCCACACTGGGAC-TGCGCCCATTGTGCAATA	38
	LF_M	CGCGGCCTATCAGCTTGT	18
	LB_M	CTCTCAGGCCGGCTACCCGT	20
	MTC	F3	CCACCAGCACCTAACCGG
B3		TCGAGTACGCCTTCTTGTGTG	20
FIP (F1c+F2)		GACAAAGGCCACGTAGGCGA-TGGGTAGCAGACCTCACC	38
BIP (B1c+B2)		ACCGACGCCTACGTTCGAG-TCGATCGCGTCGAGGACC	37
LF_MTC		CTGCCCAGGTCGACACATA	19
LB_MTC		GCTTCCACGATGGCCACCT	19
PCR			
M_common	Mycgen_F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20
	Mycgen_R	TGCACACAGGCCACAAGGGA	20
MTC	MTC_F	ATGCCCAAGAGAAGCGAATACAGGCAA	27
	MTC_R	CTATTGCTGCGGTGCGGGCTTCAA	24

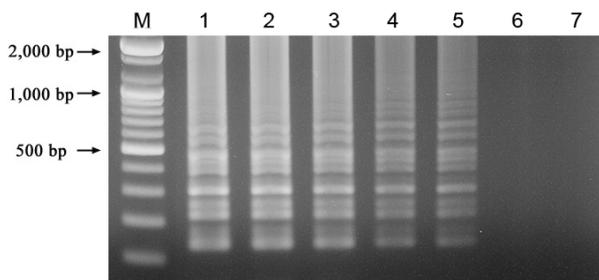


Fig. 2. Detection limit of IS6110 using LAMP assay in *M. bovis*. Varying dilutions of the IS6110 genomic DNA. Lane 1~7: 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 2×10^1 and 2×10^0 (copy/ml) of DNA, Lane M: Marker.

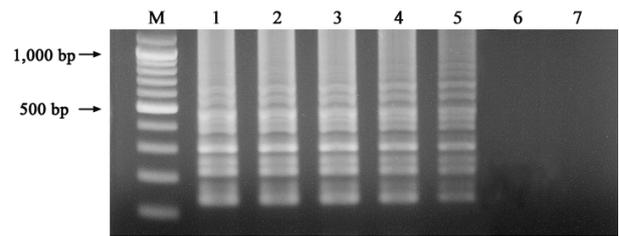


Fig. 3. Detection limit of 16S rRNA gene using LAMP assay in *M. avium*. Varying dilutions of the 16S rRNA gene genomic DNA. Lane 1~7: 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 2×10^1 and 2×10^0 (copy/ml) of DNA, Lane M: Marker.

통계 분석

일반 PCR과 LAMP의 민감도와 특이도를 비교하였다. 이들 두 검사 사이의 일치도는 Cohen's Kappa 분석을 실시하였다(Altman, 1999).

결 과

LAMP법에 의한 마이코박테리움균의 민감도

Table 1의 등온증폭반응 primer set을 이용하여 사다리 형태의 증폭산물을 얻었다. 2×10^6 부터 2×10^0 까

지 10배씩 희석한 시료에서 IS6110 gene을 증폭한 *M. bovis*의 검출한계는 2×10^2 (copy/ml)이었고(Fig. 2), 16S rRNA gene을 증폭한 *M. avium*의 검출한계도 2×10^2 (copy/ml)까지였다(Fig. 3).

PCR에 의한 Mycobacterium 균의 검출

Table 1의 PCR primer set을 이용한 conventional PCR법으로 1,030 bp (*Mycobacteria* spp.) 및 786 bp (MTC) 크기의 증폭산물을 확인하였다. *M. bovis*와 *M. avium*의 검출한계는 모두 2×10^3 (copy/ml)이었다.

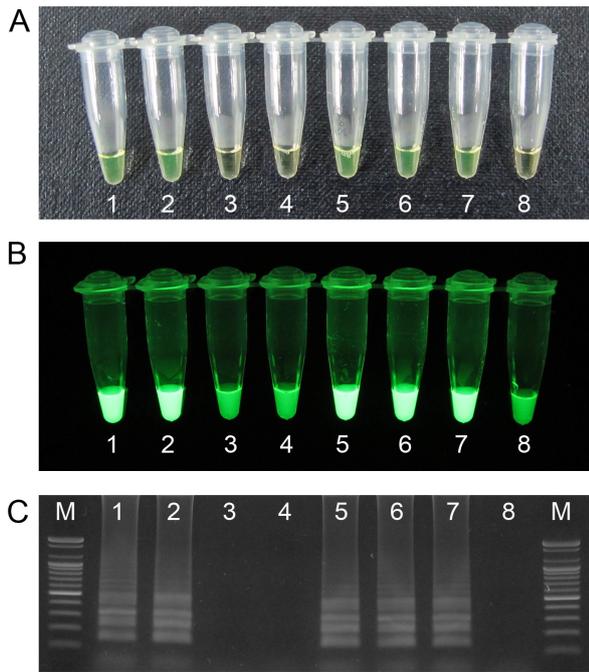


Fig. 4. Results of LAMP assay to detect *Mycobacterium* using bovine blood samples. (A) Visualization on a light box. (B) Visualization under UV irradiation : bright fluorescence indicates a positive reaction. (C) Visualization in agarose gel electrophoresis: amplification shows a ladder-like pattern. 1, Positive control (*M. avium*); 2, Positive control (*M. bovis*); 3, Negative control (no template with NTM primers); 4, Negative control (no template with MTC primers), 5, NTM positive in case no. 1; 6, MTC positive in case no. 1; 7, NTM positive in case no. 2; 8, MTC negative in case no. 2; M: DNA ladder.

형광을 이용한 시료에서의 LAMP 결과

107개의 시료를 대상으로 SYBR Green을 이용하여 LAMP 결과를 형광반응으로 확인한 결과 양성 반응의 경우 형광을 확인하였다(Fig. 4).

시료에서의 LAMP 및 PCR의 결과 비교

피내검사법(Intradermal tuberculin test, ITT) 검사상 양성으로 확인된 38마리와 음성으로 확인된 47마리, 총 85마리의 혈액 시료에서 LAMP 및 PCR 검사 결과는 Fig 4와 같다. 검사결과는 동일 시료를 대상으로 두 개의 tube를 한 세트로 분석하였다. 두 개의 tube에서 모두 형광의 양성반응을 보이면 MTC (Fig. 4B, 5, 6)로 두 번째 tube에서만 형광양성인 경우 NTM (Fig. 4B, 7, 8)으로 진단하였다. 형광 양성 반응은 전기영동 결과(Fig. 4C)를 통해 결과를 확인하였다.

Table 2. Comparison of the sensitivity and specificity of LAMP, conventional-PCR and intradermal tuberculin test (ITT) for the diagnosis of bovine tuberculosis in Korea native cattle

		Conventional PCR		LAMP	
		+	-	+	-
ITT	+	36	2	34	4
	-	1	46	2	45
Kappa index		0.93		0.86	

또한, ITT 검사와 LAMP 및 PCR 검사의 일치도 (kappa)는 각각 0.93과 0.86으로 우수함을 확인할 수 있었다(Table 2).

고 찰

국내에서는 소결핵 근절을 위해 지속적으로 ITT검사를 통해 도태 정책을 유지하고 있으며 최근에는 젓소에서의 결핵 진단 검사의 정확도를 높이기 위해 감마 인터페론 검사를 도입하여 진단을 하고 있다(신 등, 2011). 그러나 젓소와 달리 한우는 결핵검진이 의무화되어 있지 않아서 일부에서만 검사가 수행되고 있다. 그러나 한우에서의 결핵도 최근 증가 추세에 있어서 이에 대한 지속적이고 체계적인 검사가 필요하다.

최근 소결핵의 진단의 정확성을 높이고자 ITT 검사와 더불어 감마 인터페론 검사법이 스크리닝 방법으로 도입되고 있으며, 사람의 경우는 실험실 검사방법인 PCR 진단법이 널리 활용되고 있다(Shin 등, 2007). 그러나 PCR법은 여전히 현장에서 활용하기에는 장비를 이용하는 단점을 갖고 있다. 따라서 유전자 증폭 장비 없이도 동일한 수준의 민감도를 가진 진단법을 적용하거나 기존의 소결핵 진단법과 병용할 수 있다면 매우 효과적이라 생각되었다. 이번 연구에 사용된 LAMP법은 PCR법에서 사용하던 *Taq* DNA polymerase와는 달리 65°C 온도에서 활성을 갖는 *Bst* DNA polymerase를 사용하기 때문에 일정한 온도가 유지되는 수조, 오븐, 손난로 등을 이용하는 것만으로도 결과를 확인할 수 있는 매우 획기적인 진단법이며 실험 결과(Fig. 2, 3)를 통해서도 이를 확인할 수 있었다(Cho 등, 2006a; Notomi 등, 2000).

또한, ITT에서 양성 또는 음성 판정을 받은 85개의 혈액 시료를 대상으로 LAMP법과 기존의 PCR을 비

교한 결과(Table 2)에서 ITT 양성인 2 증례와 4 증례가 각각 기존의 PCR 및 LAMP법에서 음성으로 확인되었다. 또한 ITT 음성인 1 증례와 2 증례가 각각 기존의 PCR 및 LAMP법에서 양성으로 확인되었다. 이들 검사들 간의 불일치는 기존의 ITT 검사에 대한 민감도와 특이도의 문제점 및 기존 PCR에 비해 LAMP법이 갖는 높은 민감도를 고려할 때 ITT 검사가 갖는 문제인 것으로 판단할 수 있었다.

동물에서뿐 아니라 사람의 결핵도 우리나라에서는 높은 유병률을 보이고 있으며, 제 3종 법정 전염병으로 관리 하고 있는 감염성 질환이다(Ryoo 등, 2008). 최근에는 면역 결핍 환자들에 있어서의 결핵균 감염 억제 내성 결핵균의 등장, 비결핵항산균에 의한 감염의 증가 등으로 결핵균의 신속한 검출과 동정에 대한 관심이 커지고 있는 실정이다. 최근에는 NTM이 질병의 원인으로 부각되고 있는데 NTM은 결핵균과 달리 병원성은 낮고 사람 간에는 전염이 되지 않는 것으로 알려져 있다(LoBue 등, 2010; Ryoo 등, 2008). 그러나 면역이 저하된 경우 다양한 질환을 일으킬 수 있으며, 이러한 질환 중 90% 이상이 폐질환으로 나타난다고 하였다(LoBue 등, 2010). 우리나라의 경우 1993년부터 2006년까지 조사된 자료에 의하면, 미국과 일본과 마찬가지로 *Mycobacterium avium* complex에 의한 감염이 가장 많았고, *M. abscessus*, *M. fortuitum* complex, *M. chelonae* complex 및 *M. kansasii* 등의 순으로 보고되고 있다(Biet 등, 2005; Ryoo 등, 2008). 따라서 추후 한우를 포함한 동물에서의 MTC 뿐 아니라 NTM들에 대한 분포와 함께 결핵 치료제로 쓰이는 약물에 대한 내성 패턴의 연구등도 공중보건학적 측면에서 매우 중요하리라 생각된다.

이와 같이 사람의 결핵 확산의 과정에 가축을 포함한 다양한 동물의 결핵 발생이 밀접하게 연관되어 있으며 결핵병의 근절을 위해서는 한우를 포함한 다양한 동물에서의 진단검사가 필수적이다. 따라서 이번 연구에서 제시한 LAMP법의 적용은 결핵균을 현장 상황에서도 손쉽게 검출할 수 있게 해줄 것이며, 이 진단법의 활용을 통해 소결핵병 근절에 일조할 것으로 확신한다.

결 론

이번 연구에서는 소결핵을 진단할 수 있는 LAMP 진단법을 개발하고 이를 ITT 검사에서 양성으로 확

인된 38마리와 음성으로 확인된 47마리, 총 85마리의 한우 혈액 시료에서 PCR 검사와 비교하여 진단 기법의 활용성을 평가하였다. LAMP법의 *M. bovis* 및 *M. avium* 모두 검출한계는 2.0×10^2 copy/ml로 기존의 PCR보다 10배 이상의 민감함을 확인하였고, 혈액 시료를 통한 ITT 및 PCR 진단법과의 일치도(kappa)는 각각 0.93과 0.86으로 그 우수함도 확인하였다. 따라서 이번 연구에서 개발된 LAMP법은 현장에서 소 결핵균을 신속하고, 정확하게 감별 진단하는데 효과적이며 추후 현장 중심의 진단에 활용 가능성이 매우 높을 것으로 전망한다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2011-0014054).

참 고 문 헌

- 고바라다, 김현중, 박덕웅, 박성도, 김재익, 박종태, 김용환. 2007. PCR 기법을 이용한 도축 소의 결핵병 신속진단. 한국가축위생학회지 30: 393-406.
- 변현섭, 이현주, 이상명, 한성태, 곽학구, 최해연, 조윤상, 안병우. 2007. 도축 한우에서 발견된 결핵병. 한국가축위생학회지 30: 407-414.
- 신승원, 신민경, 차승빈, 우종태, 이성모, 구복경, 조윤상, 정석찬, 유한상. 2011. 국내 우군에서 소 결핵 진단을 위한 피내검사법과 Interferon- γ 생성 검사의 비교. 대한수의학회지 51: 117-122.
- 유한상. 2007. 소 결핵병의 국제 연구 동향. 한국수의공중보건학회지 31: 69-82.
- Altman DG. 1999. Practical statistics for medical research. Chapman & Hall/CRC Press, Boca Raton/London/New York/Washington, DC.
- Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet Res 36: 411-436.
- Cho HS, Kang JI, Park NY. 2006a. Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. J Vet Diagn Invest 18: 81-84.
- Cho HS, Kim YH, Park NY. 2006b. Disseminated mycobacteriosis due to *Mycobacterium avium* in captive Bengal tiger (*Panthera tigris*). J Vet Diagn Invest 18: 312-314.
- LoBue PA, Enarson DA, Thoen CO. 2010. Tuberculosis in humans and animals: an overview. Int J Tuberc Lung Dis

- 14: 1075-1078.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: E63.
- Ryoo SW, Shin S, Shim MS, Park YS, Lew WJ, Park SN, Park YK, Kang S. 2008. Spread of nontuberculous mycobacteria from 1993 to 2006 in Koreans. *J Clin Lab Anal* 22: 415-420.
- Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR. 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound Emerg Dis* 57: 205-220.
- Shin JB, Park NY, Kim YH, Cho HS. 2007. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of tuberculosis in Hanwoo. *Kor J Vet Serv* 30: 527-532.