

< Original Article >

## 소 결핵 진단을 위한 인터페론감마 검사 키트의 성능 비교 평가

홍이곤<sup>1</sup> · 최우재<sup>1</sup> · 노영혜<sup>1</sup> · 안선민<sup>1</sup> · 김은경<sup>2</sup> · 최은희<sup>2</sup> · 김단일<sup>1,2\*</sup>

서울대학교 수의과대학<sup>1</sup>, 서울대학교 산업동물임상교육연수원<sup>2</sup>

### Performance comparison and evaluation of interferon-gamma assay kit for bovine tuberculosis diagnosis

Leegon Hong<sup>1</sup>, Woojae Choi<sup>1</sup>, Younghye Ro<sup>1</sup>, Sunmin Ahn<sup>1</sup>,  
Eunkyoung Kim<sup>2</sup>, Eunhee Choe<sup>2</sup>, Danil Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

<sup>2</sup>Farm Animal Clinical Training and Research Center, Seoul National University, Pyeongchang 25354, Korea

(Received 6 August 2020; revised 15 December 2020; accepted 15 December 2020)

#### Abstract

In Korea, bovine tuberculosis (bTB) is a representative zoonotic disease that causes considerable economic loss. In determining the positive bTB, the ELISA method for examining the amount of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) is included in Korea's diagnostic standard method. Recently, commercially available BIONOTE TB-Feron ELISA Plus (TB-Feron Plus) that detects IFN- $\gamma$  has been introduced. However, since the scientific basis for the performance is limited, we evaluated performance by comparing it with the results of another IFN- $\gamma$  ELISA assay kit (BOVIGAM<sup>®</sup>) certified by Office International des Epizooties. In our research, 42 positive blood samples preliminarily tested with a tuberculin skin test and/or BOVIGAM<sup>®</sup> and 54 negative blood samples collected from three bTB free farms were subjected to IFN- $\gamma$  assay using the TB-Feron Plus and the BOVIGAM<sup>®</sup>, respectively. The result shows that the sensitivity, specificity and accuracy were 81.0% (34/42), 100% (54/54), 91.7% (88/96) in TB-Feron Plus kit and 78.6% (33/42), 100% (54/54), 90.6% (87/96) in BOVIGAM<sup>®</sup> kit, respectively. Moreover, the overall accordance percentage of the two kits was 99.0% (95/96) and there was almost perfect agreement between two assays (Kappa=0.977,  $P < 0.0001$ ). Furthermore, additional studies confirmed that elevated lymphocyte numbers in blood did not interfere with the results of the TB-Feron Plus kit. And, delayed time from sampling to culture decreased the optical density (OD) value. Therefore, we concluded that the TB-Feron Plus kit was not inferior to BOVIGAM<sup>®</sup> in performance. High lymphocyte numbers in blood did not impact on TB-Feron Plus results, while delayed time before culture interfered with OD value.

**Key words :** Bovine tuberculosis, Gamma-interferon, Diagnosis, Delayed time, Lymphocyte

## 서론

소에서 결핵은 주로 *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)에 감염되었을 때 발생하는 만성 소모성 질병으로, 증상의 발현이 나타나는 시기는 개체마다 차이가 있으며, 증상 또한 만성적인 쇠약, 유량 감소, 증체량 감

소, 호흡기 증상 등 여러 가지 형태로 나타난다(강 등, 2010; OIE, 2018). 소 결핵의 전파는 감수성이 있는 소의 호흡기 감염이 주된 경로이며 경구 감염 및 수직 감염도 가능한데(Menzies와 Neill, 2000; 강 등, 2010), 우군 내의 전파 뿐만 아니라 감염우의 멸균되지 않은 우유 및 쇠고기 섭취, 호흡기를 통한 사람으로의 전파가 가능하기 때문에 인수공통전염병으로 중요시 여겨진다(강 등, 2010; Olea-Poppelka 등, 2016). 1950년대 이

\*Corresponding author: Danil Kim, E-mail. [daniilkim@snu.ac.kr](mailto:daniilkim@snu.ac.kr)  
ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2426-9122>

전까지 소독 처리되지 않은 우유의 음용이 일반화 되어있던 지역에서 사람 폐결핵의 원인 중 약 30%가 *M. bovis*였으며(Sung 등, 1997), 영국의 경우 결핵 환자 중 *M. bovis*에 의한 감염은 0.5~1.5%라는 보고가 있다(Rua-Domenech 등, 2006). 또한 미국의 한 연구에 따르면 미국에서 1995년부터 2005년 까지 결핵으로 보고된 환자 중 1.4%가 *M. bovis*에 의한 결핵이었고(Hlavsa 등, 2008), San Diego지방에서는 어린이들의 45%와 성인의 6%가 *M. bovis*에 의한 감염으로 밝혀졌다(Rodwell 등, 2010). 이러한 인수공통 질병으로서 *M. bovis*의 중요성 때문에 국내에서는 가축 결핵이 발생한 경우 시도 가축방역기관은 결핵 발생을 시·도 보건과나 시·군·구 보건소에 보고하고 관할 보건소는 인수공통결핵 접촉자에 대한 결핵검사(흉부 X선 검사, 객담검사)를 실시하며 결핵 관리를 실시하고있다(2020 국가 결핵 관리지침).

국내 소에서 소 결핵 발생은 2000년 542두에서 점차 증가하다 최근 5년간(2015~2019) 평균 3200여두 가량 확인되었으며(농림축산검역본부, 2020), 이러한 증가는 2005년 축산물 검사의 확대시행, 2008년부터 도축검사 feedback system 도입, 2009년 이후 한(육)우로의 소 결핵 검진 확대시행, 2014년 감마인터페론법의 도입 및 2016년부터 시행한 가축거래시 소 결핵병 검사증명서 휴대명령제 시행 등 여러가지 제도의 신설에 의한 소 결핵 검출의 증가 때문이라고 판단된다(Lee 등, 2010; Ha 등, 2018; Ku 등, 2018). 국내에서는 소 결핵 근절을 위하여 소 결핵을 제 2종 가축 전염병으로 지정하였으며, 도축된 고기의 검사를 통한 도축장 검사가 1962년 최초로 법제화 되었고, 1964년 국가적인 소 결핵 근절 프로그램이 양성우 살처분 정책과 함께 도입되었다(Wee 등, 2010; Ku 등, 2018). 국내의 양성우 살처분 정책을 위한 양성우 진단법으로는 세계적으로 널리 사용되고 있는 튜버큐린 피내접종법이 사용되고 있으며, *M. bovis* 유래 우형 튜버큐린만을 사용하는 단일피내접종법이 사용되고 있다. 국내에서 사용되는 피내접종법은 1953년 old tuberculin (OT)을 도입하며 처음 시작되었고, 이후 1960년도부터 heat concentrated synthetic medium (HCSM) 튜버큐린을, 1970년도에는 purified protein derivative (PPD) 튜버큐린을 도입하여 현재까지 실시되고 있다(Cho 등, 1999; Kim 등, 2002). 현재 매년 시행되는 피내접종법은 인력부족으로 인하여 잦소에게 국한되어 있고, 비육우에 대하여 실시되는 정기적인 검진은 이루어지지 않고 있는 실정이며(Ku 등, 2018), 비정형 및 환경성 결핵균에 의

한 의양성 문제, 시술자의 주관적 판정 가능성 등 여러 문제가 제기되어 왔다(Ha 등, 2018). 이에 2016년부터 도입된 가축거래 시 소 결핵병 검사증명서 휴대명령제에서는 감마인터페론법을 피내접종법과 함께 1차적인 진단법으로 사용하게 하였고, 지속적으로 소 결핵이 발병하는 농가에서는 2개월마다 병행 테스트(피내접종법, 감마인터페론검사)를 실시하여 연속적으로 2번 결핵 음성을 확인 받도록 하였으며, 이 기간 동안에는 도축장 이외의 소 이동은 금지시켰다(Jang 등, 2020).

감마인터페론법은 피내접종법과 마찬가지로 세포성 면역반응을 이용하며, 감마인터페론의 생성을 유도한 후 ELISA를 통한 정량적 측정을 진단의 기본원리로 한다(Pollock 등, 2005). 감마인터페론법은 피내접종법에 비하여 조기에 소 결핵 진단이 가능하고(Vordermeier 등, 2004; Pollock 등, 2005), 민감도가 높은 것으로 알려져 있어 국외의 다른 여러 국가에서는 피내접종법의 보조적인 진단법으로 사용되고 있다(Gormley 등, 2006; Rua-Domenech 등, 2006; Jang 등, 2020). 감마인터페론 검사는 피내접종법과 병행 실시하였을 시 진단률이 높게 나타남이 확인되었고(Gormley 등, 2006; Rua-Domenech 등, 2006; Keck 등, 2018; Jang 등, 2020), 소 결핵의 진단법으로 피내접종법에 비하여 여러가지 장점이 확인됨에 따라 감마인터페론 검사법을 처음으로 상용화 시킨 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit (Prionics<sup>™</sup>, Switzerland)가 개발되었다(Wood 등, 2001; Cruz 등, 2018). BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit는 세계동물보건기구(Office International des Epizooties, OIE)에서 소결핵에 대한 감마인터페론 검사법으로 승인 받고 세계적으로 여러 국가에서 사용되고 있으며(OIE, 2015), 검사 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 요소들에 관한 다양한 연구도 진행되어 왔다(Rua-Domenech 등, 2006). 국내에서도 바이오노트사의 TB-Feron ELISA kit (Bionote, Korea)가 상용화되어 감마인터페론 검사법에 사용되어왔으며, 최근 TB-Feron ELISA kit에서 검사 단계를 간소화하여 검사 시간을 단축시킨 TB-Feron ELISA Plus kit (Bionote, Korea)가 새롭게 개발되었으나 진단 키트로써 정확도 및 적합성에 대한 과학적 근거가 제한되어 있었다. 따라서 본 연구에서는 세계적으로 널리 사용되고있는 Prionics사의 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit와 새롭게 개선된 바이오노트사의 TB-Feron ELISA Plus kit 사이의 성능을 비교 분석하여, TB-Feron ELISA Plus kit의 소 결핵 진단키트로써 적합성을 평가하였다. 추가적으로 감마인터페론 검사의 결과에 영향을 미칠 수 있는 요소들(혈액 내 림프구 수, 채혈 후 실험실 검사 개시시간 등)에 대한

검토를 통해 TB-Feron ELISA Plus kit의 성능을 비교 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

2019년 6월부터 12월 사이에 채취된 양성 시료 42개와 음성 샘플 54개를 포함한 총 96두의 혈액을 시료로 하였다. 양성 시료의 기준은 사전에 튜버큘린 피내접종법 및 감마인터페론 검사(BOVIGAM<sup>®</sup>)를 같이 활용하였을 때 둘 중 하나라도 양성인 경우로 판단하였다. 이는 두 실험법을 병행 실시하면 민감도가 높아진다는 여러 연구가 있고(Wood 등, 1992; Rua-Domenech 등, 2006; Sinclair 등, 2016; Jang 등, 2020), 두 실험법을 병행 실험 하였을 시 질병 진단율이 최대 95.2%에 달한다는 연구결과(Wood 등, 1992)를 고려하여 설정하였으며, 본 실험의 양성 시료는 바이오노트 사로부터 제공 받았다. 음성 시료는 결핵 청정목장으로 인증된 세 개의 목장에서 시료를 채취하였다. 혈중 림프구 수가 감마인터페론 검사 결과에 미치는 영향을 확인하기 위하여 결핵 청정 목장 두 곳을 선정하였고, 한 목장에서 혈중 고 림프구 군(혈중 림프구 > 5.6 × 10<sup>3</sup>/μL, n=8, 평균 혈중 림프구=9.73 × 10<sup>3</sup>/μL)의 시료를, 다른 한 목장에서 대조군(혈중 림프구 ≤ 5.6 × 10<sup>3</sup>/μL, n=8, 평균 혈중 림프구=2.60 × 10<sup>3</sup>/μL)의 시료를 채취하여 실험재료로 사용하였다. 혈중 림프구 수치의 참조 범위는 George 등의 실험을 바탕으로 1.6 ~ 5.6 × 10<sup>3</sup>/μL로 설정 하였다 (George 등, 2010). 또한 채혈 후 실험 개시 전까지 소요되는 시간에 따른 흡광도의 변화를 확인하기 위하여 결핵 청정 목장 내 젖소 10두에서 채혈한 혈액을 실험재료로 사용하였으며, 채혈 후 1시간 이내, 12시간 그리고 24시간에 실험을 개시하였다.

### 감마인터페론 검사

감마인터페론 검사를 위하여 TB-Feron ELISA Plus kit와 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit가 사용되었으며, 각각의 실험은 각 제조사로부터 제공된 검사 요령에 맞춰 실시하였다. 우선, 전혈 배양을 위하여 검사 대상우의 혈액을 헤파린이 함유된 튜브(BD, USA)에 채취한 뒤 24시간 이내에 준비된 혈액을 24wells 세포배양용 tray

3개의 well에 1.5 mL씩 분주하였다. 혈액이 분주된 각 well에 자극항원으로 PPD-B, PPD-A, 멸균 PBS를 100 μL씩 첨가하였다. PPD-B, PPD-A, 멸균 PBS는 각 키트에서 제공되는 서로 다른 것을 사용하였다. 자극 항원이 첨가된 전혈은 37°C의 인큐베이터에서 16~24시간 배양 후 500 g 10분간 원심분리하여 채취한 혈장 상층액을 검사 전까지 -20°C에서 보관하여 각각의 실험에 사용하였다. 각 키트는 항체 흡착 플레이트에 조제한 접합체액 및 검체를 분주하고 1시간 반응 후 기질액과 30분 반응 뒤 Optical Density (OD, 측정 파장 450 nm, 참조 파장 620 nm)를 측정하였으며(Enspire<sup>®</sup>, PerkinElmer, US), 이 과정 중 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit는 접합체액 분주 전 혈장 희석액을 분주하는 과정을 거쳤다. 양성 판정 기준은 제조사에서 제공한대로 PPD-B의 OD 값과 PBS의 OD 값의 차이와 PPD-B의 OD 값과 PPD-A의 OD 값의 차이가 동시에 0.1 이상인 경우로 하였고, PPD-B의 OD 값과 PPD-A의 OD 값의 차이와 PPD-B의 OD 값과 PBS의 OD 값의 차이 중 하나라도 0.1 미만인 경우는 음성으로 판정하였다. 감마인터페론 검사에서 TB-Feron ELISA Plus와 BOVIGAM<sup>®</sup>의 inter-assay 변이 계수(Coefficients of Variability, CV)는 각각 6.46% 13.30%이었고, intra-assay의 변이 계수는 각각 6.94%, 7.96%였다(Table 1).

### 성능비교 항목

각 시료에 대한 TB-Feron ELISA Plus kit와 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit의 질병 진단 결과를 이용하여 민감도, 특이도, 정확도를 구하였으며 두 진단 키트의 정확도를 평가

**Table 1.** The results of inter- and intra-assay coefficients of variability (CV)

	Inter-assay (n=10)			Intra-assay (n=30)
	Mean OD value	SD	CV%	CV%
TB-Feron ELISA Plus				
Positive control	0.043	0.002	3.96	6.94
Negative control	2.462	0.221	8.96	
Mean CV			6.46	
BOVIGAM <sup>®</sup> TB				
Positive control	0.019	0.003	17.59	7.96
Negative control	1.320	0.119	9.01	
Mean CV			13.30	

Inter-assay was conducted three times with each positive control and negative control samples (n=10), and intra-assay was conducted duplicate with random samples (n=30).

하기 위해 Youden's index를 사용하였다. 또한, 두 진단 키트의 질병 진단 결과 비교를 위하여 일치율을 확인하였고, Cohen's Kappa 통계량을 구하여 일치도를 확인하였다.

## 통계처리

시료의 크기 제한으로, 림프구 수치가 다른 두 집단의 OD 값에 대한 동등성 검증을 위하여 비모수 통계인 Mann-Whitney U 검증을 사용하였으며, 한 집단내의 채혈 후 혈액처리까지 지연된 시간(<1 h, 24 h)에 따른 OD 값의 비교를 위해서 비모수 통계인 wilcoxon signed-rank 검정을 이용하였다. 또한 Pearson correlation test를 통하여 각 진단법의 PPD-B, PPD-A, PBS OD 값에 대한 상관관계를 확인하였다. 위의 모든 통계처리를 위하여 SPSS version 25.0 (SPSS, USA) 프로그램이 사용되었다.

## 결 과

단일피내접종법 또는 감마인터페론법에 의하여 양성으로 판단된 42두 및 결핵음성농가의 음성우 54두에 대하여 TB-Feron ELISA Plus kit와 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit를 사용하여 검사를 실시한 결과, TB-Feron ELISA Plus kit의 민감도는 81.0%, 특이도는 100%, 정확도는 91.7%로 나타났으며, BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit의 민감도는 78.6%, 특이도는 100%, 정확도는 90.6%로 나타났다(Table 2). 진단키트의 정확도 평가를 위한 Youden's Index는 각각 TB-Feron ELISA Plus kit=0.810, BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit=0.786로 나타났다.

TB-Feron ELISA Plus kit와 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit의

결과값은 총 96개의 샘플 중 1개의 샘플에서 차이가 있었고 99.0%의 일치율을 보였으며, Cohen's Kappa 통계량을 구한 결과 Kappa=0.977 ( $P<0.0001$ )로 거의 완벽한 일치 상태를 나타냈다. 추가적으로 각 키트의 PPD-B OD 값, PPD-A OD 값 및 PBS OD 값에 대한 상관관계 검증 결과, PPD-B는  $r=0.949$  ( $P<0.001$ ), PPD-A는  $r=0.902$  ( $P<0.001$ ), PBS는  $r=0.363$  ( $P<0.001$ )로 PPD-B와 PPD-A에서 높은 상관 관계를 확인하였다.

감마인터페론이 림프구에서 분비되는 점에서 착안하여 혈중 lymphocyte가 정상 수치( $1.6\sim 5.6\times 10^3/\mu\text{L}$ , George 등, 2010)보다 높게 나타나는 결핵 음성 개체(혈중 림프구  $>5.6\times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $n=8$ )와 정상 상한 수치 보다 같거나 낮게 나타나는 결핵 음성 개체(혈중 림프구  $\leq 5.6\times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $n=8$ )에 대하여 TB-Feron ELISA Plus kit로 감마인터페론 검사를 실시한 뒤 PPD-B, PPD-A, PBS의 OD 값을 비교하였다(Fig. 1). 두 집단의 OD 값에 대한

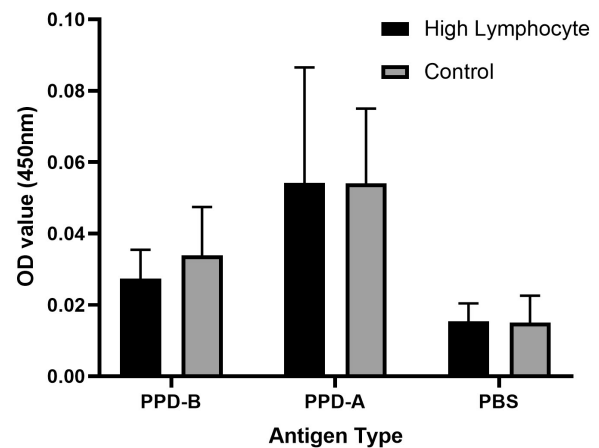


Fig. 1. Comparison of Mean OD values between tuberculosis negative samples with high lymphocyte numbers in blood ( $>5.6\times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $n=8$ ) and control ( $\leq 5.6\times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $n=8$ ).

Table 2. Results of the two interferon-gamma assay kits (TB-Feron ELISA Plus and BOVIGAM<sup>®</sup> TB), and the sensitivity (Sn), specificity (Sp) and accuracy (Acc) of results

	Samples (n=96)			Sn	Sp	Acc
	Positive	Negative	Total			
TB-Feron ELISA Plus				81.0%	100.0%	91.7%
Positive	34	0	34			
Negative	8	54	62			
Total	42	54				
BOVIGAM <sup>®</sup> TB				78.6%	100.0%	90.6%
Positive	33	0	33			
Negative	9	54	63			
Total	42	54				

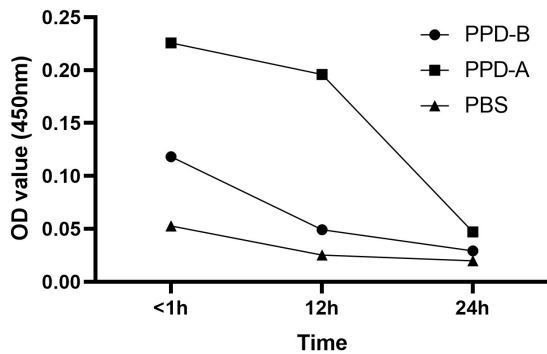


Fig. 2. Mean OD values of tuberculosis negative samples (n=10) depending on delayed time after blood collection before culture (under 1 h and at 12 and 24 h) by using TB-feron ELISA Plus kit.

동등성 검증을 위하여 Mann-Whitney U 검정을 실시한 결과 두 집단 간에는 PPD-B ( $Z=-0.897$ ,  $P>0.05$ ), PPD-A ( $Z=-0.210$ ,  $P>0.05$ ), PBS ( $Z=-0.371$ ,  $P>0.05$ )의 OD 값에서 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 따라서 두 집단의 OD 값에는 차이가 없음을 확인할 수 있었으며, 결핵 음성 시료에 대하여 실시된 본 실험결과는 모두 음성으로 나타나 실제 질병 진단 결과에도 영향을 미치지 않았다.

또한 채혈 후 실험실 검사 개시까지 소요된 시간에 따른 TB-Feron ELISA Plus kit 감마인터페론 검사의 OD 값을 비교하기 위하여 총 10두의 결핵 음성우에 대하여 채혈 1시간 이내, 12시간 및 24시간 경과 후 배양을 시작하고 TB-Feron ELISA Plus kit로 검사를 실시하였다. 실험 결과 채혈 후 혈액 처리까지의 시간이 지연됨에 따라 PPD-B (<1 h=0.115, 12 h=0.0452, 24 h=0.0293), PPD-A (<1 h=0.115, 12 h=0.0452, 24 h=0.0293), PBS의 평균 OD 값이 감소하였다(Fig. 2). 또한 wilcox signed-rank 검정 결과 채혈 후 1시간 이내에 혈액 처리를 실시한 OD 값과 비교하여, 채혈 후 24시간 경과 후 혈액 처리를 실시한 결과의 OD 값은 PPD-B ( $Z=-2.805$ ,  $P=0.05$ )와 PPD-A ( $Z=-2.803$ ,  $P=0.05$ )에서 유의미한 감소를 보이는 것으로 나타났으나, 결핵 음성 시료에 대하여 실시된 실험 진단 결과는 모두 음성으로 나타나 진단 결과에는 영향을 미치지 않았다.

## 고 찰

우결핵은 완벽한 진단법이 존재하지 않으며, 정확한 진단을 위해서는 병원체의 분리 동정이 이루어져

야 하지만, 다수의 개체에 대한 적용은 비용적, 시간적, 민감도 측면에서 제한적이다(Ryan 등, 2000; Cruz 등, 2018). 따라서 본 실험에서는 튜버큐린 피내 접종 및 감마인터페론 검사를 같이 활용하였을 때 둘 중 하나라도 양성 나타나면 양성 개체에 대한 질병 진단률이 최대 95.2%에 달한다는 연구결과(Wood 등, 1992)를 고려하여 두 가지 검사방법 중 하나라도 양성 나타난 개체에 대하여 양성 개체로 정의하고 그 혈장을 양성 시료로 사용하였다. 이후 실시한 실험에서 TB-Feron ELISA Plus kit와 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit는 중등도의 민감도(TB-Feron ELISA Plus kit 81.0%; BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit 78.6%)와 높은 특이도(TB-Feron ELISA Plus kit 100%; BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit 100%)를 보여주었다. TB-Feron ELISA Plus kit의 이러한 결과는 이전 버전인 TB-Feron ELISA kit로 실시된 민감도(81.7%, 95%CI=74.7~88.6%) 및 특이도(99.5%, 95%CI=98.9~100%)와 거의 유사한 결과이며(Jang 등 2020), BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit로 실시된 여러 연구에서 보이는 민감도 평균(84.6%, 95%CI=73.0~95.5%)보다 다소 낮고, 특이도 평균(97.4%, 95%CI=87.5~99.6%)보다 다소 높은 값이다(OIE, 2015). 다른 연구들의 결과와 본 실험의 민감도 및 특이도 차이는 실험결과에 영향을 미칠 수 있는 다른 여러 요소가 존재하며, 각 연구마다 결과 판정에 다른 기준의 OD 값이 사용되었기 때문이라 판단된다(Rua-Domenech 등, 2006; OIE, 2015). 현재 국내에서 실시되는 Test and slaughter 정책에 있어 결핵 양성축의 조기 진단이 중요한 역할을 하며(Alvarez 등, 2012), 높은 민감도의 진단법이 요구된다. 두 키트의 민감도 비교 시 TB-Feron ELISA Plus kit (81.0%)는 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit(78.6%)에 비하여 다소 높은 민감도를 나타냈으며, 이는 민감도 측면에서 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit와 동일하거나 더 높은 성능을 가진다고 볼 수 있다.

TB-Feron ELISA Plus kit와 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit 간의 결과를 비교하면 총 96개의 샘플 중 단 1개의 샘플에서 결과의 차이가 발생하였다. 두 키트는 99.0%의 일치율을 나타냈으며, 이는 제조사에서 제시한 95.3%의 일치율 보다 높았다. 두 키트 간 일치도를 평가하기 위하여 코헨의 카파계수를 측정된 결과(Kappa=0.977)는 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit와 Tb-Feron kit에서 결과 차이가 거의 없음을 나타냈다. 두 키트의 결과 이외에 샘플에 대한 각 키트의 PPD-B 및 PPD-A의 OD 값 관계를 확인하기 위하여 상관관계 검증을 실시한 결과, 샘플에 대한 두 키트 각각의 OD 값은 강한 양의 상관관계가 있음을 보여주었다(PPD-B,  $r=0.949$  ( $P<0.001$ );

PPD-A,  $r=0.902$  ( $P<0.001$ }). BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit는 처음으로 상용화된 감마인터페론 진단 키트로(Cruz 등, 2018), OIE에서 승인 받았고, 소에서 민감도 84.6% (95%CI=73.0~95.5%), 특이도 97.4% (95%CI=87.5~99.6)를 가지며, 호주, 미국, 뉴질랜드, 유럽 등 여러 국가에서 진단키트로써 적합성을 인정받아 사용되고 있다(Wood와 Jones, 2001; Gormley, 2006; Shin 등, 2011; OIE, 2015). 본 실험에서는 공인된 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit와 TB-Feron ELISA Plus kit의 결과 및 OD 값의 비교를 통하여 높은 일치율 및 OD 값의 강한 양의 상관관계를 확인하였고, 이러한 결과를 바탕으로 우리는 두 진단 키트의 성능에는 거의 차이가 없다고 결론지었다.

감마인터페론을 이용한 ELISA 진단법은 항원 자극에 대하여 T림프구가 생성하는 감마인터페론의 정량적 측정을 기본 원리로 하고 있으며, 피내검사법과 마찬가지로 *M. bovis*에 대한 숙주의 세포성 면역 반응을 감지하는 것이다(Wood 등, 1990; Wood와 Jones, 2001; Rua-Domenech, 2006). 따라서 결핵 판정 대상우의 면역상태에 따른 감마인터페론 실험결과와 간섭이 나타날 수 있다. 이와 관련하여 B. Charleston 등은 이전에 *M. bovis* bacilli Calmette-Guérin (bcg) 백신을 접종한 개체에 림프구의 기능을 저하시키는 non-cytopathogenic Bovine viral diarrhea virus를 감염시켜 감마인터페론 생성의 저하를 확인하였고(Charleston 등, 2001), Doherty 등은 부신피질호르몬제 처치를 받은 소에서 PPD에 대한 감마인터페론 생성 저하를 확인하였다(Doherty 등, 1995). 위의 연구들 이외에도 면역능 저하에 대한 감마인터페론 생성의 감소 관련 연구가 몇몇 진행 되었고, 거짓 음성에 대한 가능성도 확인되었으나(Rua-Domenech 등, 2006), 혈중 림프구의 수치와 감마인터페론과의 관계는 명확히 알려진 바가 없었다(OIE, 2015). 따라서 본 실험에서는 혈중 림프구 수치가 정상범위보다 증가된(혈중 림프구  $>5.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) 개체에 대하여 TB-Feron ELISA Plus로 감마인터페론 검사를 진행하였고 증가된 혈중 림프구 수치는 감마인터페론 생성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 이러한 결과는 결핵 양성 개체에 대한 평가가 이루어지지 않았다는 한계점은 있지만, 증가된 혈중 림프구 수치를 감마인터페론 검사의 결과에 영향을 미치는 요소에서 배제할 근거가 될 수 있다. 소 류코시스에 이환된 환우에서는 혈장 T림프구의 비율 뿐만 아니라 절대적인 수의 증가가 알려져 있는데(Blagitz 등, 2017), 우리나라에서 2003년 전국적으로 실시된 조사에 따르면 젖소의 bovine leukemia virus (BLV)의 항체 양성률

이 평균 54.2%였으며(Suh 등, 2003), 2007년 전북 익산 지역 89.6% (Chu 등, 2007), 2012년 경기 북부 지역 76.3%의 젖소에서 BLV 항체 양성률을 확인하였다(Jung 등, 2012). 또한 2017년에 실시된 연구에서는 한우에서의 BLV 항체 양성률도 평균 10.2%로 확인됨으로써 젖소 뿐만 아니라 한우까지 소 류코시스가 만연해 있음을 확인 할 수 있다(Kim 등, 2017). 따라서 이번 연구를 통하여 확인한 증가된 혈중 림프구 수치와 감마인터페론 시험 결과와의 비상관성을 통하여 국내에 만연해 있는 소 류코시스에 이환된 개체에 대한 감마인터페론 검사법의 신뢰도를 확인할 수 있었다.

채혈 후 혈액 배양까지 지연된 시간은 감마인터페론 시험법의 결과에 영향을 미칠 수 있는 요소 중 하나이다(Buddle 등, 2009). 채혈 후 배양까지 시간이 지연됨에 따른 OD 값의 감소로 인하여 최초로 제시된 채혈과 혈액배양까지의 시간 간격은 8시간 이내가 추천되었으나(Rothel 등, 1992), Ryan 등의 연구에서 결과 판정 기준을 bovine OD-avian OD  $>0.1$ 로 설정했을 때, 채혈 후 20~28시간 내의 혈액 배양 결과와 8시간에서 12시간 이내의 배양 결과는 크게 다르지 않음을 밝혔다(Ryan 등, 2000). 하지만 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit를 사용한 Gormley 등의 연구에서 채혈 후 8시간과 24시간 시점에서 혈액 배양을 실시하였을 때 OD 값의 급격한 감소 및 시험 결과의 변동을 확인하였고, 채혈 후 혈액 배양까지 지연시간에 따른 다른 기준 설정의 필요성을 제시하였다(Gormley 등, 2004). 이번 연구에서 총 10두에 대하여 채혈 후 1시간 이내, 채혈 후 12시간 및 채혈 후 24시간에 혈액 배양을 실시한 다음 TB-Feron ELISA Plus kit 검사를 실시하였을 때, 채혈 후 배양까지 시간이 지연됨에 따라 OD 값의 감소가 나타났으며, 채혈 후 1시간 이내에 혈액 배양을 실시한 OD 값에 비하여 24시간 후에 실시한 OD 값은 대략 20~30%정도의 OD 값을 나타냈다. 본 실험에서는 음성 개체의 혈액을 이용하여 실험하였기에 결과 판정에 영향은 없으나, OD 값이 판정 기준에 근접하여 있는 양성 시료의 경우 OD 값의 감소로 인한 결과의 변화도 가능할 것으로 판단된다. TB-Feron Plus kit를 사용한 검사의 경우 사용설명서상 24시간 이내에 배양을 시작할 것을 규정하고 있으나, 더 정확한 결과를 얻기 위하여 채혈 후 시간에 따라 결과 판정 기준의 재설정이 필요하며, 이를 위한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

소 결핵균에 감염된 초기에는 세포 매개 면역에 의한 감마인터페론 실험만 반응이 나타나고 피내 반응

을 유도하는 피내접종법에는 반응이 나타나지 않기 때문에, 감마인터페론 실험은 피내검사법보다 소 결핵의 조기 진단이 가능하다고 알려졌다(Vordermeier 등, 2004; Pollock 등, 2005). 이러한 반응의 시간 차이에 의하여 두 가지 시험을 병행 하여 실시하였을 때, 질병 진단율이 높아진다는 여러 연구가 있으며(Wood 등, 1992; Rua-Domenech 등, 2006; Sinclair 등, 2016; Jang 등, 2020), 최근 TB-Feron ELISA kit 또는 미근부 추벽 피내접종법을 병행 실시한 국내의 연구에서 민감도가 94.5% (n=91)로 확인되었다(Jang 등, 2020). 현재 우리나라는 국내에서 사육되고 있는 생후 12개월 이상의 소 및 거래되거나 가축시장에 출하되는 생후 12개월 이상의 소 등을 결핵병 검사대상 소로 지정하며 튜버큐린 피내 주사 반응법을 실시하고, 필요시 튜버큐린 반응과 병행하여 감마인터페론법을 실시하고 있다(결핵병 및 브루셀라 방역실시요령, 2019). 감마인터페론법을 보조적 수단으로 사용하는 다른 나라들과는 다르게 국내에서는 방역 정책상 감마인터페론 검사법이 튜버큐린 반응검사법과 동등하게 사용되고 있고, 2014년부터 2016년 까지 매년 우결핵 발생 이력이 있는 농가에서 사육되는 30만두 가량이 TB-Feron ELISA kit에 의하여 검사 되는 등 감마인터페론 검사법의 필요성과 수요는 증가되고 있다(Jang 등, 2020). 증가된 감마인터페론 검사법의 수요에 맞추어 새롭게 개발된 TB-Feron ELISA Plus kit의 성능에 관한 이번 연구는 TB-Feron ELISA Plus kit와 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit의 높은 일치율(99%)을 확인함과 동시에 증가된 혈중 림프구 수치는 감마인터페론 검사 결과에 영향을 미치지 않음을 확인함으로써, TB-Feron ELISA Plus kit의 성능을 검증하였다. 그러나 TB-Feron ELISA Plus kit를 사용한 실험에서 채혈 후 전혈 배양 개시까지 지연된 시간에 따른 OD 값의 감소가 큰 폭으로 나타남을 확인하여 채혈 후 배양까지 소모된 시간과 OD 값에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

## 결 론

본 실험에서 소 결핵병 양성우 42두와 음성우 54두에 대하여 TB-Feron ELISA Plus kit와 BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit를 사용하여 감마인터페론 검사를 실시한 결과 민감도, 특이도, 정확도가 각각 TB-Feron Plus kit에서 81.0% (34/42), 100% (54/54), 91.7% (88/96), BOVIGAM<sup>®</sup> TB kit에서 78.6% (33/42), 100% (54/54), 90.6% (87/96)

로 나타났으며, 두 키트 간 결과의 일치율은 99.0% (95/96), 일치도(Kappa)는 0.977로 나타났다.

위의 실험결과에 따라 두 키트 사이의 성능은 차이가 없음을 확인하였으며, 추가적으로 실시된 실험에서 혈중 높은 림프구 수치와 감마인터페론 검사법과의 비상관성을 확인함으로써 국내에 만연해있는 소류코시스 이환우에 대한 감마인터페론 실험결과의 신뢰성을 확인하였다. 또한 채혈 후 혈액 전처리까지의 시간이 지연됨에 따른 OD 값의 감소를 확인함으로써 혈액처리까지 지연된 시간에 따른 결과 판정 기준변화의 필요성을 확인하였다.

## 감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농식품 기술융합 창의인재양성사업의 지원을 받아 연구되었음(과제번호: 320005-4).

## CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## ORCID

Leegon Hong, <https://orcid.org/0000-0003-4519-5465>  
 Woojae Choi, <https://orcid.org/0000-0002-0779-9236>  
 Younghye Ro, <https://orcid.org/0000-0002-8567-4690>  
 Sunmin Ahn, <https://orcid.org/0000-0002-6300-7547>  
 Eunkyung Kim, <https://orcid.org/0000-0003-0242-7203>  
 Eunhee Choe, <https://orcid.org/0000-0001-5457-0066>  
 Danil Kim, <https://orcid.org/0000-0002-2426-9122>

## REFERENCES

- 강경선, 김기석, 김석, 김태중, 김현수, 백병걸, 서건호, 이범준, 이영순, 이영주, 이재일, 이준화, 이후장, 임윤규, 최농훈, 홍중해, 황규계. 2010. 결핵 (Tuberculosis). pp. 201-207. 수의학 및 인수공통전염병학. 문우당, 서울.
- 농림수산식품부. 2019. 결핵병 및 브루셀라병 방역실시요령. 제 2019-30호.

- 농림축산검역본부. 2020. 법정가축전염병 발생통계. <https://www.kahis.go.kr/home/lkntscriinfo/selectLkntsStats.do>.
- 질병관리본부. 2020. 2020 국가결핵관리지침. pp. 269-274.
- Alvarez J, Perez A, Bezos J, Marques S, Grau A, Saez JL, Minguez O, de Juan L, Dominguez L. 2012. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet Microbiol* 155(1): 38-43.
- Blagitz MG, Souza FN, Batista CF, Azevedo LFF, Sanchez EMR, Diniz SA, Silva MX, Haddad JP, Della Libera A. 2017. Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Res Vet Sci* 114: 109-116.
- Buddle B, Livingstone P, De Lisle G. 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N Z Vet J* 57(4): 173-180.
- Charleston B, Hope JC, Carr BV, Howard CJ. 2001. Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec* 149(16): 481-484.
- Cho YS, Kim JM, Jung SC, Woo SR, Kim JY, Yoo HS, Park YH, Ahn JS. 1999. Diagnosis of bovine tuberculosis by single intradermal comparative tuberculin test and gamma-interferon assay. *Korean J Vet Res* 39(6): 1119-1125.
- Chu KS, Hyong SG, Im JC, Seo LW. 2007. Seroprevalence of infection with *Neospora caninum*, *Mycobacterium paratuberculosis*, bovine leukosis and *Brucella abortus* of dairy cattle in Jeounbuk-Iksan area. *Korean J Vet Serv* 30(1): 95-102.
- de la Cruz ML, Branscum AJ, Nacar J, Pages E, Pozo P, Perez A, Grau A, Saez JL, de Juan L, Diaz R, Minguez O, Alvarez J. 2018. Evaluation of the Performance of the IDvet IFN-Gamma Test for Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Spain. *Front Vet Sci* 5: 229.
- de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 81(2): 190-210.
- Doherty ML, Bassett HF, Quinn PJ, Davis WC, Monaghan ML. 1995. Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res* 56(10): 1300-1306.
- George JW, Snipes J, Lane VM. 2010. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *VET CLIN PATH* 39(2): 138-148.
- Gormley E, Doyle M, McGill K, Costello E, Good M, Collins J. 2004. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *VET IMMUNOL IMMUNOP* 102(4): 413-420.
- Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol* 112(2-4): 171-179.
- Ha MJ, Oh GM, Kim SY, Do JC, Lee YJ. 2018. A comparative study of the gamma-interferon assay and the single intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions. *Korean J Vet Serv* 41(2): 71-78.
- Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, Morlock GP, Crawford JT, Lobue PA. 2008. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis* 47(2): 168-175.
- Jang YH, Kim TW, Jeong MK, Seo YJ, Ryoo S, Park CH, Kang SS, Lee YJ, Yoon SS, Kim JM. 2020. Introduction and Application of the Interferon-gamma Assay in the National Bovine Tuberculosis Control Program in South Korea. *Front Vet Sci* 7: 222.
- Jung K, Shim H-S, Baek J-J. 2012. Investigation of bovine leukemia virus infection in dairy farms of northern Gyeonggi province, Korea. *Korean J Vet Serv* 35(4): 333-7.
- Keck N, Boschirola ML, Smyej F, Vogler V, Moyon JL, Desvaux S. 2018. Successful Application of the Gamma-Interferon Assay in a Bovine Tuberculosis Eradication Program: The French Bullfighting Herd Experience. *Front Vet Sci* 5: 27.
- Kim H-U, Lee E-Y, Lee K-K, Kim S-H, Moon B-Y, So B-J, Kim Y-H. 2017. Seroprevalence of the bovine leukemia virus among Korean native cattle in South Korea. *Journal of Preventive Veterinary Medicine* 41(1): 52-55.
- Kim YH. 2002. Bovine Tuberculosis. *Korean Journal of Veterinary Pathology*:53-60.
- Ku BK, Jeon BY, Kim JM, Jang YB, Lee H, Choi JY, Jung SC, Nam HM, Park H, Cho SN. 2018. Investigation of bovine tuberculosis outbreaks by using a trace-back system and molecular typing in Korean Hanwoo beef cattle. *J Vet Sci* 19(1): 45-50.
- Lee JJ, Kim DS, Lee JH, Lee CS. 2010. A comparative study on the diagnosis of ELISA test and PPD test of the bovine tuberculosis. *Korean J Vet Serv* 33(4): 335-340.
- Menzies FD, Neill SD. 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 160(2): 92-106.
- OIE. 2008. Bovine Tuberculosis. pp. 1-17. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th ed. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, Paris.
- OIE. 2015. OIE Procedure for Registration of Diagnostic kits, BOVIGAM<sup>®</sup> - *Mycobacterium bovis* Gamma interferon test kit for cattle. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/OIE\\_Register\\_Bovigam\\_Abstract\\_v1\\_05.2015.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/OIE_Register_Bovigam_Abstract_v1_05.2015.pdf)
- Olea-Popelka F, Muwonge A, Perera A, Dean AS, Mumford E, Erlacher-Vindel E, Forcella S, Silk BJ, Ditiu L, El Idrissi A, Raviglione M, Cosivi O, LoBue P, Fujiwara PI. 2017. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. *Lancet Infect Dis* 17(1): e21-e25.
- Pollock JM, Welsh MD, McNair J. 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diag-



- nosis and control of disease. *Vet Immunol Immunopathol* 108(1-2): 37-43.
- Rodwell TC, Kapasi AJ, Moore M, Milian-Suazo F, Harris B, Guerrero LP, Moser K, Strathdee SA, Garfein RS. 2010. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. *Int J Infect Dis* 14 Suppl 3: e129-135.
- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust Vet J* 69(1): 1-4.
- Ryan TJ, Buddle BM, De Lisle GW. 2000. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res Vet Sci* 69(1): 57-61.
- Shin SW, Shin MK, Cha SB, Woo JT, Lee SM, Ku BK, Cho YS, Jung SC, Yoo HS. 2011. Comparison of tuberculin skin test with Interferon-gamma assay for the diagnosis of bovine tuberculosis in Korean cattle. *Korean Journal of Veterinary Research* 51: 117-121.
- Sinclair JA, Dawson KL, Buddle BM. 2016. The effectiveness of parallel gamma-interferon testing in New Zealand's bovine tuberculosis eradication programme. *Prev Vet Med* 127: 94-99.
- Suh GH, Lee CG, Lee CY, Hur TY, Kang SJ, Son DS, Ryu IS, Ahn BS, Kim NC, Joo YS. 2003. Prevalence of anti-bovine leukemia virus antibodies in dairy and Korean native cattle. *J Vet Clin* 20(2): 172-176.
- Sung MS, Kim S, Kim SY, Son JK. 1997. Studies on inoculation test of experimental animal and isolation and identification of *Mycobacterium* in tubercle and lymph node of tuberculin(PPD) test positive dairy cattle. *Korean J Vet Serv* 20(2): 205-215.
- Vordermeier M, Goodchild A, Clifton-Hadley R, de la Rua R. 2004. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Vet Rec* 155(2): 37-38.
- Wee SH, Kim CH, More SJ, Nam HM. 2010. *Mycobacterium bovis* in Korea: an update. *Vet J* 185(3): 347-350.
- Wood PR, Corner LA, Plackett P. 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res Vet Sci* 49(1): 46-49.
- Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, de Witte K, et al. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 31(1): 71-79.
- Wood PR, Jones SL. 2001. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81: 147-155.