

Seroreactive Mycobacterial Proteins and Lipid in Cattle with Bovine Tuberculosis

Haet Sal Jeon¹, A-Rum Shin¹, Yeo-Jin Son¹, Jae-Myung Kim², Yunho Jang²,
Suk Kim³, Kang-In Lee¹, Chul Hee Choi¹, Jeong-Kyu Park¹ and Hwa-Jung Kim^{1*}

¹Department of Microbiology and Research Institute for Medical Sciences, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon; ²Bacteriology Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang, Gyeonggi-do;

³Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

Bovine tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* is a major economic problem in several countries. Antibody responses are useful indicators of *M. bovis* infection of cattle. To overcome drawback of serological tests with low sensitivity, identification and characterization of multiple serodiagnostic antigens has been required. In this study, the antigens with strong antibody reactivity were searched using fractionation of *M. bovis* culture filtrate proteins and probing with sera from *M. bovis*-infected cattle. Twelve proteins which have not previously been described as serologic targets were identified and six proteins among them were expressed in *Escherichia coli*. The mycobacterial lipoarabinomannan (LAM) with strong seroreactivity in cattle was identified and purified. IgG and IgA responses against the newly identified proteins, the seroreactive proteins with strong antibody reactivity in human tuberculosis, and LAM were compared in *M. bovis*-infected and non-infected cattle as well as in field samples. In general, sensitivity of the tested antigens was higher in *M. bovis*-infected cattle than purified protein derivative (PPD) (+) field samples. Although a diverse reactivity and sensitivity according to the antigens were shown, the diagnostic utility of both IgA and IgG antibody to the antigens was similar in *M. bovis*-infected cattle but utility of IgG antibody was superior to that of IgA in field samples. The antigen with the highest diagnostic value was LAM in both the groups. Other antigens with considerable diagnostic utility were BCG_3488c, BCG_2330, Antigen 85, HspX, and Rv3593 when considered the sensitivity and area under the receiver characteristic curve (AUC) value. These antigens may be valuable candidates to be included in a cocktail test kit for bovine tuberculosis diagnosis.

Key Words: Bovine tuberculosis, Antibody response, Recombinant protein, Lipoarabinomannan

INTRODUCTION

우결핵(bovine tuberculosis)은 *Mycobacterium bovis*에 의해 발생하는 인수공통전염병이다 (1). 우리나라를 포함한

많은 나라는 우결핵 관리를 위해 purified protein derivative (PPD) 피내반응 검사를 주로 사용하며 양성 개체는 살처분하는 정책을 펴고 있다. 따라서 양성 개체의 살처분, 살처분 보상금, 매몰비용, 양성농장우 이동제한 등과 같이 우결핵으로 인한 경제적 손실이 막대하다. *M. bovis*는

Received: April 7, 2015/ Revised: May 4, 2015/ Accepted: May 7, 2015

*Corresponding author: Hwa-Jung Kim. Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, 6 Munwha-Dong, Jung-Ku, Daejeon, 301-747, Korea.

Phone: +82-42-580-8242, Fax: +82-42-585-3686, e-mail: hjukim@cnu.ac.kr

**This study was financially supported by the Animal and Plant Quarantine Agency (Z-1541778-2012-13-01), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

사람과 가축 및 여러 야생 동물에 광범위하게 감염을 일으키기 때문에 감염원을 쉽게 제거할 수 없다 (2, 3). 비록 감염된 양성우를 살 처분하더라도 지속적인 감염원이 존재하기 때문에 PPD 피내 진단만으로는 결핵을 완전히 제어하는 데는 오랜 시간이 소요된다. 따라서 소와 다양한 야생 동물에 기존 진단법과 병용할 수 있는 새로운 진단법 개발이 필요하다.

PPD 피내 검사법의 진단 특이성을 개선하기 위해서 우결핵균 PPD와 조형결핵균 유래의 PPD로 피내반응 검사를 비교하는 피내 검사법이 개발되어 사용되고 있고 (4), 또한 사람잠복결핵 진단에 사용되는 interferon- γ (IFN- γ) release assay (IGRA)를 우결핵 진단에도 도입하고 있다 (5). PPD 검사법은 단순하고 경제적이지만 확진을 위해 농장에 2번 방문을 필요로 하기 때문에 인력과 시간이 많이 소요되어 결핵행 검사를 확대하는데 어려움이 있다. 또한 질병 초기단계에서 음성의 결과를 얻을 수 있다는 제한점이 있다 (2, 3). 또한 IGRA은 비용이 많이 소요되고 검사를 위해 숙련된 전문가를 필요로 한다.

혈청학적인 방법은 다수를 대상으로 우결핵 노출여부를 신속하고 경제적으로 스크리닝을 할 수 있는 방법이기 때문에 보조진단법으로서의 가능성이 보고되고 있다 (6, 7). 그러나 사람결핵의 혈청학적인 진단법과 유사하게 특정 항원에 대한 개체간의 다양한 면역반응 때문에 민감도와 특이도를 충분히 만족시키는 방법이 없다 (4, 6). 민감도를 높이기 위해서는 항체반응을 강하게 유도하는 항원들을 발굴하여 다중항원을 적용한 진단법 개발이 요구되고 있다. 현재 우결핵의 혈청학적 진단에 사용되는 항원으로는 MPB70, MPB83, ESAT-6, CFP-10, Antigen 85 (Ag85) 등의 항원이 보고되었지만 MPB70과 MPB83 항원 이외에는 뚜렷한 항원이 없는 상태이다 (6, 8, 9). 최근에 몇 개의 단백을 fusion 시킨 항원에 대한 진단적인 유용성이 보고된 바 있다 (4). 사람의 혈청학적인 연구는 특정 항원에 대한 IgG와 IgA 항체 모두 진단적인 유의성이 인정되고 있지만 우결핵의 경우 대부분 항원에 대한 IgG 항체가에 대한 진단적인 유의성을 평가하였다. 최근에 본 연구팀은 우결핵의 혈청학적인 진단에서 IgG 뿐만 아니라 IgA의 진단적인 유의성을 보고한 바 있다 (10).

본 연구는 *M. bovis* culture filtrate proteins (CFPs)으로부터 우결핵 진단에 적용될 수 있는 새로운 혈청학적 항원을 발굴하였다. 발굴된 항원 중에서 몇 종의 항원은 대장균에서 재조합단백질을 생산하여 우결핵 감염이 확인된

소, PPD (+) 또는 PPD (-) 소를 대상으로 이들 항원에 대한 IgG와 IgA에 대한 항체가를 측정하여 진단적인 유의성을 평가하였다. 또한 이외에도 기존의 *M. tuberculosis* 혈청학적 항원들에 대한 항체 반응성을 소에서 측정하였다.

MATERIALS AND METHODS

혈청

배양 또는 조직소견에서 우결핵 감염이 확인된 소 혈청 30개, 매년 피부반응검사서 음성을 나타내는 농장의 건강한 소 혈청 30개를 농림수산검역검사원(안양, 경기도)에서 분양 받았다. 혈청학적인 항원의 스크리닝을 위해 인위적으로 우결핵을 감염시킨 소 혈청은 또한 농림수산검역검사원에서 분양 받았다. 필드샘플로는 경상남도 지역의 몇 개의 농장에서 PPD 양성 혈청 59개, 음성 혈청 96개를 수집하였다. PPD 피부반응검사는 12개월 이상 소의 미근부 추벽에 PPD 진단액을 피내접종하고 72시간 후에 피부두께를 측정하였다. 접종 전과 접종 후의 종창의 차이가 5 mm 이상을 양성, 3 mm 이하를 음성으로 판정하였다.

우결핵균 배양액(CFP)의 분획화

우결핵균(*M. bovis* AN5)은 Sauton 배지(pH 7.2)에 37°C, 5~6주간 표면 배양하고 원심분리하여 배양액을 얻었다. 배양액을 0.22 μ m의 bottle-top filter (3 kDa cut-off membrane)로 여과멸균하고 농축하였다. 배양액의 분획화는 Byun 등 (11)의 방법에 준하여 실시하였다. 약술하면 CFPs를 일차적으로 ammonium sulfate precipitation (ASP)으로 0~80% 또는 50~80% 분획으로 침전시킨 다음, 침전물은 1 M ammonium sulfate가 포함된 50 mM potassium phosphate buffer (kPB, pH 7.0)로 부유하여 Phenyl-Sepharose column (GE Healthcare Bio-Sciences, NJ, USA)에 가하여 hydrophobic interaction chromatography (HIC)를 실시하였다. Sepharose column에 흡착하지 않고 통과되는 단백질분획(HIC pass 분획), 50 mM kPB로 용출된 분획(HIC 50 mM), 1 mM kPB로 용출된 분획(HIC 1 mM)으로 일차 분획화를 실시하였다. 이들 분획을 1 mM kPB로 투석하여 hydroxylapatite (HAT) column에 가하여 통과한 분획(HAT pass 분획)과 500 mM kPB로 용출된 분획(HAT 500 mM 분획)으로 분획화를 실시하고 필요할 경우 ion-exchange chromatography로 분획화를 실하였다. 각 분획의 단백질 농도는 bovine serum

albumin (BSA)를 표준으로 하여 Micro BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 Bradford method로 측정하였다.

Lipoarabinomannan (LAM) 정제

우결핵균 CFPs에 대한 항체반응을 면역블롯으로 분석하는 과정 중에 세포벽의 당지질성분인 LAM 부위에 강한 항체반응이 관찰되었다. 따라서 결핵균 세포벽으로부터 Hamasur 등 (12)과 Mazurek 등 (13)의 방법에 준하여 LAM을 정제하였다. 약술하면 결핵균을 고압증기 멸균하여 사멸시킨 후에 유기용매($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 10:10:3$)로 delipidation 시키고 Triton-X 114와 단백분해효소 억제제가 포함된 braking buffer로 부유하여 초음파로 균을 파쇄하였다. 원심분리(27,000 x g, 1시간) 후 얻은 상층액으로부터 Triton X-114의 특성을 이용한 phase separation을 통해 LAM을 정제하였다. 최종적으로 pronase를 처리하여 모든 단백질을 분해하였다.

SDS-PAGE와 면역블롯

분획화된 각 분획은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하고 Coomassie blue로 염색하여 관찰하였다. 면역블롯은 Kwon 등 (14)의 방법에 준하여 실시하였다. 약술하면 전기영동으로 분리된 단백질을 Polyvinyl difluoride membrane (PVDF, Milipore corporation, Billerica, MA, USA)에 전사한 후에 5% skim milk가 포함된 Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris, 137 mM NaCl)으로 blocking하였다. 1차 항체반응은 *M. bovis* 감염 혈청을 5% skim milk가 포함된 TBS에 1,000배로 희석하여 4°C에서 16~18시간 반응시켰다. 2차 항체는 alkaline phosphatase-conjugated anti-bovine IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 2,000배 희석하여 상온에서 2시간 반응하였다. 발색반응 용액은 alkaline phosphatase (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , pH 9.0) 용액 5 ml에 33 μl 의 nitro blue tetrazolium (NBT; Promega, Madison,

Table 1. Primers sets for genes amplified by polymerase chain reaction (PCR)

Protein	Primer sequences (5' - 3')	Restriction site used
BCG_0389	5' <u>CATATG</u> GCTCGTGCGGTCGGGATCGAC 3'	<i>Nde</i> I
	5' <u>AAGCTT</u> CTTGCCCTCCCGGCCGTCGTC 3'	<i>Hind</i> III
BCG_1909	5' <u>CATATG</u> AAGTCAGCAAGCGACCCGTTTC 3'	<i>Nde</i> I
	5' <u>AAGCTT</u> TGTGACCGCCAGTAATGCCAC 3'	<i>Hind</i> III
BCG_2330	5' <u>CATATG</u> GCCACCAGTAGCGACGACATC 3'	<i>Nde</i> I
	5' <u>AAGCTT</u> TGGGCCGACAGGAAGCTCAGC 3'	<i>Hind</i> III
BCG_2765	5' <u>CATATG</u> CCCGTCGTCGTCGTCGCCACG 3'	<i>Nde</i> I
	5' <u>AAGCTT</u> CCGGCGCAGCTGCCCTTTGCT 3'	<i>Hind</i> III
BCG_3488c	5' <u>CATATG</u> GCGAAGGTGAACATCAAGCCA 3'	<i>Nde</i> I
	5' <u>AAGCTT</u> CTTGGAACGACGGCCAGCAC 3'	<i>Hind</i> III
Rv1605	5' GGGCCCC <u>CATATG</u> TATGCCGACCGTGACCTTCCGGGG 3'	<i>Nde</i> I
	5' GGGCCCC <u>AAGCTT</u> TCGCACGGTGATTCCTTCCGCGGC 3'	<i>Hind</i> III
Rv3593	5' CGCC <u>CATATG</u> AATCACGGGCACCGGATCGAC 3'	<i>Nde</i> I
	5' CCC <u>AAGCTT</u> TTTGTGGCGCTATCAACGCAAAG 3'	<i>Hind</i> III
MAV5183	5' <u>CATATG</u> TCCAAGCCGGGG CTTCGGGTG 3'	<i>Nde</i> I
	5' <u>AAGCTT</u> GGTGGCGGGCTGGGCGGGTTG 3'	<i>Hind</i> III
MAV4300	5' GGGCCCC <u>CATATG</u> TCTGTGCGACCGGACGTCGAA 3'	<i>Nde</i> I
	5' GGGCCCC <u>TCGAGG</u> CGGGAGAACATGATGGCGCG 3'	<i>Xho</i> I

WI, USA)과 16.5 μ l의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP; Promega)를 첨가하여 사용하였다. 발색반응 후 1% acetic acid가 첨가된 증류수로 세척하여 반응을 정지시켰다.

2-차원 전기영동(2-dimensional electrophoresis; 2-DE)과 단백질 동정

2-DE는 pH 4~7의 IPG strip (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 Kwon 등 (14)의 방법에 준하여 isoelectric focusing을 실시하고, 2차원은 SDS-PAGE로 분리한 다음 Coomassie blue로 염색하거나 면역블롯으로 분석하였다. 단백질의 동정은 2-DE 후 Coomassie blue로 염색한 겔에서 유의성이 있는 spot을 Yonsei Proteomic Research Center (Seoul, Korea)에 의뢰하여 liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS)로 동정하였다.

재조합단백질 발현 및 정제

재조합단백질 발현을 위해 우결핵균 genomic DNA로부터 각 단백질의 해당 유전자를 Table 1과 같은 primer를 사용하여 증폭하였고, 생산된 유전자 산물은 발현벡터인 pET22b(+)에 클로닝하였다. 각 유전자가 삽입된 발현벡터를 형질전환시킨 *Escherichia coli* BL-21를 600 nm에서 흡광도가 0.4~0.6까지 이르도록 배양한 후 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; ELPIS-Biotech, 대전, 한국)를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 발현된 단백질은 nikel-nitrilotriacetic acid (NI-NTA; Qiagen, Valencia, CA, USA) agarose를 이용하여 제조회사의 방법에 준하여 정제하였다. 사람 결핵환자에서 혈청진단항원으로 알려진 몇 종의 항원에 대한 우결핵에서의 항체가를 분석하기 위해서는 본 연구실에서 스크리닝을 통해 동정된 결핵의 혈청학적 진단항원인 Rv3593, Rv1605, MAV5183, MAV4300에 대한 재조합단백질을 정제하였다. 결핵균(*M. tuberculosis* H37Rv ATCC27294)의 genomic DNA로부터 Rv3593과 Rv1605의 유전자를, *M. avium* 104균주의 genomic DNA로부터는 MAV5183, MAV4300의 유전자를 Table 1과 같은 primer를 사용하여 증폭하고 발현벡터에 클로닝한 후 대장균에서 재조합단백질을 생산하여 정제하였다. 또한 결핵균 배양으로부터 정제된 native Ag85 (15), 대장균에서 발현 정제한 재조합단백질 HspX와 CysA2 항원을 준비하였다 (16, 17).

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

각 단백질에 대한 항체가는 ELISA로 Shin 등 (16)의 방법에 준하여 측정하였다. 약술하면 96-well microplate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 각 단백질을 well당 100 ng씩 coating하고, BSA이 첨가된 PBS로 blocking을 실시하였다. 혈청은 blocking buffer에 1:50으로 희석하여 각 well당 0.1 ml씩 분주하여 반응시켰고, 2차 항체는 1:5,000으로 희석된 alkaline phosphatase-conjugated anti-bovine IgG (Sigma-Aldrich) 또는 IgA (Bethyl Lab, Montgomery, TX, USA)를 well당 0.1 ml씩 분주하여 반응시켰다. 발색반응은 3차 증류수 5 ml 1개의 p-Nitrophenyl phosphate tablet과 1개의 Tris Buffer tablet (Sigma-Aldrich)를 녹인 다음 각 well당 0.2 ml씩 분주하여 30분 동안 반응 후, 3 M NaOH를 well당 50 μ l씩 첨가하여 반응을 정지시켰다. 흡광도(optical density, OD)는 405 nm에서 microplate reader (Molecular

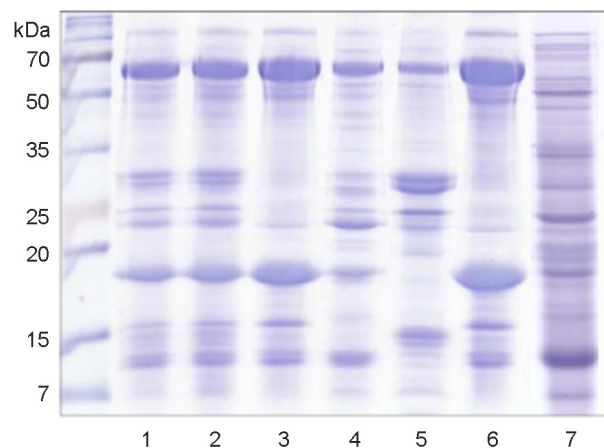


Figure 1. SDS-PAGE analysis of the fractionation of *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins (CFPs). The 0~80% or 50~80% ammonium sulfate precipitate (ASP) of *M. bovis* AN5 total CFPs (lane 1) was fractionated into a pass fraction, 50 mM potassium phosphate buffer (kPB) eluate, and 1 mM kPB eluate by hydrophobic interaction chromatography (HIC). Three fractions were separated into a pass fraction and 500 mM kPB eluate by hydroxylapatite (HAT) chromatography, and then if necessary, further fractionated by diethylaminoethanol (DEAE) ion exchange chromatography. Total CFPs → 0~80% ASP (lane 2), total CFPs → 0~80% ASP → HIC pass (lane 3), total CFPs → 0~80% ASP → HIC 50 mM (lane 4), total CFPs → 0~80% ASP → HIC 1 mM (lane 5), total CFPs → 0~80% ASP → HIC pass → HAT pass (lane 6), *M. bovis* BCG total CFPs → 50~80% ASP → HAT pass → DAEA 51~66 (lane 7). The gel was stained with Coomassie blue.

Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

통계 분석

항원에 대한 IgG와 IgA 항체가의 양성과 음성을 구분하기 위한 cut-off 값은 건강한 대조 혈청의 항체가의 평균값에 2배의 표준편차(standard deviation; SD)를 더한 값을 기준으로 하였다. 검사결과의 정확성은 area under the receiver operator characteristic (ROC) curve (AUC) 값을 계산하여 비교하였다. 우결핵에 감염된 소와 건강한 소 혈청의 평균 흡광도 간의 통계학적인 유의성 차이는 Mann-Whitney test로 평가하였다. 모든 통계 분석은 Prism software, version 5 (GraphPad Software)를 사용하였다.

RESULTS

우결핵균 단백항원의 혈청학적인 분석과 항원 동정

우결핵균의 CFPs는 수많은 단백항원 밴드를 포함하고

있다(Fig. 1의 lane 1). 이들로부터 유의성 있는 단백질을 동정하기 위해서는 복잡한 항원을 분획화하여 분석할 필요가 있었다. 본 연구에서는 CFPs를 일차적으로 0~80% 또는 50~80%의 ASP, HIC, HAT 또는 ion-exchange chromatography를 적용하여 분획화를 실시하였다(Fig. 1). 이들 분획의 혈청학적인 반응성은 우결핵균을 인위적으로 감염시킨 소 혈청을 사용하여 면역블롯으로 분석하였다. 유의성이 있는 분획은 2-DE로 분리하고 면역블롯을 실시하였다(Fig. 2). Fig. 2A는 우결핵균의 CFPs의 0~80% ASP을 HIC의 column에 가하여 흡착되지 않고 통과된 분획을 다시 HAT column에 가하여 흡착되지 않은 분획(total CFPs → 0~80% ASP → HIC pass → HAT pass)을 2-DE로 분리하여 Coomassie blue 염색과 면역블롯으로 분석한 결과이다. 3개의 spot이 우결핵균이 감염된 소의 혈청과 강하게 반응하였다. 또 다른 예로 Fig. 2D의 경우는 CFPs의 0~80% ASP을 HIC column에 가한 후 50 mM kPB로 용출된 분획(total CFPs → 0~80% ASP → HIC 50 mM)을 2-DE로 분리

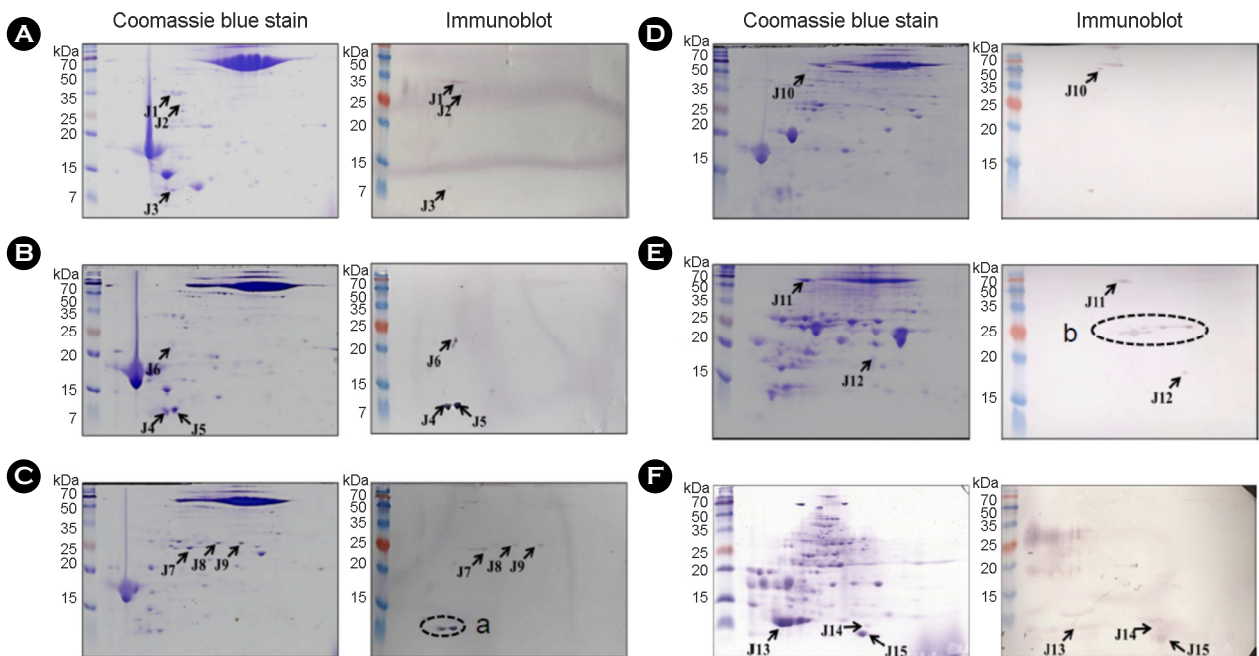


Figure 2. 2-DE and immunoblot analysis of fractionated culture filtrate proteins (CFPs). The fractions were separated by isoelectric focusing using a 7 cm pH gradient strip (pH 4 to 7) in the first dimension, and 15% SDS-PAGE in the second dimension. *M. bovis* AN5 total CFPs → 0~80% ASP → HIC pass → HAT pass (A), total CFPs → 0~80% ASP → HIC pass (B), total CFPs → 0~80% ASP (C), total CFPs → 0~80% ASP → HIC 50 mM (D), total CFPs → 0~80% ASP → HIC 1 mM (E) and *M. bovis* BCG total CFPs → 50~80% ASP → HAT pass → DAEA 51~66 (F). The gels were analyzed by Coomassie blue stain and immunoblot with *M. bovis*-infected sera.

하고 Coomassie blue 염색과 면역블롯으로 분석한 결과 감염 혈청과 강하게 반응하는 1개의 spot을 동정하였다. 그러나 우결핵이 감염되지 않은 소 혈청으로 면역블롯을 한 결과 뚜렷하게 반응하는 spot이 관찰되지 않았다(data는 제시하지 않음). Fig. 2C의 a로 표시된 영역의 spot은 J4와 J5와 일치하는 spot이었고, Fig. 2E의 b로 표시된 영

역의 spot은 J7, J8, J9 spot과 일치하였다. 이와 같이 총 6개의 분획을 2-DE로 분석한 결과 우결핵균이 감염된 소의 혈청과 강하게 반응하는 15개의 spot이 관찰되었다. 이들 spot을 Yonsei Proteomic Research Center에 의뢰하여 LC-ESI-MS로 동정한 결과는 Table 2와 같다. Antigen 85A (Ag85A)로 동정된 J7, J8, J9 spot을 제외한 나머지 단백질

Table 2. Identification of *Mycobacterium bovis* seroreactive proteins by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS)

Spot No.	Protein	Mass (kDa)	pI	Amino acid (aa)	Locus tag
J1	Conserved hypothetical protein	31.567	11.92	288	BCG_3953c
J2	Possible transposase	25.021	11.39	225	BCG_3456
J3	Probable transposase (fragment)	23.975	11.41	228	BCG_1093c
J4	Hypothetical protein BCG_2330	10.598	9.35	95	BCG_2330
J5	Conserved hypothetical protein	16.207	7.79	145	BCG_1909
J6	Putative conserved lipoprotein lpqU	25.983	6.96	243	BCG_1079
J7, 8, 9	Secreted antigen 85A precursor	35.686	6.1	338	BCG_3866c
J10	Conserved hypothetical protein	69.775	4.7	677	BCG_1871c
J11	Probable chaperone protein dnaK	66.83	4.85	625	BCG_0389
J12	Probable membrane protein	23.116	6.81	209	BCG_2817
J13	Chain A, crystal structure of cpn10, GroES	10.667	4.6	100	BCG_3488c
J14	Cold shock protein A	7.336	5.2	67	BCG_3706c
J15	Hypothetical protein Rv2749	11.149	5.2	104	BCG_2765

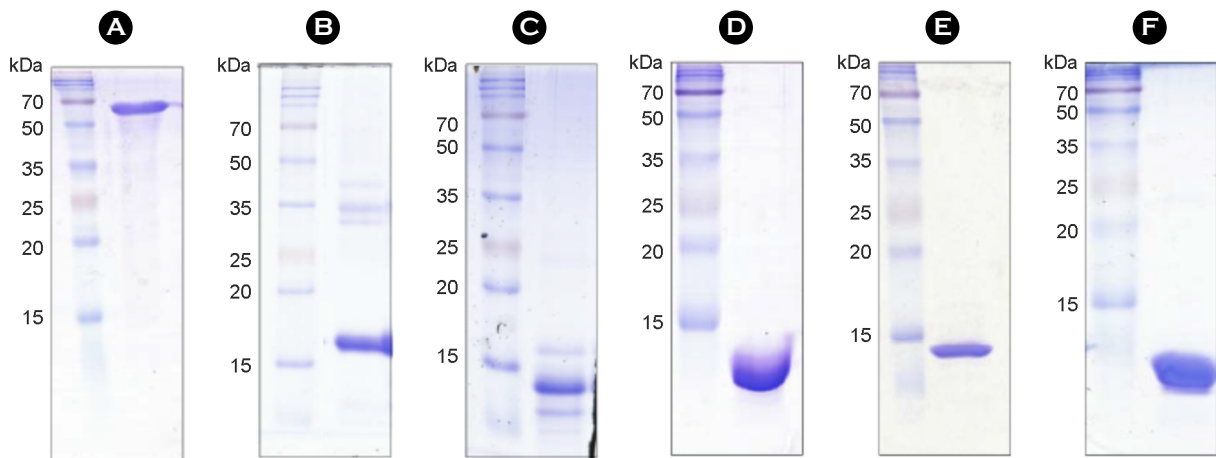


Figure 3. SDS-PAGE analysis of purified proteins. BCG_0389 (A), BCG_1909 (B), BCG_2330 (C), BCG_2765 (D), BCG_3488c (E) and BCG_3706c (F) proteins were overexpressed in *Escherichia coli*, purified by Ni-NTA affinity chromatography, and analyzed by SDS-PAGE with Coomassie blue staining.

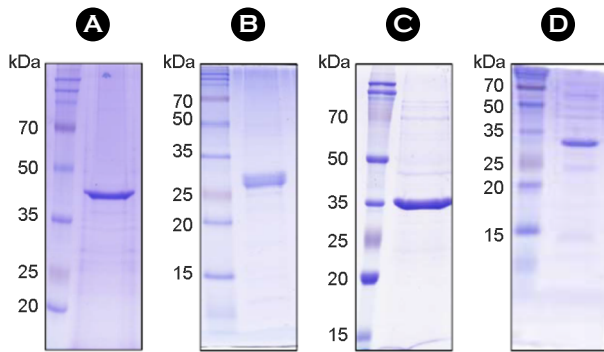


Figure 4. SDS-PAGE analysis of purified proteins with diagnostic utility in human tuberculosis. The purified recombinant proteins of Rv3593 (A), Rv1605 (B), MAV5183 (C) and MAV4300 (D) were subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie blue.

들은 우결핵의 혈청학적 반응성에 대한 연구보고가 없는 항원이었다. 이들 모든 단백질의 유전자 서열은 *M. bovis* BCG와 *M. bovis* AN5와 일치하였기 때문에 BCG_3593c, BCG_3456 등과 같이 BCG 단백질 number로 표기하였다 (Table 2).

재조합단백질의 정제

동정된 단백질 중 Ag85를 제외한 12개의 단백질에 대한 해당 유전자를 발현벡터인 pET22b(+)에 모두 클로닝하였다. 그러나 각 유전자가 삽입된 발현벡터를 대장균에 형질전환 시킨 후에 발현여부를 확인한 결과 6개의 단백질인 BCG_2330, BCG_1909, BCG_0389, BCG_3488c, BCG_3706c, BCG_2765만이 발현되었고 정제할 수 있었다. 정제된 각 재조합단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과 예측되는 분자량 부위에 주요 band로 정제되었고, 항체반응을 측정할 수준인 90% 이상의 순도를 나타내었다 (Fig. 3).

본 실험실에서 폐결핵환자 혈청으로 스크리닝하여 동정된 혈청학적 진단항원인 *M. tuberculosis* 항원 Rv3593과 Rv1605 단백질, *M. avium* 항원인 MAV5183과 MAV4300 단백질을 대장균에서 발현하여 정제하였다(Fig. 4). 이들 4개의 재조합단백질 또한 해당되는 분자량에 하나의 major band로 정제되었고 항체반응을 측정할 수 있을 정도의 순도를 나타내었다. 본 교실에서 기존에 보고한 혈청학적 항원인 native Ag85, HspX, CysA 항원은 이미 보고된 논문 (15~17)에서 정제된 항원을 사용하였다.

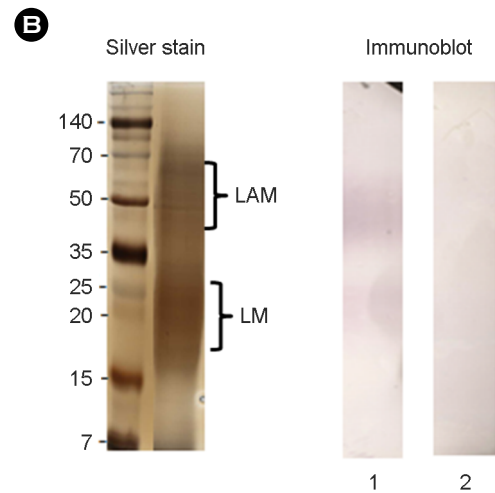
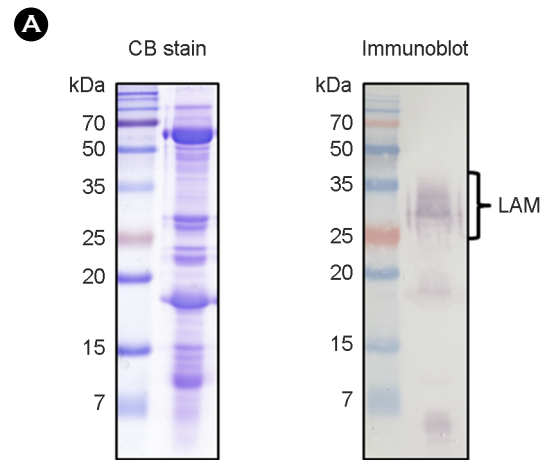


Figure 5. Antibody reactivity and purification of lipoarabinomannan (LAM). (A) The *M. bovis* CFPs was analyzed with Coomassie blue (CB) staining and immunoblot using *M. bovis*-infected cattle sera. (B) LAM from total lipid extract of *M. tuberculosis* was purified by Triton-X 114 phase partitioning, separated by SDS-PAGE, and then analyzed with silver staining and immunoblot using sera of *M. bovis*-infected (lane 1) or *M. avium*-infected cattle (lane 2). LM, lipomannan.

LAM의 정제

우결핵균의 CFPs를 SDS-PAGE로 분리하고 우결핵균을 감염시킨 소 혈청으로 면역블롯을 실시한 결과 Fig. 5A와 같이 LAM 부위에 해당되는 band에 강한 항체반응을 나타내었다. 따라서 균체로부터 LAM을 정제하고 전기영동으로 분리하여 silver stain을 한 결과 LAM 뿐만 아니라 lipomannan (LM)도 동시에 정제되었음이 확인되었다(Fig. 5B). 정제된 LAM은 우결핵균을 감염시킨 소 혈청과는

Table 3. IgG antibody responses to each antigen in sera from *Mycobacterium bovis*-infected cattle and non-infected cattle^a

Antigens	Groups (n=60)					
	<i>M. bovis</i> -infected cattle (n=30)				Non-infected cattle (n=30)	
	Mean OD \pm SD	% sensitivity (no. of positive samples)	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$) (95% CI)	P value ^b	Mean OD \pm SD	% specificity (no. of positive samples)
BCG_0389	0.0218 \pm 0.0206	23.3 (7)	0.6422 (0.5007~0.7838)	0.0585	0.0124 \pm 0.0132	90.0 (3)
BCG_2330	0.1664 \pm 0.0657	3.3 (1)	0.6289 (0.4854~0.7724)	0.0864	0.1252 \pm 0.092	100.0 (0)
BCG_2765	0.0021 \pm 0.0129	16.7 (5)	0.6778 (0.5395~0.8160)	0.018	0.0001 \pm 0.0094	96.7 (1)
BCG_3488c	0.0065 \pm 0.0102	3.3 (1)	0.7489 (0.6226~0.8752)	0.0009	0.0018 \pm 0.012	96.7 (1)
Ag85	0.0738 \pm 0.2035	53.3 (16)	0.8450 (0.7487~0.9413)	<0.0001	0.0002 \pm 0.0058	96.7 (1)
HspX	0.0613 \pm 0.2137	26.7 (8)	0.7711 (0.6531~0.8891)	0.0003	0.0061 \pm 0.0082	93.3 (2)
CysA	0.0137 \pm 0.0129	40.0 (12)	0.8689 (0.7764~0.9613)	<0.0001	0.0017 \pm 0.0057	96.7 (1)
Rv1605	0.0076 \pm 0.0133	30.0 (9)	0.7294 (0.5980~0.8609)	0.0023	0.0002 \pm 0.0054	96.7 (1)
Rv3593	0.0229 \pm 0.0538	33.3 (10)	0.7206 (0.5895~0.8516)	0.0034	0.003 \pm 0.0059	96.7 (1)
MAV5183	0.2726 \pm 0.2444	6.7 (2)	0.6178 (0.4736~0.7620)	0.1171	0.3199 \pm 0.1582	100.0 (0)
MAV4300	0.0365 \pm 0.0351	10.0 (3)	0.5550 (0.4072~0.7028)	0.4643	0.0306 \pm 0.0278	93.3 (2)
LAM	0.2118 \pm 0.2713	90.0 (27)	0.9600 (0.9051~1.015)	<0.0001	0.0105 \pm 0.007	96.7 (1)

^a The cut-off value for each antigen was calculated as mean optical density (OD) plus two standard deviations (SD) obtained with sera from cattle known to be non-infected with *M. bovis*. AUC = area under the receiver characteristic curve; CI = confidence interval.

^b Mann-Whitney test was used to determine differences between two groups for each antigen.

반응하였지만 *M. avium*을 감염시킨 소 혈청과는 반응하지 않았다.

우결핵균이 감염된 소에서의 항체반응

일차적인 ELISA 스크리닝 과정에서 BCG_3706c와 BCG_1909c에 대한 항체가가 매우 낮았기 때문에 이를 제외하고 4개의 새로 발굴 정제된 재조합단백질에 대한 IgG와 IgA 항체가를 ELISA로 측정하였다. 배양 또는 조직소견에서 우결핵으로 확진된 30개의 혈청과 비감염으로 확인된 30개의 혈청을 대상으로 항체가를 측정하였

다. 또한 결핵의 혈청학적 진단항원으로 알려진 Ag85, HspX, CysA와 본 연구실에서 스크리닝 과정에서 발굴된 Rv1605, Rv3593, MAV5183, MAV4300에 대한 항체가를 동시에 측정하여 비교 분석하였다(Table 3과 4). BCG_0389, BCG_2330, MAV5183, MAV4300을 제외한 항원들에 대한 IgG 항체가는 우결핵 혈청에서 건강한 혈청에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$) (Table 3). LAM과 Ag85의 IgG 항체의 민감도는 각각 90%, 53%를 나타내었고, 30% 이상의 민감도를 나타내는 항원은 CysA, Rv1605, Rv3593이었다. 대부분 항원의 특이도는 96% 이상을 나타내었다.

Table 4. IgA antibody responses to each antigen in sera from *Mycobacterium bovis*-infected cattle and non-infected cattle^a

Antigens	Groups (n=60)					
	<i>M. bovis</i> -infected cattle (n=30)				Non-infected cattle (n=30)	
	Mean OD \pm SD	% sensitivity (no. of positive samples)	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$) (95% CI)	P value ^b	Mean OD \pm SD	% specificity (no. of positive samples)
BCG_0389	0.1447 \pm 0.2052	20.0 (6)	0.6889 (0.5542~0.8235)	0.012	0.0735 \pm 0.0448	96.7 (1)
BCG_2330	0.0722 \pm 0.2118	33.3 (10)	0.7833 (0.6704~0.8963)	0.0002	0.012 \pm 0.0105	96.7 (1)
BCG_2765	0.0625 \pm 0.0686	20.0 (6)	0.6272 (0.4852~0.7692)	0.0906	0.0331 \pm 0.0344	96.7 (1)
BCG_3488c	0.0792 \pm 0.2108	50.0 (15)	0.7856 (0.6702~0.9009)	0.0001	0.0149 \pm 0.0098	100.0 (0)
Ag85	0.0808 \pm 0.2209	40.0 (12)	0.7767 (0.6578~0.8956)	0.0002	0.0075 \pm 0.0102	93.3 (2)
HspX	0.0252 \pm 0.0225	10.0 (3)	0.6672 (0.5281~0.8063)	0.0261	0.0161 \pm 0.0209	90.0 (3)
CysA	0.0083 \pm 0.0263	10.0 (3)	0.7189 (0.5841~0.8537)	0.0036	0.0001 \pm 0.0213	96.7 (1)
Rv1605	0.0973 \pm 0.2102	36.7 (11)	0.7767 (0.6610~0.8923)	0.0002	0.0233 \pm 0.0166	100.0 (0)
Rv3593	0.0507 \pm 0.041	40.0 (12)	0.7883 (0.6759~0.9007)	0.0001	0.0192 \pm 0.0137	96.7 (1)
MAV5183	0.2564 \pm 0.2707	20.0 (6)	0.5633 (0.4160~0.7107)	0.3994	0.1774 \pm 0.0881	96.7 (1)
MAV4300	0.1079 \pm 0.2081	30.0 (9)	0.7667 (0.6485~0.8849)	0.0004	0.0286 \pm 0.0349	96.7 (1)
LAM	0.2164 \pm 0.3078	60.0 (18)	0.8856 (0.8032~0.9679)	<0.0001	0.0247 \pm 0.0213	93.3 (2)

^aThe cut-off value for each antigen was calculated as mean optical density (OD) plus two standard deviations (SD) obtained with sera from cattle known to be non-infected with *M. bovis*. AUC = area under the receiver characteristic curve; CI = confidence interval.

^bMann-Whitney test was used to determine differences between two groups for each antigen.

각 항원에 대한 IgA 항체가를 비교한 결과는 Table 4와 같이 BCG_2765와 MAV5183을 제외한 다른 항원에 대한 IgA 항체가는 우결핵 혈청에서 건강한 혈청에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$). LAM에 대한 IgA 항체의 민감도가 60%로 가장 높았다. BCG_3488c의 IgG 항체의 민감도는 3.3%였으나 IgA의 민감도는 50%를 나타냈다. 또한 IgA 항체가 30% 이상의 민감도를 나타내는 항원으로는 Ag85, Rv3593, Rv1605, BCG_2330, MAV_4300이었다. AUC 값을 고려할 때, LAM에 대한 IgG 항체가 가장 높은 진단적인 유의성을 나타내었고, 측정된 단백질 중에서

는 BCG_3488c에 대한 IgA 항체가 가장 높은 진단적인 유의성을 나타내었다. LAM을 제외하면 항원에 따라 다르지만 IgA가 IgG보다 민감도가 높은 경향을 나타내었다.

필드샘플에서의 항체반응

한우농장에서 PPD 피부반응검사를 하여 얻은 PPD (+) 혈청 59검체, PPD (-) 혈청 96검체의 필드샘플을 대상으로 각 항원에 대한 IgG와 IgA 항체가를 ELISA로 측정하였다(Table 5와 Table 6). BCG_0389, HspX, Rv3593, MAV_4300, BCG_2765에 대한 IgG 항체가를 제외하고 다른 항

Table 5. IgG antibody responses to each antigen in field samples^a

Antigens	Group (n=155)					
	PPD (+) cattle (n=59)				PPD (-) cattle (n=96)	
	Mean OD \pm SD	% sensitivity (no. of positive samples)	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$) (95% CI)	P value ^b	Mean OD \pm SD	% specificity (no. of positive samples)
BCG_0389	0.0253 \pm 0.0258	5.1 (3)	0.5280 (0.4277~0.6284)	0.56	0.0225 \pm 0.0224	96.9 (3)
BCG_2330	0.0806 \pm 0.0648	18.6 (11)	0.6245 (0.5316~0.7174)	0.0097	0.0514 \pm 0.0448	95.8 (4)
BCG_2765	0.0033 \pm 0.061	0.0 (0)	0.5580 (0.4444~0.6715)	0.2282	0.0021 \pm 0.0307	99.0 (1)
BCG_3488c	0.0191 \pm 0.0197	55.9 (33)	0.6956 (0.5989~0.7924)	<0.0001	0.0026 \pm 0.0073	95.8 (4)
Ag85	0.0072 \pm 0.014	13.6 (8)	0.6724 (0.5867~0.7581)	0.0003	0.0011 \pm 0.0088	94.8 (5)
HspX	0.049 \pm 0.2823	10.2 (6)	0.5927 (0.5039~0.6815)	0.0531	0.0099 \pm 0.0152	95.8 (4)
CysA	0.0077 \pm 0.0062	1.7 (1)	0.7071 (0.6263~0.7879)	<0.0001	0.0042 \pm 0.0113	96.9 (3)
Rv1605	0.0034 \pm 0.0061	0.0 (0)	0.6326 (0.5454~0.7198)	0.0057	0.0086 \pm 0.0114	93.7 (6)
Rv3593	0.0025 \pm 0.0092	8.5 (5)	0.5535 (0.4608~0.6462)	0.2665	0.0028 \pm 0.0068	96.9 (3)
MAV5183	0.4782 \pm 0.425	33.9 (20)	0.6613 (0.5597~0.7629)	0.0008	0.2652 \pm 0.2073	94.8 (5)
MAV4300	0.0326 \pm 0.03	8.5 (5)	0.5767 (0.4849~0.6685)	0.1108	0.0262 \pm 0.0271	94.8 (5)
LAM	0.2129 \pm 0.2007	71.2 (42)	0.9328 (0.8915~0.9740)	<0.0001	0.019 \pm 0.0206	96.9 (3)

^a The cut-off value for each antigen was calculated as mean optical density (OD) plus two standard deviations (SD) obtained with sera from purified protein derivative (PPD) (-) cattle. AUC = area under the receiver characteristic curve; CI = confidence interval.

^b Mann-Whitney test was used to determine differences between two groups for each antigen.

원에 대한 IgG 항체가는 PPD (+) 혈청군에서 PPD (-) 혈청군에 비해 유의하게 높았다(Table 5). LAM, BCG_3488c, MAV5283에 대한 IgG 항체가의 민감도는 각각 71.2%, 55.9%, 33.9%를 나타냈다. 반면 PPD (+) 혈청에서 PPD (-) 혈청에 비해 유의하게 높은 IgA 항체가를 나타낸 항원은 2종류의 항원(BCG_2330, LAM)에 불과했다(Table 6). 또한 민감도 측면에서 IgA는 LAM을 제외하고 낮은 민감도를 나타내었다. BCG_3488c는 우결핵군 감염이 증명된 수의과학검역원 샘플에서는 IgG 항체의 민감도보다 IgA 항체의 민감도가 유의하게 높았지만, 필드샘플에서는 반

대로 IgG 항체의 민감도가 IgA에 비해 유의하게 높았다.

각 항원에 대한 개체간의 항체반응 분석

사람결핵이나 우결핵에 대한 혈청학적 진단 개발에서 가장 큰 제한점인 개체간 다양한 항체반응 때문에 단일 항원으로는 충분한 민감도를 달성할 수 없다는 것이다. 따라서 2~3개의 항원을 조합하여 진단에 적용하고 있다. 몇 개의 항원을 조합하는 경우 특이도가 감소하는 단점이 있다. 본 연구에서도 특이도가 93% 이상을 유지하는 조건에서 LAM을 기반으로 민감도가 높은 항원을 조합한

Table 6. IgA antibody responses to each antigen in field samples^a

Antigens	Group (<i>n</i> =155)					
	PPD (+) cattle (<i>n</i> =59)				PPD (-) cattle (<i>n</i> =96)	
	Mean OD ± SD	% sensitivity (no. of positive samples)	AUC (μg · h/ml) (95% CI)	<i>P</i> value ^b	Mean OD ± SD	% specificity (no. of positive samples)
BCG_0389	0.0961±0.2789	13.6 (8)	0.5717 (0.4760~0.6673)	0.1347	0.0685±0.0398	93.7 (6)
BCG_2330	0.0547±0.2815	6.8 (4)	0.6705 (0.5870~0.7539)	0.0004	0.0117±0.0158	95.8 (4)
BCG_2765	0.0592±0.0393	3.4 (2)	0.5395 (0.4470~0.6319)	0.4102	0.0565±0.0458	97.9 (2)
BCG_3488c	0.0629±0.2816	3.4 (2)	0.5200 (0.4286~0.6113)	0.6771	0.0285±0.0302	91.7 (8)
Ag85	0.0562±0.2816	6.8 (4)	0.5640 (0.4733~0.6547)	0.1816	0.0175±0.0208	94.8 (5)
HspX	0.0201±0.0165	3.4 (2)	0.5200 (0.4257~0.6144)	0.6758	0.0223±0.0186	95.8 (4)
CysA	0.006±0.0325	1.7 (1)	0.5560 (0.4610~0.6509)	0.2445	0.0126±0.0392	95.8 (4)
Rv1605	0.0817±0.2792	1.7 (1)	0.5514 (0.4574~0.6453)	0.2836	0.0532±0.036	96.9 (3)
Rv3593	0.04±0.0299	5.1 (3)	0.6312 (0.5369~0.7255)	0.0062	0.0511±0.0332	95.8 (4)
MAV5183	0.12±0.1248	1.7 (1)	0.5672 (0.4735~0.6608)	0.1627	0.1755±0.229	95.8 (4)
MAV4300	0.1026±0.2809	3.4 (2)	0.5245 (0.4279~0.6210)	0.6098	0.0779±0.0695	96.9 (3)
LAM	0.2026±0.3073	49.2 (29)	0.8397 (0.7694~0.9100)	<0.0001	0.0372±0.0339	97.9 (2)

^aThe cut-off value for each antigen was calculated as mean optical density (OD) plus two standard deviations (SD) obtained with sera from purified protein derivative (PPD) (-) cattle. AUC = area under the receiver characteristic curve; CI = confidence interval.

^bMann-Whitney test was used to determine differences between two groups for each antigen.

결과 Table 7과 같이 민감도가 증가함을 확인할 수 있었다. 예를 들면 필드샘플에서 LAM과 BCG_3488c의 IgG 항체반응 결과를 합하는 경우 민감도가 84.7%로 증가하였다. 각 개체간의 항원에 대한 IgG 항체의 양성 개수를 분석해보면 비감염 혈청과 PPD (-) 음성 혈청에서 항원 3개 이상에 양성인 혈청은 각각 2, 7개, 반면 결핵감염이 확인된 혈청과 PPD (+) 혈청은 항원 3개 이상 양성인 혈청은 각각 18개와 22개였다. 이는 2~3개 이상의 항원에 동시에 양성인 경우 우결핵일 가능성이 높다는 것을 시사한다.

DISCUSSION

결핵균을 비롯한 미코박테리아 감염은 전 세계적으로 사람과 동물의 생명을 심각하게 위협하는 질환 중의 하나이다. 2009년에 9백만 이상의 결핵환자가 보고되었고 (18), 선진국에서 우결핵에 대한 관리가 집중적으로 이루어 졌지만, 전 세계적으로 우결핵으로 인한 경제적 손실이 30억불 정도 된다고 보고되었다 (19). 이러한 미코박테리아 감염질환 관리를 위한 가장 효과적인 수단은 빠

Table 7. Effect of antigen combination to increase the sensitivity

Ag combination	<i>M. bovis</i> -infected /non-infected cattle	
	Sensitivity % (No. of positive sera)	Specificity % (No. of positive sera)
IgG		
LAM only	90.0 (27)	96.7 (1)
LAM + Ag85	93.3 (28)	93.3 (2)
IgA		
LAM only	60.0 (18)	93.3 (2)
LAM + BCG_3488c	70.0 (21)	93.3 (2)

Ag Combination	PPD (+) and (-) field sample	
	Sensitivity % (No. of positive sera)	Specificity % (No. of positive sera)
IgG		
LAM only	71.2 (42)	96.9 (3)
LAM + BCG_3488c	84.7 (50)	93.7 (6)
IgA		
LAM only	49.2 (29)	97.9 (2)
LAM + Ag85	50.8 (30)	94.8 (5)

르고 정확한 진단법을 개발하는 것이다. 경제적이고 신속한 혈청학적 진단방법은 이들 감염질환 관리에 적합한 진단법으로 생각되고 있다 (8). 그러나 혈청진단의 낮은 민감도 문제는 극복해야 될 주요이슈이다. 민감도를 높이기 위해서는 다양한 혈청항원 발굴이 필요하기 때문에 본 연구에서는 우결핵균 CFPs의 부분적인 분획화와 혈청항원 탐색을 통해 15개의 항원을 발굴하였다. 이들 발굴된 항원 중에서 Ag85를 제외하고는 기존에 우결핵 혈청항원으로 보고된 바가 없는 새로운 항원이었다. 다음 단계로 진단적인 유의성 평가를 위해 이미 확보하고 있는 native Ag85 단백질을 제외한 12개의 단백질에 대한 재조합단백질을 생산하였다. 그러나 6종류의 단백질만이 발현되었고 정제할 수 있었다. 유의성 있는 단백질 발굴연구분야에서 가장 큰 장벽은 재조합단백질의 확보이다. 본 연구에서도 6개의 단백질은 대장균에서 전혀 발현되지 않았다. 6개의 발현된 단백질 중에서 실제 진단적인 유의성 분석

과정에서 2개의 단백질은 ELISA에서 항체가가 매우 낮았다. 이는 항원발굴 때 사용한 면역블롯법은 변성된 항원 결정기(epitope)를 인지하는 반면 ELISA는 conformational epitope을 인지하는 특성의 차이 때문일 가능성이 있다. 또 다른 이유는 항원 스크리닝 시에는 인위적으로 우결핵균을 감염시킨 소 혈청을 사용하였기 때문에 강하게 항체반응을 나타낼 수 있지만 자연 감염 때에는 항체반응이 보다 약하기 때문일 것으로 생각된다.

사람 결핵에서 IgM 항체는 진단적인 유의성이 없다고 보고된 바가 있다 (20). 따라서 발굴된 항원에 대한 IgG와 IgA 항체가를 측정하여 진단적인 유의성을 평가하였다. 우결핵이 확진된 혈청과 PPD (+) 혈청에서 BCG_0389, BCG_2765, BCG_3488c, Ag85, Rv1605, Rv3593, MAV4300에 대한 IgA 항체가는 IgG 항체가가 보다 더 높았다. LAM에 대한 IgG 항체가가나 IgA 항체가 비슷했다. 우결핵이 확진된 검체에서는 대체적으로 항원에 대한 IgA 항체의 민감도가 더 높았지만, 필드샘플에서는 IgG 항체의 민감도가 더 높은 경향을 나타내었다. 이는 PPD (-) 혈청의 IgA 항체가가 우결핵 비감염 혈청보다 높은 경향을 나타내는 것과 연관이 있다고 생각된다. 왜냐하면 항체의 민감도는 대조 검체 혈청의 평균항체 값에 좌우되기 때문이다. 우결핵 감염여부가 확실한 수의과학검역원 검체에서는 BCG_3488c 단백질에 대한 IgA 항체의 민감도가 높았지만 필드샘플에서는 IgG의 민감도가 더 높았다. 이러한 이유를 정확히 설명할 수는 없지만 BCG_3488c의 IgA 항체가가 IgG 항체가가 보다 월등히 높지만, 비감염 혈청에 비해 PPD (-) 필드 검체에서 IgA 항체 값이 상대적으로 더 높기 때문에 필드샘플에서 BCG_3488c의 IgA 항체가의 cut off 값이 더 높을 것으로 추정된다.

우결핵의 혈청학적 진단에 가장 널리 사용된 2종류의 항원인 MPB70과 MPB83 (3, 8)의 민감도는 논문에 따라 70~85%였다 (7). 최근 본 연구팀은 이들 두 항원에 대한 민감도가 75~90%임을 보고한 바가 있다 (10). 이들 두 항원의 민감도를 고려하면 본 연구에서는 이들 항원보다 진단적인 유의성이 뛰어난 단백질 항원을 발굴하지 못했다. 흥미로운 사실은 LAM의 진단적인 유의성이 MPB70과 MBP83과 유사하다는 사실이다. LAM에 대한 IgG와 IgA 항체가는 유사하였지만 민감도는 IgG 항체가 높았다. 최근에 보고된 논문은 없지만 1996년에 보고된 우결핵 진단을 위한 LAM의 IgG 항체가의 민감도는 60%였다 (8, 21). 본 과제에서 정제한 LAM을 사용한 경우 IgG

항체의 민감도는 우결핵이 확인된 검체에서는 90%, PPD (+) 검체에서는 71%로 진단적인 유의성이 높았다. 따라서 각테일 항원을 사용할 경우를 고려하면 MPB70과 MPB83 항원에 새로운 진단항원으로 LAM을 추가하면 유의성이 높은 우결핵 혈청진단 법을 개발할 수 있을 것이다.

이상의 결과를 종합해보면 비록 우결핵 진단의 대표 항원인 MPB70과 MPB83 만큼의 진단적인 유의성이 높은 단백항원을 발굴하지는 못했지만, 우결핵 진단을 위한 각테일 항원으로 포함될 수 있는 몇 종의 후보항원들을 동정하였다. 특히 LAM은 각테일 항원의 주요 타깃이 될 수 있음을 확인하였다. 앞으로 각테일 항원으로서의 가치를 평가하는 후속 연구가 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Vordermeier HM, Chambers MA, Buddle BM, Pollock JM, Hewinson RG. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *Vet J* 2006; 171:229-44.
- 2) Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock JM, Clements A, *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec* 1994;135:134-5.
- 3) Wadhwa A, Johnson RE, Eda K, Waters WR, Palmer MV, Bannantine JP, *et al.* Evaluation of ethanol vortex ELISA for detection of bovine tuberculosis in cattle and deer. *BMC Vet Res* 2014;10:147.
- 4) Waters WR, Buddle BM, Vordermeier HM, Gormley E, Palmer MV, Thacker TC, *et al.* Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18:1882-8.
- 5) Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, *et al.* Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound Emerg Dis* 2010;57:205-20.
- 6) Souza II, Melo ES, Ramos CA, Farias TA, Osório AL, Jorge KS, *et al.* Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *Springerplus* 2012; 1:77.
- 7) Casal C, Díez-Guerrier A, Álvarez J, Rodríguez-Campos S, Mateos A, Linscott R, *et al.* Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Vet Microbiol* 2014;170:342-51.
- 8) Wadhwa A, Hickling GJ, Eda S. Opportunities for improved serodiagnosis of human tuberculosis, bovine tuberculosis, and paratuberculosis. *Vet Med Int* 2012;2012:674238.
- 9) Fifis T, Rothel JS, Wood PR. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation. *Vet Microbiol* 1994;40:65-81.
- 10) Jeon HS, Shin AR, Son YJ, Kim JM, Jang Y, Kim S, *et al.* An evaluation of the use of immunoglobulin A antibody response against mycobacterial antigens for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Vet Diagn Invest* 2015.
- 11) Byun EH, Kim WS, Shin AR, Kim JS, Whang J, Won CJ, *et al.* Rv0315, a novel immunostimulatory antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, activates dendritic cells and drives Th1 immune responses. *J Mol Med* 2012;90:285-98.
- 12) Hamasur B, Källénus G, Svenson SB. A new rapid and simple method for large-scale purification of mycobacterial lipoarabinomannan. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;24:11-7.
- 13) Mazurek J, Ignatowicz L, Kallenius G, Svenson SB, Pawlowski A, Hamasur B. Divergent effects of mycobacterial cell wall glycolipids on maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One* 2012;7:e42515.
- 14) Kwon YM, Jung KH, Choi GE, Shin AR, Lee BS, Won CJ, *et al.* Identification and diagnostic utility of serologic reactive antigens from *Mycobacterium tuberculosis* sonic extracts. *J Bacteriol Virol* 2009;39:329-36.
- 15) Lee JS, Jo EK, Noh YK, Shin AR, Shin DM, Son JW, *et al.* Diagnosis of pulmonary tuberculosis using MTB12 and 38-kDa antigens. *Respirology* 2008;13:432-7.
- 16) Shin AR, Shin SJ, Lee KS, Eom SH, Lee SS, Lee BS, *et al.* Improved sensitivity of diagnosis of tuberculosis in patients in Korea via a cocktail enzyme-linked immunosorbent assay containing the abundantly expressed antigens of the K strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1788-95.
- 17) Choi GE, Eom SH, Jung KH, Son JW, Shin AR, Shin SJ, *et al.* CysA2: A candidate serodiagnostic marker for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Respirology* 2010;15:636-42.
- 18) Organization WH. Global tuberculosis control: WHO report 2010: World Health Organization, 2010.
- 19) Chambers MA. Review of the diagnosis and study of tuberculosis in non-bovine wildlife species using immunological

- methods. *Transbound Emerg Dis* 2009;56:215-27.
- 20) Shin AR, Lee KS, Lee JS, Kim SY, Song CH, Jung SB, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* HBHA protein reacts strongly with the serum immunoglobulin M of tuberculosis patients. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:869-75.
- 21) De Anda JH, Monaghan M, Collins JD, Brennan PJ, Salman MD. Evaluation of MPB70, bovine PPD and lipoarabomannan as antigens in ELISA for the serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Prev Vet Med* 1996;27:211-5.
-