

소 결핵균의 면역세포화학적 동정

김순복·서정향·문운경*
경상대학교 수의과대학
경상남도 가축위생시험소*
(1992년 10월 3일 접수)

Immunocytochemical identification of *Mycobacterium bovis* in tissues

Soon-bok Kim, Jung-hyang Sur, Oun-gyeong Moon*
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
Gyeongsang Provincial Institute of Animal Health*
(Received Oct 3, 1992)

Abstract : The present study was intended to use the avidin-biotin-peroxidase-antiperoxidase complex (ABPAP) method for the identification of *Mycobacterium bovis* in the tissue sections of infected cattle. Antibodies and linkers for ABPAP procedure used in incubated order were rabbit anti-*Mycobacterium* polyvalent antibodies, goat anti-rabbit IgG, rabbit peroxidase-antiperoxidase complex, biotinyl-horse anti-rabbit IgG, and avidin-biotin-peroxidase complex.

Where the bacterial antigen was localized by ABPAP, a dark brown deposit occurred in the cytoplasm of macrophages and Langerhans' giant cells of the granulomatous lesions.

The method approved to be highly specific for the identification of the bacteria and allowed a precise localization of the bacterial antigen in infected cells.

Key words : Immunocytochemical identification, mycobacterial antigen.

서 론

소 결핵은 사람의 결핵에 대한 중요한 감염원이 되기 때문에 우리나라에서는 튜버클린시험 양성반응우 살 처분 정책을 채택하여 이 병의 박멸에 힘쓰고 있으나 아직까지 그 발생이 줄어들지 않고 있는 실정이다.

결핵균의 확인을 위한 원인균의 분리 동정에는 많은 시일이 소요될 뿐만 아니라 분리성공율이 높지 않으며 항산성염색법을 이용한 조직내 관찰은 다른 종류의 항산성염색균들과의 감별이 곤란하다.¹⁻³ 그리고 튜버클린시험에도 많은 비특이반응인자들이 존재하기 때문에 이 병의 확진에는 어려움이 있다.^{4,5}

면역세포화학적 방법은 오늘날 각종 항원검출에 이용

되어 질병의 진단법으로 많이 개발되고 있으며⁶⁻¹⁰, Swanson은 peroxidase-antiperoxidase(PAP)와 Avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)를 혼합하여 감수성이 더욱 높은 새로운 방법 즉, Avidin-biotin-peroxidase-antiperoxidase complex(ABPAP)를 고안하였다.¹¹

지금까지 개발된 면역세포화학적 방법중에 가장 우수한 것으로 알려지고 있는 ABPAP을 이용하여 감염조직의 냉동 및 파라핀절편에서 결핵균체항원을 직접 검출함으로써 소 결핵균을 간편한 방법으로 수시간이내에 확인할 수 있는 면역세포화학적 진단법을 개발코자 한다.

재료 및 방법

* 이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성) 과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

실험동물 : 결핵피내반응시험의 양성판정 도살우중에서 결핵병소가 확인된 2두와 건강우 1두를 실험동물로 공시하였으며 병변부를 절취하여 통상방법에 의한 병리조직학적 검사 및 조직내 ziehl-neelsen 염색 그리고 원인균의 분리동정을 동시에 실시하였다.

일차항체 : 고도면역혈청 생산을 위해 결핵균체 20mg과 incomplete adjuvant 2ml 혼합액을 건강가토의 등피하조직 8부위에다 나누어 접종한 뒤 4주경과 후에 incomplete adjuvant 5ml를 접종하였다. 4주 후에 다시 균체 10mg과 식염수 1ml의 혼합액을 접종하였으며 4주경과 후에 채혈하여 혈청을 분리하였다. 또한 Dakopatts 회사에서 생산한 rabbit anti-Mycobacterium bovis(Bacillus calmettegueris, BCG) 정제면역단백을 일정배수 희석하여 함께 일차항체로 사용하였다.

면역염색 : 파라핀포매 또는 냉동조직절편을 제작하여 5분간 완충용액(tris buffered saline)에 씻은 다음 0.3% 또는 0.6% 과산화수소-메탄올용액에 5분간 전처리한 후에 2% 정상산양혈청으로 20분간 감작하였다. 일차항체로서 rabbit anti-mycobacterium 50~100배로 희석하여 30~60분간 감작시킨 후 완충액으로 3분간씩 2회 슬라이드진동기위에서 수세하였다. 이차항체로서 goat anti rabbit IgG (Sigma)를 완충액에도 100~300배 희석하여 30분간 반응시킨 후 3분간씩 2회 수세하였다. 다음 3차 항체로서 rabbit peroxidase-antiperoxidase complex (Sigma)를 완충액에도 200배 희석하여 50분간 반응시킨 후 수세하였으며, 4차 항체로써 biotinyl-horse antirabbit IgG(Vector Lab)를 완충액에 200배 희석하여 30분간 감작시킨 다음 5차 항체인 avidin-biotin-peroxidase complex(Vector Lab)200배 희석액으로 30분간 처리하였다. 이때 모든 항체반응은 moisture chamber 내에서 진행되었으며 반응이 끝난 슬라이드는 충분히 씻은 다음 발색을 위해 0.001% 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(Sigma) 완충용액으로 암소에서 약 10분간 반응시킨 다음 완충액으로 신속하게 세척하였다. 헤마톡실린으로 약하게 염색한 다음 알콜용액에 이행탈수시켜 자일린 투명후 발삼마운팅하였다.

결 과

병변부의 헤마톡실린-에오신염색에서 결핵병소 특유의 대식세포와 유사피세포의 침윤, Langhans 거대세포, 건락피사소 내의 석회침착, 임파구 침윤이 관찰되었으며(Fig 1), 이 부위 조직의 ziehl-neelsen 염색에서 적색으로 염색되는 결핵균을 관찰할 수 있었다(Fig 2). 그리고 이들 병소로부터 Mycobacterium bovis를 분리 동정할 수 있었다.

조직절편에서 결핵균체항원을 검출하기 위해 ABPA-P을 실시한 결과 병변부에서 암갈색의 색소침착을 보이는 양성반응세포를 관찰할 수 있었으며, 양성반응은 대식세포(Fig 3)와 거대세포(Fig 4)의 세포질내에서 주로 확인되었다. 그리고 균체항원검출에 있어 냉동절편에서 상대적으로 비특이반응이 적고 특이적 발색반응이 현저하였으며, 파라핀절편에서는 전자에 비해 다소 반응이 미약하였으나 균체항원의 존재를 쉽게 확인할 수 있었다(Fig 5).

ABPAP 양성반응은 ziehl-neelsen 염색에서 균체의 존재가 확인되지 않았던 감염세포에서도 균체항원을 증명할 수 있었으며 균체항원증명에 있어 탁월한 검출효과를 얻을 수 있었다. 그리고 ABC와의 비교시험에서도 상대적으로 특이반응이 강하게 관찰되었다.

일차항체로서 자체 생산한 고도면역혈청과 Dakopatts사의 anti-Mycobacterium bovis 정제면역단백을 사용해 본 결과 전자는 50배, 후자는 100배 희석배수에서 우수한 검출율을 보였으며 정제면역단백에서는 30분간의 감작에서도 강한 양성반응을 관찰할 수 있었다.

고 찰

면역세포화학적 방법은 원인체의 분리 동정이 까다로운 세균성 또는 바이러스성 질병의 진단법으로 최근 많이 개발되고 있으며⁶⁻¹⁰, 원인체 분리 동정의 복잡한 과정을 거치지 않고 조직절편내에서 원인체항원을 직접 검출함으로써 신속하게 조기에 확진할 수 있어 시간과 경비를 절감할 수 있기 때문에 오늘날 크게 각광을 받고 있다. 특히 소결핵병이 인수공통전염병이라는 점에서 볼 때 포르말린고정-파라핀절편에서의 균체항원동정은 세균학적 실험과정에서 있을 수 있는 실험자에 대한 감염우려를 완전히 배제시킬 수 있다는 큰 장점이 있다.

병리조직 및 세균학적 검사에서 Mycobacterium bovis에 기인한 결핵병으로 사전에 확인한 감염우의 병변조직절편에서 ABPAP을 적용한 결과 특이성이 높은 결핵균체 양성반응을 대식세포와 Langhans 거대세포의 세포질내에서 관찰할 수 있었으며 미세한 암갈색의 과립침착으로 나타나는 항원양성반응은 ziehl-neelsen 염색에서 균체가 관찰되지 않는 부위에서도 흔히 확인되었다. 일반적으로 결핵균은 대식세포에 탐식되어 소화 용해되기 때문에 조직의 항산성 세균염색에서 세포내 균체를 관찰하는 것은 그렇게 용이하지 않을 뿐만 아니라¹² 항산성 염색균이 관찰된다고 하여도 이를 결핵균으로 단정할 수는 없으며 결핵병소의 육아종성염 또한 다른 세균들에 의해서도 일어날 수 있기 때문에^{13, 14} 기존의 병리학적 방법으로 결핵병을 확진한다는 것은 매우

조심스러운 일이다. 따라서 본 실험에서 확립된 조직절편내 면역세포화학적 균체항원증명법은 위에서 나열한 병리학 및 세균학적 진단의 결점들을 보완하여 앞으로 야외에서 신속한 간이진단법으로 널리 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서 1차 항체로는 자체 또는 상품생산된 2종의 다가면역혈청을 사용하였으며 균체항원 검출효과에서는 모두 우수하였으나 이들이 다른 종류의 항산성 세균이나 *Mycobacterium* 속간의 교차면역반응에 관해서 앞으로 추사가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 그리고 단클론성항체를 이용한 실험이 성공적으로 수행된다면 감염조직절편내에서 *Mycobacterium* sp.를 동정할 수 있는 면역조직화학적 감별수단이 확립될 것으로 생각된다.

결 론

결핵균체항원의 면역세포화학적 동정을 위하여 감염우의 병변조직절편에 대해 avidin-biotin-peroxidase-antiperoxidase complex(ABPAP)법을 적용하였으며, 1차 항체는 rabbit anti-*Mycobacterium bovis* 다가항체, 2차 항체는 goat anti-rabbit IgG, 3차항체는 rabbit peroxidase-antiperoxidase complex, 4차항체는 biotinyl-horse anti-rabbit IgG, 5차항체는 avidin-biotin-peroxidase complex로 각각 처리하였다.

양성반응은 대식세포와 Langhans 거대세포의 세포질내에서 관찰되었으며 특이적인 암갈색의 색소침착을 일으켰다.

이상의 결과에서 ABPAP법은 앞으로 결핵병의 진단에 중요한 수단으로 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

Legends for figures

Fig 1. A granulomatous lesion. H & E. $\times 132$.

Fig 2. Acid-fast stainind mycobacteria in a granuloma. Ziehl-Neelsen stain. $\times 330$.

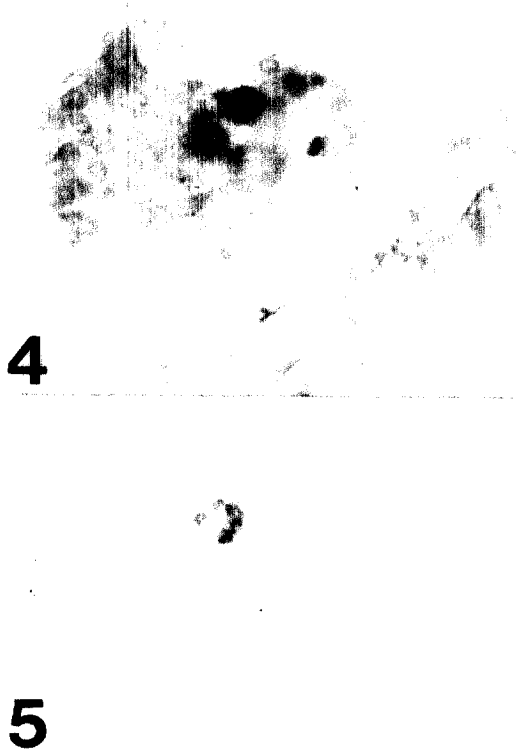
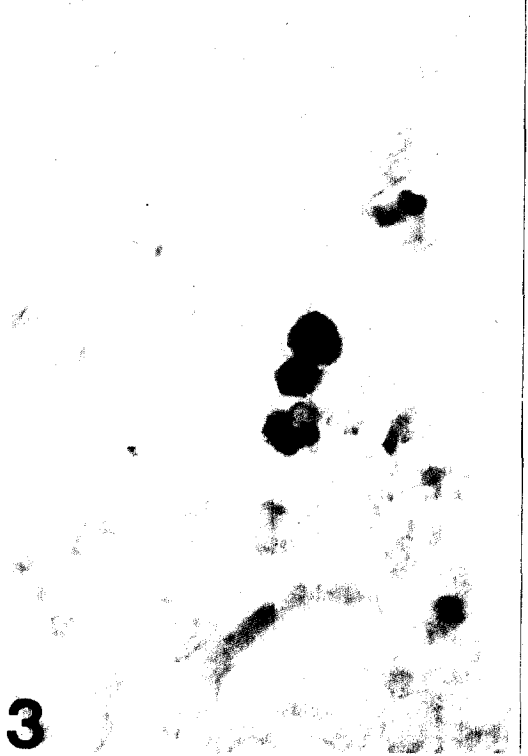
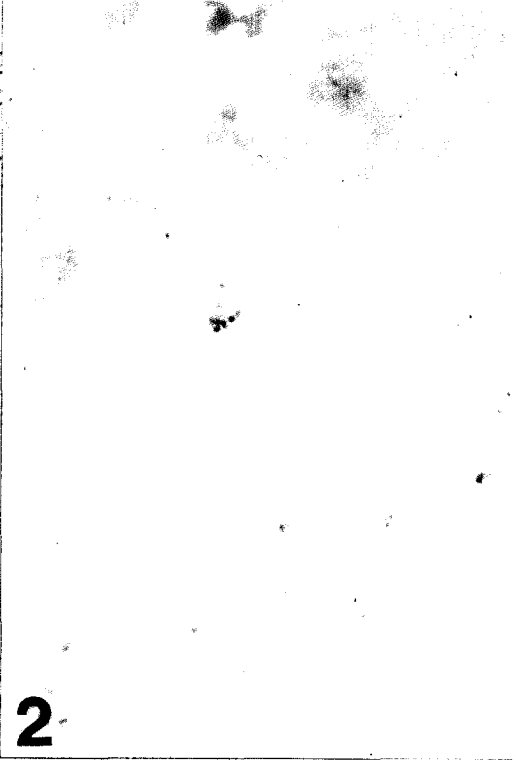
Fig 3. Dark brown deposits, indicating the presence of mycobacterial antigen, appeared in the cytoplasm of macrophages. Frozen section. ABPAP. $\times 330$.

Fig 4. Positive pigmentation is detected in a Langhans' giant cell. Frozen section. ABPAP. $\times 330$.

Fig 5. Positive pigmentation is detected in a macrophage. Paraffin section. ABC. $\times 330$.

참 고 문 헌

- Collind CH, Grange JM. The bovine tubercle bacillus. A review. *J Appl Bacteriol* 1983 ; 55 : 13~59.
- Tymoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 28. The genus *Mycobacterium*. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th ed. Comstock Ass. Conell Univ Prss, 1988 ; 270~289.
- Wolinsky E, Mycobacteria. In : Davis B, et al ed. 4th ed. Microbiology. Singapore : Harper & Row Pub 1980 ; 647~664.
- 김종면. 튜버큐린 양성 무병소유우의 질병진단에 관한 실험적 연구. 대한수의학회지 1976 ; 16 : 151~158.
- 박병옥, 김창수, 우기방. 효소면역법(ELISA)에 의한 우결핵병의 진단에 관한 연구. Tuberculin 양성반응우 혈청의 *Mycobacterium bovis* 특이항원에 대한 항체검사. 한국가축위생시험연구회지 1989 ; 12 : 133~145.
- 문운경, 조희택, 김순복. Peroxidase-antiperoxidase (PAP) 복합체를 이용한 돼지콜레라의 면역조직화학적 진단. 대한수의학회지 1990 ; 3 : 215~221.
- 노환국, 서정향, 김순복. Indirect immunoperoxidase법을 이용한 조직내 뉴켓슬병 바이러스 항원동정. 대한수의학회지 1990 ; 30 : 309~316.
- Kim SB, Sur JH, Moon UG. Avidin-biotin complex for immunohistochemical diagnosis of Aujeszky's disease and hog cholera. *Korean J Vet Sci* 1990 ; 30 : 435~440.
- 서정향, 김순복. Dexamethasone 전처리후 *Listeria monocytogenes*를 인공감염시킨 랫트의 조직절편내 균체항원 동정. 대한수의학회지 1992 ; 32 : 91~98.
- Meador VP, Deyoe BL, Cheville NF. Effect of nursing on *Brucella abortus* infection of mammary glands of goats. *Vet Path* 1989 ; 26 : 369~375.
- Swanson PE, Kimberly AH, Mark RW. Avidin-bio-



- tin-peroxidase-antiperoxidase(ABPAP)complex. An immunocytochemical method with enhanced sensitivity. *Am J Clin Path* 1987 ; 88 : 162~176.
12. Van Kruiningen HJ. 4. Gastrointestinal system. In : Thomson ed. Special Veterinary pathology. Tronto : *BC Decker Inc.* 1988 : 199~200.
13. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Chronic granulomatous inflammation. Robbins pathologic basis of disease. 4th ed. Philadelphia : W.B. *Saunders Co* 1939 : 65~68.
14. Macmillan AP. Brucellosis. In : Leman AD, et al. ed. 7th ed. Diseases of swine. *Iowa State Univ Press* 1992 : 446~453.
-