

**Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA)를
이용한 혈청 및 원유 중의
Mycobacterium bovis 항체 검출에 관한 연구**

심항섭 · 국정희 · 박병옥 · 김성열 · 박유순

경기도 가축위생시험소

**Studies on Enzyme-linked Immunosorbent
Assay(ELISA) for Detection of Antibody to
Mycobacterium bovis in Serum and Milk**

Hang-Sub Shim, Jung-Hee Kook, Byoung-Ok Park,
Sung-Youl Kim, Yu-Soon Park

Kyunggi Veterinary Service Laboratory

Abstract

In order to supplement a diagnostic method for detection of infectious cattle to bovine tuberculosis, performed ELISA for detection of antibody to *M. bovis* in serum and milk.

The diagnostic efficacy of the established ELISA was compared with test of the tuberculin skin test for bovine tuberculosis.

The positive corresponding rate of serum ELISA and tuberculin skin test showed 84.3%, milk ELISA and tuberculin skin test showed 75.0%, milk ELISA and serum ELISA showed 75.0% respectively. Comparison of the serum and milk to tuberculin antibody concentration in tuberculin positive cattle, the milk contained 1/100-1/150 concentration compared serum tuberculin concentration.

The established ELISA was considered efficient for detection of antibodies to *M. bovis* in serum and milk.

Key words : *Mycobacterium bovis*, ELISA, Tuberculin skin test

서 론

*Mycobacterium bovis*는 주로 소 및 가축에서 결핵병을 일으키는 세균으로 사람에도 감염하여 결핵을 일으키는 인수공통 전염병의 원인체이다^{1, 2)}.

*M. bovis*는 항산성 세균이며 세대기간이 18시간으로 다른 균들에 비해 많은 배양시간이 소요되는 세균으로 감염동물의 대식구와 같은 탐식세포내에 존재하기 때문에 항생제 등에 영향을 받지 않고 만성 감염 상태를 유지하는 치료가 어려운 질병으로 전세계에 걸쳐 발생하고 있으며, 우리 나라를 비롯한 각국에서는 가축에 대해 예방접종은 허용하지 않고 감염축을 색출하여 살 처분하는 Test and slaughter법으로 방역을 실시하고 있다^{3, 4, 5, 6, 7)}.

국내에서는 우결핵병이 1913년 처음 보고된 이후 매년 계속 발생하고 있으며 1992년 이후 발생이 증가하고 있어 축산농가 및 국가예산에 커다란 경제적 손실을 일으키고 있는 질병이다.^{8, 9, 10, 11)}

본 병의 진단법으로는 1891년 Koch¹²⁾에 의해 Old tuberculin(OT)이 소개된 이후 사람과 동물의 결핵 진단액으로 널리 보급되어 왔다. 그후 OT의 특이성을 높이기 위하여 Heat concentrated synthetic medium (HCSM) tuberculin과 Tuberculin 제조시 가열 처리로 인한 단백질의 변성을 방지하기 위해 Trichloro-acetic acid를 처리한 Purified protein derivatives(PPD) tube-rculin이 개발되어 세계적으로 결핵 검색을 위하여 이들 HCSM 및 PPD tuberculin을 가장 많이 사용하고 있다^{13, 14)}.

우리 나라에서는 1960년까지 OT에 의한 열반응법 및 피내접종법으로 우결핵을 검색하였으며, 1961년부터 HCSM tuberculin으로, 1975년부터 1994년까지 HCSM과 PPD tuberculin을 병용하여 검색하였으나, 1995년부터는 PPD tuberculin에 의한 피내 접종법만을

실시하고 있다¹⁵⁾.

이러한 피내접종법은 소에 대해 개체별로 미추벽 피내에 Tuberculin을 접종하는 방법으로 검진을 위해 많은 노동력을 요구하고 있는 실정이다.

혈청검사 방법으로는 백혈구유주억제반응^{16, 17)}, Lymphocyte transformation test 등^{18, 19)}이 보고되어 있으나 대개 시술시 많은 시설, 기구 및 숙련된 인력 등이 있어야 하며, 시간이 많이 소요되고 술식이 복잡하다는 단점이 있고 현재 실용화되어 있는 혈청학적 진단방법이 없어 이에 대한 신속 정확하고 술식이 간편한 항체 검출법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

Evall 등²⁰⁾에 의하여 개발된 효소연계면역 흡수시험법(Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)은 항원 및 항체의 검출에 매우 민감할 뿐만 아니라 술식이 간편하고 대량 검사할 수 있으며 진단 시간을 단축시킬 수 있다는 장점 때문에 요네병 등 여러 질병의 항원 및 항체 검출에 이용되는 등 이미 그 특이성과 감수성 및 간편성이 입증된 바 있어 여러 가지 감염성 질병 검사에 응용되고 있는 진단법이다^{21, 22, 23, 24, 25)}. 이러한 ELISA법을 이용하여 미국 및 유럽에서는 사슴 등 야생 동물에서 결핵을 검사하는 연구^{26, 27)}가 계속 수행되고 있으며, 국내에서도 효과적인 우결핵의 방역을 위하여 이러한 연구를 필요로 하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 소에서 결핵병을 검사하는 현행의 피내접종법에 의한 검사법을 보완하고자 ELISA법을 이용하여 혈중 및 원유 중의 *M. bovis* 항체 검사를 위한 시험을 수행하였으며 ELISA법에 의한 결핵 항체 검출 효능을 피내접종법과 비교 실험하였다.

재료 및 방법

1. 항원 및 공시동물

1) 항원

연세대 의대에서 분양 받은 *M. bovis* AN5 균주를 이용하여 Tuberculin purified protein derivety (PPD)를 최 등²⁸⁾의 방법에 준하여 제조하였다.

약술하면 균주를 Sauton media에 접종하여 37°C에서 10주동안 배양하여 100°C에서 3시간 가열한 후 Filter paper로 여과하였다.

여과된 Tuberculin 여과액을 1/10 양의 40% Trichloroacetic acid sol(TCA)을 첨가하여 교반한 후 5°C에서 2일간 정치시켜 Tuberculo-protein을 침전시킨 후 상층액을 버리고 침전물을 4,000g에 30분 원심하여 1% TCA로 2회 세척 원심한 후, 냉아세톤으로 2회 세척 원심하고, Ethyl ether로 2회 세척 원심한 후 37°C에서 2일간 건조시킨 PPD분말을 Glycerin-phenol buffer에 2%되게 녹여 4°C에 보관한 후 Lowry법²⁹⁾에 의해 단백질 농도를 측정하여 항원으로 사용하였다.

2) 공시동물의 혈청 및 원유

'96년 경기 지역에서 유우를 대상으로 피내반응법에 의한 우결핵검진 결과 양성우로 판정된 소의 혈청 51두와 원유 45두 및 피내반응 결과 음성우로 확인된 소의 혈청 51두와 원유 45두를 사용하였다.

혈청은 분리하여 56°C에서 30분동안 비동화시킨 후 냉장 보관하여 사용하였으며, 원유는 4,000g에 30분 원심하여 지방 및 침전물을 제거한 후 냉장 보관하여 사용하였다.

3) Enzyme-linked immunosorbent assay

혈중 및 원유 중의 항체를 검출하기 위한 ELISA방법은 Voller 등³⁰⁾ 및 Hanna 등³¹⁾의 방법을 응용하여 실시하였다.

제조한 PPD 항원을 Carbonate buffer(pH 9.5)를 이용하여 10 μ g/ml농도로 조절한 후 Microplate (96well Costar)에 50ul씩 분주하여 4°C에서 18시간 흡착시킨 후 0.05% Tween20-PBS으로 3회 세척하고 5% Normal

goat serum PBS 150 μ l을 넣고 37°C에서 1시간 반응시켜 Blocking한 후 세척액으로 3회 세척하였다. 혈청은 0.05% Tween 20-PBS에 100배 희석하여 100ul씩 주입하고, 원유는 4배로 희석하여 100ul씩 주입하였다.

또한 시료 1개당 Twoplicate로 실시하였으며 혈청을 주입하지 않은 Blank well을 두었다. 혈청을 주입한 Plate를 37°C에서 1시간 반응시킨 후 3회 세척하여 50ul의 Peroxidase-conjugated rabbit anti-bovine IgG 1,500배액을 가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 세척하였다. 그리고 발색 지지 Substrate로 Citrate buffer(OPD 0.4mg/ml, 30% H2O2 0.4ul/ml)를 50ul을 가하고 37°C에서 15분 반응시킨 후 2.5N H2SO4로 반응을 정지시켜 산화된 OPD의 Optical density (O-D)를 ELISA reader로 492nm에서 측정하여, 두 Well의 OD 평균치에서 Blank well의 O-D평균치로 뺀 것을 가검혈청 및 원유의 O-D치로 간주하였다.

결 과

1. 피내반응 양성우 및 음성우의 혈중 OD치 분포

피내접종결과 결핵양성우로 판정된 51두 및 음성우로 판정된 51두에 대한 혈중 항체가를 비교하기 위해 OD치 분포를 조사한 결과는 Fig 1. 에서 나타낸 바와 같다. 음성우의 혈중 OD치는 0.114 에서 0.856까지의 분포를 보였으며 평균치는 0.397이었고, 양성우의 OD치는 0.324에서 1.987의 분포를 나타내었다.

본 실험에서는 양성 및 음성 기준을 음성 평균치의 2배인 0.794로 정하였으며, 음성 평균치의 1.5-1.9배인 0.569이상 0.794미만을 의양성이라 정하였고, 1.5배미만인 0.569미만을 음성으로 정하였다.

위의 우결핵 양성 및 음성 기준에 따른 O-

D치의 판정 결과를 조사한 바 Table 1.에서 나타낸 바와 같다.

즉 피내반응 양성우 51두중 혈청 ELISA에서 양성 43두(84.3%), 의양성 5두 (9.8%) 및 음성 3두(3.8%)로 나타났으며 또한 피내

반응 음성우 51두 중 양성 2두 (3.9%), 의양성 7두(13.7%), 음성42두 (82.4%)로 나타나 피내반응과 혈중 ELISA의 양성 검출 일치율은 84.3%인 것으로 나타났다.

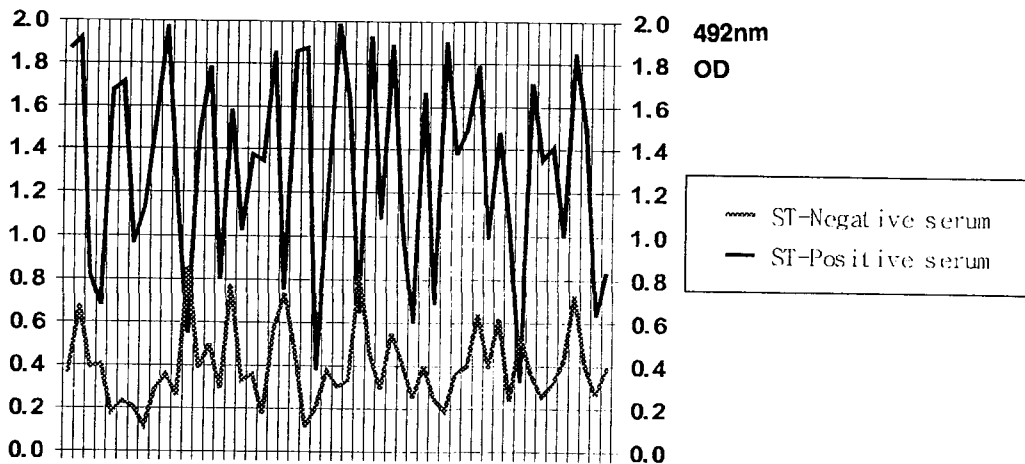


Fig 1. Distribution of OD results for serum ELISA on tuberculin reactor cattle

Table 1. Comparison of the serum ELISA reactions and tuberculin skin tests in 102 cattle

Tuberculin skin test	No. of cattle tested	Serum ELISA reactions (%)		
		Positive	Suspicious reactor	Negative reactor
Positive reactor	51	43(84.3)	5(9.8)	3(3.8)
Negative reactor	51	2(3.9)	7(13.7)	42(82.4)

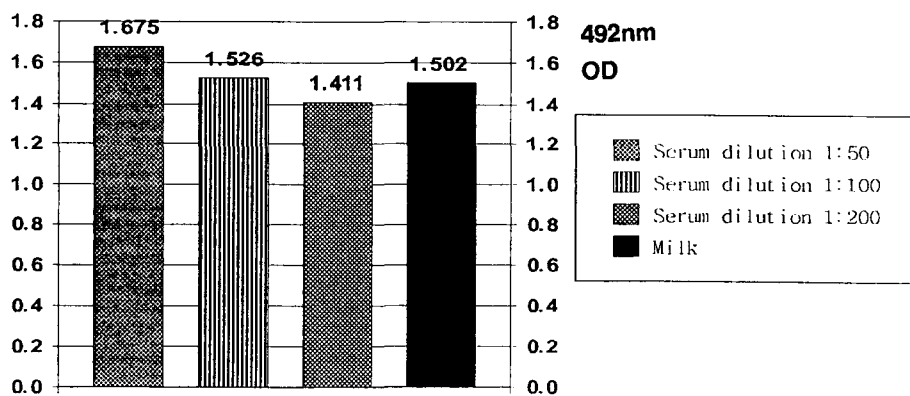


Fig 2. Comparison of the OD results for serum and milk to tuberculin antibody on tuberculin positive cattle

2. 혈중 우결핵 항체 농도와 원유 중 우결핵 항체 농도 비교

피내반응 양성우의 혈청 및 원유를 채취하여 혈청과 원유 중의 결핵항체 농도를 OD치로 상대 비교한 결과는 Fig 2 와 같다.

즉 혈청희석 배수별 OD치는 50배 희석에서 1.675, 100배 희석에서 1.526, 200배 희석에서 1.411이였으며, 원유 원액 중의 PPD 항체 OD치는 1.502로 나타나 혈중 결핵항체의 1/100-1/150배 수준의 항체가 원유 중에 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

3. 피내반응 양성우 및 음성우의 원유 OD치 분포

원유에서의 결핵 항체를 효과적으로 검출하고 비특이 반응을 줄이기 위해 양성우 및

음성우의 원유를 4배 희석하여 OD치를 조사한 결과는 Fig 3.과 같다.

음성우의 원유 OD치는 0.122에서 0.821까지의 분포를 보였고 평균치는 0.385이였으며 양성우의 원유 OD치는 0.294에서 1.683의 분포를 보였다.

본 실험에서는 양성 및 음성 기준을 음성 평균치의 2배인 0.770으로 정하였으며, 음성 평균치의 1.5-1.9배 (0.578-0.769)를 의양성이라 정하였고, 1.5배 이하인 0.577이하를 음성으로 정하였다.

위의 우결핵 양성 및 음성 기준에 따른 원유 OD치의 판정 결과를 조사한 바 Table 2.에서 나타낸 바와 같다.

즉 양성우 45두에 대한 원유 ELISA에서 양성은 29두(64.4%), 의양성 11두(24.4%) 및 음성 5두(11.1%)인 것으로 나타났다. 또

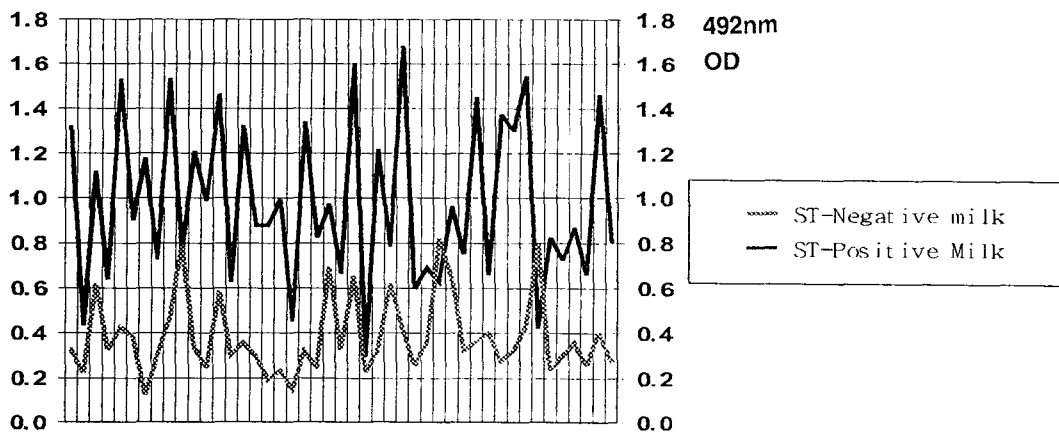


Fig 3. Distribution of OD results for milk ELISA on tuberculin reactor cattle

Table 2. Comparison of the milk ELISA reactions and skin tests in 90 cattle

Tuberculin skin test	No. of cattle tested	MILK ELISA reactions (%)		
		Positive reactor	Suspicious reactor	Negative reactor
Positive reactor	45	29(64.4)	11(24.4)	5(11.1)
Negative reactor	45	3(6.7)	6(13.3)	36(80.0)

Table 3. Relationship between results of serum ELISA and milk ELISA on 47 cattle

Serum ELISA	No. of cattle tested	MILK ELISA reactions (%)		
		Positive reactor	Suspicious reactor	Negative reactor
Positive reactor	20	15(75.0)	4(20.0)	1(5.0)
Suspicious reactor	7	1(14.3)	4(57.1)	2(28.6)
Negative reactor	20	- (0)	3(15.0)	17(85.0)

한 음성우 45두중 양성 3두 (6.7%), 의양성 6두(13.3%), 음성 36두 (80.0%)로 나타났으며 피내반응과 원유중 항체 양성 검출 일치율은 64.4%인 것으로 나타났다.

4. 혈청 ELISA반응 결과와 원유 ELISA반응의 비교

혈청 ELISA반응과 원유 ELISA반응의 항체 검출 효능을 비교한 결과는 Table 3.과 같다.

혈청 ELISA 양성 20두에 대한 원유 ELISA 검사 결과를 비교한 바 양성 15두 (75.0%), 의양성 4두(20%) 및 음성 1두 (5.0%)로 나타났으며, 혈청 의양성 7두에 대한 원유 ELISA 검사 결과를 비교한 바 양성 1두(14.3%), 의양성 4두(57.1%) 및 음성 2두(28.6%)로 나타났으며, 혈청음성 20두에 대한 원유 ELISA 검사 결과를 비교한 바 의양성 3두(15.0%) 및 음성 17두(85.0%)로 나타났다.

고 찰

우결핵은 소의 주요 전염병중의 하나인 동시에 인수공통전염병^{3, 32)}으로 공중위생상 크게 문제시되기 때문에 감염우는 살처분하도록 법으로 정하고 있으며³³⁾ 우리 나라에서는 결핵을 근절시킬 목표로 방역을 실시하고 있다.⁴⁾

우결핵의 원인균인 *Mycobacterium bovis*은

우리 나라의 주요 경제적 사육동물로 급성장하고 있는 사슴에게도 감염이 가능하다^{34, 35)}.

따라서 우결핵의 방역이 불완전할 경우 다른 경제성 동물은 물론 사람에게도 전파될 위험성이 있으며³²⁾, 사람의 평균 수명이 연장되고 면역 결핍을 초래하는 여러 질병, 예를 들면 AIDS의 확산, 암, 장기이식, 당뇨병 등에 의하여 면역이 저하되는 경우 우형 결핵균 등에 노출되면 이환될 확률이 높아지므로³⁶⁾ 사회적인 민감성을 감안할 때 가축의 우형 결핵균 감염 근절이 절실히 요청되고 있다.

현재 결핵병 진단에 가장 보편적으로 이용되고 있는 Skin test는 지연형 과민반응에 의한 생체 세포성 면역상태 측정법으로^{37, 38)} 종양면역^{39, 40)}, 미생물감염^{41, 42)}, 알러지성 질환⁴³⁾ 등에 응용되고 있다. 그러나 진단을 위해서는 많은 노동력과 특이성이 문제시되어 신속하고 정확하게 결핵병을 진단 할 수 있는 방법이 요구되고 있는 실정이다^{9, 10, 44)}.

우결핵병의 진단에 있어 혈청학적 검사는 항체가 일반적으로 낮고 개체의 균에 대한 저항 정도와 항체가 일치하지 않기 때문에 진단적 가치가 적은 것으로 알려져 있으나³⁾, Nassau 등⁴⁵⁾, Reggiardo 등⁴⁶⁾은 사람의 결핵을 진단하는데 ELISA법이 유용한 방법이라 지적한 바 있고, Thoen 등^{47, 48)}은 외국에서 수입되는 야생 포유동물과 조류의 결핵 진단에 ELISA를 적용한 결과 확진율이 다른 혈청반응보다 우수함을 입증한 바 있으며 돼지⁴⁹⁾, 닭⁵⁰⁾의 결핵 진단에도 이용할 수 있다고 하

였다. 또한 Cousins 등⁵¹⁾은 동물원의 물개에서 결핵 검출을 위해 PPD를 이용한 ELISA를 실시한 결과 피내접종법과 100% 일치하여 동물의 스트레스 방지 등 인력의 효과적인 활용법으로 ELISA법이 좋다고 보고하였으며, Francis 등⁵²⁾은 PPD에 의한 ELISA법이 결핵 피내반응법과 특이성이 86.6%, 민감성이 76%라 보고한 바 있어 우결핵 진단에서 ELISA에 의한 혈청검사의 유용성이 확인된 바 있다.

본 시험에서도 우결핵 피내반응 결과 양성 및 음성으로 판정된 혈청에 대해 ELISA를 실시하여 피내접종법과 비교한 바 특이성이 84.3%, 민감성이 82.4%인 것으로 나타나 이들과 유사한 결과를 보였다.

또한 국내에서 박 등⁵³⁾이 Tuberculin 양성우 12두에 대해 MB-O-BSA항원으로 ELISA를 실시하여 양성 일치율이 3례(25.0%)인 것으로 보고하였고, 윤 등¹⁷⁾은 Tuberculin 양성우 31두에 대해 PPD항원으로 ELISA를 실시한 결과 21두(65.6%)가 양성인 것으로 보고하여 본 실험에 비해 특이성이 비교적 낮은 경향을 보였으나 이는 당시 HCSM tuberculin 양성우에 대한 비교성적으로 본 시험에서 PPD tuberculin 양성우를 대상으로 한 결과의 차이인 것으로 생각된다.

Tizard 등⁵⁴⁾은 혈중 IgG의 농도는 1,700-2,700mg/100ml이고 원유에서의 농도는 50-750mg/100ml인 것으로 보고한 바 있어 본 시험에서 결핵 양성우에 대한 혈중항체의 농도와 원유중의 항체농도를 비교 조사한 바 결핵감염우의 혈중항체의 1/100-1/150배가 원유 중으로 이행되는 것을 확인할 수 있었으며, 원유를 이용한 ELISA로 양성우 64.4%의 특이성을 확인할 수 있어, 우결핵 및 기타 질병에 대해 원유로 검사할 수 있는 방법에 대한 연구를 계속해야 할 것으로 생각된다.

이상의 본 시험에서 얻어진 일련의 결과를 보면 혈중 및 원유의 ELISA법을 현행의 Tuberculin 피내접종법의 보조시험방법으로 용

용할 수 있을 것으로 생각 된다. 또한 ELISA에 의한 결핵검사의 특이성 및 민감성을 높이기 위해 최근 연구되고 있는 정제화된 특이 항원^{31, 55)}을 사용하고 술식을 표준화하여 더 많은 시험자료를 추가하면 현행의 피내접종법과 병용하여 우결핵검사를 실시할 수 있을 것으로 사료되며 이에 대한 추가 실험이 요망된다.

결 론

1. 피내반응 양성우 51두중 혈청 ELISA에서 양성 43두(84.3%), 의양성 5두(9.8%) 및 음성 3두(3.8%)인 것으로 나타났으며, 음성우 51두 중 양성 2두(3.9%), 의양성 7두(13.7%), 음성 42두(82.4%)로 나타나 피내반응과 혈중 항체 양성 검출 일치율이 84.3%인 것으로 나타났다.
2. 피내반응 양성우의 혈청 및 원유를 채취하여 혈청과 원유 중의 결핵항체 농도를 OD치로 상대 비교한 결과 혈중 결핵항체의 1/100-1/150배 수준의 항체가 원유에 함유되어 있는 것으로 나타났다.
3. 피내반응 양성우 45두중 원유 ELISA에서 양성 29두(64.4%), 의양성 11두 (24.4%) 및 음성 5두(11.1%)인 것으로 나타났으며, 음성우 45두 중 양성 3두(6.7%), 의양성 6두(13.3%), 음성 36두(80.0%)로 나타나 피내반응과 원유 ELISA의 양성검출 일치율은 64.4%인 것으로 나타났다.
4. 혈청 ELISA 양성 20두의 원유에 대해 ELISA를 실시한 결과 양성 15두(75.0%), 의양성이 4두(20.0%) 및 음성이 1두(5.0%)로 나타났으며, 혈청 의양성 7두의 원유에 대해 ELISA를 실시한 결과 양성 1두(14.3%), 의양성 4두(57.1%) 및 음성 2두(28.6%)로 나타났으며, 혈청 ELISA음성 20두의 원유에 대해 ELISA를 실시한 결과 의양성 3두(15.0%) 및 음성 17두(85.0%)로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Grange JM, Yates MD. 1994. Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis infection. *Vet Microbiol.* 40:125-135.
2. Daborn C. 1995. TB in humans and domestic animals in the developing world. *Ibid.* pp205-209.
3. Gillespie JH, Timoney JF. 1984. Hagan and Brunner's infectious disease of domestic animals. 7th ed. Corenell Univ Press.
4. 결핵병 및 부루셀라병 방역실시요령. 농림수산부고시. 제94-33호. 1994.7.2.
5. Essey MA, Koller MA. 1994. Status of bovine tuberculosis in North America. *Vet Microbiol.* 40:15-22.
6. Caffrey JP. 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programme in Europe. *Vet Microbiol.* 40:1-4.
7. Ryan T, Cameron C. 1995. The NewZal and cattle tuberculosis testing programme. *Ibid.* 351-353.
8. 농림수산 통계연보. 1888년-1995년.
9. 손봉환. 1987. 우결핵병에 대한 종합검토. *대한수의사회지.* 23(9)577-590.
10. 손봉환, 홍중순, 정길생. 1979. 경기지역 우결핵병의 역학적 조사 연구. *대한수의사회지.* 15(9-10)497-504.
11. 배길한, 황영순, 손봉환. 1994. 우결핵 병리 조직으로 부터의 우형 결핵균의 분리 및 신속동정방법. *한국수의공중보건학회지.* 18(3)183-190.
12. Koch R. 1891. *Deutsch Med. Wehnschr.* 17:101.
13. Dorset M. 1934. A comparison of Koch's old tuberculin with new syntetic medium tuberculin. *J Am Vet Assoc.* 84: 439-456.
14. Sibert FB. 1950. Progress in the chemistry of tuberculin. *Adv Tuberc Res.* 3: 1-9.
15. 윤용덕. 1992. 동물에서의 결핵발생현황과 관리대책. *한국가축위생학회지.* 15(2) 33-49.
16. Bendixen PH. 1977. Application of the direct leukocyte migration agarose test in cattle from Mycobacterium paratuberculosis infected herd. *Am J Vet Res.* 38(12):2027-2028.
17. 윤용덕, 김종만, 박정문, 이민웅, 최철순. 1990. 백혈구유주억제 반응 및 효소면역항체법에 의한 우결핵 진단에 관한 연구. *농시논문집.* 32(1):1-22.
18. Klaunser DJ, Johnson DW, Thoen CO, Slone ED, Muscoplat. 1979. Suppression of specific lymphocyte blastogenesis after intravenous tuberculin injection in Mycobacterium bovis-sensitized cattle. *Am J Vet Res.* 40(1) 121-123.
19. Muscoplat CC, Chen AW, Johnson DW, Alhaji I. 1974. In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: standardization and kinetics of the responses. *Am J Vet Res.* 35:1557-1561.
20. Evall E, Perlmann. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Innu-nochem.* 8: 871-874.
21. Ianconescu M, Smith EJ, Fadley AM, Nazerian. 1984. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hemorrhagicenteritis virus and associated antibodies. *Avian Dis.* 28: 677-692.
22. Marquardt WW, Jonhson RB, Odenwald WF, Schlotthober BA. 1980. An indirect enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal-disease virus. *Avian Dis.* 24:375-385.
23. Konishi E, Yomaoka M. 1982. Enzyme-

- linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in swine sera. *Kobe J Med Sci.* 28:7-17.
24. Nielsen K, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR, Bundle DR. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. *Am J Vet Res.* 50:5-9.
 25. Eliot M, Frageaud D, Vannier P, Toma B. 1989. Development of ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujesz'ks disease virus. *Vet Rec.* 124:91-94.
 26. Charles O, Thoen. 1980. Enzyme-linked protein A: An enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detecting antibodies in tuberculosis exotic animals. *Am J Vet Res.* 41(5)833-835.
 27. Griffin JFT, Nagai S, Buchan GS. 1991. Tuberculosis in domesticated red deer: comparison of purified protein derivative and the specific protein MPB70 for in vitro diagnosis. *Research in Veterinary Science.* 50:279-285.
 28. 최철순, 김재학, 이현수, 전윤성. 1975. Bovine tuberculin 개량에 관한 연구 I. 저온 처리된 우결핵균 배양액 및 균체세포질 유래 PPD'S의 특이성. *농사시험연구보고.* 17:101-108.
 29. Pepterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 83:346-356.
 30. Voller A, Bidwell D, Bartlett A. 1979. The enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). In : *Immunoassay In : Immunoassays in the Clinical Laboratory.* New York A R Liss. pp359-371.
 31. Hanna J, Neill SD, O'Brien JJ. 1989. Use of PPD and Phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science.* 47:43-47.
 32. Grange JM, Yates MD. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol.* 40:137-151.
 33. Moris R. 1995. Epidemiological principles tuberculosis control. *Ibid.* 210-213.
 34. Griffin JET, Buchan GS. 1994. Aetology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. *Vet Microbiol.* 40:193-205.
 35. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol.* 40:153-177.
 36. Cousins D, Williams S. 1995. A study of *M. bovis* infection in Australia patients 1970-1994. *Idid.* 260-263.
 37. Muscoplat CC, Thoen CO, Chen AW, Rakich PM, Johnson. 1975. Development of specific lymphocyte immunostimulation and tuberculin skin reactivity in swine infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*. *Am J Vet Res.* 36:1167-1171.
 38. Woodard LF, Harland WR, Burger D. 1978. Cell-mediated immunity in neonatal calves: Delayed-type hypersensitivity and lymphocyte blastogenesis following immunization with a Mycobacterial immunopotentiating glycolipid and tuberculoproteins of *Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res.* 39:579-584(1978).
 39. Hallidays WJ, Webb M. 1969. Delayed hypersensitivity to chemically induced

- tumors in Mice and correlation with an vitro test. *J Nat Cancer Inst.* 43:141-149.
40. Fass L, Herberman RB, Ziegler JL, Kiryabwire JWM. 1970. Cutaneous hypersensitivity reactions to autologous extracts of Malignant melanoma cells. *The Lancet.* 17: 116-118.
 41. 윤용덕, 김금화, 손봉환. 1979. 우결핵병 검색결과 및 tuberculin 반응에 관계되는 주요인에 관하여. *한국수의공중위생학회지.* 3: 1-8.
 42. Mackaness GB. 1962. Cellular resistance to infection. *J Exp Med.* 116:381-406.
 43. Gray DF, Jennings PA. 1955. Allergy in experimental mouse tuberculosis. *Amer Rev Tuberc.* 72:171-195.
 44. Paterson AB. 1956. The incidence and causes of tuberculin reactions in non-tuberculosis cattle. *Adv Tuber Res.* 7: 101-129.
 45. Nassau E, Parsons E R, Johnson GD. 1976. The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle.* 57:67-70.
 46. Reggiardo Z, Vazquez E, Schnaper L. 1980. ELISA tests for antibodies against mycobacterial glycolipids. *J Immunol Methods.* 34 : 55-60.
 47. Theon CO, Himes EM. 1981. Tuberculosis, in Davis JW, Karstad LA, Karstad LA, Trainer D (ed) *Infectious Diseases of Wild Mammals* ED 2. Ames, Iowa State University Press.
 48. Theon CO, Mills K, Hopkins MP. 1980. Enzyme-linked protein A : An enzyme linked immunosorbent assay reagent for detecting antibodies in tuberculosis exo-zytic animals. *Am J Vet Res.* 41(5):833-835.
 49. Thoen CO, Armbrust AL, Hopkins MP. 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in Swine infected with *Mycobacterium avium*. *Am J Vet Res.* 40:1096-1099.
 50. Theon CO, Eacr et W G, Himes EM. 1978. An Enzyme-labeled antibody test for detecting antibodies in chickens infected with *Mycobacterium avium* serotype 2. *Avian Dis.* 22:162-166.
 51. Cousins DV. 1987. ELISA for detection of tuberculosis in seals. *Vet Rec.* 26: 305.
 52. Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, O'boyle D, Lumsden MJ, Frosts AJ. 1978. *Vet Rec.* 103:420.
 53. 박병옥, 김창수, 우기방. 1989. 효소 면역법(ELISA)에 의한 우결핵병 진단에 관한 연구. *한국가축위생시험연구회지.* 12: 133-145.
 54. Tizard. 1982. *An introduction to veterinary immunology.* 2th ed. W B Saunders Company.
 55. Fifer T, Rothel JS, Wood PR. 1994. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation. *Vet Microbiol.* 40:65-81.