<원 저>

국내 우군에서 소 결핵 진단을 위한 피내검사법과 Interferon- γ 생성 검사의 비교

신승원¹ · 신민경¹ · 차승빈¹ · 우종태² · 이성모³ · 구복경⁴ · 조운상⁴ · 정석찬⁴ · 유한상^{1,*}

¹서울대학교 수의과대학 및 BK21 수의과학인력양성사업단, ²경기도 축산위생연구소,
³인천광역시 보건환경연구원 가축위생시험소, ⁴농림수산검역검사본부 동식물위생연구부 세균질병과
(게재승인: 2011년 6월 14일)

Comparison of tuberculin skin test with Interferon- γ assay for the diagnosis of bovine tuberculosis in Korean cattle

Seung Won Shin¹, Min Kyoung Shin¹, Seung Bin Cha¹, Jong Tae Woo², Sung Mo Lee³, Bok Kyung Ku⁴,
Yun Sang Cho⁴, Suk Chan Jung⁴, Han Sang Yoo^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine and BK21 for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Gyeonggi-do Veterinary Service, Suwon 441-460, Korea

³Incheon Metropolitan City Institute of Health & Environment, Incheon 400-102, Korea

⁴Bacterial Disease Division, Department of Animal and Plant Health Research, Animal,
Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-757, Korea

(Accepted: June 14, 2011)

Abstract : Bovine tuberculosis (bTB), caused primarily by *Mycobacterium bovis*, continues to exert an economic loss, even in countries with active control measures, and is one of zoonotic diseases enable to be transmitted to human. The control and eradication of bTB are mainly based on a test and slaughter policy and/or abattoir surveillance. Various factors including limitation of diagnostic tests have been considered as major constraints to eradication. Single intradermal test (SIT) is the official diagnostic test. New diagnostic methods are needed to be developed, because of limitations of the test. In the present study SIT was compared with single intradermal comparative cervical test (SICCT) and interferon (IFN)- γ assay. There was very low correlation between SIT and SICCT. However, high correlation was shown between SIT and IFN- γ assay while no correlation was observed between SICCT and IFN- γ assay. Therefore, our results suggest the possibility of replacement of SIT with IFN- γ assay for the diagnosis of bovine tuberculosis.

Keywords : bovine tuberculosis, IFN- γ assay, SICCT, SIT

서 론

소결핵(Bovine tuberculosis)은 *Mycobacterium(M.) bovis* 감염에 의한 만성, 소모성 질병이며, 중요한 인수공통전염병의 하나로서, 많은 나라에서 오랫동안 퇴치를 위한 노력을 하였음에도 불구하고 현재도 전 세계적으로 연간 30억 만頭の 경제적 피해를 주는 것으로 추정되고 있다 [21, 23].

소 결핵 박멸을 위해 대부분의 나라에서 양성우 살처분(test and slaughter) 정책 및 도축장 예찰방법(abattoir surveillance)을 사용하고 있다 [21]. 지난 수십년간 많은 나라에서 소 결핵 퇴치를 위하여 노력을 하였음에도 계속적인 문제가 되는 것은 야생동물에 의한 재감염, 동물의 이동증가, 진단법의 한계성, 우군의 크기 증가 등 여러 가지 제약조건 때문이다 [1, 7, 16, 21].

세계동물보건기구(OIE)에서 국제적인 무역을 위한 소

*Corresponding author

Tel: +82-2-880-1263, Fax: +82-2-874-2738

E-mail: yoohs@snu.ac.kr

결핵 검사법을 지연형과민반응(delayed type hypersensitivity)에 기초한 피내검사법(tuberculin skin test)을 인정하고 있다. 이는 purified protein derivative(PPD)를 미근부주벽(caudal fold), 또는 목의 피부에 접종하고 3일 후에 종창차를 비교하여 판정한다 [19, 21]. 이 방법은 여러 가지 문제점이 있음에도 소 결핵근절을 위한 유일한 생체 진단법이기에 때문에 오랫동안 사용되어 왔다. 우리나라에서 소 결핵이 1913년 최초 보고된 이후 소 결핵근절을 위하여 피내진단법을 사용하여 왔다. 다만 튜버클린을 Robert Koch에 의한 Old tuberculin(OT)에서 특이성을 높이기 위해 HCSM(Heat concentrated synthetic medium), PPD로 개량하여 사용하였다 [3, 4]. 이러한 소 결핵 피내검사는 *M. bovis* 유래 우형 튜버클린만을 사용하는 단일피내검사법(single intradermal test)과 우형튜버클린과 *M. avium* 유래 조형 튜버클린을 같이 사용하는 비교피내검사법(single intradermal comparative cervical test)이다. 비교피내검사는 *M. bovis* 가 아닌 *M. avium* 을 포함한 다른 환경성 mycobacterium 감염을 구별하기 위한 진단방법이다. 비특이 감염우에 의한 피해를 막고자 여러 나라에서 사용하고 있으나, 기술상 여러 가지 어려움이 있어서 새로운 진단기법을 찾고 있다 [2, 11, 20, 26, 28].

Interferon- γ 분석법은 최근에 소 결핵 박멸을 위한 진단법의 하나로 세계적으로 여러나라에서 사용되고 있다. 이 진단법은 피내진단법에 비하여 여러 가지 장점을 가지고 있다 [2, 3, 26, 27]. 즉, 민감도의 증가, 빠른 재검사의 가능, 농장을 재방문할 필요가 없고 무엇보다도 실험방법이나 실험결과의 해석이 투명하다는것이다. 이러한 이유로 이 방법이 소결핵의 확진을 위한 진단법으로 추천되고 있다. 국내에서는 현재 단일피내검사에 의하여 소 결핵을 진단하고 있으나, 비특이반응에 의한 false reactor에 의한 경제적인 피해가 큰 상황이다. 또한 현재는 우유를 중심으로 피내검사법을 적용하고 있기 때문에 한우 또는 육우에서의 소 결핵의 확산방지를 위한 새로운 진단법의 도입이 요구되는 시점이다. 이에 본 연구에서는 국내에서 소 결핵 진단을 위해 사용되고 있는 단일피내검사 결과를 비교피내검사 및 IFN- γ 검사법을 통하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

대상동물

2007년 3~12월과 2010년 4~12월 사이에 경기도와 인천광역시 지역에서 사육되는 소들 중 우리나라 결핵병 및 브루셀라병 방역실시요령(농림수산식품부고시 제 2009-147호)에 의해 매년 실시하는 소 결핵검사대상우

를 대상으로 하였다. 위 실시요령에 따라 실시한 단일피내검사결과를 바탕으로 양성, 의양성, 음성의 142두에 대하여 비교피내검사를 실시하였으며, 단일피내검사결과 양성, 의양성, 음성의 141두의 혈액을 이용하여 IFN- γ 분석법을 실시하였다.

PPD

단일피내검사를 위해 사용한 PPD는 국내 동물약품업체에서 생산하여 국가검정을 거친 *M. bovis* AN5 유래 PPD-B를 사용하였으며, 비교피내검사를 위한 PPD-B와 PPD-A는 국립수의과학검역원에서 *M. bovis* AN5(ATCC35726)와 *M. avium* AV14141(ATCC35716)을 이용하여 조 등 [2]의 방법에 의하여 제조 및 역가검정을 실시하여 사용하였다.

피내 튜버클린 검사(Tuberculin skin test)

단일피내검사는 국내 결핵병 및 브루셀라병 방역실시요령(농림수산식품부 고시 제2009-147호)에 따라 실시하였다. 즉, 국내에서 사육되는 12개월 이상의 소에 대하여 미근부 주벽의 피내에 튜버클린 피내검사용 PPD 진단액을 접종후 48~72시간 사이에 피부두께를 측정하여 접종전과 후의 종창차이가 5 mm 이상이면 양성, 3~5 mm 이면 의양성, 3 mm 미만은 음성으로 판정하였다. 비교피내검사는 단일피내검사 3일 후에 Huitema 방법 [12] 및 Norby 등 [17]의 방법에 따라서 실시하였다. 간단히 설명하면, 3번과 4번 경골아래의 경측부 피내의 털을 12.5 cm 간격으로 털을 깎은 다음 각각의 피부의 두께를 측정하고 위는 우형 PPD 튜버클린(PPD-B)을, 아래는 조형 PPD 튜버클린 (PPD-A)을 0.1 mL 씩 피내접종하였다. 피내접종 72 시간후 접종부위의 종창차를 구한 뒤, PPD-B와 PPD-A 각각의 종창차이가 4 mm 이상인 개체를 양성으로, 0 mm 초과 4 mm 미만인 개체를 의양성으로, 0 mm 이하인 개체를 음성으로 판정하였다.

IFN- γ 생성 검사

IFN- γ 생성검사는 Wood 등 [27]의 방법에 따라 전혈을 처리하여 실시하였으며, 생성량은 Bovigam ELISA Kit(Prionics, Switzerland)을 이용하여 측정하였다. 즉, 피내진단검사 결과 3~30일 이내에 해파린이 첨가된 시험관에 미정맥 또는 경정맥에서 혈액을 채취한 뒤 상온 상태로 실험실로 운반하여 30시간 이내에 PPD로 자극시켰다. 채혈한 혈액은 24 well microplate에 well 당 혈액 1.5 mL 씩 3개의 well에 분주한 후 각각 0.01 M PBS, PPD-B(0.3 mg/mL), PPD-A(0.3 mg/mL, 7,500 units per mL)를 100 mL 씩 첨가한 뒤 37°C CO₂ incubator에서 16~24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 배액을 500 × g로

Fig. 1. Comparison of single intradermal test (SIT) with single intradermal comparative cervical test (SICCT). In SIT, the cattle were considered as reactor, suspect and negative to bovine tuberculosis when The difference ("after" minus "before") was ≥ 5 mm, 3~5 mm and < 3 mm, respectively. In SICCT, ≥ 4 mm, 0~4 mm and < 0 mm in the difference of skin thickness by PPD-B minus PPD-A were considered as reactor, suspect and negative in bovine tuberculosis.

10분간 원심분리하여 상층액을 채취한 후 -20°C 에 보관하면서 실험에 공시하였다. 생성된 IFN- γ 의 양은 제공사의 실험방식에 따라서 실시하였다. 즉, test sample과 희석액을 각각 50 mL 씩 1:1 비율로 희석한 후 실온에서 1시간 동안 반응시키고 세척액을 이용하여 well 당 200 mL 씩 6회 세척한 후 conjugate(Horseradish peroxidase labelled anti-bovine IFN- γ)을 100배로 희석하여 첨가한 뒤 실온에서 다시 1시간 동안 반응시킨 후 세척액으로 6회 세척하고 enzyme substrate solution을 각각의 well에 100 mL 씩 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 enzyme stopping solution을 각각의 well에 50 mL 씩 첨가한 후 450 nm에서 흡광도(OD)를 측정 하였다. 흡광도를 측정한 후 제조사에서 제공한 기준에 따라서 판정하였다. 각 well 당 2회 반복실험하여 흡광도의 평균값을 사용하였으며, sample마다 0.01 M PBS(nil antigen), PPD-A, PPD-B를 첨가한 3개의 평균흡광도 값을 구하고 이수치를 다음과 같은 기준에 의해서 양성 또는 음성으로 판정 하였다. PPD-B의 OD 값과 PBS의 OD 값의 차이가 0.1 이상이고, PPD-B OD 값과 PPD-A OD 값의 차이가 0.1 이상인 경우 양성으로 판정하였다. 음성은 PPD-B OD와 PBS에 의한 OD 차이가 0.1 미만 또는 PPD-B와 PPD-A OD 차이가 0.1 미만인 경우로 하였다.

통계처리

단일피내진단법과 비교피내진단법의 시험결과는 회귀

분석을 실시하고 상관관계수를 구하여 유의성을 검정하였다. 단일피내진단법 및 비교피내진단법에 대한 IFN- γ assay의 민감도, 특이도 및 Youden's Index를 구하였다. Youden's index는 진단 검사법의 정확도를 비교적 쉽게 평가하는 지표로서 1에 가까울수록 효율적인 진단기준이라 할 수 있으며, 그 공식은 다음과 같다.

Youden's index =

민감도(Sensitivity) + 특이도(Specificity) - 1

또한 이에 대한 Receiver-operating-characteristics(ROC) 곡선분석을 실시하고 area under curve(AUC)로 비교하였다. 통상적으로 AUC 수치에 따라 진단의 정확도가 우연의 일치로 일어날 수 있는($\text{AUC} = 0.5$), 덜 정확한($0.5 < \text{AUC} \leq 0.7$), 중등도의 정확한($0.7 < \text{AUC} \leq 0.9$), 매우 정확한($0.9 < \text{AUC} < 1$) 그리고 정확도가 완벽한($\text{AUC} = 1$) 진단으로 분류한다. 이 통계처리를 위하여는 SPSS version 17.0(SPSS, USA) 프로그램을 이용하였다.

결 과

2007년에 85,111두, 2010년 134,608두로 경기도와 인천광역시 지역에서 사육되는 유우, 한우 총 219,719두에 대하여 결핵병 및 브루셀라병 방역실시요령에 따라서 단일피내진단법을 실시한 결과 2007년도에는 양성 130두, 의양성 84두, 음성 84,897두이었고, 2010년도에는 양성 189두, 의양성 12두, 음성 134,407두로 총 양성 319두, 의양성 96두, 음성 219,304두 이었다.

단일피내진단검사결과 양성우 98두, 의양성우 36두와 음성우 8두의 총 142두에 대하여 비교 피내진단검사를 실시하여 비교한 결과 단일피내검사결과 양성우가 비교 피내검사결과 우결핵 특이 양성우로 판정되는 경우의 비율이 매우 낮아($n = 15$), 이 두 검사간에는 매우 낮은 상관 관계를 나타내었다($R^2 = 0.052$). 그러나, 의양성우 경우는 대부분 의양성($n = 19$) 또는 음성($n = 13$)으로 판정되었으며, 음성우는 모두 음성($n = 8$)으로 판정되었다(Fig. 1). 또한 단일피내진단검사결과 양성 28두, 의양성 12두, 음성 101두에 대하여 IFN- γ 생성검사를 실시하여 분석한 결과 IFN- γ 생성검사법이 높은 민감도(82.5%)와 특이도(85.1%)를 나타내었으며, ROC 분석 결과 AUC 값이 0.863(95% confidence interval, $p < 0.001$)이었고, Youden's index는 0.676이었다(Fig. 2). 그러나, 비교피내검사결과를 바탕으로 IFN- γ 검사를 비교한 결과 민감도(91.7%)는 매우 높았으나, 특이도(35.7%)는 매우 낮았고, ROC 분석 결과 AUC 값이 0.592(95% confidence interval)이었고, Youden's index는 0.274이었다(Fig. 3).

Fig. 2. Receiver-operating-characteristics(ROC) analysis of single intradermal test with IFN- γ assay. AUC value was 0.863 in 95% confidence interval($p < 0.001$). Sensitivity and specificity were 82.5% and 85.1%, respectively. Youden's Index was 0.676.

Fig. 3. ROC analysis of single intradermal comparative cervical test with IFN- γ assay. AUC value was 0.592 in 95% confidence interval. Sensitivity and specificity were 91.7% and 35.7%, respectively. Youden's Index was 0.274.

고 찰

소 결핵은 *Mycobacterium tuberculosis* complex에 속하는 *M. bovis* 감염에 의한 질병으로 전 세계적으로 발생하고 있어 축산업에 막대한 경제적인 피해를 주고 있

을 뿐만 아니라, 사람에도 감염될 수 있는 중요한 인수 공통전염병 원인체로서 공중보건학적으로도 매우 중요한 질병이다 [3, 4, 21, 23]. 이러한 이유로 여러나라에서 이 질병의 근절을 위한 많은 노력에도 불구하고 지속적으로 문제가 되고 있다. 우결핵을 박멸하기 위해 다양한 기초연구를 통해 민감도와 특이도가 높은 진단법 개발 및 확산방지를 위한 백신개발 등에 치중하고 있다 [1, 8, 13, 15]. 특히 소 결핵균은 소뿐만 아니라, 사람, 오소리, 너구리, 야생노루, 사슴 등 넓은 숙주 영역을 가지고 있어서 결핵병의 박멸을 위해서 야생동물에서 근절을 위한 백신 개발 등에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다 [6, 9, 18]. 그러나 무엇보다도 감염체계를 효과적으로 검색할 수 있는 진단법의 개발이 이루어져야 한다고 생각된다.

우리나라에서는 소 결핵을 제2종 가축법정 전염병으로 규정하고 있고, 박멸을 위하여 농림수산식품부 고시인 결핵병 및 브루셀라병역질시 요령에 따라서 대상 소에 대하여 단일피내 반응을 통하여 매년 정기적인 검진을 실시하고 있다. 그러나 단일피내진단법의 경우 민감도나 특이도가 낮고, 상당부분 진단자의 주관에 개입될 가능성이 높으며, 최초 진단시 많은 시간이 소요되고, 결과 판정을 위해 농장을 재방문해야 하며, 재진단이 필요한 경우 2개월 이상을 기다려야 하는 비효율성과, PPD의 접종부위, tuberculin의 종류 및 검사의 횟수 등에 따라서 다양한 결과를 나타낼 수 있으며 [14], 또한 소들이 여러종류의 비정형 결핵균 및 환경 mycobacterium 균등에 노출 또는 감염되어 진단시 비특이 반응을 유발할 수 있는 문제점을 내포하고 있어 새로운 진단법에 대한 연구가 계속적으로 제기되어 왔다 [5, 10, 22]. 이 실험에서 단일피내 양성우를 대상으로 비교피내진단법으로 재검사를 한 결과 양성두수의 비율이 낮아지고, 의양성, 음성 두수가 증가 하였다. 이는 다른 연구에서도 보고된 바 있는데 이는 PPD의 상태, 접종시 미세한 용량 차이, 실험자의 숙련도, 진단자의 주관성 개입, *M. avium* 및 환경성 mycobacterium의 감염 등 다양한 요인을 생각할 수 있다. 그러나, 단일피내진단법에 의한 진단결과를 IFN- γ 생성법에 의해서 판정한 결과 매우 높은 상관관계를 나타내었다. IFN- γ 검사법은 호주에서 개발되어 1980년대 후반 단일피내검사법과 함께 소 결핵 진단을 위한 *in vitro* blood test로 개발된 진단기법이다 [17, 24, 25, 27]. 이 진단법은 비교피내진단법과 유사하게 PPD-B와 PPD-A를 모두로 소 혈액세포를 자극시킨 후 면역세포 중 활성화된 T 림프구에서 분비되어 대식세포를 자극하는데 중요한 역할을 하는 IFN- γ 의 농도를 측정함으로써, 소 결핵균 감염인지 또는 환경결핵균(조형결핵균 포함)에 감염되었는지를 감별하는 진단으로 사

용되고 있다. 비교피내검사결과와 IFN- γ 생성검사법간의 상관관계를 분석한 결과 매우 낮은 상관관계를 나타내었다. 즉, 이는 현행 우리나라에서 시행되고 있는 단일피내진단법에서 제기되고 있는 여러 가지 문제점들을 극복하기 위해서는 비교피내진단법보다는 IFN- γ 진단법을 시행하는 것이 더 효율적일 것으로 생각된다. 그러나, 현행 시행되고 있고 세계동물보건기구에서도 인정하고 있는 소 결핵의 진단법인 단일피내진단법의 진단효율을 증진시키기 위한 다양한 연구, 즉, 소 결핵균의 특성 분석, 소 결핵병의 면역학적 분석 등의 기초연구를 통한 새로운 튜버클린 진단액의 개발, 새로운 실험실내 진단법 개발과 함께 시술자의 전문성을 증진시킬 수 있는 방향으로 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결론

우리나라에서 소 결핵의 진단은 현재까지 PPD를 이용한 단일피내검사법을 이용하여 실시하여 왔다. 그러나 이 진단법이 타 mycobacterium 균과의 비특이 반응, 시술의 어려움 등으로 새로운 진단기법의 개발이 요구되었다. 이 진단기법을 대체하기 위한 방법 중 하나로 IFN- γ 진단법을 국내 우군에서 비교 검토한 결과, IFN- γ 진단법이 현재 국내에서 사용 중인 단일피내검사법의 문제점을 보완할 수 있을 것으로 판단되며, 이 방법을 국내 소 결핵병 검진을 위한 방법으로 대체할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 수의과학검역원 용역연구과제에 의해 수행되었으며, BK21 수의과학연구인력양성사업단, 서울대학교 수의과학연구소의 일부 지원이 있었습니다.

참고문헌

1. 유한상. 소 결핵의 국제 연구 동향. 한국수의공중보건학회지 2007, **31**, 69-82.
2. 조윤상, 김종만, 정석관, 우승룡, 김중염, 유한상, 박용호, 안종삼. 비교 피내 검사와 감마 인터페론 검사에 의한 우결핵의 진단. 대한수의학회지 1999, **39**, 1119-1125.
3. 조윤상. 국내 소결핵의 발생 및 연구동향. 한국수의공중보건학회지 2007, **31**, 61-67.
4. 최철순. 최신 인수공통전염병학. 제1판 개정. pp 145-153, 서흥출판사, 서울, 2006.
5. Ameni G, Hewinson G, Aseffa A, Young D, Vordermeier M. Appraisal of interpretation criteria for the comparative intradermal tuberculin test for diagnosis of tuberculosis in cattle in central Ethiopia. Clin Vaccine Immunol 2008, **15**, 1272-1276.
6. Buddle BM, Wedlock DN, Denis M. Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife. Vet Microbiol 2006, **112**, 191-200.
7. Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet Microbiol 1994, **40**, 53-63.
8. Dietrich J, Weldingh K, Andersen P. Prospects for a novel vaccine against tuberculosis. Vet Microbiol 2006, **112**, 163-169.
9. Donnelly CA, Woodroffe R, Cox DR, Bourne FJ, Cheeseman CL, Clifton-Hadley RS, Wei G, Gettinby G, Gilks P, Jenkins H, Johnston WT, Le Fevre AM, McInerney JP, Morrison WI. Positive and negative effects of widespread badger culling on tuberculosis in cattle. Nature 2006, **439**, 843-846.
10. Faye S, Moyen JL, Gares H, Benet JJ, Garin-Bastuji B, Boschirolu ML. Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN γ assay (Bovigam) in a low prevalence area in France. Vet Microbiol 2011, **151**, 60-67.
11. Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. Vet Rec 1978, **103**, 420-425.
12. Huitema H. Development of a comparative test with equal concentrations of avian and bovine PPD tuberculin for cattle. Tijdschr Diergeneeskde 1973, **98**, 396-407.
13. Khare S, Hondalus MK, Nunes J, Bloom BR, Garry Adams L. *Mycobacterium bovis* Δ leuD auxotroph-induced protective immunity against tissue colonization, burden and distribution in cattle intranasally challenged with *Mycobacterium bovis* Ravenel S. Vaccine 2007, **25**, 1743-1755.
14. Marassi CD, Medeiros L, Lilenbaum W. The use of a Gamma-interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. Acta Trop 2010, **113**, 199-201.
15. Maue AC, Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Minion FC, Brown WC, Norimine J, Foote MR, Scherer CFC, Estes DM. An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. Vaccine 2007, **25**, 4735-4746.
16. More SJ. What is needed to eradicate bovine

- tuberculosis successfully: an Ireland perspective. *Vet J* 2009, **180**, 275-278.
17. **Norby B, Bartlett PC, Fitzgerald SD, Granger LM, Bruning-Fann CS, Whipple DL, Payeur JB.** The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Diagn Invest* 2004, **16**, 126-131.
 18. **O'Brien DJ, Schmitt SM, Rudolph BA, Nugent G.** Recent advances in the management of bovine tuberculosis in free-ranging wildlife. *Vet Microbiol* 2011, **151**, 23-33.
 19. **Office International des Epizooties (OIE).** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.4.7. pp. 3-8, OIE, France, 2009.
 20. **Rangen SA, Surujballi OP, Lutze-Wallace C, Lees VW.** Is the gamma interferon assay in cattle influenced by multiple tuberculin injections? *Can Vet J* 2009, **50**, 270-274.
 21. **Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR.** 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**, 205-220.
 22. **Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Kyburz A, Cagiola M, Whelan A, Palmer MV, Thacker TC, Meijlis J, Carter C, Gordon S, Egnuni T, Hardegger R, Marg-Haufe B, Raeber A, Oesch B.** Comparison of tuberculin activity using the interferon- γ assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet Rec* 2010, **167**, 322-326.
 23. **Steele JH.** Regional and country status report. In: Thoen CO, Steele JH (eds.). *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. pp. 169-172, Iowa State University Press, Ames, 1995.
 24. **Waters WR, Palmer MV, Whipple DL, Carlson MP, Nonnecke BJ.** Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003, **10**, 960-966.
 25. **Whipple DL, Palmer MV, Slaughter RE, Jones SL.** Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *J Vet Diagn Invest* 2001, **13**, 117-122.
 26. **Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SI, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweddle NE.** Field comparison of the interferon- γ assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J* 1991, **68**, 286-290.
 27. **Wood PR, Jones SL.** BOVIGM: An in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2001, **81**, 147-155.
 28. **Worthington RW.** Mycobacterial PPD sensitins and the nonspecific reactor problem. *Onderstepoort J Vet Res* 1967, **34**, 345-437.