

면역학적인 방법에 의한 한우와 유우의 요네병 발생조사

김종만 · 안종삼 · 우승룡 · 조동희 · 조윤상 · 박정문 · 윤용덕 · 장국현 *

가축위생연구소 세균과
강원도 가축위생시험소 중부지소*
(1994년 1월 11일 접수)

A Survey of paratuberculosis by immunological methods in dairy and Korean native cattle

Jong-man Kim · Jong-sam Ahn · Seung-rong Woo · Dong-hee Jo
Yun-sang Jo · Jeung-moon Park · Yong-dhuk Yoon · Guk-hyun Chang.*

Department of Bacteriology, Veterinary Research Institute
Kangwon Veterinary Service Laboratory, Chungbu Branch*
(Received Jan 11, 1994)

Abstract : A immunological survey of paratuberculosis in dairy and Korean native cattles was conducted by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA), complement fixation test(CFT), agar gel immunodiffusion test (AGID) and intradermal skin test(ID).

Over all prevalence of paratuberculosis in cattles was 6.7%(109/1633) by ID, 7.5%(205/2719) by AGID, 9.3%(245/2641) by CFT and 13.4%(363/2719) by ELISA.

Prevalence in dairy cattle was higher than that of Korean native cattle.

Of 70 ELISA-positive cattle, 23(28.6%) and 48(68.6%) cattles were classified as positive in the AGID and positive or suspect in CFT, respectively.

Of 92 ELISA-suspect cattle, 32(34.9%) and 48(52.2%) cattles were classified as AGID-positive and CFT-positive or suspect, respectively.

It was concluded that paratuberculosis is widespread in cattle of Korea.

Key words : Survey, paratuberculosis, dairy and Korean native cattle

서 론

요네병은 소, 양, 산양, 사슴 등 대부분의 반추수에 발생하는 만성 소모성 전염병으로 유육생산의 현저한 감소는 물론 수태율 저하, 고질적 유방염 등에 의한 조기 도태로 축산업에 막대한 경제적 손실을 초래하는 질병이다.^{1,2,4,10,11}

이러한 요네병은 범세계적으로 발생하고 있으며 오래 전부터 나라 별로 발생상황 조사에 이은 진단 및 방제법

연구로 피해감소와 근절대책을 추진하고 있다.^{5,6,9,10,11,13,14}

그러나 국내에서는 요네병발생에 대한 광범위한 조사나 피해연구가 아직 수행된 바 없으며 다만 임상병리 학적인 소견에 의한 발생추정, 강원지역 일부 목장 소를 대상으로 한 피내반응조사 및 요네병 임상증상이 있는 소로부터 *Mycobacterium paratuberculosis* 분리보고 등에 그치고 있다.²²⁻²⁴

본 연구에서는 국내 요네병 발생상황을 정확히 파악하고 종합적인 방제대책을 수립하기 위한 연구의 일환

으로 피내반응과 3종의 혈청학적인 진단법으로 한우와 유우에서의 요네병 발생상황을 조사하였다.

재료 및 방법

검사용 혈청은 1993년 3월 부터 11월 사이에 강원, 경기, 충남, 전북에 있는 8개 한우 및 유우 목장과 2개 도축장의 소로부터 채혈한 것으로, 원심분리 후 56℃ 30분 비등화하여 시험에 공시하였다.

항원제조 : 면역학적진단을 위한 항원 및 진단액은 다음과 같이 제조하였다.

1) Ammonium sulfate purified protein(ASP) : *Mycobacterium paratuberculosis*(P18)를 Sauton 배지에서 8주간 정치배양 후 균체를 100목 동당과 4겹가게로 여과 수집하고 증류수로 3회 세척하여 4-5시간 여과 깔때기 내에서 수분을 제거하였다. 균체 100g(wet weight)을 200ml cold PBS(PH7.2)에 부유시켜 French Pressure Cell Press(American Instrument CO.)로 20,000 psi에서 5회 반복 균체를 파괴시키고 10,000rpm에서 60분간 원심분리하여 상층액을 수집한 후 ammonium sulfate를 포화용액이 될 때까지 소량씩 저으면서 가하고 5℃에서 18시간 정치하여 형성된 단백질 입자를 원심, 수집하여 단백질용 투석막으로 3일간 투석 후 농도를 1mg/ml로 하여 동결건조 하였다. ELISA실험시 이것을 1:200(5µg/ml)으로 희석하여 항원으로 사용하였다.

2) Lipopolysaccharide(LPS) : LPS항원은 ASP 항원제조에서와 같이 배양균을 French pressure로 파괴 후 PH를 1N NaOH로 11.5가 되게 조절하고 90℃ 10분간 가열한 후에 10,000rpm, 60분간 원심하여 상층액을 수집하고 PH를 다시 0.1N/HCl로 4.5되게 조절하여 형성된 LPS를 10,000rpm, 60분간 원심수집하고 PH를 7.0으로 조절한 후에 항원농도를 1mg/ml로 하여 동결건조하였다. AGID실험시 PBS에 같은 농도로 부유시켜 사용하였으며, CFT에서는 checkerboard titration에 의해 농도를 조절한 후 항원으로 공시하였다.

3) Johnin : Sauton 배지에서 8주간 정치배양한 *M. paratuberculosis*(P18) 배양물을 15Lb, 1시간 습열멸균한 뒤 균체를 여과 제거하고 수집한 배양여액을 가열증발시켜 1/10로 농축하였다. 이렇게 조제한 요닌은 미국 NVSL에서 분양 받은 진단액을 표준품으로 하여 기니픽 피내반응을 측정하고 통계분석하여 농도를 조절한 후에 공시하였다.

면역학적 진단 : 1) Intradermal skin test(ID) :

Johnin을 소의 미근부 피내에 0.1ml 주사하고 48시간 후 주사전과 주사후의 종창차가 5mm 이상인 것을 양성으로 판정하였다.

2) Ager gel immunodiffusion test(AGID) : Agarose (type 1, Sigma)를 0.075M barbital buffer(sodium barbital 4.128g, barbital 0.8g, D.W 1,000ml, pH 8.6)로 1%되게 조제하여 자불용해후 조직 배양용 plate에 5ml씩 분주하고 gel puncher로 직경 3mm, hole간의 거리가 4mm되게 hole을 만든 후 가운데 hole에 항원과 바깥 hole에 항체를 각 10µl씩 가하여 wet chamber에 넣고 실온에서 48~96시간 반응시키면서 형성된 침강선이 2개 이상인 것을 양성으로 판정하였다.

3) Complement fixation test(CFT) : U형 마이크로 프레이트(Nunclon)를 이용하여 200µl system으로 실시하였다.

즉 혈청을 1:8, 1:16, 1:32로 희석하여 40µl씩 넣은 후 예비 시험서 결정된 2단위 보체와 항원을 각 40µl씩 첨가후 37℃ 30분 반응시킨 후 동량으로 혼합한 2단위 용혈소와 3% 양적혈구액을 80µl씩 가하고 다시 37℃ 30분 반응시킨뒤 100% 용혈이 저지된 것을 기준으로 1:32 이상 양성, 1:16 의양성, 그리고 1:8 이하는 음성으로 판정하였다.

4) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) : 항원을 coating buffer(0.1M carbonate bicarbonate buffer, pH 9.6)로 희석하여 96 well ELISA plate (Nunc-immunoplate)에 100µl씩 분주후, 5℃에서 하루 밤 coating 시키고 Tween-PBS(0.5M NaCl, 2.5mM KCl, 1.5M KH₂PO₄, 8mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20, pH7.4)로 4회 세척한 후 가검혈청을 Tween-PBS로 1:200 희석하여 100µl씩 2 hole(2반복)에 분주하고 37℃, 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Tween-PBS로 4회 세척하고 1:3,000으로 희석한 antibovine IgG peroxidase conjugate(Sigma,A-8917)를 100µl씩 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 Tween-PBS로 4회 세척하였다. 이어서 100µl의 ABTS 기질액을 가하고 실온에서 30분간 반응시켜서 ELISA reader(Multiskan, Titertek)로 405nm에서 흡광도를 측정하였다. P/N value는 각 프레이트마다 표준의 양성 및 음성혈청을 대조로 동시에 시험하여 P/N value가 2.0이상을 양성, 1.5-1.9사이를 의양성으로 판정하였다.

결 과

요네병 발생상황 : 진단법별로 조사한 요네병 발생상

Table 1. District related incidence of paratuberculosis in cattle

District	Farm <Slaughter house>	No. of cow	No. of positive reactors(%)			
			ID	AGID	CFT	ELISA
Gangweon	A	379	55(14.5)	2(0.5)	39(10.3)	29(7.6)
	B	283	11(3.9)	2(0.7)	27(9.5)	43(15.2)
	<C>	50	NT	0	4(8.0)	9(18.0)
	Subtotal	712	66/662(10.0)	4(0.6)	70(9.8)	81(11.4)
Kyunggi	D	160	NT	20(12.5)	4/141/(2.8)	2(1.3)
	E	96	0	0	0	0
	F	78	NT	10(12.8)	NT	21(26.9)
	Subtotal	334	0/96	30(9.0)	4/256(1.6)	23(6.9)
Chungnam	G	939	36/692(5.2)	58(6.2)	64(6.8)	126(13.4)
	H	389	NT	68(17.5)	60(15.4)	82(21.1)
	Subtotal	1,328	36/692(5.2)	126(9.5)	124(9.3)	208(15.7)
Jeonbug	I	183	7(3.8)	27(14.7)	39(21.3)	46(25.1)
	<J>	162	NT	18(11.1)	8(4.9)	5(3.1)
	Subtotal	345	7/183(3.8)	45(13.0)	47(13.6)	51(14.8)
Total	10	2,719	109/1,633(6.7)	205(7.5)	245/2,641(9.3)	363(13.4)

Table 2. Breed related incidence of paratuberculosis in cattle

Breed	No. of Farm	No. of cow	No. of reactors(%)			
			ID	AGID	CFT	ELISA
Dairy cow	4	801	7/279(2.5)	108(13.5)	101/723(14.0)	150(18.7)
Korean native cattle	4	1,706	102/1,354(7.5)	82(4.8)	132/1,677(7.9)	199(11.7)
Total	8	2,507	109/1,633(6.7)	190(7.6)	233/2,400(9.7)	349(13.9)

Table 3. Comparison of the reaction in CFT and AGID on positive or suspect reaction sera by the ELISA

ELISA reaction	No. of sera	AGID reaction		CFT reaction(%)		
		Positive	Negative	Positive (≥1:32)	Suspect (1:16)	Negative (≤1:8)
Positive	70	23 (32.8)	47 (67.2)	25 (35.7)	23 (32.9)	22 (31.4)
Suspect	92	32 (34.8)	60 (65.2)	13 (14.1)	35 (38.0)	44 (47.7)

황은 피내반응(ID)에서 1,633두중 109두(6.7%), 겔침 강반응(AGID)에서 2,719두중 206두(7.6%), 보체결합 반응(CFT)에서 2,641두중 245두(9.3%) 그리고 효소면역항체법(ELISA)에서는 2,719두중 363두(13.4%)가 양성반응을 나타내었다.

조사한 8개 목장중 7개 목장(87.5%)이 요네병 감염 우군으로 나타났으며 목장별 감염율도 진단법에 차이는 있었지만 무감염 우군에서부터 중감염 우군까지(ELISA:0-26.9%)다양하였으나, 지역별로는 6.9%의 경

기도를 제외하고는 강원, 충남, 전북이 11.4%-15.7%로써 큰 차이를 볼 수 없었다. 유우와 한우간의 발생률에서는 검사예수가 적은 유우의 ID반응을 제외하고는 AGID, CFT, ELISA에서 유우가 13.5, 14.0, 18.8%로 한우의 4.8, 7.9, 11.7%보다 높았다(표 1,2).

진단법간의 일치율 : ELISA에서 양성 및 의양성인 혈청에 대한 AGID와 CFT검사에서의 양성, 의양성 일치율을 비교한바 ELISA 양성 70예중 AGID에서 양성 이 23(32.8%), 음성이 47(67.2%)이었고 CFT에서는 양

성 또는 의양성이 48(68.6%) 음성 22(31.4%)였다.

ELISA의 양성 92예중 AGID에서 양성은 32(34.8%) 음성 60(65.2%)였으며, CFT에서는 양성 또는 의양성 48(52.3%) 음성 44(47.7%)였다(표 3).

고 찰

요네병의 정확한 면역학적 진단이 어려운 것은 개체별, 또는 감염균량에 따라 면역반응이 다른 것은 물론 감염시기에 따라라도 체액과 세포면역 반응이 다양하기 때문이다.

즉 조직내 세균수가 적고 염증반응이 왕성한 감염초기(tuberculoid stage)에는 피내반응등 주로 세포면역반응에 의해서만 진단이 가능하며, 중기(intermediate stage)이후에는 세포면역 반응이 감소하고 체액면역반응이 왕성하여 주로 혈청학적인 검사에 의해 검출할 수 있으며 말기(lepromatous stage)에는 자주 anergy phenomenon이 발생하는데 이때는 체액 및 세포면역 반응 모두가 불만족스러우며 특히 세포면역반응이 더 많은 억제 영향을 받는다. 따라서 면역학적인 방법으로 요네병을 진단할 경우에는 여러 가지 진단법으로 검사하는 것이 보다 정확한 진단을 할 수가 있다.^{3,15,20}

면역학적인 진단법의 민감성 및 특이성은 여러 학자들에 의하여 균분리율을 기준으로 비교연구된 바 있으며, 일반적으로 ELISA, CFT, AGID 및 피내반응순으로 진단효율의 우수함이 인정되고 있다.^{8-11,16,18,19,21}

본 연구에서 진단법별 감염상황을 요네에 의한 피내반응과 체액면역반응으로 AGID, CFT 및 ELISA에 의해서 조사한 바 ELISA가 가장 민감성이 우수하였으며 다음으로 CFT, AGID 및 피내반응 순으로서, 균분리율과의 비교 결과는 아니었지만 선인들과 유사한 경향의 결과를 얻었다.

국내처음으로 비교적 광범위한 지역의 소를 대상으로 조사한 요네병감염 조사에서 진단법별로 차이는 있었지만 전체적으로 10%내외의 양성율을 보였고 4개도 8개 대규모 목장중 7개 목장(87.5%)이 요네병 감염목장으로 나타났으며, 특히 2개도의 도축장에서의 임의 채취한 혈청에서도 적지 않은 양성율을 나타낸 것으로 보아 요네병이 전국적으로 발생하고 있는 것으로 추정되며 앞으로 이에 대한 방제대책연구가 시급한 것으로 사료된다.

축종별로는 한우보다 유우에서 발생율이 높았으며 이는 유우와 육우의 발생비교 조사에서 전반적으로 유우가 육우보다 많은 발생율을 나타내었다는 외국의 보고들과^{2,12} 유사한 양상으로서 젖소 목장에서 본 병의 예

방대책강구가 보다 절실한 것으로 생각된다.

본 연구에서 목장별, 진단법별로 발생율을 조사하는 중에 민감성이 가장 낮은 피내반응이 일부 목장에서는 가장 높은 민감성을 나타내는 경우가 있었다.

이것은 요네병 감염우군의 분포가 임상증상을 정점으로 준임상 감염우, 무증상감염우, 비감염우순으로 피라미드 양태를 나타내는 것이 일반적이므로 그 목장에 감염초기우가 집단적으로 있어 피내반응에 많이 검출되었다고 볼수는 없기 때문에 그 원인에 대하여는 역학적이나 면역학적 측면에서 앞으로 좀더 연구되어야 할 것이다.

가장 민감성이 높은 ELISA와 AGID, CFT 진단법과의 반응 일치율에서 CFT가 AGID보다는 ELISA와 양성, 의양성 일치율이 높았는데 이는 진단법의 민감성 차이에 기인하는 결과라고 할 수 있다. 그러나 ELISA와 CFT간의 일치율도 그리 높지는 않았는데 이는 ELISA 항체가 CFT항체가보다 2-4배 높게 검출되며¹⁰ CFT보다 조기에 민감성 있게 검출이 가능했기 때문에 감염중, 말기에 많이 발생하는 CF 항체 검출율보다 높으므로²² 진단 일치율에서 차이를 나타낸 것으로 여겨진다.

결 론

세포면역반응으로는 피내반응(ID), 체액면역반응으로는 겔침강반응(AGID), 보체결합반응(CFT) 및 효소면역항체법(ELISA)으로 4개도, 8개 목장, 2,719두의 한우 및 젖소에 대한 요네병 검사를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 진단법별 요네병 감염상황은 ID에서 1,633두 중 109두(6.7%), AGID에서 2,719두 중 205두(7.5%), CFT에서 2,641두 중 245두(9.3%) 그리고 ELISA에서 2,719두 중 363두(13.4%)가 양성으로 나타났다.

2. 조사한 8개 목장 중 7개 목장(87.5%)이 양성 우군으로 나타났으며 젖소가 한우보다 발생율이 높았다.

3. 혈청학적 진단법간의 반응 일치율은 ELISA양성 70예에 대해 AGID 양성은 23(32.8%), CFT 양성 또는 의양성이 48(68.6%)이었으며, ELISA 의양성 92예에 대해서는 AGID 양성 32(34.8%), CFT 양성 또는 의양성이 48(52.1%)이었다.

참 고 문 헌

1. Benedictus G, Dijkhuizen AA, Stelwagen J.

- Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec* 1987; 121(7):142.
2. Braun RK, Buergelt CD, Littell RC, et al. Use of an enzymelinked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. *JAVMA* 1990; 196(8):1251.
 3. Brooks BW, Young, NM, Watson, DC, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* antigen D : Characterization and evidence that it is a bacterioferritin. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29(8):1652.
 4. Buergelt CD, Duncan JR, Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *JAVMA* 1975; 173(5):478.
 5. Buergelt CD, Hall CE, Merkal RS, et al. Lymphocyte transformation : An aid in the diagnosis of paratuberculosis. *Am J Vet Res* 1992; 38(11):1709.
 6. Camphausen RT, Jones RL, Brennan RJ. A glycolipid antigen specific to *Mycobacterium paratuberculosis* : Structure and antigenicity. *Proc, Natl, Acad, Sci USA* 1985; 82:3068.
 7. Chiadini RJ, Van kruininggen HJ, Merkal R. Ruminant paratuberculosis(Johne's disease) : The current status and future prospects. *Reprinted from the Cornell Veterinarian* 1984; 74(2):219.
 8. Colgrove CS, Thoen CO, Blackburn BO, et al. Paratuberculosis in cattle : A comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Veterinary Microbiology* 1989; 19:183.
 9. Collins MT, Sockett DC, Ridge S, et al. Evaluation of a commercial enzymelinked immunosorbent assay for Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29(2):272.
 10. Jgensen JB, Jensen PT. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. *Acta Vet Scand* 1978; 19:310.
 11. Merkal RS, Paratuberculosis : Advances in cultural, serologic and vaccination methods. *JAVMA* 1984; 184(8):939.
 12. Merkal RS, Whipple DD, Sacks JM, et al. Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *JAVMA* 1987; 190(6):676.
 13. Milner AR, Lepper AWD, Symonds wN et al. Analysis by ELISA and western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with M. Phlei. *Research in Veterinary Science* 1987; 42: 140.
 14. Seitz SE, Heider LE, Hueston WD, et al. Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *JAVMA* 1989; 194(10):1423.
 15. Sherman DM, Markham RJF. Bates F. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *JAVMA* 1984; 185(2):179
 16. Sherman DM, Bray B, Gay JM, et al. Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *AM J Vet Res* 1989; 50(4):525.
 17. Sherman DM, Gay JM, Bouley DS, et al. Comparison of the complement fixation and agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis, *Am J Vet Res* 1990; 51(3):461.
 18. Thoen CO, Baum KH. Current knowledge on paratuberculosis. *JAVMA* 1988; 192(11):1609.
 19. Yokomizo Y, Merkal RS, Lyle PAS. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G₄ antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 1983; 44:2205.
 20. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A method for avoiding false-positive reaction in enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn J Vet Sci* 1985; 47(1):111.
 21. Yokomizo Y, Kishima M, Mori, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *J Vet Med Sci* 1991; 53(4):577.
 22. 尹用德. 소 요네병의 특성과 진단. 대한수의사회지 1986; 22(8):464.
 23. 李芳煥. 林鳳鎭. 河昶守 等 國內發生의 卞라 結核病(Johne's Disease)例에 대한 臨床病理學的 追跡調査報告. 大韓獸醫師會誌 1983; 19(2):8.
 24. 全允成. 李芳煥. 金鍾培 等 牛由來 Mycobactin 依存性 抗性細菌(*M.paratuberculosis*)의 分離同定. 大韓獸醫學會誌 1984; 24(1):58.