

강원지역 젖소의 요네병 감염실태

김두*, 전관준, 김종택, 신광순¹, 신명균², 장국현², 김정기², 김옥성², 정재영²
강원대학교 수의학과, ¹충남대학교 수의과대학, ²강원도 가축위생시험소*
(게재승인 : 2002년 1월 9일)

Prevalence of paratuberculosis of dairy cattle in Kangwon area

Doo Kim*, Kwan-joon Jeon, Jong-taek Kim, Kwang-soon Shin¹, Myung-kyun Shin²,
Guk-hyun Chang², Jeung-ki Kim², Och-sung Kim², Jae-young Jung²

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

²Kangwon Veterinary Service Laboratory

(Accepted : January 9, 2002)

Abstract : The purpose of this study was to conduct diagnosis of bovine paratuberculosis in Kangwon area. Blood samples were collected from 2,261 dairy cows of 162 herds, and the ELISA and immunoblotting using recombinant 34KDa protein of *M. paratuberculosis* were conducted. The feces collected from dairy cows were cultured on HEY medium with mycobactin-J and PCR was conducted with washing solution of medium 4 weeks after culture. The ELISA had sensitivity of 83.3% and specificity of 96.7%. And the immunoblotting had sensitivity of 83.3% and specificity of 100%. Of the 2,261 dairy cows, 371 cows(16.4%) were positive in ELISA and 75 cows(3.3%) were positive in immunoblotting. And of the 162 herds, 109 herds(67.3%) had an apparent paratuberculosis prevalence by ELISA and 40 herds(24.7%) by immunoblotting. The geographic distribution of herds with paratuberculosis was not uniform. Of the 241 feces samples including 110 feces from ELISA positive cow, 9 feces were positive in culture and PCR. PCR was able to detect the growth of *M. paratuberculosis* as early as 4 weeks of culture.

Key words : Bovine paratuberculosis, recombinant 34KDa protein, diagnosis, Kangwon area.

서 론

요네병은 1895년 Johne와 Frothingham에 의해 처음 확인되었으며, 원인균은 Twort와 Ingram에 의하여 1910년 처음 분리되었다^{1,2}. 요네병은 가축과 야생 반추류에서 장염, 설사와 쇠약이 특징인 만성 염증성 장관 증후군으로 원인체는 *Mycobacterium paratuberculosis*로서 매우 느리게 자라는 mycobactin 의존성 세균이다³. 요네병은 전 세계적으로 발생하고 있으며 감염된 우군의 손실액은 성우 1두 당 연간 75-100 달러로 추정된다고 보고되었다³. 요네병의 진단에는 조직학적 검사나 세균배양을 이용

한 원인체의 확인과 다양한 방법을 이용한 면역학적인 반응검사가 있으며, 1980년대에 새로운 진단적인 기술의 출현은 요네병 진단법에 대한 연구를 강화시켰다³. 새로운 기술로서 gene probe⁴, interferon- γ 검출을 기초로 한 세포면역활성 검사⁵, 분변의 세균학적 배양의 개량된 방법^{6,7}, IS900 gene을 확인하는 PCR^{8,9}과 ELISA 기법을 기초로 한 혈청학적인 검사¹⁰⁻¹³ 등을 들 수 있다. 그러나, 요네병은 한 가지 진단법으로 완벽하게 진단할 수 없기 때문에 임상증상, 역학적 상황, 세균분리와 혈청학적 진단을 종합하여 판단하여야만 보다 정확한 진단을 내릴 수 있다.

* Corresponding author : Dr. Doo Kim, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
E-mail : kimdoo@kangwon.ac.kr

국내에서는 이 등¹⁴이 강원도 대관령지역의 외국에서 수입된 소들에서 처음으로 임상형 요네병의 발생을 보고하여 국내에 요네병의 유입 가능성을 시사하였다. 그리고, 전 등¹⁵은 임상증상이 있는 Hereford 종의 유우로부터 요네병균을 분리하여 국내에 요네병 발생을 공식으로 확인하였다. 김 등¹⁶은 한우와 유우의 요네병을 면역학적인 방법으로 조사한 결과 상당히 높은 감염률(13.9%)을 보고함으로써 요네병에 대한 중요성을 부각시켰으며, Kim과 Park¹⁷은 요네병균의 특이적인 항원인 재조합 34KDa 단백질을 생산하여 요네병의 혈청학적인 진단에 활용 가능성을 보고하였다.

본 연구에서는 강원도 지역의 요네병 발생실태를 조사하기 위하여, 재조합 34KDa C-terminal 단백질을 항원으로 이용한 ELISA와 immunoblotting에 의한 혈청학적 진단방법, 분변의 세균학적 검사와 요네병균의 IS900 gene을 확인하는 PCR 기법을 확립하고 강원도 지역 젖소를 대상으로 요네병 진단을 실시하였다.

재료 및 방법

혈청과 분변

세균학적 검사에서 *M. paratuberculosis*가 배양되어 요네병으로 확진된 소 30두의 혈청과 요네병이 발병하지 않는 것으로 확인된 목장의 30두의 혈청을 미국의 Cornell 대학으로부터 제공받아 본 연구에서 확립한 ELISA와 immunoblotting의 민감도와 특이도의 측정에 사용하였다.

그리고, 강원도 지역 젖소의 요네병의 감염실태를 조사하기 위하여, 강원도 지역 162개 목장의 2,261두 젖소의 혈액을 채취하여 혈청학적인 진단에 사용하였으며, ELISA 양성우로 진단된 110두와 음성우로 진단된 131두의 혈액과 분변을 채취하여 분변의 세균 배양에 사용하였다.

항원

요네병의 혈청학적인 진단에는 요네병균의 특이적인 34KDa 단백질의 재조합 C-terminal 단백질(rC34P)을 사용하였으며 Kim과 Park¹⁷의 방법으로 순수분리하였다.

ELISA

ELISA는 Voller 등¹⁸의 방법에 의거하여 rC34P를 항원으로 사용하여 실시하였으며 ELISA reader(BIO-TEK Instrument Inc, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 각 plate에는 표준 양성과 음성 혈청을 포함시켰으며 각 혈청은 2반복으로 검사하였다. 각 혈청의 검사결과는

다음과 같은 공식에 의하여 ELISA value percentage (EV%)로서 표현하였다.

EV%=

$$\frac{\text{Mean OD test serum} - \text{Mean OD negative control serum}}{\text{Mean OD positive control serum} - \text{Mean OD negative control serum}}$$

ELISA에서 가장 높은 정확도를 얻을 수 있는 EV%를 구하기 위하여, 세균학적 검사에서 *M. paratuberculosis*가 배양되어 요네병으로 확진된 소의 30개 혈청과 요네병이 발병하지 않는 것으로 확인된 목장의 30두 소의 혈청에 대한 EV% 자료를 receiver operating characteristic (ROC) curve에 의하여 분석하였으며¹⁹, 이것에 의하여 양성과 음성 사이의 cutoff point를 EV% 50으로 설정하였다(Fig 1).

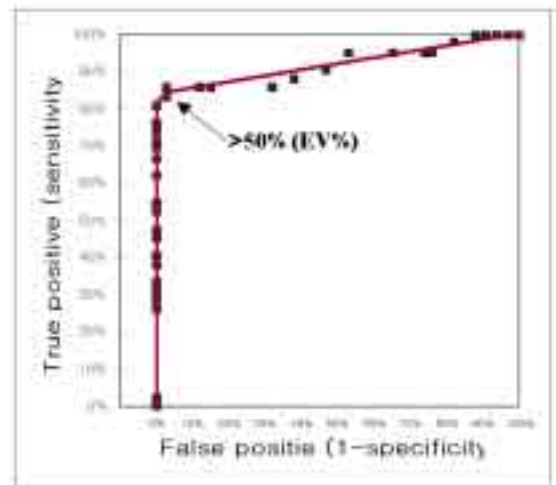


Fig 1. Receiver operating characteristic curve for results of an ELISA to determine paratuberculosis in cattle. Data represents results of testing blood samples from 30 paratuberculosis-positive cattle and 30 paratuberculosis-negative cattle. EV% = ELISA value percentage of the optical density of a positive control sample.

Immunoblotting analysis

rC34P를 항원으로 사용하여 Kim과 Park¹⁷이 사용한 방법으로 실시하였다.

분변 배양

직장에서 채취한 분변 2g을 원심분리용 튜브에서 35ml의 증류수와 혼합하고 상온에서 30분 정치시킨 후, 상청액 5ml를 채취하여 25ml의 0.9% hexadecylpyridium chloride(HPC)가 함유된 1/2 × brain heart infusion(BHI)

broth가 들어있는 50ml 원심분리용 tube에 섞어 주고, 35~37°C에서 18~24시간 동안 배양하였다. 10°C에서 3,000× g로 20분간 원심 분리한 후, 상청액을 제거하고, 1ml의 항생제 혼합액(BHI 1ml에 50µg amphotericin, 100 µg vancomycin과 100µg nalidixic acid 함유)으로 현탁시켜, 35~37°C에서 하루 밤 동안 배양하였다. 분변 배양액을 항생제(amphotericin, vancomycin, Nalidixic acid)와 mycobactin-J가 함유된 Herrold's egg yolk(HEY) medium 3 tube와 mycobactin-J가 함유되지 않은 HEY medium 1 tube에 각각 0.15ml씩 접종하여 37°C에서 배양하면서 1 주 간격으로 16주간 집락의 발육상태를 확인하였다.

PCR

HEY medium에 분변을 4주간 배양한 후에 배지표면을 면봉으로 채취하여 TEN buffer(50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 150mM NaCl(pH8.0))로 세번 세척하고 subtilisin(10mg/ml) 175µl로 37°C에서 2시간, lysozyme (10mg/ml) 250µl로 37°C에서 2시간, proteinase K(12.9mg/ml) 175µl와 10% SDS 75µl로 37°C에서 3시간 동안 차례로 소화시키고 RNase(20mg/ml) 5µl로 37°C에서 30분간 처리한 후 phenol과 chloroform으로 DNA를 추출하여 최종적으로 TE buffer(1M Tris pH8.0, 0.5M EDTA pH8.0)에 용해시켜 -20°C에 보존하였다. 요네병균의 IS900 gene을 검출하기 위하여, 네 가지의 200µM deoxynucleotide triphosphates(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100pM의 1쌍의 IS900 primer, 2 unit의 Vent[®] DNA polymerase, 10× PCR buffer(100 mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl(pH 8.8), 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100), template DNA와 멸균된 증류수를 혼합하여 100µl가 되도록 조정하였다. PCR 반응액은 Thermal Cycler 9600(Perkins Elmer Cetus, USA)을 이용하여, 94°C에서 10분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분간의 과정을 35회 반복하여 증폭시킨 후, 최종적으로 72°C에서 15분 동안 반응시켰다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide(10µg/ml) 용액으로 30분간 염색하여 UV- transilluminator에서 확인하였다.

결 과

강원지역의 요네병 발생 실태를 조사하기 위하여, 강원지역의 젖소에서 채취한 혈청과 분변을 대상으로 혈청학적 진단, 분변배양과 PCR을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

ELISA와 immunoblotting의 정확도

제조합 34KDa의 C-terminal 단백질(rC34P)을 항원으로 사용한 혈청학적 진단의 민감도와 특이도를 구하기 위하여, 요네병 표준 양성 혈청과 음성 혈청을 사용하여 구한 ROC curve로부터 가장 적합한 cutoff point로서 EV% = 50으로 결정하였다(Fig 1). 이 cutoff point에서 세균배양 양성 혈청 30개 중 25개 혈청이 rC34P를 항원으로 사용한 ELISA에서 양성을 보여 83.3%의 민감도를 나타내었다. 또한 세균배양 음성 혈청 30개 중 1개의 혈청이 양성반응을 보였으며 29개 혈청이 음성반응을 보여 96.7%의 특이도를 보였다(Table 1).

Table 1. Sensitivity and specificity of ELISA using rC34P

ELISA reaction	Culture positive sera*	Culture negative sera*
Positive	25 (83.3%)	1 (3.3%)
Negative	5 (16.7%)	29 (96.7%)
Total	30	30

* = All sera were reference sera obtained from Cornell University.

Immunoblotting의 정확도를 확인한 결과, rC34P를 항원으로 사용한 immunoblotting에서 30개 세균배양 양성 혈청 중 25개 혈청이 양성을 보여 83.3%의 민감도를 나타내었다. 또한 세균배양 음성 혈청 30개 중 30개 혈청 모두가 음성반응을 보여 100%의 특이도를 보였다(Table 2).

Table 2. Sensitivity and specificity of Immunoblotting using rC34P

Immunoblotting reaction	Culture positive sera*	Culture negative sera*
Positive	25 (83.3%)	0 (0%)
Negative	5 (16.7%)	30 (100%)
Total	30	30

* = All sera were reference sera obtained from Cornell University.

PCR의 민감도와 특이도

PCR의 특이성을 확인하기 위하여, 요네병 표준균주인 *M. paratuberculosis*(ATCC 19698)와 연세대학교에서 분양받은 *M. avium* 1414, *M. avium* 25, *M. bovis* AN5와 *M. bovis* R 4061-62의 5 strain에서 추출한 chromosomal DNA를 이용하여 PCR 방법으로 특이성을 조사한 결과 표준균주인 *M. paratuberculosis* (ATCC 19698)에서만 예측하였

던 229bp의 특이 band가 확인되었고, 다른 *Mycobacterium* 속에서는 증폭산물이 확인되지 않았다(Fig 2).

그리고 분변 중에 함유되어 있는 요네병균의 검출 가능한 PCR의 민감성을 조사하기 위하여 요네병균 표준균주인 *M. paratuberculosis*(ATCC 19698)의 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 과 10^0 개에서 chromosomal DNA를 추출하여 PCR을 실시한 결과 10^1 까지 229bp의 특이 band가 확인되었다(Fig 3).

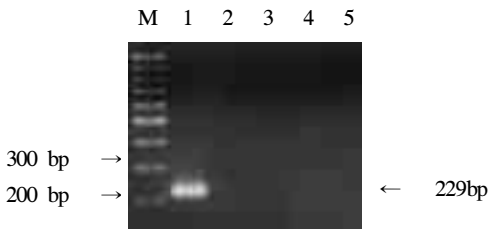


Fig 2. Amplification of IS900 gene of *M. paratuberculosis* by PCR. Lane M; DNA size standard (100 bp ladder, Biotools, Spain), Lane 1; *M. paratuberculosis* 19698, Lane 2; *M. avium* 25, Lane 3; *M. avium* 1414, Lane 4; *M. bovis* AN5, Lane 5; *M. bovis* R4061-62.

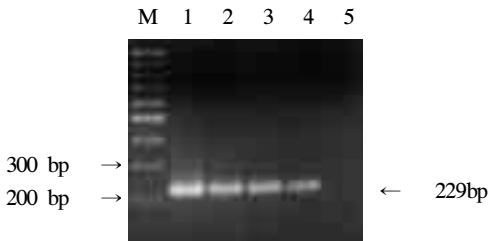


Fig 3. Sensitivity of the PCR for IS900 gene. Lane ; 1-5, serial 10-fold diluted *M. paratuberculosis*, 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , respectively were amplified with the IS900 primers. Lane M; DNA size standard (100 bp ladder, Biotools).

혈청학적 방법에 의한 강원도 지역의 요네병의 진단

rC34P를 항원으로 사용한 ELISA에서 총 2,261두의 혈청 중 372두의 혈청(16.4%)이 양성반응을 보였다. 그리고 rC34P를 항원으로 사용한 immunoblotting에서는 ELISA 양성반응을 보인 372두의 혈청 중 75두의 혈청에서 양성반응을 보여 총 2,261두 혈청의 3.3%에서 양성을 보였다(Table 3). 또한 요네병 혈청 양성우는 지역에 따라 양성률에서 다소 차이를 나타내어 본소 관할지역은 489두 중 64두(13.1%)가 ELISA 양성을 나타내는 가장 낮은 양성률을 보였으며, 중부지소 관할지역은 500 두 중 123두(24.3%)가 양성을 나타내어 가장 높은 양성률을

보였다. 동부지소 관할지역은 500두 중 68두(13.6%), 북부지소 관할지역은 266두 중 35두(13.2%), 남부지소 관할지역은 500두 중 81두(16.2%)가 ELISA 양성반응을 나타내었다. 그리고 immunoblotting에서 동부지소 관할지역은 500두 중 5두(1.0%)가 양성을 나타내어 가장 낮은 양성율을 보였으며, 중부지소 관할지역은 506두 중 25두(4.9%), 본소 관할지역은 489두 중 5두(1.0%), 북부지소 관할지역은 266두 중 6두(2.3%)가 양성반응을 나타내었다. 그리고 남부지소 관할지역은 500두 중 34두(6.8%)가 양성반응을 보여 가장 높은 양성율을 나타내었다(Table 3).

Table 3. District related incidence of paratuberculosis of dairy cows in Kangwon area

District	No. of Cows	No. of positive reactor(%)	
		ELISA	Immunoblotting
Headquarters	489	64(13.1)	5(1.0)
Central branch	506	123(24.3)	25(4.9)
Eastern branch	500	68(13.6)	5(1.0)
Southern branch	500	81(16.2)	34(6.8)
Northern branch	266	35(13.2)	6(2.3)
Total	2,261	372(16.4)	75(3.3)

ELISA에 의한 목장별 요네병의 감염률을 조사한 결과, 총 162개 목장 중 109개의 목장에서 1두 이상의 젖소가 양성우로 진단되어 67.3%의 양성률을 보였고, immunoblotting에 의한 요네병의 감염률 조사에서는 40개 목장에서 1두 이상의 양성우가 진단되어 24.7%의 양성률을 보였다(Table 4). 지역별 분포에 따른 ELISA의 목장별 양성률은 본소 관할지역이 51개 목장 중 29개 목장(56.9%), 중부지소 관할지역이 27개 목장 중 24개 목장(88.9%), 동부지소 관할지역이 25개 목장 중 18개 목장(72.0%), 북부지소 관할지역이 16개 목장 중 13개 목장(81.3%), 남부지소 관할지역이 43개 목장 중 25개 목장(58.1%)으로 양성을 나타내어 중부지소 관할지역의 목장이 가장 높은 양성률을 나타내었다. Immunoblotting에 의한 목장별 양성률은 본소 관할지역이 51개 목장 중 4개 목장(7.8%), 중부지소 관할지역이 27개 목장 중 11개의 목장(40.7%), 동부지소 관할지역이 25개 목장 중 4개 목장(16.0%), 북부지소 관할지역이 16개 목장 중 6개 목장(37.5%), 남부지소 관할지역이 43개 목장 중 15개 목장(34.9%)으로 양성을 나타내어 중부지소 관할지역의 목장이 가장 높은 양성률을 나타내었다.

ELISA에 의한 목장별 요네병 감염률을 162개 목장을 대상으로 조사한 결과, 53개 목장(32.7%)에서는 양성우

가 검출되지 않았으며 61개 목장에서는 0 - 20%의 ELISA 양성률을 보였다. 그리고 20% 이상의 요네병 양성률을 보이는 목장의 수는 점차 감소하였으며 1개의 목장에서는 검사한 젖소 모두에서 ELISA 양성을 나타내었다(Fig 4).

Table 4. District related incidence of paratuberculosis of dairy herds in Kangwon area

District	No. of herds	No. of positive reactor(%)	
		ELISA	Immunoblotting
Headquarters	51	29 (56.9)	4 (7.8)
Central branch	27	24 (88.9)	11 (40.7)
Eastern branch	25	18 (72.0)	4 (16.0)
Southern branch	43	25 (58.1)	15 (34.9)
Northern branch	16	13 (81.3)	6 (37.5)
Total	162	109 (67.3)	40 (24.7)

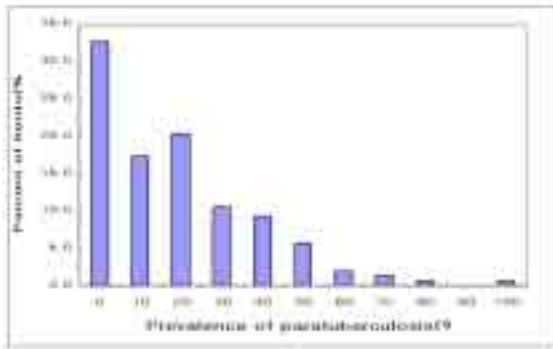


Fig 4. Histogram of the herd prevalence rates for paratuberculosis among 162 dairy herds in Kangwon area.

분변배양과 PCR에 의한 강원도 지역의 요네병의 진단

1) 분변의 배양법에 의한 요네병 감염우 진단

표준주인 *M paratuberculosis* 19698과 국내 분리 균주 3주를 사용한 배양 실험에서 배양 6주와 9주째에 세균의 증식이 확인되어 배양방법은 정상적인 것으로 확인되었다. 분변의 세균 배양을 위하여 강원도 지역의 총 2,261두의 젖소 중 ELISA 양성우 110두와 음성우 131두의 분변을 채취하여 배양한 결과 배양 12주째에 ELISA 양성우 분변 9개에서 요네병균의 배양이 확인되었으나 ELISA 음성우 분변에서는 요네병균의 증식이 확인되지 않았다(Table 5). ELISA 양성우 110두의 혈청 중 20두의 혈청이 immunoblotting 양성이었으며, immunoblotting 양성우 중 9두가 분변배양 양성이었다. 즉, immunoblotting

양성우 중 45%가 분변배양 결과 양성을 나타내었다.

2) PCR에 의한 요네병 감염우 진단

ELISA 양성우 110두와 ELISA 음성우 131두의 분변을 배양한 4주째에 배지표면을 채취하여 chromosomal DNA를 분리한 후 PCR을 실시한 결과 ELISA 양성우 분변 9개에서 PCR에 의한 IS900 gene의 증폭이 확인되었으나 ELISA 음성우 분변에서는 PCR 생산물이 확인되지 않았다(Table 5).

Table 5. Result of fecal culture and PCR of 110 feces collected from ELISA positive cows in Kangwon area

District	No. of cows	No. of positive reactor	
		Fecal culture	PCR
Headquarter	25	2	2
Central branch	12	2	2
Eastern branch	18	1	1
Southern branch	33	3	3
Northern branch	22	1	1
Total	110	9(8.2%)	9(8.2%)

고 찰

요네병 감염은 조직 내 세균수가 적지만 염증반응이 왕성한 감염초기(tubercloid stage)에 피내반응 등 주로 세포면역반응에 의해서 진단이 가능하며, 중기(intermediate stage) 이후에는 세포면역반응이 감소하지만 체액면역반응이 왕성하여 주로 혈청학적인 검사에 의해 검출할 수 있고, 말기(lepromatous stage)에는 자주 면역무반응상태가 되어 체액 및 세포면역반응 모두가 억제되며 특히 세포면역반응이 더 많은 억제를 받는다. 따라서 면역학적인 방법으로 요네병을 진단할 경우에는 다양한 진단법으로 검사하는 것이 보다 정확한 진단을 내릴 수 있다²⁰.

*M paratuberculosis*는 요네병 감염우의 혈청에서 그 항체가 흔히 확인되는 A36 major antigen complex를 함유하고 있다²¹. A36 complex 구성분의 하나인 34KDa 단백질은 요네병 감염우에서 주요 면역원성 물질로서 *M paratuberculosis*의 특이적인 B epitope이다²². 이 34KDa 단백질의 C-terminal은 세포표면에 노출되어있고, B epitope는 C-terminal 부분에 한정된다. 따라서 재조합 34KDa의 C-terminal 단백질(rC34P)은 요네병의 특이적인 혈청학적 검사에 사용될 수 있다고 보고되었다^{17,22}.

Collins 등²³은 요네병 흡착 enzyme immunoassay(EIA)

kit(Johne's Absorbed EIA[®], CSL Ltd, Australia)는 요네병에 대한 혈청학적 진단결과 99.0%의 특이도를 보여 역학적인 조사에 유용한 방법이라 보고하였다. Kesel 등²⁴은 재조합 34KDa 단백질용 요네병의 ELISA 분석에 이용한 결과 70%의 민감도와 95%의 특이도를 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서는 rC34P를 항원으로 사용한 ELISA를 실시한 결과 분변배양 양성우에 대하여 83.3%의 민감도와 96.7%의 특이도를 나타내었고 immunoblotting에서는 분변배양 양성우에 대하여 83.3%의 민감도와 100%의 특이도를 나타내었다. 그러므로 본 연구에서 개발한 rC34P를 항원으로 사용한 immunoblotting은 비특이적인 양성반응 없이 요네병균을 배설하는 소의 83.3% 검출해낼 수 있어 ELISA의 비특이적인 양성반응을 제거할 수 있는 방법으로 판단되었으며, 목장에서 도태가 필요한 요네병 양성우 선발에 적합한 검사법으로 판단되었다. 이상의 면역학적인 검사 결과에 따라 요네병에 이환된 목장과 개체를 ELISA에 의하여 screening하고 immunoblotting 양성우를 대상으로 세균배양을 실시한다면 도태의 대상이 되는 요네병균을 배설하는 소를 경제적이고 효과적으로 확인할 수 있을 것으로 생각되었다.

Thoen과 Baum²⁵은 미국에서 5-20%의 소가 요네병에 감염된 것으로 추정하였으며 Florida의 4,500두의 혈청을 ELISA를 이용하여 검사한 결과, 유우의 17.1%와 육우의 8.6%가 양성반응을 나타내었다고 보고하였다. 그리고 Collins 등¹⁹은 미국 Wisconsin 지역의 158개 젖소 목장 4,990두를 ELISA를 이용한 검사에서 50%의 목장에서 1두 이상이 요네병 양성반응을 보였고 7.29%의 소가 양성반응을 나타내었다고 보고하였다. Johnson과 Kaneene²⁶는 미국 Michigan 주의 121개 목장의 3,886두를 ELISA kit(IDEXX Laboratories Inc, USA)를 이용하여 검사한 결과 80개의 목장에서 1두 이상의 양성우가 진단되었고, 총 267두가 양성우로 진단되어 6.9%의 발생률을 나타내었다고 보고하였다. 국내에서 김 등¹⁶은 강원, 경기, 충남, 전북지역의 2,719두를 ELISA로 검사한 결과 363두(13.4%)가 양성반응을 나타내었고, 지역별로는 강원, 충남, 전북이 11.4%-15.7%로서 큰 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 rC34P를 사용한 ELISA에서 총 2,261두 중 372두(16.4%)가 양성반응을 보여 기존에 국내에서 조사연구된 결과와 비슷한 감염률은 나타내었다. 그리고 rC34P를 항원으로 사용한 immunoblotting에서는 ELISA 양성반응을 보인 총 372개의 혈청 중 75개의 혈청에서 양성반응을 보였으며 immunoblotting 양성우는 분변에서 요네병균이 검출될 가능성이 높아 이들 75두의 젖소에서는 분변검사서 세균이 검출될 것

으로 예측되었다. 또한 요네병 혈청 양성우는 지역에 따라 양성률이 다소 차이를 나타내고 있어 중부지소 지역의 양성률은 24.3%로 가장 높게 나타났다. 중부지소 관찰지역에서 높은 항체 양성률을 보인 것은 이 지역이 국내에서 요네병이 가장 먼저 발생하여¹⁴, 지역 내에 장기간에 걸쳐 요네병의 전파가 이루어진 때문으로 생각되었다.

김 등¹⁶은 국내 8개의 목장을 조사한 결과 7개의 목장(87.5%)이 요네병 감염우군이었고, 목장별 감염율은 진단법에 따라 차이가 있었지만 무감염 우군에서부터 중감염우군까지 다양하였다고 보고하였다. 본 연구에서 우군별로 ELISA에 의한 요네병의 감염률을 조사한 결과 총 162개 목장 중 109개의 목장에서 1두 이상의 젖소가 양성우로 진단되어 67.3%의 양성률을 보였다. 그리고 immunoblotting에 의한 요네병의 감염률 조사에서는 40개 목장에서 양성우가 진단되어 24.7%의 목장에서 요네병균을 배설하는 젖소를 보유하고 있는 것으로 추정되었다. 한편 김 등²⁷은 경기도, 강원도, 충청도 일대의 소에서 ELISA를 실시한 결과 총 577두 중 63두(10.9%)가 양성반응을 보였고, 이 중 9두가 분변배양과 PCR에서 양성이었음을 보고하였다. 본 연구에서 분변의 세균 배양을 위하여 ELISA 양성우 110두와 음성우 131두의 변을 배양한 결과 배양 12주째에 ELISA 양성우 변 9개에서 요네병균의 배양이 확인되었으나 ELISA 음성우 변에서는 요네병균의 증식이 확인되지 않았다. 변을 배양한 4주 째에 PCR을 실시한 결과 ELISA 양성이면서 균 배양 12주 째에 균배양이 확인된 소의 변 9개에서 PCR에 의하여 IS900 gene의 증폭이 확인되었다. 이상의 결과는 분변배양 초기에 PCR을 실시함으로써 12주 이상이 소요되는 진단기간을 단축시킬 수 있는 장점으로 확인되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 immunoblotting 양성으로서 분변으로 요네병균을 배출할 것으로 예측되는 소는 낮은 수준(3.3%)이었으나, ELISA 양성반응을 보여 요네병 감염초기인 잠복기에 해당하는 젖소는 상당히 높은 수준(16.4%)이었다. 이들 소는 신체의 방어력이 저하되거나 연령이 증가하게 되면 변으로 요네병균을 배출할 것으로 예상되어 요네병에 대한 적절한 관리대책이 강구되어야 할 것으로 생각되었다.

결 론

재조합 34KDa의 C-terminal 단백질을 항원으로 이용한 혈청학적 진단, 분변의 배양, 요네병균의 특이적인 IS900 gene을 확인하는 PCR 기법으로 강원도 지역의

162개 목장 2,261두의 젖소를 대상으로 요네병의 발생 실태를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 연구에서 확립한 ELISA는 83.3%의 민감도와 96.7%의 특이도를 나타내었고, immunoblotting은 83.3%의 민감도와 100%의 특이도를 나타내었다.

2. 강원도 지역의 총 2,261두의 젖소 중 372(16.4%)두가 ELISA 양성을 보였으며, 75두(3.3%)가 immunoblotting 양성을 나타내었다.

3. 총 162개 목장 중 67.3%의 목장에서 1두 이상의 요네병 양성우가 ELISA에 의하여 검출되었으며 24.7%의 목장에서 immunoblotting 양성우가 검출되었다. 요네병에 감염된 우군의 지역적인 분포는 다소 차이를 나타내었다.

4. ELISA 양성우 110두의 분변과 음성우 131두의 분변을 배양한 결과 ELISA 양성우 9두가 분변배양 양성이었다, 배양 4주 후에 PCR을 실시한 결과 9두 모두 조기 검출 가능하였고, ELISA 음성우 분변은 분변배양과 PCR에 음성이었다.

참고문헌

- Johne HA, Frothingham L. Ein eigenthuemlicher fall von tuberkulose beim rind. *Tiermed Path*, 27: 438-454, 1895.
- Twort FW, Ingram WD. A method for isolating and cultivating *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johnei* and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovis. *Proc Soc Lond*, 84: 517-543, 1912.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Van Merkel RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's Disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet*, 74: 218-262, 1984.
- Vary PH, Andersen PR, Green E, et al. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's Disease. *J Clin Microbiol*, 28: 933-937, 1990.
- Billman-Jacobe H, Carrigan M, Cockram F, et al. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J*, 69: 25-28, 1992.
- Collins MT, Gabric DM, de Lisle GW. Identification of two group of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol*, 28: 1591-1596, 1990.
- Whipple DL, Callihan DR, Jamagin JL. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J Vet Diagn Invest*, 3: 368-373, 1991.
- Colston A, McConnell I, Bujdoso R. Cloning and expression in *Escherichia coli* of DNA encoding a 60 kDa stress protein of *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease. *Microbiology*, 140: 3329-3336, 1994.
- el-Zaatari FA, Naser SA, Engstrand L, et al. Identification and characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant proteins expressed in *E coli*. *Curr Microbiol*, 29:177-184, 1994.
- Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn J Vet Sci*, 47: 111-119, 1985.
- Milner AR, Lepper AW, 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*. *Res Vet Sci*, 42: 140-144, 1987.
- Tsai SJ, Hutchinson LJ, Zarkower A. Comparison of a dot immunobinding assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunodiffusion for serodiagnosis of paratuberculosis. *Can J Vet Res*, 53: 405-410, 1989.
- Cox JC, Drane DP, Jones SL, et al. Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J*, 68: 157-160, 1991.
- 이방환, 임봉호, 하영시 등. 국내발생의 소 파라결핵병 예에 대한 임상병리학적 추적조사 보고. 대한수의사회지 19: 8-20, 1983.
- 전윤성, 이방환, 김중배 등. 소 유래 Mycobactin 의존성 항산성균의 분리동정. 대한수의학회지, 24: 53-63, 1984.
- 김중만, 안중삼, 우승룡 등. 면역학적인 방법에 의한 한우와 유우의 요네병 발생조사. 대한수의학회지, 34: 93-97, 1994.
- Kim D, Park HW. Expression of the C-terminal of 34KDa protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Korean J Vet Res*, 40: 86-93, 2000.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. The enzyme-linked

- immunosorbent assay (ELISA). Diagnostic Laboratories, Alexandria, Va, 1983.
19. Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ, *et al.* Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *JAVMA*, 204: 636-641, 1994.
 20. Collins MT. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12:357-371, 1996.
 21. De Kesel M, Gilot P, Coene M, *et al.* Composition and immunological properties of the protein fraction of A36, a major antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Scand J Immunol*, 36: 201-212, 1992.
 22. Gilot P, De Kesel M, Machtelinckx L, *et al.* Isolation and sequencing of the gene coding for an antigenic 34-kilodalton protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Bacteriol*, 175: 4930-4935, 1993.
 23. Collins MT, Sockett DC, Ridge S, *et al.* Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J Clin Microbiol*, 29: 272-276, 1991.
 24. De Kesel M, Gilot P, Misonne MC, *et al.* Cloning and expression of portions of the 34-kilodalton protein gene of *Mycobacterium paratuberculosis*: its application to serological analysis of Johne's disease. *J Clin Microbiol*, 31: 947-954, 1993.
 25. Thoen CO, Baum KH. Current knowledge on paratuberculosis. *JAVMA*, 192: 1609-1611, 1988.
 26. Johnson-Ifearulundu Y, Kaneene JB. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am J Vet Res*, 60: 589-596, 1999.
 27. 김태중, 김윤식, 김재천 등. 분자생물학과 면역학적 방법에 의한 소 요네병 진단의 연구. *대한수의학회지* 37: 349-358, 1997.