

< Original Article >

경남 중부지역 도축장 출하우의 요네병 감염실태 조사

손병국* · 석주명 · 장은희 · 지대해 · 신정섭 · 황보원

경상남도축산진흥연구소 중부지소

Prevalence of Johne's disease from slaughtered cattle in central area of Gyeongnam province, Korea

Byeong-Guk Son*, Ju-Myoung Seok, Eun-Hee Jang, Dae-Hae Ji,
Jeong-Seop Shin, Bo-Won Hwang

Central Branch of Gyeongnam Livestock Veterinary Promotion Research Institute, Gimhae 621-833, Korea

(Received 28 September 2012; revised 14 February 2013; accepted 19 March 2013)

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is the pathogen of paratuberculosis called Johne's disease. Johne's disease is hardly eliminated because of its long latent period and continuous dissemination, so it is found in ruminants worldwide and can cause substantial economic losses in cattle. It has been reported in many studies on the distribution of Johne's disease in some provinces of Korea that not many, but noticeable numbers of infected cows have been detected since the first detection in 1984. The aims of this study was to investigate the prevalence of Johne's disease obtained from slaughtered cattle in central area of Gyeongnam province, Korea. In this study, the ELISA serum antibody test and PCR were employed on a total of 240 blood and ileac substrate samples from slaughtered cattle in two slaughtering and wholesale centers in Gyeongsangnam-do Livestock Veterinary Research Institute Central Branch. Out of the entire 240 blood samples, three (1.3%) were positive by ELISA, while five (2.1%) were suspected cattle. But ileac substrate samples, eight (3.3%) were positive by PCR. By breeds, positive rates of ELISA and PCR in Korean native cattle were 1.3% and 3.5%, respectively, but no positive cows were found in dairy cattle. By provinces, sero-positive rates of Gyeongnam and Gyeongbuk were 1.6% and 1.3%, respectively. And PCR positive rates of Gyeongnam, Gyeongbuk and other provinces were 2.4%, 5.0% and 2.8%, respectively. These results indicate that it requires the nationwide monitoring test and measure to deal with subclinically infected slaughtering cows.

Key words : Johne's disease, Cattle, ELISA, PCR

서 론

요네병(Johne's disease; Paratuberculosis)은 소, 양, 사슴 등 반추수 및 돼지에서 만성적인 장염을 일으키는 만성소모성 질병이다(McFadden 등, 1987; Timoney 등, 1988). 요네병의 원인체인 *Mycobacterium (M.) avium* subsp. *paratuberculosis*는 동물 체내에 감염되어 주로

장벽과 장관막 림프절에 들어가 세포면역을 일으켜 과민반응을 유도하고 장관으로 단백질 혈장성분이 유출되어 만성 소모성 상태가 지속되어, 지속적인 설사가 일어나고 결국 영양분 흡수 억제로 인해 폐사하게 된다. 또한, 요네병에 감염된 개체는 뚜렷한 임상 증상 없이 오랜 잠복기와 함께 진행되면서 병원체를 지속적으로 배출하여 강력한 방역대책 없이는 근절이 어려운 실정이므로, 미국, 유럽에서는 소 전염병 중 가장 막대한 경제적 피해를 주는 만성 질병 중 하

*Corresponding author: Byeong-Guk Son, Tel. +82-55-254-3213,
Fax. +82-55-254-3229, E-mail. bgs123@korea.kr

나로 규정짓고 있다(VanLeeuwen 등, 2006; Lee 등, 2009).

국내에서는 Jeon 등(1984)이 젖소에서 요네병 원인 균을 분리하여 국내 요네병의 발생을 공식 확인하였다. 현재 요네병은 우리나라에서 가축전염병예방법에서 제2종 가축전염병으로 규정하고 있으며, 당대·후대검정 및 육종농가 검진 등 농가에서 신청하는 방식으로 혈청 검사가 이루어지고 있다. 그러나 가축전염병예방법의 살처분 대상 전염병이 아니므로 양성으로 판정된 가축은 도태 처리를 하며, 그나마도 전신 증상이 있으면 축산물위생관리법상 도축이 되지 않고 또한, 임상 증상이 발현되지 않는 무증상우에 대한 국내 모니터링 검사에 대한 보고가 거의 없어 방역 상의 허점이 있다(Lee 등, 2009).

요네병은 혈청학적 진단법으로 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), complement fixation test (CF), agar gel immunodiffusion test, crossed immunoelectrophoresis, radioimmunoassay, immunoperoxidase 법이 있다(Timoney 등, 1988). 전형적인 임상증상이 나타나는 경우 임상적인 수준에서 확정적 진단을 할 수 있고(Jeon 등, 2009), 감염 초기에는 요닌 진단법과 같은 세포면역 반응에 의해서 진단이 가능하며, 이후에는 보체결합반응, ELISA 등 혈청반응에 의해 진단한다. ELISA를 이용한 혈청학적 검사방법은 요네병균의 혈청항체에 대한 가장 민감하고 특이성이 높은 시험법으로 알려졌다(Tsai 등, 1989; Cox 등, 1991).

또한, 분변 또는 병변 조직을 배양하여 균을 분리 동정하는 방법도 있으며 요네병균 유전자 중 특이적인 primer (IS900)를 이용하여 중합효소연쇄반응을 통해 분변에서 신속하고 높은 민감도로 요네병균을 검출하는 방법도 있다(Colston 등, 1994; Timoney 등, 1988). 또한, 개체의 혈액을 PPD (Purified protein derivative) 항원으로 자극시켜 분비되는 interferon- γ 의 양의 측정을 통한 진단법이 있다(Billman-Jacobe 등, 1992).

이번 연구에서는 도축을 통해 생산되는 축산물의 안전성을 높이고 축산물작업자의 위생적인 관리방안을 모색하며 농가피해 최소화, 방역지도자료, 질병예방을 위한 기초자료로 활용하기 위해, 관내 도축장 2 개소에 출하되는 소에 대하여 무작위로 개체를 선정하여 ELISA법을 이용하여 요네병 항체 양성율을 조사하였고, 축산물 검사 시 회장 내 내용물을 임의로 채취하여 PCR (Polymerase chain reaction)을 통해 요네병균의 감염여부를 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료

경남 축산진흥연구소 중부지소 관할 도축장 출하 우의 요네병 감염 실태를 조사하기 위하여 2011년 10월부터 12월까지 총 240두(한우 90농가 228두, 젖소 7농가 12두)를 무작위로 선정하였다. 먼저 혈청을 채취하고 검사 전까지 -20°C 냉동보관한 후 항체검사를 실시하였고, 대상 소의 회장 내 내용물을 멸균된 면봉으로 채취하여 항원검사용 시료로 사용하였다.

ELISA 검사

ID Screen Paratuberculosis Indirect ELISA Kit (ID.Vet sarl[®], France)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 검사를 실시하였다.

DNA 추출 및 PCR 검사

회장 내 내용물을 PBS로 10배 희석한 다음 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액 300 μl 를 취하여 G-Spin DNA extraction kit (iNtRON, Korea)를 사용하여 DNA 추출을 제조사의 술식에 따라 수행하였다. DNA를 추출하였고 Maxime PCR Premix kit (iNtRON, Korea)를 사용하여 PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer는 Vary 등(1990)이 사용한 것으로, *M. paratuberculosis*에 특이적으로 존재하는 IS900 유전자를 증폭시키는 forward primer IS900/150C (5'-CCGCTAATT GA GA GATGCGA TTGG-3')와 reverse primer IS900/921 (5'-AATT CAACTCCAGCAGC GCGGCCTCG-3')를 사용하였다. PCR 반응은 94°C 30초, 60°C 30초, 그리고 72°C 30초씩 34회 반복 반응시킨 후 최종 72°C 에서 10분간 반응시켰다. PCR이 끝난 후 증폭된 유전자 부위의 확인을 위해 Ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose (Sigma, USA)에 반응이 끝난 시료를 각각 12 μl 씩 취하여 한천 사이에 점적하고 100 V, 30분간 전기영동을 실시하였다. 자외선 조사하에서 특정 위치의 DNA band를 확인하여 사진 촬영을 하였다. Molecular size marker는 1 kb DNA ladder (Bioneer, Korea)를 사용하였다.

결 과 고 찰

축종별 양성율

경남 축산진흥연구소중부지소 관할 도축장 2개소에서 채취한 소 240두의 혈청 및 회장 내용물 시료에 대해 ELISA 및 PCR을 실시한 결과는 Table 1과 같았다. ELISA 검사결과 한우 농가 90호 중 3호(3.3%)가 양성 반응을 나타내었고, 개체별로는 228두 중 3두(1.3%)가 양성을 보였다. 젖소 농장은 7농가 12두에 대한 검사 결과 양성 반응이 나타난 농가는 없으나, 1농가 1두에서 의양성 반응을 보였다. 또한, 회장 내용물에 대한 PCR 검사 결과 8농가(8.2%) 8두(3.3%)가 양성으로 판정되었으며, 모두 한우에서 확인되었다(Fig. 1).

연령별 양성율

경남 축산진흥연구소중부지소 관할 연령별 요네병 양성율은 Table 2와 같았다. 연령별로 ELISA 검사에서 2세(2두), 3세(1두)에서 양성으로 판정되었고, PCR 검사결과 2세(3두), 3세(2두), 4세(1두) 및 연령이 많은 14세(1두)와 16세(1두)에서 양성우가 확인되었다. ELISA 검사에서 양성인 2세(2두)와 3세(1두)인 개체는 PCR 검사결과 양성으로 판정되었다.

지역별 양성율

지역별 요네병 ELISA 및 PCR 양성율은 Table 3과 같았다. PCR 검사에서 경상북도에서 출하된 소가 4두로 가장 많았고, 경상남도에서 3두, 울산광역시에서 1두가 양성이었다. 경상남도에서는 고성, 김해, 하동에서 각각 1두씩 양성으로 판정되었다.

한우와 젖소에서 만성소모성 질환을 일으키는 요네병은 소, 돼지, 사슴, 양에서 지속적인 장염을 일으켜, 만성 설사, 쇠약, 증체율 감소 등을 유발한다. 그러나 뚜렷한 임상증상 없이 잠복기가 길고 병원체가 지속적으로 분변을 통해 배출 되어 근절과 치료가 어렵기 때문에 농가에 피해를 유발하는 질병이다. 그 결과 일부 국가에서는 결핵병, 네오스포라병, 소류코시스, 바이러스성 설사병과 함께 요네병을 젖소의 생산성과 잠재적 경제손실에 관련된 위험 질병으로 지정하여 근절을 위한 지속적인 노력을 하고 있는 실정이다(Van Leeuwen 등, 2006).

미국의 Thoen과 Baum (1988)은 5~20%의 소가 요네병에 감염된 것으로 추정하였고, 플로리다 주 소 4,500두의 혈청을 ELISA로 검사한 결과, 젖소의 17.1% 및 육우의 8.6%가 양성반응을 나타내었다고 보고하였다(Thoen과 Baum, 1988). 그리고 미국의 Collins 등 (1994)은 위스콘신 주 158개 젖소 목장 4,990두의 혈청을 대상으로 한 ELISA를 이용한 검사에서, 전체 목장의 50%에서 최소 1두 이상이 요네병 양성반응을 보였고 전체 소의 7.29%가 양성반응을 보였다고 보

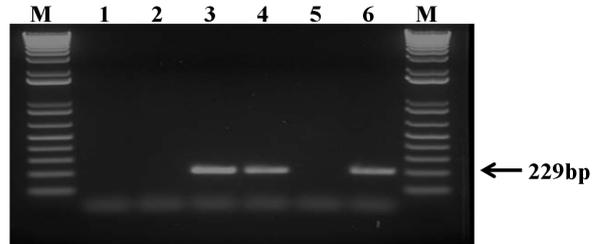


Fig. 1. PCR results for the detection of *M. paratuberculosis* in ileac substrate samples. Lane M : 1kb DNA ladder; lane 1 to 4: sample, Lane 5: negative control, Lane 6: positive control.

Table 1. The positive rate of *M. paratuberculosis* of Korean native cattle and dairy cattle by ELISA and PCR

Breed	Group	No. of tested samples	ELISA test		PCR test
			No. of positive (%)	No. of suspected (%)	No. of positive (%)
Korean native cattle	Farms	90	3 (3.3)	4 (4.4)	8 (8.9)
	Heads	228	3 (1.3)	4 (1.8)	8 (3.5)
Dairy cattle	Farms	7	0 (0)	1 (14.3)	0
	Heads	12	0 (0)	1 (8.3)	0
Total	Farms	97	3 (3.1)	5 (5.2)	8 (8.2)
	Heads	240	3 (1.3)	5 (2.1)	8 (3.3)

Table 2. The positive rate of *M. paratuberculosis* by ELISA and PCR according to age

Age (year)	No. of tested samples	ELISA test		PCR test
		No. of positive (%)	No. of suspected (%)	No. of positive (%)
1	2	0	0	0
2	91	2 (2.2)	2 (2.2)	3 (3.3)
3	56	1 (1.8)	0	2 (3.6)
4	30	0	1 (3.3)	1 (3.3)
5~6	33	0	0	0
7	11	0	1 (9.1)	0
8~10	7	0	0	0
11	3	0	1 (33.3)	0
12~13	4	0	0	0
14	1	0	0	1 (100)
15	1	0	0	0
16	1	0	0	1 (100)
Total	240	3 (3.1)	5 (5.2)	8 (8.2)

Table 3. The positive rate of *M. paratuberculosis* according to provinces

Province	Group	No. of tested samples	ELISA test		PCR test
			No. of positive (%)	No. of suspected (%)	No. of positive (%)
Gyeongnam	Farms	49	2 (4.1)	3 (6.1)	3 (6.1)
	Heads	124	2 (1.6)	3 (2.4)	3 (2.4)
Gyeongbuk	Farms	36	1 (2.8)	0	4 (11.1)
	Heads	80	1 (1.3)	0	4 (5.0)
Other provinces*	Farms	12	0	2 (16.7)	1 (8.3)
	Heads	36	0	2 (5.6)	1 (2.8)
Total	Farms	97	3 (3.1)	5 (5.2)	8 (8.2)
	Heads	240	3 (1.3)	5 (2.1)	8 (3.3)

*Daegu, Ulsan, Jeonnam, Jeonbuk, Chungnam, Chungbuk.

고하였다. Johnson-Ifearulundu와 Kaneene (1999)는 미시간 주의 121개 목장 2,886두를 ELISA로 검사한 결과 80개 목장에서 1두 이상의 양성우가 진단되었고, 총 267두(6.9%)가 양성반응을 나타내었다고 보고하였다.

국내에서 Kim 등(1994)은 강원, 경기, 충남, 전북 지역의 소 2,719두를 대상으로 혈청 ELISA 검사를 한 결과, 363두(13.4%)에서 양성반응을 나타내었고 지역별로는 11.4~15.7%로 큰 차이를 보이지는 않았다고 보고하였다. 또한, 2002년에는 Kim 등(2002)이 강원 지역 젖소 2,261두의 혈청을 ELISA 검사하였으며 372두(16.4%)가 양성으로 진단되었다고 보고하였다.

또한, 2007년에는 울산 지역의 젖소를 대상으로 ELISA 검사를 실시하였으며, 총 452두 중 24두(5.3%)가 양성반응을 나타내었다고 보고하였고, Jeon 등(2009)이 충남 서산·태안지역 젖소 착유 농가를 대상

으로 MRT용 집합유에 대한 요네병 ELISA 검사 결과 총 254건 중 13건(5%)에서 양성반응이 나타났다고 보고하였고, Lee 등(2009)은 경북 동부지역 젖소 363두 중 25두(6.9%), 한우 189두 중 19두(6.8%)가 ELISA 양성반응을 나타내었다고 보고하였다.

2000년대 이후로도 요네병은 지속적으로 발생하였으며, 2011년까지 전국적으로 607건 1,560두가 발생하였다. 연도별로는 2000년에 1건 5두, 2001년에 1건 2두, 2002년 6건 45두, 2003년 10건 39두, 2004년 28건 73두, 2005년 30건 69두, 2006년 20건 122두, 2007년 26건 53두, 2008년 48건 90두, 2009년 111건 277두, 2010년 168건 432두가 발생하는 등 최근 4년간 증가 추세에 있다.

도축장 출하우를 대상으로 한 이번 조사에서는 ELISA 검사 결과 총 240두 중 3두에서 양성반응을 보였으며, 양성율은 1.3%였다. 그리고 회장내용물을 이용한 PCR 검사에서는 8두(3.3%)가 양성반응을 보

였다. 국내의 경우 1994년부터 2009년까지 사육소의 혈청 및 우유를 대상으로 한 연구에서 ELISA 양성율이 5~13.4%로 이번 조사에서의 양성율 1.3%보다 높은 양성율을 나타내었다. 이는 이번 조사가 기존의 연구와 달리 특정지역에 한정되지 않고 8개도 30개 시·군의 도축장 출하우에 대해 모니터링 검사를 실시하였고, 기존 연구에서 사용한 ELISA 키트와 다른 상용화된 제품을 사용하여 특이도에 차이가 있는 것으로 생각한다.

이번 조사에서 ELISA 양성개체는 2세가 2두, 3세가 1두인 반면 PCR 검사에서는 2세 3두, 3세 2두, 4세가 1두, 14세 1두, 16세 1두가 양성으로 확인되었다. 요네병은 흔히 3-5세에서 흔히 농장에서 발견되며, 이 질병은 잠복기가 긴 특징을 가지고 있다(Timoney 등, 1988). *M. paratuberculosis*의 탐식세포 내 생존이나 증식 및 발병기전은 완전하게 규명되지 않았다(Woo와 Cruprynski, 2008). ELISA 항체검사방법은 감염 초기의 진단이 어려우며, 회장내 내용물을 이용한 PCR 검사에서는 감염초기의 진단이 가능하여 양성개체가 더 많이 색출된 것으로 보여지며, 향후 요네병의 진단법에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

경남 축산진흥연구소중부지소 관할 도축장은 2개소가 있으며, 2011년 12월말 기준으로 소 104,914두, 돼지 687,727두를 도축하여 경남지역을 비롯해 인근 부산·울산 지역 등 전국적으로 축산물을 공급하고 있다. 도축의뢰두수는 경남지역이 가장 많고, 지리적으로 인접한 경북지역의 축산농가에서 경남 다음으로 많이 의뢰하고 있으며, 제주도에서 충청남·북도까지 전국적으로 이들 도축장을 이용하고 있다. 전국적으로 인지도가 높은 관계로 2011년 12월말 경남지역 전체 도축장 9개소의 소 도축두수 118,757두 중 88% (104,914두)를 도축하여 축산물을 공급하는 등 경남도민 등 전국적으로 안전한 축산물 공급을 위한 중추적인 역할을 하였다. 그러나 전국 각지의 농가에서 도축 의뢰를 하고 있어 가축·차량·사람의 이동을 통한 가축전염병의 도내 유입이 우려되고 있다. 요네병과 같은 가축전염병을 보유한 가축으로부터 도축장 종사자 등 사람에게 전파될 수 있는 위험성을 배제할 수 없는 상황이다. 특히 이번 조사에서 보고되었듯이, 도축장 출하우에서 요네병 항체검사에서 양성 반응이 나타나고 있으며, 비임상형 요네병이 도내에서도 발생하고 있는 것으로 보이기 때문에, 도축장 출하우에 대한 검색을 강화하고, 비임상형 요네병 발생농장

을 파악하여 농장 사육소에 대한 추적검사를 통한 질병발생 실태를 파악하여, 도태를 유도하는 방역대책이 필요할 것으로 생각한다.

결 론

2011년 9월부터 12월까지 경남 중부지역의 도축장 출하우 97농가 240두에 대하여 요네병 감염실태를 조사하였다. ELISA검사결과 5두(2.1%)가 의양성, 3두(1.3%)가 양성반응을 나타내었고, PCR 검사에서는 8두(3.3%)가 양성이었다. 품종별로 한우에서 ELSA와 PCR 검사결과 3두(1.3%), 8두(3.5%)가 양성으로 나타난 반면 젖소에서는 모두 음성이었다. 지역별로 ELISA검사결과 경남 2두(1.6%), 경북 1두(1.3%)가 양성 있었고, PCR 검사에서 경남 3두(2.4%), 경북 4두(5.0%), 울산 1두(2.8%)가 양성으로 나타난 것으로 보아 도축장 출하우에 대한 검색을 강화, 농장 사육소에 대한 추적검사를 통한 질병발생 실태를 파악, 도태를 유도하는 방역대책이 필요할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Billman-Jacobe H, Carrigan M, Cockram F, Corner LA, Gill IJ, Jessep T, Milner AR, Wood PR. 1992. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 69: 25-28.
- Collins MT, Socket DC, Goodger WJ, Conrad TA, Thomas CB, Carr DJ. 1994. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am Vet Med Assoc* 204: 636-641.
- Colston A, McConnell I, Bujdso R. 1994. 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.
- Cox JC, Drane DP, Jones SL, Ridge S, Milner AR. 1991. 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.
- Jeon DM, Yook SY, Hyun NI, Lee MS, Han WS, Kang HJ, Lee JB. 2009. Prevalence of *M. paratuberculosis* antibody in dairy cattle in Seosan-Taean areas for M.R.T. samples. *Korean J Vet Serv* 32: 251-255.
- Jeon YS, Lee BW, Kim JB, Choi CS, Kim JK. 1984. Isolation and identification of mycobactin dependent acid-fast bacteria (*M. paratuberculosis*) from bovine fecal mate-

- rial. Korean J Vet Res 24: 58-63.
- Johnson-Ifeorulundu Y, Kaneene JB. 1999. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. Am J Vet Res 60: 589-596.
- Kim D, Jeon KJ, Kim JT, Shin KS, Shin MK, Chang GH, Kim JK, Kim OS, Jung JY. 2002. Prevalence of paratuberculosis of dairy cattle in Kangwon area. Korean J Vet Res 42: 81-88.
- Kim JM, Ahn JS, Woo SR, Jo DH, Jo YS, Park JM, Yoon YD, Chang GH. 1994. A survey of paratuberculosis by immunological methods in dairy and Korean native cattle. Korean J Vet Res 34: 93-97.
- Lee SM, Kim MS, Jang YS, Chon RH, Park NC. 2009. Seroprevalence of paratuberculosis of dairy cattle and Korean cattle in Eastern-Gyeongbuk area. Korean J Vet Serv 32: 171-176.
- McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J. 1987. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. J Clin Microbiol 25: 796-801.
- Thoen CO, Baum KH. 1988. Current knowledge on paratuberculosis. J Am Vet Med Assoc 192: 1609-1611.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animal. 8th ed. pp. 280-285. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Tsai SJ, Hutchinson LJ, Zarkower A. 1989. Comparison of dot immunobinding assay, enzyme-linked immunodiffusion for serodiagnosis of paratuberculosis. Can J Vet Res 53: 405-410.
- Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, McFadden JJ. 1990. Use of highly DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. J Clin Microbiol 28: 933-937.
- Van Leeuwen JA, Tiwari A, Plaizier JC, Whiting TL. 2006. Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. Can Vet J 47: 783-786.
- Woo SR, Cruprynski CJ. 2008. Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. J Vet Sci 9: 1-8.