

최 종
연구보고서

GOVP 12010390

636.089
L 293 0

요네병의 진단기법 개발

**Establishment of diagnosis for bovine
paratuberculosis**

강원대학교 동물자원과학대학

農 林 部



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “요네병의 진단기법 확립” 과제의 최종보고서
로 제출합니다.

1999 . 10 .

주관연구기관명 : 강원대학교

연구책임자 : 김 두

요 약 문

I. 제 목

요네병의 진단기법 확립

II. 연구개발의 목적 및 중요성

요네병은 결핵균과 유사한 *Mycobacterium paratuberculosis*에 의해 야기되는 질병이다. 이 질병은 만성 소모성 전염병으로 고기 및 우유생산의 현저한 감소는 물론 수태율 저하, 고질적인 유방염 등으로 막대한 경제적 손실을 초래한다.

국내에서 요네병은 1980년대 초에 강원도의 대관령에서 처음 발생이 보고된 이후 전국에 걸쳐서 이 질병과 유사한 임상증상들의 관찰되었지만 이 질병에 대한 연구가 거의 이루어지지 않았다. 그러나 1994년 수의과학연구소는 요네병을 면역학적 방법으로 조사한 결과 상당히 높은 감염율(13.4%)을 보였다고 보고함으로써 국내에서도 이 질병이 대한 체계적인 진단과 국가적인 적절한 방역관리대책 수립이 시급한 실정이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

현재 구미 각국은 자신들이 개발한 요네병의 진단법에 의거하여 방역대책을 수립하여 요네병을 박멸키 위한 조치들을 실시하고 있지만 아직도 세균학적 진단법과 혈청학적인 진단법에서 문제점들이 지적되고 있어 보다 개량된 검사법들의 개발에 관심을 집중시키고 있다.

본 연구에서는 요네병에 의한 가축의 경제적인 손실을 최소화하기 위하여 젖소를 대상으로 변에서 요네병균 분리방법 확립, PCR에 의한 변 중의 요네병균 검출방법 확립, 요네병의 혈청학적 진단에 필요한 특이항원 생산 및 요네병에 대한 특이 혈청학적 검사기법을 확립하였다. 그리고 강원도 지역의 젖소를 대상으로 시범적으로 요네병을 진단하여 국내 실정에 적합한 요네병에 대한 방역대책을 수립하고자 하였다. 본 연구에서 수행한 구체적 내용은 다음과 같다.

- 가. 변에서 요네병균 분리를 위한 최적배지제조
- 나. 변에서 요네병균 분리방법 확립
- 다. PCR에 의한 변 중의 요네병균 검출방법 확립
- 라. 유즙 중의 요네병균 분리 및 PCR 검출
- 마. 요네병균의 특이항원 검출
- 바. 특이항원 유전자의 cloning
- 사. 재조합 특이항원의 발현
- 아. 재조합 특이항원의 면역원성 평가
- 자. Kinetic ELISA 기법 확립
- 차. ELISA로 감염우 진단
- 카. 변 배양법에 의한 요네병 감염우 진단
- 타. PCR기법에 의한 요네병 감염우 진단
- 파. 요네병의 방역대책수립

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. *Mycobacterium paratuberculosis*는 변을 0.9% hexadecylpyridium chloride에 1일 처리와 amphotericin B, vancomycin, nalidixic acid에 1일 처리하여 mycobactin-J와 amphotericin B, vancomycin, nalidixic acid를 함유한 Herrold's egg yolk medium에 접종하여 5% CO₂ 존재하에 배양할 때 오염균이 오염되지 않는 상태에서 가장 빠르게 성장하였다. 변의 배양은 요네병의 확진방법으로 활용되는 표준진단법이며 야외에서 분리된 *M paratuberculosis*는 표준균주인 *M paratuberculosis* 19698보다 느리게 성장하여 육안적으로 집락을 확인하는데 12주 정도 소요되었다.

나. 변에서 요네병균이 분리되었던糞소의 유즙에서 요네병균이 분리되지 않았으며 배양후 4주째에 실시한 PCR 검사에서도 음성반응을 보였다.

다. 본 연구에서 확립한 PCR에서는 표준균주인 *M paratuberculosis* 19698에서만 IS900 gene의 229bp의 PCR 생산물이 증폭되었으며 기타의 *Mycobacterium*에서는 PCR 생산물이 증폭되지 않아 PCR의 특이성이 확인되었다. 그리고 요네병 표준균주인 *M paratuberculosis* 19698를 10개까지 검출할 수 있는 높은 민감도를 보였다. 변을 Herrold's egg yolk medium에 배양한 4주째에 PCR을 실시함으로써 요네병의 진단기간을 단축시킬 수 있었다.

라. *Mycobacterium paratuberculosis*의 균체내 단백질에서 요네병균 이외에서는 관찰되지 않는 특이적인 34KDa에 해당하는 단백질을 확인하였으며 34KDa protein의 면역학적 epitope에 해당하는 C-terminal 단백질을 cloning하여 재조합 C-terminal 단백질을 대량생산하여 순수분리하였다. 이 단백질은 요네병균에만 특이

적 항원성을 나타내었으며 요네병진단의 특이항원으로 확인되었다.

다. ELISA의 면역반응은 혈청희석배수 200배, 항원농도 $1\mu\text{g}/\text{ml}$, conjugate 희석배수 1:10,000에서 최적반응이 나타났으며 우결핵과의 교차반응은 나타나지 않았다. 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 ELISA의 민감도는 83.3%이었으며 특이도는 96.7%이었고, immunoblotting의 민감도는 83.3%이었으며 특이도는 100%이었다.

바. 강원도지역의 젖소를 대상으로 요네병의 감염실태를 조사한 결과, 재조합 34KDa 단백질을 사용한 ELISA에서는 총 2,261개의 혈청 중 372개 혈청(16.4%)이 양성반응을 보였고 immunoblotting에서는 ELISA 양성반응을 보인 총 372개의 혈청 중 75개(3.3%)의 혈청에서 양성반응을 보였다. ELISA에 의한 요네병의 우군별 양성율을 67.3%이었으며 immunoblotting에 의한 요네병의 우군별 양성율은 24.7%이었다. ELISA 양성우 110두의 변 중 9개에서 요네병균의 배양이 확인되었으며 변을 배양한 4주째에 PCR을 실시한 결과 8개의 변에서 IS900 gene의 증폭이 확인되었다.

사. 국내의 요네병에 대한 연구의 결과 국내에도 10% 이상의 젖소가 요네병에 감염된 것으로 알려졌지만 요네병에 대한 인식은 아직도 부족한 실정이다. 그러므로 요네병에 대한 방역대책의 수립을 위해서는 요네병의 역학에 대한 지식이 필요하다. 그리고 요네병의 역학에 근거하여 이미 확립된 진단기법을 활용하여 목장에 요네병 방역대책을 적용함과 아울러 감독하고, 국가적으로 요네병 인증 프로그램의 활용이 필요할 것으로 사료된다.

2. 활용에 대한 건의

가. 강원대학교 수의학과 내과학실험실은 본 연구에서 확립된 요네병의

진단기법인 변배양법, PCR기법, 혈청학적인 진단기법을 종합적으로 실시할 수 있는 실험실이며 본 연구에 참여한 연구원들이 실험방법에 숙달되어 있고 본 연구과정에서 사용한 시설이나 시약들이 완비되어 있으므로 국가에서 공인한 요네병 진단검사소로 활용될 수 있기를 바랍니다.

나. 본 연구에서 생산한 재조합 34KDa 단백질은 요네병의 특이항원으로 서 ELISA와 immunoblotting과 같은 혈청학적인 진단에 활용가치가 높다. 그러므로 이 항원을 전국의 시험소와 같은 검사기관에서 손쉽게 활용할 수 있도록 ELISA 진단 kit와 immunochromatography kit로 개발하고 이들 kit의 quality control을 위하여 1년의 추가연구가 필요합니다.

다. 본 연구에서 확립한 검사방법은 요네병의 진단에 필수적인 검사법으로 요네병 진단이 필요한 전국의 가축위생시험소에 workshop을 통하여 기술전수가 가능하다.

라. 요네병은 제2종 법정 전염병으로 소를 사육하는 전국의 국공립 기관(한우개량사업소, 유우개량사업소, 축산기술연구소, 각 도 종축장 등)과 우수한 종축을 생산판매하는 목장은 요네병 인증 프로그램을 적용하여 요네병을 근절할 수 있도록 제도를 확립하여야 할 것으로 판단됩니다.

SUMMARY

Johne's disease(paratuberculosis) is a chronic granulomatous enteritis of domestic and wild ruminant. It has worldwide distribution and causes significant losses in the cattle industry. The etiologic agent of this disease, *Mycobacterium paratuberculosis*, is a slow growing mycobactin-dependent mycobacterial species that infects and multiplies in mononuclear phagocytes. Johne's disease ranges in severity from inapparent subclinical infection to persistent diarrhea that inexorably leads to decreased production, cachexia, and death.

In Korea, Johne's disease was officially reported first in early 1980's. Recently Veterinary Science Institute surveyed Johne's disease by immunological methods and they reported that prevalence rate of Johne's disease was high. So Johne's disease is important infectious disease and control measures for Johne's disease are needed.

The aims of this research project were to establish the detection methods for *M paratuberculosis* from bovine feces and milk, to produce *M paratuberculosis* species-specific antigen for serological tests, to establish serological test methods for bovine paratuberculosis, and to establish the paratuberculosis control program could be adopted in Korea.

The results are summerized as follows,

1. *M paratuberculosis* was grown rapidly without contamination of

other bacteria and fungi. When fecal specimens were treated with 0.9% hexadecylpyridium chloride and antibiotics brew containing amphotericin B, nalidixic acid, vancomycin, and cultivated on Herrold's egg yolk medium (HEYM) supplemented with mycobactin-J and antibiotics brew mentioned above, and cultivated in 5% CO₂ incubator. The field strains of *M paratuberculosis* were grown more slowly than *M paratuberculosis* 19698, so it was taken about 12 weeks to identify the colonies of *M paratuberculosis* on HEYM macroscopically.

2. *M paratuberculosis* was not detected from milk specimens by culture or PCR, even though *M paratuberculosis* were detected in feces from those dairy cows.

3. PCR for amplification of IS900 gene of *M paratuberculosis* was a specific for *M paratuberculosis* without non-specific reaction with other mycobacteria and sensitive to detect 10 *M paratuberculosis*. PCR conducted 4 weeks after cultivation of fecal specimens on HEYM was shortened the period of diagnosis of paratuberculosis.

4. The 34KDa protein which is cellular protein of *M paratuberculosis* was specific for paratuberculosis. So the recombinant C-terminal of 34KDa protein (rC34P) which has the characteristic property of immunological epitope was produced by gene cloning methods and purified by affinity chromatography. The recombinant C-terminal of 34KDa protein was only shown the antigenicity to the

anti-*M paratuberculosis* serum. And the recombinant protein produced in this project is expected as a useful candidate for antigen in serological diagnosis of bovine paratuberculosis.

5. The reactivity of the rC34P with sera from cows reached the maximum level at a concentration of $1\mu\text{g}/\text{ml}$, at a serum dilution of 1:200, and at a conjugate dilution of 1:10,000 by checkerboard titration. And no significant reactivity was noted with 10 serums from bovine tuberculosis. From the ROC curve, optimal cutoff for EV% was determined to be 50. At this cutoff, the ELISA using rC34P as a antigen had sensitivity of 83.3% and specificity of 96.7% for culture-positive and paratuberculosis-negative individual cow samples, and the ELISA had sensitivity of 68.1% for latent infected individual cow samples. The immunoblotting using rC34P as a antigen had sensitivity of 83.3% and specificity of 100% for culture-positive and paratuberculosis-negative individual cow samples, and the immunoblotting had sensitivity of 9.7% for latent infected individual cow samples.

6. To conduct diagnosis of bovine paratuberculosis in Kangwon area, the ELISA and immunoblotting using recombinant C-34KDa protein of *M paratuberculosis* as antigen was performed, the feces were cultured, and PCR was conducted.

Of the 262 dairy herds, 109 herds(67.3%) had a paratuberculosis prevalence by ELISA and 40 herds(24.7%) by immunoblotting. Of the 2,261 dairy cows, 371 cows(16.4%) were ELISA positive test results and

75 cows(3.3%) were immunoblotting positive results. Of the 241 feces samples including 110 feces from ELISA positive cows, 9 feces from ELISA positive cows were culture positive. And PCR was able to detect the growth of *M paratuberculosis* as early 4 weeks of fecal culture. The geographic distribution of cows with paratuberculosis was not uniform.

7. Prevalence studies in Korea indicate that over 10% of dairy cows are infected with *M paratuberculosis*. Despite reports that the disease is spreading and that it causes economic harm to affected herds, bovine paratuberculosis has not stimulated widespread concern in the cattle industry. Therefore, recognition by livestock owners and veterinarians that paratuberculosis should be controlled in herds is necessary.

A national control program is desired that it would provide uniformity to control efforts. In addition, national program guidelines should be written to certify test-negative herds for paratuberculosis.

CONTENTS

SUMMARY	2
Chapter 1. General introduction	15
Chapter 2. Diagnosis of paratuberculosis by culture	23
1. Introduction	23
2. Materials and methods	24
3. Results and discussion	27
4. Abstract	30
Chapter 3. Diagnosis of paratuberculosis by PCR	32
1. Introduction	32
2. Materials and methods	33
3. Results and discussion	35
4. Abstract	39
Chapter 4. Production of recombinant species-specific antigen for paratuberculosis	40
1. Introduction	40
2. Materials and methods	42
3. Results and discussion	48
4. Abstract	53

Chapter 5. Diagnosis of paratuberculosis by serological tests ...	58
1. Introduction	58
2. Materials and methods	59
3. Results and discussion	61
4. Abstract	65
 Chapter 6. Diagnosis of paratuberculosis of dairy cows	
in Kangwon area	68
1. Introduction	68
2. Materials and methods	69
3. Results and discussion	73
4. Abstract	83
 Chapter 7. Establishment of control program for paratuberculosis ..	86
1. Introduction	86
2. Materials and methods	94
3. Results and discussion	97
4. Abstract	105
 References	106
Appendix	123

목 차

요약문	2
SUMMARY	7
제 1 장 서 설	15
제 2 장 배양법에 의한 요네병의 진단	23
제1절 서 설	23
제2절 재료 및 방법	24
제3절 결과 및 고찰	27
제4절 결과요약	30
제 3 장 PCR 기법에 의한 요네병의 진단	32
제1절 서 설	32
제2절 재료 및 방법	33
제3절 결과 및 고찰	35
제4절 결과요약	39
제 4 장 요네병균 재조합 특이항원의 생산	40
제1절 서 설	40
제2절 재료 및 방법	42
제3절 결과 및 고찰	48
제4절 결과요약	53

제 5 장	혈청학적 기법에 의한 요네병의 진단	58
제1절	서 설	58
제2절	재료 및 방법	59
제3절	결과 및 고찰	61
제4절	결과요약	65
제 6 장	강원도지역 젓소의 요네병 진단	68
제1절	서 설	68
제2절	재료 및 방법	69
제3절	결과 및 고찰	73
제4절	결과요약	83
제 7 장	요네병의 방역대책 수립	86
제1절	요네병의 역학	86
제2절	목장의 요네병 관리대책	94
제3절	요네병 인증 프로그램	97
제4절	요약	105
참고문헌		106
부록		123

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

요네병은 결핵균과 유사한 *Mycobacterium paratuberculosis*에 의해 야기되는 질병이다. 이 질병은 만성 소모성 전염병으로 고기 및 우유생산의 현저한 감소는 물론 수태율 저하, 고질적인 유방염 등으로 막대한 경제적 손실을 초래한다.

이 질병은 1895년 Johne와 Frothingham에 의하여 처음 확인된 이래 전세계적으로 발생이 보고되고 있으며 뚜렷한 임상증상 없이 오랜 잠복기와 함께 병이 진행되면서 병원체를 분변을 통하여 지속적으로 배출하므로 강력한 방역대책 없이는 근절이 어렵기 때문에 미국, 유럽, FAO에서도 최근 발생하는 소 전염병 중에서 가장 많은 경제적 피해를 주는 고질병 중의 하나로 규정하는 질병이다.

그리고 일반적인 치료법으로 치료가 불가능하므로 적절한 방역관리대책이 이 병으로 오는 경제적인 손실을 최소화하는 유일한 방법이다.

축종별로는 소, 양, 산양, 사슴, 낙타 등 거의 모든 반추동물 또는 야생동물에서 발생하며, 특히 소와 염소에서 많이 발생한다. 소에서는 육우보다 유우에서 발생률이 높으며, 젖소 중에서는 홀스타인과 건지종이, 육우에서는 앵거스와 쇼트종이 감수성이 높으며, 한우에서도 발생하고 있다. 유우의 경우는 일반적으로 밀집사육하게 되므로 병원균이나 환축과의 접촉 기회가 많기 때문에 다발하는 경향이 있다.

요네병 발병 요인으로는 분만, 영양결핍 등의 각종 스트레스와 과다한 우유생산, 기생충감염, 밀사, 저습지나 미네랄이 부족한 곳에서 사육할 경우 발생율이 높아지며 특히 분만후 스트레스로 인하여 면역기능이 저하될 때 설사발생이 급증한다.

국내에서 요네병은 1980년대 초에 강원도의 대관령에서 처음 발생이 보고된 이후 전국에 걸쳐서 이 질병과 유사한 임상증상들의 관찰되었지만 이 질병에 대한 연구가 거의 이루어지지 않았다. 그러나 1994년 수의과학연구소는 요네병을 면역학적 방법으로 조사한 결과 상당히 높은 감염율(13.4%)을 보였다고 보고함으로써 국내에서도 이 질병이 대한 체계적인 진단과 국가적인 적절한 방역관리대책 수립이 시급한 실정이다.

그러나 요네병의 진단은 여러가지 면에서 제약점을 가지고 있다. 병원균의 분리동정법은 이 세균의 증식속도가 느려 집락을 확인하는데 12-14주일이 소요되기 때문에 이용이 제한되고 있으며, DNA probe를 이용하는 방법도 1차적인 세균배양 없이 실시할 수 있지만 변내로 세균을 배설하지 않는 경우에는 진단을 할 수 없다. Johnin을 이용한 피내반응 검사법은 특이성이 낮으며 질병이 진행된 경우에 음성반응이 나타나는 경우도 있다. 그리고 ELISA는 감염된 동물의 항체가 수준을 측정함으로써 감염우를 진단할 수 있지만 아직까지 혈청학적 진단에 이용할 수 있는 *M paratuberculosis*의 특이항원이 잘 규명되지 않았다.

또한 국내에서 ELISA에 의하여 요네병으로 양성 진단된 13두 젖소의 혈청을 미국의 Cornell 대학교 수의과대학의 Diagnostic Laboratory에서 대조 검사한 결과 15.3%(2두)가 비감염상태, 15.3%(2두)가 중등도 감염상태, 53.8%(7두)가 중등도에서 높은 감염상태이었으며 15.3%(2두)는 높은 감염상태이었다. 이상의 결과는 국내에서 사용되고 있는 검사방법이 단지 양성과 음성으로 분류하여 감염우의 병원균 배출의 위험성 정도를 나타내지 못하는

단점이 있으며 또한 양성우로 판별된 개체들이 음성으로 진단되는 결과가 초래되어 국내에서 사용되고 있는 ELISA 항원에 대한 재검토의 필요성이 요구되고 있다.

나. 경제·산업적인 측면

요네병의 경제 산업적인 면을 고려하면 가장 큰 피해는 우유와 고기생산의 현저한 감소이다. 이는 요네병균이 감염된 장벽 부위로 면역현상에 의해 다수의 대식구와 림프구가 축적되어 장벽이 비후되므로 영양분의 흡수가 차단되고 흡수된 영양분도 맥관의 압박으로 수송이 불가능하게 되어 장관으로 영양분이 배출되기 때문이다.

소모성의 영양결핍 상태는 만성감염 우군에서 연간 3-10%의 폐사율과 다른 질병에 대한 감수성을 증가시키는데 특히 번식장애와 요네병균에 의한 고질적 유방염 발생으로 도태두수가 증가하게 된다. 이같은 조기도태 등의 2차적 피해를 제외하더라도 전반적인 우유와 고기의 생산성 감소율만 약 8%에 이르며 손실액은 감염된 소 1두당 연간 75-100달러로서 우리나라의 조사된 발생율을 한우와 젖소의 전체 두수에 적용하게 되면 연간 200억 원 정도의 경제적인 손실이 추정된다.

축산업의 채산성 악화와 WTO 체제의 축산물 수입자유화 여파 속에서 의욕상실이 된 농촌 현실에서 이 질병에 대한 진단법을 개발하고 방역대책을 수립하여 이 질병으로 인한 경제적인 손실을 줄여 축산업의 대외경쟁력을 높이는 데 일조하는 것은 시대적인 요청이다.

다. 사회·문화적인 측면

*M paratuberculosis*는 사람의 Crohn's disease를 일으키는 원인체로 의심되고 있어 인수공통전염병으로서도 관심이 증대되고 있다. 유선의 감염

때문에 임상증상을 보이는 소의 11.6% 이상이 유증증에 원인균을 배설하는 것으로 알려져 있으나 요네병균은 우유의 일반적인 살균법으로는 사멸되지 않기 때문에 국민 보건위생의 측면에서도 이 질병의 박멸이 필수적이다.

이 질병은 전세계적으로 발생하고 있기 때문에 국내로 수입되는 모든 반추수에 대하여 검역을 강화하고 있지만 신속하고 정확한 진단방법이 확립되지 않아 방역의 문제점으로 지적되고 있다.

또한 정확한 진단방법의 확립으로 정액과 종축생산 목장에 대하여는 요네병 비발생증명 제도를 도입하여 양축농가에서 안심하고 종축구입이나 인공수정을 할 수 있도록 하여야 할 것이다.

라. 외국의 요네병 연구

외국의 요네병에 대한 연구로서 Chiodini(1986)은 야외분리 요네병균의 생화학적인 성상을 조사하여 요네병균의 동정을 실시하였으며, McFadden 등(1987)은 사람의 Crohn's disease에서 분리한 *M paratuberculosis*를 요네병균 specific DNA probe로 확인하여 요네병균이 Crohn's disease의 원인체일 가능성이 높다고 보고하였다. 또한 Butcher 등(1988)은 Crohn's disease에 감염된 환자에서 채취한 조직내에 요네병균이 존재하는지를 확인하기 위하여 DNA probe를 이용한 DNA hybridisation을 실시하였지만 요네병균의 관련성을 확인하지 못하였다.

Collins 등(1990)은 46 개의 분리 요네병균을 restriction endonuclease analysis로 분석한 결과 다양한 숙주 범위를 보였다고 보고하여 여러 동물을 혼합사육하는 방식에서 관리의 중요성을 강조하였다. Whitlock 등(1990)은 변에서 요네병균을 분리하기 위한 방법들을 비교연구하였다. Lein 등(1990)은 요네병균의 검출에 이용되는 DNA probe, 변 배양법, kinetic ELISA, 보체결합법과 AGID 항체검사법을 비교분석하여 각 방법의 장단점을

분석하였다.

Boddinghaus 등(1990)은 mycobacteria의 검출에 PCR을 이용한 rRNA 서열의 증폭이 매우 감수성이 높으며 특이적인 방법이라고 보고하였다. Collins 등(1990)은 변종의 요네병균 검출에 sample을 filtering한 후 radiometric medium에 배양하면 요네병균의 검출율을 2배로 향상시킬 수 있으며 요네병의 진단과 관리에 유용한 방법이라고 보고하였다. 또한 Vary 등(1990)은 요네병균의 진단에 mycobacterial insertion sequence인 IS900을 증폭하여 DNA probe로 확인하면 특이성이 매우 높으며 균배양법보다 진단을 신속히 내릴 수 있다고 보고하였다.

Kesel 등(1990)은 요네병균의 major antigen complex인 A36을 분리하여 그 면역학적 성상을 밝히고 그 중에 34KD protein이 요네병의 혈청학적 진단에 이상적인 항원이라고 보고하였다. Sugden 등(1991)은 요네병균의 균체와 배양액에서 분리한 protein antigen A와 D를 면역 요네병의 혈청학적 진단에 활용한 결과 antigen A는 82%의 감수성을 보였으며 antigen D는 100%의 감수성을 보였다고 보고하였다. Cox 등(1991)은 absorbed ELISA법을 개발하여 요네병에 대한 혈청학적인 진단을 실시한 결과 99.8%의 특이성을 보였으며 역학적인 조사에 유용한 방법이라고 보고하였다.

Hamilton 등(1991)은 athymic nude mice를 요네병에 대한 모델 실험동물로 개발하여 소에서와 유사한 임상증상과 병리적인 소견을 관찰하였으며 요네병에 대한 면역조절기전과 항균제 치료에 대한 기초연구에 활용 가치가 있을 것으로 보고하였다. Sweeney 등(1992)은 비임상형 도축우의 유방상임파절과 유즙중에서 *M paratuberculosis*을 검출한 결과, 유방상임파절에서는 27%, 유즙중에서는 11.6%의 검출율을 보였다고 보고하였다.

Nielson 등(1992)은 dot-ELISA에서 *M phlei*로 혈청을 흡착시키는 경우에 특이성이 증가된다고 보고하였으며 Shulaw 등(1993)은 agar gel

immunodiffusion을 이용하여 면양의 요네병 감염 상태를 조사하여 만성적인 체중감소를 보이는 양의 진단에 유용하며 screening test에 유용하다고 보고하였다.

Gilot 등(1993)은 *M paratuberculosis*의 특이항원으로 34KD protein을 분리하고 그 유전자를 sequencing하였다. Kesel 등(1993)은 요네병균 특이항원인 34KD gene을 cloning하고 발현시켜 요네병의 혈청학적분석에 이용한 결과 모든 감염단계의 소를 정확하게 진단하였다고 보고하였다.

Collins 등(1993)은 소의 요네병 진단에 사용하는 시판용 ELISA Kit를 이용하여 동일한 혈청 sample을 대상으로 8개의 실험실에서 평가조사한 결과 99.8%의 일치율을 보여 kit의 재현성이 높았다고 보고하였다.

US Animal Health Association은 Johne's disease program을 발표하였으며 수행기구로서 요네병 연구를 활발히 하고 있는 모든 지역의 축산단체, 주, 연방감시기구, 수의분야단체와 대학으로 구성하였다.

마. 국내의 요네병 연구

국내의 요네병 연구로서 이방환 등(1981)은 외국에서 수입된 소들에서 요네병과 유사한 증상들이 발생하고 있다고 보고하여 국내에 요네병의 유입 가능성을 처음 시사하였다. 그리고 전윤성 등(1984)은 요네병으로 의심되는 소의 변에서 *M paratuberculosis*를 분리동정함으로써 국내에서 요네병 발생을 처음으로 확인하였다. 김종만 등(1994)은 전국의 한우와 젖소를 대상으로 면역학적 방법으로 요네병을 조사한 결과 검사방법에 따라 양성율에 차이는 있으나 ELISA에서 13.4%의 항체 양성율을 보였다고 보고하여 전국에 걸쳐 요네병이 문제시되고 있으며 국가적인 요네병에 대한 대책의 필요성이 제기되었다.

2. 연구개발의 목적과 범위

현재 구미 각국은 자신들이 개발한 요네병의 진단법에 의거하여 방역대책을 수립하여 요네병을 박멸키 위한 조치들을 실시하고 있지만 아직도 세균학적 진단법과 혈청학적인 진단법에서 문제점들이 지적되고 있어서 보다 개량된 검사법들의 개발에 관심을 집중시키고 있다. 그리고 국내에서도 국립수의과학검역원의 세균과에서도 이 질병의 심각성 때문에 혈청학적인 진단의 민감도와 특이성을 높힐 수있는 항원을 생산키 위한 연구와 요네병균의 신속배양법에 대한 연구를 실시하고 있어 본 연구의 결과와 국립수의과학검역원의 연구결과를 효과적으로 활용하면 국내의 요네병 관리에 좋은 결실을 얻을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 요네병에 의한 가축의 경제적인 손실을 최소화하기 위하여 젖소를 대상으로 변에서 요네병균 분리방법 확립, PCR에 의한 변 중의 요네병균 검출방법 확립, 요네병의 혈청학적 진단에 필요한 특이적인 항원 생산 및 요네병에 대한 특이적인 ELISA 기법을 확립하여 강원도 지역의 젖소를 대상으로 시범적으로 요네병을 진단하여 국내 실정에 적합한 요네병에 대한 방역대책을 수립하고자 하였다. 본 연구에서 수행한 구체적 내용은 다음과 같다.

- 가. 변에서 요네병균 분리를 위한 최적배지제조
- 나. 변에서 요네병균 분리방법 확립
- 다. PCR에 의한 변 중의 요네병균 검출방법 확립
- 라. 유즙 중의 요네병균 분리 및 PCR 검출
- 마. 요네병균의 특이항원 검출
- 바. 특이항원 유전자의 cloning
- 사. 재조합 특이항원의 발현
- 아. 재조합 특이항원의 면역원성 평가

- 자. Kinetic ELISA 기법 확립
- 차. ELISA로 감염우 진단
- 카. 변 배양법에 의한 요네병 감염우 진단
- 타. PCR기법에 의한 요네병 감염우 진단
- 파. 요네병의 방역대책수립

제 2 장 배양법에 의한 요네병의 진단

제1절 서 설

요네병은 소, 양, 산양, 사슴, 등 거의 모든 종의 반추수에 발생하는 만성소모성 전염병으로 고기와 우유 생산의 현저한 감소는 물론 수태율 저하, 고질적인 유방염 등에 의한 조기 도태로 막대한 경제적 손실을 초래하는 질병이다.

요네병의 원인균인 *Mycobacterium paratuberculosis*는 그람 양성이고 항산성의 작은 간균으로 인공배지에서 발육이 매우 느려 그 집락을 확인하는데 12-16주 이상의 배양시간이 소요된다. 요네병균은 동물 체외에서 오랫동안 생존이 가능하고, 일반소독제에 저항성이 있으며 mercury bichloride (1:1,000), calcium hypochloride(1:50), formalin(5%), cresylic disinfectant(1:32)에 노출되면 10분 이내에 살균되지만 분변 등 이물질 속에 섞여 있을 경우에는 저항성이 증가된다.

대부분의 감염된 소는 요네병의 임상증상이 나타나기 수 개월 또는 수 년전부터 변으로 병원체를 배설한다. 요네병은 감수성이 가장 예민한 갓 태어난 송아지가 초유를 섭취할 때 어미의 유두에 오염된 *Mycobacterium paratuberculosis*를 섭취할 때 전파되기 때문에 대부분의 요네병의 관리대책들은 이 시기에 요네병균의 전파를 막는 것에 집중되어 있다. 그러나 다른 전파 경로의 가능성이 인지되고 있어 이들도 목장에서 요네병 전파의 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다. 임상형 요네병에 감염된 소에서 태어난 송아지가 출생시에 이미 태내감염이 이루어진 것이 확인되었으며 감염된 암소의 자궁으로 *Mycobacterium paratuberculosis*가 배설된다. 또한 요네병에 감염된 수소는 정액으로 *Mycobacterium paratuberculosis*을 배설

하며 정액에 존재하는 요네병균은 정액을 제조하는 과정에 첨가하는 항생제나 냉동과정에 의하여 사멸되지 않는다. 그리고 요네병에 감염된 젖소는 초유나 유즙 중으로 *Mycobacterium paratuberculosis*을 배설하게 되어 요네병에 감수성이 가장 예민한 송아지가 초유를 섭취할 때 감염이 이루어지는 중요한 감염원으로 작용한다. 유즙 중으로 배출된 *Mycobacterium paratuberculosis*는 시유의 일반적인 멸균방법에 의하여 사멸되지 않아 소비자에게도 감염을 초래할 수 있다.

요네병을 진단하기 위한 많은 진단법이 개발되었지만 조직이나 변에서 *Mycobacterium paratuberculosis*을 분리하는 방법이 소 요네병의 확진방법이며 변시료로부터 *Mycobacterium paratuberculosis*을 배양하는 방법이 요네병 진단에 가장 흔히 이용되고 있고 거의 모든 다른 검사 방법을 비교하는 기준으로 이용되고 있다. 대부분의 요네병관리대책은 요네병관리의 기초로서 변의 세균배양 결과를 이용하고 있지만 아직까지 변시료의 채취보관 방법, 변의 오염균 제거 방법, 배지의 종류, mycobactin의 종류, 배지의 품질관리 방법 등의 세균배양 과정이 표준화되어 있지 못한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 현재 세계적으로 이용되고 있는 변의 다양한 배양방법 중에 국내 실정에 적합한 배양방법을 확립하고자 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 변 중의 요네병균 분리방법 확립

가. 변에서 요네병균 분리를 위한 최적배지 제조와 배양조건 확립

1) 본연구의 수행에 적합한 요네병균의 선택배지를 선정하기 위하여 요네병균의 배양을 위하여 세계적으로 많이 사용하고 있는 Lewenstein-Jensen medium과 Herrold's egg yolk medium의 요네병균의 성장 정도를 비교분석하였다. 이들 두 배지에 mycobactin-J를 배지 1리터당 4mg의 수준으로 첨가하였으며 이들 배지에 mycobactin-J를 첨가하지 않은 대조배지도 제조하였다.

2) 변중에 오염된 세균과 곰팡이의 제거에 적합한 방법을 확립하기 위하여 0.3% benzalkonium chloride와 0.9% hexadecylpyridium chloride(HPC)의 오염제거 효과를 비교하였다.

3) 배지에 첨가하는 항생제들의 오염균 제거효과를 비교하기 위하여 위의 기초배지에 항생제를 penicillin(200IU/ml)과 chloramphenicol(200ug/ml)의 첨가균과 amphotericin B(50 μ g/ml), vancomycin(100 μ g/ml)과 nalidixic acid(100 μ g/ml)를 첨가한 배지를 제조하였다.

4) 요네병균의 CO₂의 의존성을 확인하기 위하여 요네병균이 접종된 배지를 일산화탄소배양기와 CO₂ 배양기에서 각각 배양하여 요네균의 발육상태를 비교하였다.

5) 변의 처리

요네병에 대한 ELISA에서 모든 소가 음성으로 진단된 목장의 2세된 1두의 변을 직장에서 채취하여 변 2g에 McFarland #2로 희석한 *Mycobacterium paratuberculosis* 19698 200 μ l를 첨가하여 0.3% benzalkonium chloride 또는 0.9% hexadecylpyridium chloride를 함유한 BHI broth에서 37 $^{\circ}$ C로 하룻밤 동안 배양하였다. 배양된 변을 원심분리하여 침전물을 penicillin (200IU/ml)과 chloramphenicol(200ug/ml)의 1ml 또는 amphotericin B(50 μ g/ml) 및 vancomycin(100 μ g/ml)과 nalidixic acid(100 μ g/ml)의 1ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C로 하룻밤 더 배양하였다.

6) 변의 배양

Mycobactin-J가 포함된 tube와 mycobactin-J가 포함되지 않은 tube에 균별로 4tube씩 앞에서 처리된 변 0.15ml씩을 접종하여 37℃의 일반배양기와 5% CO₂ 배양기에서 배양하면서 1주 간격으로 16주간 집락의 발육상태를 확인하였다.

나. 유증증의 요네병균 분리

1) 유증채취

유증채취를 위하여 착유전에 유방을 세척하고 유두를 1% povidone iodide로 소독한후 70% ethanol을 적신 탈지면으로 각 유두별로 변이 오염되지 않도록 철저히 소독하였다. 각 분방의 처음 20ml의 유즙을 버린후 4개 분방에서 각각 50ml의 유즙을 채취하였다. 유즙은 5% 면양혈액한천배지와 McConkey배지에 배양하여 대장균이 분리된 유즙은 변이 오염된 것으로 판단하여 검사에서 제외하였다. 실험방법을 확립하기 위하여 ELISA에 의하여 요네병 음성으로 진단된 목장의 2세 젖소의 유즙을 채취하여 McFarland #2로 희석한 *Mycobacterium paratuberculosis* 19698 200 μ l를 첨가하고 변배양법에서 가장 적합한 배양조건으로 확인된 아래의 배양방법으로 배양을 실시하였다.

2) 배양

채취된 유즙을 3000×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 동량의 PBSS로 희석한후 0.9% HPC로 45ml가 되도록 채운후 20-22℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양액을 3000×g에서 10분간 원심분리한후 침전물에 amphotericin B(50 μ g/ml), vancomycin(100 μ g/ml)과 nalidixic acid(100 μ g/ml)의 1ml를 첨가하여 37℃로 하룻밤 더 배양하였다. 이 배양액을 mycobactin-J를 함유한 Herrold's egg yolk

medium 3개의 tube와 mycobactin-J가 포함되지 않은 1개의 tube에 각각 0.15ml씩 접종하여 37℃의 배양기에서 16주 동안 배양하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 변 중의 요네병균 분리방법 확립

가. 변에서 요네병균 분리를 위한 최적배지 제조와 배양조건 확립

배지의 종류, 변의 오염균 제거방법, 배지 중의 항생제, 배양시 CO₂의 요구에 따른 배양상태를 확인한 결과, 표1에서와 같이 표준균주인 *Mycobacterium paratuberculosis* 19698은 Herrold's egg yolk medium에 mycobactin-J를 첨가한 균은 배양 6주째에 집락이 육안적으로 확인되기 시작하여 Lewenstein-Jensen medium에 mycobactin-J를 첨가한 균의 8주째보다 2주 빠르게 배양이 확인되었다. 변의 0.3% benzalkonium chloride 처리균과 penicillin-chloramphenicol 처리균 일부에서는 진균의 오염에 의하여 요네병균의 확인이 불가능하였다. 그리고 배지를 5% CO₂에서 배양한 Lewenstein-Jensen medium에 mycobactin-J를 첨가한 균은 7주째에 처음 집락이 확인되었고 Herrold's egg yolk medium에 mycobactin-J를 첨가한 균은 4주째에 집락이 확인되어 일반 배양기에서 배양한 균보다 5% CO₂에서 배양하면 1-2주 정도 배양속도가 빨라졌다. 그러나 배지에 mycobactin-J를 첨가하지 않은 균에서는 *M paratuberculosis* 19698이 증식되지 않았다. 이상의 결과를 종합하면, *M paratuberculosis* 19698은 변을 0.9% hexadecylpyridium chloride로 처리하여 mycobactin-J와 amphotericin B, vancomycin, nalidixic acid를 함유한 Herrold's egg yolk medium에 접종하여 5% CO₂ 존재하에 배양할 때 오염균이 오염되지 않는 상태에서 가장 빠르게 성장하였다(Table 1).

나. 젖소의 변에서 요네병균의 분리

앞에서 확립된 요네병균 분리를 위한 최적배지 제조와 배양조건에 의하여 젖소 변중의 요네병균 분리를 위하여 16개 목장의 386두의 변을 채취하여 검사한 변중에 1개 목장의 2두의 젖소에서 배양 12주째에 요네병균의 증식상태가 확인되었다. 이들 야외에서 분리된 *M paratuberculosis*는 배양시에 표준균주인 *M paratuberculosis* 19698보다 느리게 성장하여 육안적으로 집락을 확인하는데 12주 정도 소요되었다.

다. 유즙중의 요네병균 분리

표준균주인 *Mycobacterium paratuberculosis* 19698을 정상유즙에 첨가하여 실시한 배양검사에서는 배양 6주째에 요네균의 집락이 육안적으로 확인되어 유즙내에 존재하는 요네병균을 배양하는 실험방법이 확립되었다. 그러나 5개 목장의 112두의 유즙을 배양하였으나 육안적으로 확인할 수 있는 집락은 관찰되지 않았으며 배양후 4주째에 실시한 PCR 검사에서도 음성반응을 보였다. 그리고 변에서 요네병균이 분리되었던 젖소의 유즙에서도 요네병균은 분리되지 않았다.

유즙중의 요네병균의 분리율은 변으로 많은 세균을 배출하는 임상형 요네병의 소에서도 낮은 편(11.6%)으로 감염우의 진단을 위하여 유즙중의 요네병균의 검출방법을 시도하는 것은 민감도가 낮아 비실용적으로 판단되며, 유즙중의 요네병균의 배양법은 유즙이 요네병균에 감염된 변에 오염된 상태를 확인하는 방법으로 활용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

Table 1. Growth rate of *Mycobacterium paratuberculosis* 19698, depending on media, antiseptics, antibiotics, mycobactin-J and CO₂

Culture conditions	Weeks after incubation											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LJ/J+BZ+PC			C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
LJ/J+BZ+AVN		C	C	C	C	C	C	C	1/4	2/4	3/4	3/4
LJ/J+HPC+PC			C	C	C	C	C	2/4	3/4	3/4	3/4	3/4
LJ/J+HPC+AVN									1/4	2/4	4/4	4/4
HEY/J+BZ+PC		C	C	C	C	1/4	3/4	3/4	3/4	3/4	3/4	3/4
HEY/J+BZ+AVN						1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
HEY/J+HPC+PC							1/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4
HEY/J+HPC+AVN						1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
LJ/J+HPC+AVN w/oCO ₂								2/4	4/4	4/4	4/4	4/4
LJ/J +HPC+AVN w/CO ₂							1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
HEY/J+HPC+AVNw/oCO ₂						1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
HEY/J+HPC+AVN w/CO ₂				1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
LJ	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
HEY	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

LJ: Lowenstein-Jensen medium, HEY: Herrold's egg yolk medium,

BZ: benzalkonium chloride, HPC: hexadecylpyridium chloride,

AVN: amphotericin B, vancomycin and nalidixic acid,

PC: penicillin and chloramphenicol, /J: mycobactin-J

C: contaminated, w/: with, w/o: without.

제4절 결과요약

요네병을 진단하기 위한 많은 진단법이 개발되었지만 조직이나 변에서 *Mycobacterium paratuberculosis*을 분리하는 방법이 소 요네병의 확진방법이며 거의 모든 다른 검사 방법을 비교하는 기준으로 이용되고 있다. 대부분의 요네병관리대책은 요네병관리의 기초로서 변의 세균배양 결과를 이용하고 있지만 아직까지 변시료의 채취보관방법, 변의 오염균 제거 방법, 배지의 종류, mycobactin의 종류, 배지의 품질관리 방법 등의 세균배양 과정이 표준화되어 있지 못한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 현재 세계적으로 이용되고 있는 변의 다양한 배양방법 중에 국내 실정에 적합한 배양방법을 확립하고자 하였다.

M paratuberculosis 19698은 변을 0.9% hexadecylpyridium chloride에 1일 처리와 amphotericin B, vancomycin, nalidixic acid에 1일 처리하여 mycobactin-J와 amphotericin B, vancomycin, nalidixic acid를 함유한 Herrold's egg yolk medium에 접종하여 5% CO₂ 존재하에 배양할 때 오염균이 오염되지 않는 상태에서 가장 빠르게 성장하였다.

16개 목장의 386두의 변을 채취하여 검사한 변중에 1개 목장의 2두의 젖소에서 배양 12주째에 요네병균의 증식상태가 확인되었으며 이들 야외에서 분리된 *M paratuberculosis*는 표준균주인 *M paratuberculosis* 19698보다 느리게 성장하여 육안적으로 집락을 확인하는데 12주 정도 소요되었다.

5개 목장의 112두의 유즙을 배양하였으나 육안적으로 확인할 수 있는 집락은 관찰되지 않았으며 배양후 4주째에 실시한 PCR 검사에서도 음성반응을 보였다. 그리고 변에서 요네병균이 분리되었던 젖소의 유즙에서도 요네병균은 분리되지 않았다.

유즙중의 요네병균의 분리율은 변으로 많은 세균을 배출하는 임상형 요네병의 소에서도 낮은 편(11.6%)으로 감염우의 진단을 위하여 유즙중의 요네병균의 검출방법을 시도하는 것은 민감도가 낮아 비실용적으로 판단되었다.

제 3 장 PCR 기법에 의한 요네병의 진단

제1절 서 설

Mycobacterium paratuberculosis(요네병균)은 반추수의 만성 염증성 장 증후군인 요네병의 원인체이다. 이 질병은 약 100년전에 알려졌지만 소에서 아직도 중요한 경제적인 손실을 일으키고 있다. 적절한 관리가 요네병의 감염율을 줄이고 있지만 이것만으로는 이 질병을 완전히 예방하기에는 충분하지 못하다. 요네병의 관리는 가능하면 빠르게 감염된 동물을 검출하고 도태하는 것에 달려있다. 다른 대안으로는 예방접종이 있으나 예방접종은 우군 내에서 임상형의 발생은 줄이지만 일부의 소들이 여전히 세균을 분변으로 배출할 수 있다. 이러한 소들은 소수의 세균을 지속적으로 배설하여 우군 내에서 지속적으로 감염을 초래하여 중요한 경제적 문제를 야기하게 된다. 그러므로 요네병의 관리대책에 사용될 수 있는 빠르고 믿을 만한 진단방법이 필요하다. 이 시점에서 가장 믿을 만한 방법은 6개월 마다 모든 소의 변에서 세균을 배양하여 배양 양성인 소를 모두 도태하는 것이다. 그러나 배양법은 *Mycobacterium paratuberculosis*가 느리게 자라기 때문에 확진하는데 3개월 정도 소요된다. 그러므로 감염된 소들은 그들이 도태되기 전에 수개월 동안 세균을 배출할 수 있다. 혈청학적 진단법은 빠르고 수행하기에 간편하지만 어떠한 검사도 민감도나 특이도에 있어서 충분하지 못하다. 최근에 요네병 음성 우군에 특이도가 100%에 가까운 ELISA가 개발되었지만 예방접종에 의하여 유발된 항체에 교차반응을 보이는 문제점을 가지고 있다. 그리고 더 중요한 문제점은 아직까지도 민감도가 불충분하여 잠재성 감염우와 세균배양 양성 동물에서 민감도가 각각 47%와 60% 수준이라는 점이다.

최근에 DNA 조작기법들이 서로 다른 종의 유전적인 관련성을 밝히는 방법으로 생물학 분야에서 광범위하게 이용되고 있다. PCR기법이 mycobacteria를 빠르게 결정적으로 동정하는 수단으로 등장하여 감염된 동물의 변에 있는 *Mycobacterium paratuberculosis*을 직접 검출할 수 있는 DNA probe와 PCR이 연구자들의 관심을 받고 있다. 그 결과 일부의 DNA probe가 개발되어 상용화되어 높은 특이도를 보였지만 낮은 민감도 때문에 이용이 한정되고 있다. 또한 *Mycobacterium paratuberculosis*에 특이적인 IS900 insertion element gene이 확인되어 PCR기법으로 임상형 요네병에서 배양된 *Mycobacterium paratuberculosis*를 3-4일 이내에 신속하게 확진하기 위하여 이용되고 있다.

본 연구에서는 요네병의 확진에 필요한 PCR의 기법을 확립하고 PCR의 특이성과 민감성을 조사하였으며, 요네병의 조기진단을 위하여 변과 유즙의 세균배양후 육안적으로 *M paratuberculosis*의 증식이 확인되기 전에 PCR을 실시하여 *M paratuberculosis*의 존재를 확인하였다. 또한 세균배양검사서 증식된 세균을 PCR기법을 활용하여 *M paratuberculosis*를 최종 동정하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 변종의 *Mycobacterium paratuberculosis*의 PCR 진단

가. 요네병균의 chromosomal DNA 분리

Herrold's egg yolk medium에서 육안적으로 확인된 집락을 채취하여 TEN

buffer로 세 번 세척하여 subtilisin, lysozyme, proteinase K와 10% SDS로 차례대로 소화시킨후 RNase로 소화시키고 phenol과 chloroform으로 DNA를 추출하여 최종적으로 TE buffer에 용해시켜 -20℃에 보존하였다.

나. PCR

요네병균의 IS900 gene을 증폭하기 위하여, 네 가지의 200 μ M deoxynucleotide triphosphate(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1쌍의 IS900 primer, 2 unit의 DNA polymerase, 10 \times PCR buffer, NP-40, template DNA와 멸균된 증류수를 혼합하여 100 μ l가 되도록 조성하였다. PCR 반응액은 thermal cycler(GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus)를 이용하여, 94℃에서 10분간 가열한 후 94℃에서 1분(denaturation), 50℃에서 1분(annealing), 72℃에서 1분(extension) 간의 과정을 35회 반복하여 증폭시킨 후, 최종적으로 72℃에서 증폭된 DNA를 15분 동안 연장시켰다. PCR 산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide 용액으로 염색하여 UV-transilluminator에서 확인하였다.

IS900/401 : 5'-CCGCTAATGAGAGATGCGATTGG-3'

IS900/402 : 5'-AATCAACTCCAGCAGCGCGGCTCG-3'

Fig 1. Primers for amplification of IS900 gene of *Mycobacterium paratuberculosis*

다. PCR의 특이성과 민감성의 확인

요네병 표준균주인 *Mycobacterium paratuberculosis* 19698, *Mycobacterium avium* 1414, *Mycobacterium avium* 25, *Mycobacterium bovis* AN5와 *Mycobacterium bovis* R 4061-62의 5 strain에서 추출한 chromosomal DNA를 이용하여 상기의 방법으로 특이성을 조사하였다. 그리고 변종에 함유

되어 있는 요네병균의 PCR 검출의 민감성을 조사하기 위하여 요네병균 표준균주 1, 10, 100, 1,000과 10,000개에서 chromosomal DNA를 추출하여 PCR을 실시하였다.

라. 젖소 변종의 요네병균의 PCR 진단

젖소와 한우의 변 시료를 Herrold's egg yolk medium에 배양한후 배양 4주째에 배지 표면을 긁어 상기의 방법으로 DNA를 추출하여 PCR을 실시하였다.

마. 유즙종의 요네병균의 PCR 진단

실험방법을 확립하기 위하여 혈청검사에서 요네병 음성으로 진단된 젖소의 유즙에 McFarland #2로 희석한 *Mycobacterium paratuberculosis* 19698 200 μ l를 첨가하여 변배양법에서 가장 적합한 배양조건으로 Herrold's egg yolk medium에 배양한 후 배양 4주째에 변에서와 동일한 방법으로 PCR을 실시하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. PCR의 특이성과 민감성

표준균주인 *M paratuberculosis* 19698과 기타 *Mycobacterium* 속 세균의 chromosomal DNA로 실시한 PCR에서 *M paratuberculosis* 19698에서만 IS900 gene

의 229bp의 PCR 생산물이 증폭되었으며 기타의 *Mycobacterium*에서는 PCR 산물이 증폭되지 않아 PCR의 특이성이 확인되었다(Fig 2). 그리고 본 연구의 PCR은 요네병 표준균주인 *M paratuberculosis* 19698를 10개까지 검출할 수 있는 높은 민감도를 보였다(Fig 3).

2. 변종의 요네병균의 PCR에 의한 검출

Herrold's egg yolk medium에 변을 배양한 4주째에 모든 가검물을 대상으로 PCR을 실시한 결과 2두의 젖소의 가검물에서 IS900 gene에 대한 양성반응이 관찰되어 변배양검사와 일치하는 결과를 나타내었다. 이상의 결과는 변배양과 PCR을 실시하여 12주 이상이 소요되는 변배양의 단점을 보완하여 진단기간을 단축시킬 수 있는 장점이 확인되었다.

3. 유즙의 요네병균의 PCR에 의한 검출

표준균주인 *Mycobacterium paratuberculosis* 19698을 정상유즙에 첨가하여 Herrold's egg yolk medium에 배양한 후 배양 4주째에 chromosomal DNA를 분리하여 PCR을 실시한 결과 229bp의 IS900 gene의 특이 PCR 생산물이 확인되었다. 그러나 5개 목장 112두의 유즙을 배양후 4주째에 실시한 PCR 검사에서 모두 음성반응을 보였으며 배양 12주후에도 육안적으로 확인할 수 있는 집락은 관찰되지 않았다.

이상에서와 같이 유즙을 대상으로 실시한 배양과 PCR에서 요네병균을 검출할 수 없었기 때문에 감염우의 진단을 위하여 유즙중의 요네병균의 검출방법은 비실용적으로 판단되었다.

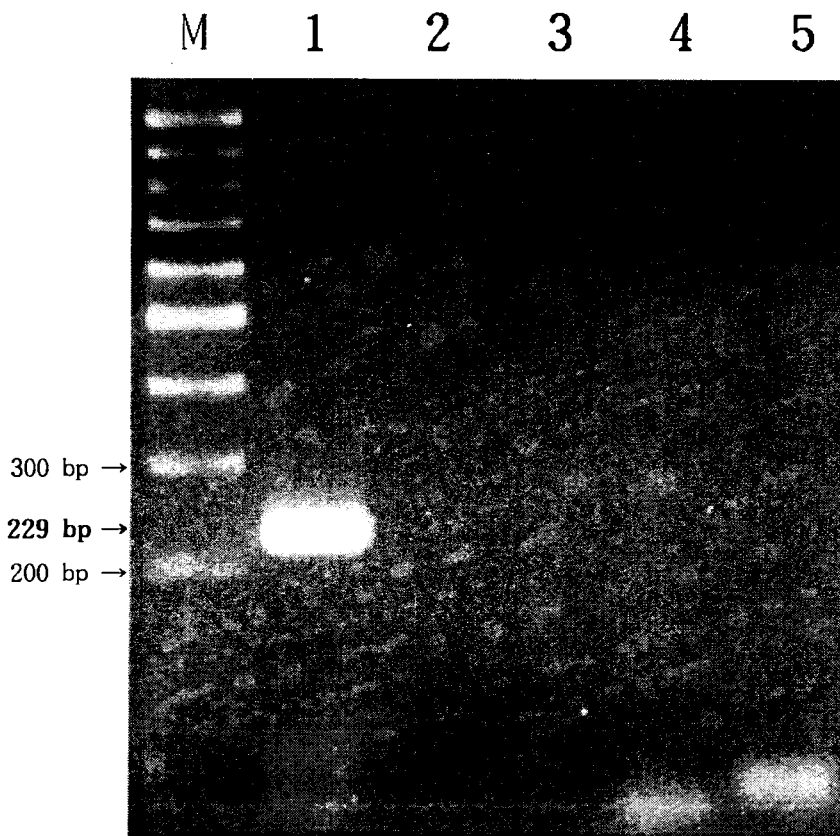


Figure 2. Amplification of IS900 gene of *M paratuberculosis* by PCR.
Lane M: DNA size standard (100 bp ladder, Biotools, Spain), Lane 1: *M paratuberculosis* 19698, Lane 2: *M avium* 25, Lane 3: *M avium* 1414, Lane 4: *M bovis* AN5, Lane 5: *M bovis* R4061.

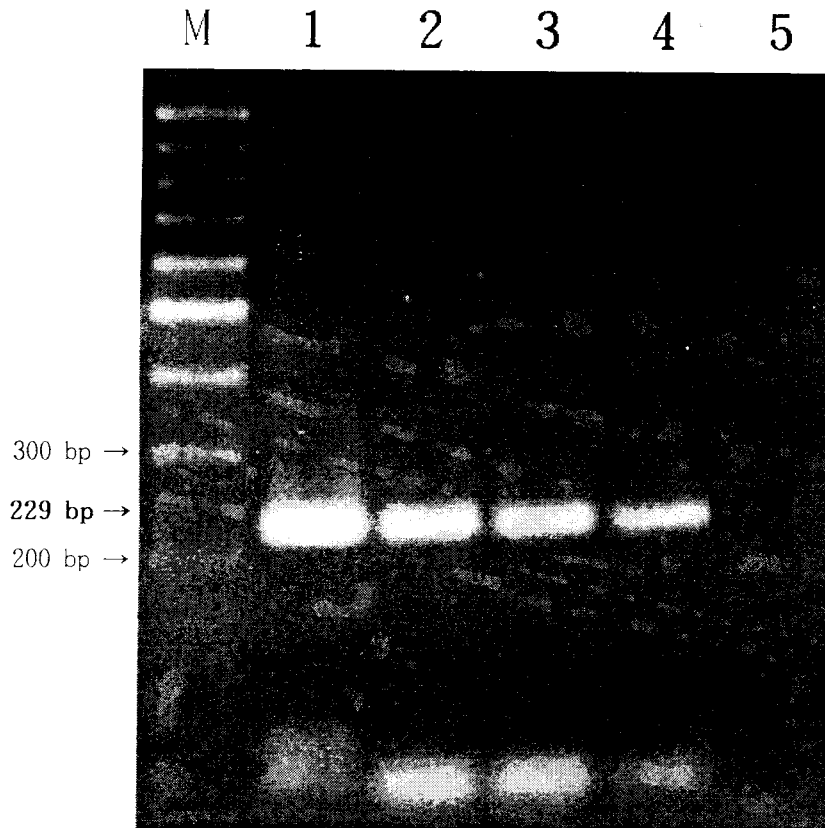


Figure 3. Sensitivity of the PCR for IS900 gene. Lane : 1-5. Serial 10-fold diluted *M paratuberculosis*, 10,000, 1,000, 100, 10, 1 were amplified with the IS900 primers. Lane M: DNA size standard(100 bp ladder, Biotools, Spain).

제4절 결과요약

본 연구에서는 요네병의 확진에 필요한 PCR의 기법을 확립하고 PCR의 특이성과 민감성을 조사하였으며, 요네병의 조기진단을 위하여 변과 유즙의 세균배양후 육안적으로 *M paratuberculosis*의 증식이 확인되기 전에 PCR을 실시하여 *M paratuberculosis*의 존재를 확인하였다. 또한 세균배양검사에서 증식된 세균을 PCR기법을 활용하여 *M paratuberculosis*를 최종 동정하였다.

그 결과 본 연구에서 확립한 PCR에서는 표준균주인 *M paratuberculosis* 19698에서만 IS900 gene의 229bp의 PCR 생산물이 증폭되었으며 기타의 *Mycobacterium*에서는 PCR 산물이 증폭되지 않아 PCR의 특이성이 확인되었다. 그리고 요네병 표준균주인 *M paratuberculosis* 19698를 10개까지 검출할 수 있는 높은 민감도를 보였다.

16개 목장의 386두의 변을 Herrold's egg yolk medium에 배양한 4주째에 모든 가검물을 대상으로 PCR을 실시한 결과 2두의 젖소의 가검물에서 IS900 gene에 대한 양성반응이 관찰되어 변배양후 4주째에 PCR을 실시함으로써 진단기간을 단축시킬 수 있는 장점이 확인되었다.

5개 목장 112두의 유즙을 배양후 4주째에 실시한 PCR 검사에서 모두 음성반응을 보여 감염우의 진단을 위하여 실시한 유즙중의 요네병균의 PCR 검출방법은 비실용적으로 판단되었다.

제 4 장 요네병균 재조합 특이항원의 생산

제1절 서 설

준임상형 요네병의 소는 임상형 소보다 훨씬 많기 때문에 감염의 확산을 막기 위해서는 세균을 배출하는 소를 확인하는 조기진단은 아주 중요하다. 그러나 현재까지 활용가능한 검사법들은 많은 단점들을 가지고 있다. 세균학적인 검사는 *Mycobacterium paratuberculosis*(요네병균)이 매우 느리게 증식하기 때문에 제한적으로 이용되고 있으나 장조직이나 변에서 요네병균의 배양이 요네병을 확진하는 방법이다. 요네병균은 배양시에 mycobactin이 필요하며 매우 느리게 자라기 때문에 다른 mycobacteria와 감별이 가능하지만 이러한 성질과 생화학적 검사 및 항생제 감수성 차이만으로는 *M. avium* 또는 다른 mycobacteria와 감별이 충분치 못하다.

많은 혈청학적 검사법이 *Mycobacterium paratuberculosis*에 인공적으로 또는 자연 감염된 소의 혈청-항체를 검출하기 위하여 개발되었다. ELISA, CF test와 AGID의 비교에서 ELISA가 요네병의 진단에 가장 예민한 혈청학적 검사법으로 밝혀졌지만 이러한 많은 검사법들이 현장에서는 광범위하게 이용되지 못하고 있다.

현재까지 요네병에 대한 특이적인 치료법, 효과적인 관리대책이나 예방 접종법이 개발되지 못하였으며 이 질병에 대한 좋은 관리법이 감염률을 줄이기는 하지만 이 질병의 박멸은 가능한 조기에 감염된 소를 검출하여 도태시키는 방법이다. 그러나 이 질병의 박멸대책과 관리는 준임상적으로 감염된 동물을 검출할 수 있는 간단하고 특이적인 진단법이 결여되어 있기 때문에 어려움이 있다.

준임상형 요네병을 확인하기 위하여 대부분의 연구들은 DNA probe와 PCR 과 함께 새롭게 개량된 종 특이적인 혈청학적 검사법을 개발하는 것에 중점을 두었다. 현재 혈청학적인 방법으로 요네병 진단을 위하여 국내외에서 사용되고 있는 항원은 ammonium sulfate purified protein(ASP), lipopolysaccharide(LPS), lipoarabinomannan(LAM), carbohydrate antigen (CH-CFT), protein A와 D, thermostable macromolecular antigen(TMA), purified protein derivative(PPD-J) 등 다양한 종류가 있으나 종특이성이 다소 낮은 편이다.

*Mycobacterium paratuberculosis*의 잘 규명되고 종특이적인 항원성분의 확인은 요네병의 면역학적 분석의 특이도와 민감도를 개선하는 수단이 될 수 있다. De Kesel 등과 Gilot 등은 *M paratuberculosis*의 종 특이적인 epitope을 함유하는 34kDa 단백질을 최초로 확인하였으며 이 단백질을 이용한 혈청학적 검사는 요네병의 모든 단계의 감염된 동물을 진단할 수 있다고 보고하였다.

국내에서는 1983년에 이 등이 처음으로 임상형 요네병이 국내에 발생하고 있다고 보고하였으며 전 등은 임상형 요네병에 감염된 Hereford 소로부터 *Mycobacterium paratuberculosis*을 분리하였다. 그리고 김 등은 1994년에 면역학적인 검사법에 의하여 한우와 젖소가 요네병에 광범위하게 이환되어 있다고 보고하였다. 그러나 현재까지 국내에서는 요네병균에 대한 종 특이적인 항원이 개발되지 않아 요네병에 대한 특이적인 혈청학적 검사법이 개발되지 못하였다.

본 연구에서는 *Mycobacterium paratuberculosis*의 종 특이적인 epitope인 재조합 34kDa 단백질을 대량 생산하여 요네병에 감염된 소 혈청의 항체를 효과적으로 검출할 수 있는 면역학적 검사법의 개발에 사용하고자 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 요네병균의 특이항원 검출

가. 사용균주

요네병의 혈청학적인 진단에 필요한 특이항원을 선별하기 위하여 *Mycobacterium paratuberculosis* 19698, *Mycobacterium avium* type 25, *Mycobacterium avium* 1414, *Mycobacterium bovis* R4060-62, *Mycobacterium bovis* AN5을 연세대학교 의과대학에서 분양받아 요네병균의 균체내 단백질과 균체외 단백질을 생산하기 위하여 사용하였다

나. 배양

상기의 균주들을 mycobactin-J가 함유된 Sauton medium 225ml가 들어있는 1 l screw cap flask에 접종하여 37℃에서 OD₅₄₀가 0.3이 될 때까지 약 10주간 정치배양하였다.

다. 균체외 또는 균체내 단백질의 수거

균체외 단백질의 수거를 위하여 배양액을 3000g로 원심분리후 상청액을 ammonium sulfate로 침전시켰다. 침전물을 PBS로 투석한후 단백질을 정량하였다. 균체내 단백질의 수거를 위하여 원심분리된 침전물을 500W로 3분간 10회 sonication을 실시한 후 100,000g로 원심분리하여 그 상청액에 PMSF를 1mM이 되도록 첨가하였다.

라. 특이항원 확인

단백질의 전개를 위하여 SDS-PAGE와 2-dimensional gel electrophoresis를 실시하였다. 그리고 각 단백질의 항원성을 확인하기 위하여 anti-*Mycobacterium paratuberculosis* serum을 사용하여 Western blot을 실시하였다.

2. 요네병균의 특이항원 유전자 cloning

가. *Mycobacterium paratuberculosis*의 chromosomal DNA 분리

요네병균의 34KDa 단백질의 면역학적 epitope에 해당하는 C-terminal 재조합 단백질을 증폭하는데 주형으로 사용할 chromosomal DNA는 *M paratuberculosis* 19698 strain을 배양하여 Kohoe의 방법을 개량하여 분리하였다. 즉, *M paratuberculosis* 19698 strain을 Herrold's egg yolk medium에서 16주 배양한 후, 배지표면을 긁어 균체를 수집한후 원심분리하여 lysis buffer(Tris [pH 8.0, 50mM], EDTA [10mM], glucose [50mM])로 세척하였고 lysozyme(1mg/ml), pronase (1mg/ml)와 1% SDS로 차례로 소화시킨 후, phenol과 chloroform으로 chromosomal DNA를 추출하였으며 sodium acetate(0.5M)와 ethanol을 사용하여 침전시킨후 RNase로 처리하고 다시 phenol과 chloroform으로 chromosomal DNA를 추출한 후 ethanol로 침전시켰다. 마지막으로 TE buffer(10mM Tris HCl / 1mM EDTA, pH 8)에 용해시켜 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

나. Polymerase chain reaction에 의한 34KDA gene의 증폭

1) Oligonucleotide primers

Cloning에 필요한 34KDa gene을 PCR기법을 이용하여 증폭하기 위하여, Gilot 등이 보고한 요네병균의 34KDa gene의 nucleotide sequence를 참조하여 C-terminal 만 증폭시킬 수 있는 ① 5'-GGTCAGCCCCGGATCCCGCCG-3'과 ② 5'-CACGTTGTCGACTAGGCGCGA-3'의 1쌍의 oligonucleotide primer를 설계하여 DNA Synthesizer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 제작하였다. Primer에는 *BamH I*과 *Sal I*의 제한효소 절단부위를 각각 삽입하였다.

2) 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)

M paratuberculosis 19698 strain에서 분리한 chromosomal DNA를 주형으로 하여 34KDa gene을 증폭하기 위하여, 4가지의 200 μ M의 deoxynucleotide triphosphates(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1쌍의 primer(100 μ M), 2.5 unit의 Taq DNA polymerase(New England Biolabs, USA), 10 \times PCR buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.5, 25mM MgCl₂, 5% DMSO, 0.2mg/ml gelatin), template DNA와 멸균된 증류수를 혼합하여 100 μ l가 되도록 조정하였다.

PCR 반응액을 Thermal Cycler 9600(Perkin Elmer-Cetus, USA)을 이용하여, 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분간(denaturation), 52 $^{\circ}$ C에서 2분간(annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 1분간(extention)의 과정을 30회 반복하여 증폭시킨 후, 증폭된 DNA를 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 연장시켰다. 증폭된 34KDa gene은 0.7% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator(Vibberlourmat, France)에서 확인하였다.

3) *M paratuberculosis* 34KDa gene의 cloning

PCR기법에 의하여 증폭된 34KDa gene을 vector plasmid인 pGEX-4T-2(Phamacia Biotech, Sweden)에 cloning하기 위하여, *BamH I*과 *Sal I*을 사용하여 증폭된 34KDa gene과 pGEX-4T-2를 소화시켜 agarose gel에

전기영동시킨 후 해당되는 DNA band를 Prep-A-Gen DNA Purification System(Bio Rad, USA)으로 추출하였다. 추출된 34KDa gene과 pGEX-4T-2를 ligase(NEB, USA)로 15℃에서 하룻밤 동안 ligation시킨후 DH5_a *E coli*에 재조합 DNA(34KDa/pGEX-4T-2)를 형질전환시켰다(Fig 1).

4) 삽입된 34KDa gene의 DNA sequencing

34KDa gene이 vector DNA에 올바르게 cloning된 것을 확인하기 위하여, Sanger 등의 dideoxynucleotide chain reaction method에 의거하여 Sequenase kit(United States Biochemicals)와 pGEX sequencing primer (5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3', 5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3')를 사용하여 sequencing을 실시하였다.

3. 재조합 특이항원의 발현 및 순수분리

가. 재조합 34KDa 단백질의 발현

형질전환된 DH5_a *E coli*가 재조합 34KDa 단백질을 발현하는지를 확인하기 위하여, 재조합 34KDa gene을 함유하는 양성 clone을 LB broth에서 OD₆₀₀ 값이 1이 되도록 배양한후 isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside (IPTG)로 재조합 34KDa 단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 재조합 34KDa 단백질은 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시한후 Coomassie brilliant blue staining 용액으로 염색하여 확인하였다.

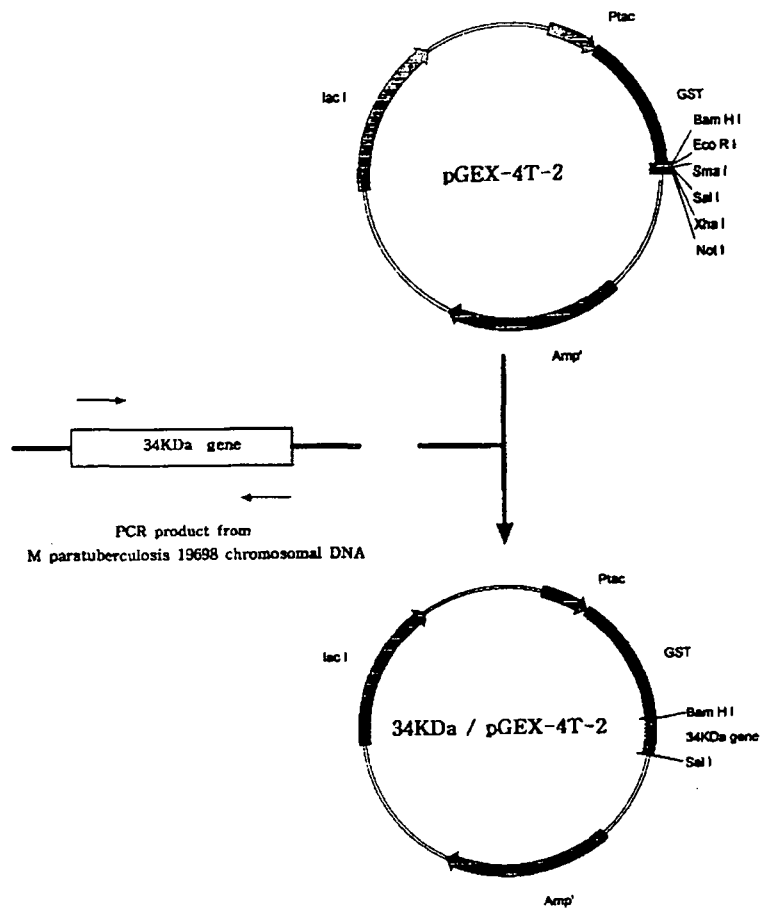


Fig. 1 Schematic outline of cloning the gene encoding the 34KDa protein into the expression vector pGEX-4T-2. The 34KDa gene was amplified by PCR. The amplified 34KDa gene was then digested with *BamHI* and *SalI*, and cloned into the expression vector resulting in p34KDa/GEX-4T-2.

나. 재조합 34KDa 단백질의 순수분리

재조합 34KDa 단백질을 순수분리하기 위하여, IPTG를 첨가하여 발현을 유도시킨 DH5 α *E coli*의 배양액을 원심분리하여 집균하였고 세균침전물을 PBS에 부유시켜 French press를 사용하여 16,000psi로 용균시켰으며, Bulk GST Purification Module(Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용한 affinity chromatography를 실시하여 glutathione-S-transferase와 fusion된 34KDa 단백질을 순수분리하였다.

4. 재조합 특이항원의 항원성 평가

가. 재조합 34KDa 단백질의 Western blot

순수분리된 재조합 34KDa 단백질의 항원성을 확인하기 위하여 Western blot을 실시하였다. GST-34KDa 단백질을 thrombin으로 소화시켜 Sephadex G-50을 사용한 gel chromatography를 실시하여 순수분리된 재조합 34KDa 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였으며 전개된 재조합 34KDa 단백질은 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 재조합 34KDa 단백질이 부착된 nitrocellulose membrane은 gelatin으로 blocking한 후, 토끼에서 제조한 *M paratuberculosis*의 polyclonal antiserum, 요네병균이 분리된 소의 혈청 및 요네병 음성 소의 혈청과 반응시키고, horseradish peroxidase anti-rabbit IgG와 반응시킨 후 4-chloro-1-naphtol용액을 첨가하여 발색시켜 관찰하였다. 분자량은 prestained molecular size marker(Bio Rad, USA)를 지표로 하여 결정하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 요네병균의 특이항원 검출

Mycobacterium paratuberculosis, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*의 5 strain을 배양하여 균체외 단백질과 균체내 단백질을 분리한후 SDS-PAGE를 실시하여 균체내 단백질에서 요네병균 이외에서는 관찰되지 않는 특이적인 34KDa에 해당하는 단백질을 확인하였다(Fig 2). 균체외 단백질에서는 5가지 strain이 비슷한 전기영동상을 나타내었다.

2. 요네병균의 특이항원 유전자 cloning

가. 중합효소 연쇄반응에 의한 34KDa gene의 증폭

재조합 34KDa protein의 면역학적 epitope에 해당하는 C-terminal 단백질(34KDa 단백질로 약칭)의 cloning에 필요한 *M paratuberculosis*의 34KDa gene을 증폭하기 위하여, *M paratuberculosis* 19698 strain에서 분리한 chromosomal DNA를 주형으로 하여 34KDa gene을 PCR기법으로 증폭시킨 결과 348bp의 band가 증폭되었다.

나. *M paratuberculosis* 34KDa gene의 cloning

PCR기법에 의하여 증폭된 34KDa gene을 pGEX-4T-2에 ligation시켜 DH5 α *E coli*에 형질전환시킨후 34KDa gene을 함유하는 plasmid(pkD1)을 miniprep으로 분리하고 제한효소로 분석한 결과 34KDa gene이 올바른 위치에 삽입된 것을 확인하였다(Fig 3).

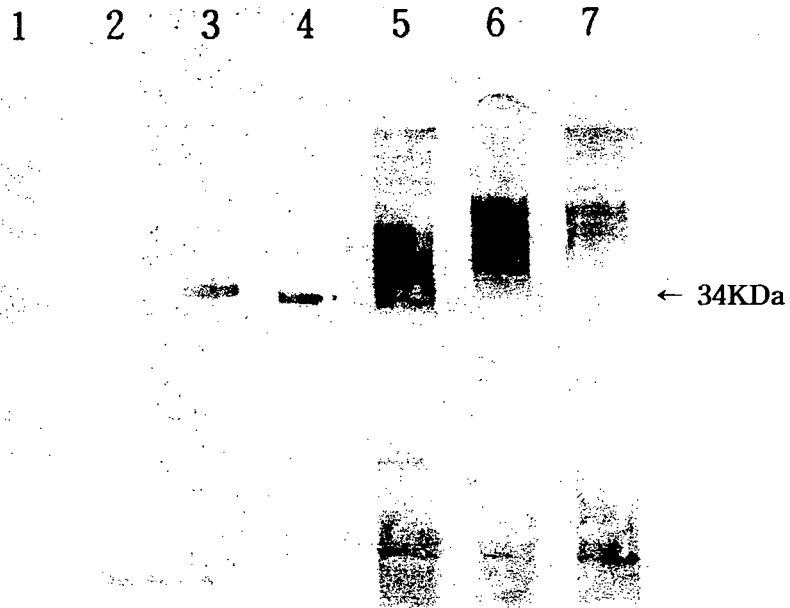


Fig2. Western blot analysis of the recombinant 34 KDa protein and native 34 KDa protein of *M paratuberculosis*.

- Lane 1: molecular weight standards,
- Lane 2: before the induction of 34 KDa protein,
- Lane 3: recombinant protein MP1,
- Lane 4: recombinant protein MP34,
- Lane 5: lysate of *M paratuberculosis*,
- Lane 6: lysate of *M avium*,
- Lane 7: lysate of *M bovis*.

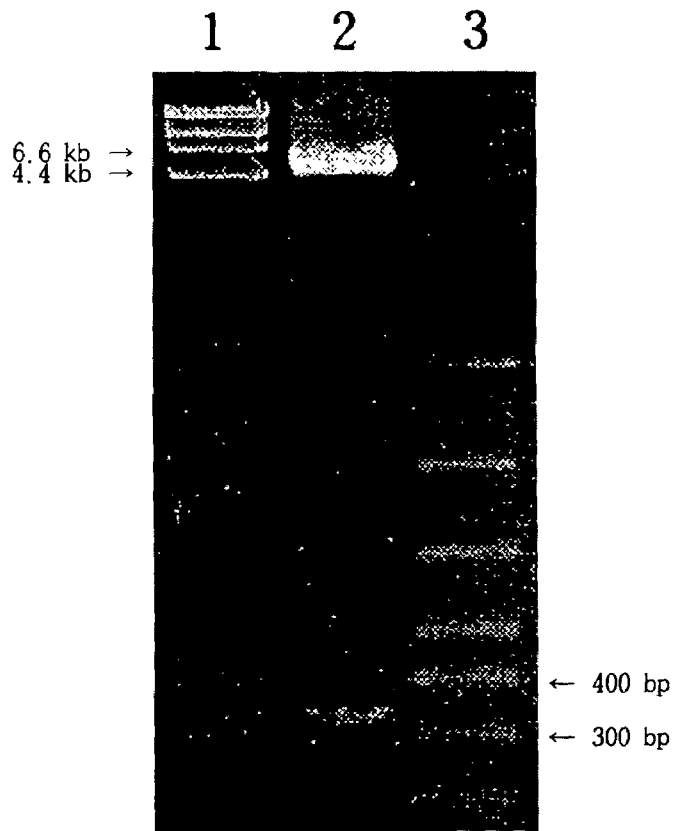


Fig. 3. To check the C-terminal of 34 KDa protein gene inserted into vector pGEX-4T-2 plasmid, the purified plasmid DNA from pKD1 clone was digested with *Bam*HI and *Sal*I. The 333 bp gene was inserted into vector pGEX-4T-2 correctly. Lane 1: DNA Size Standard(high range, Bio-Rad); lane 2: 333 bp band of C-terminal of 34KDa protein gene and 4970 bp band of pGEX-4t-2; lane 3: DNA Size Standard(low range, Bio-Rad).

다. 삽입된 34KDa gene의 DNA sequencing

34KDa gene이 vector DNA에 올바르게 cloning된 것을 확인하기 위하여 pGEX-4T-2에 삽입된 34KDa gene(pKD1)을 sequencing한 결과, C-terminal에 해당하는 333bp의 gene이 gene bank에 등록된 34KDa gene의 C-terminal과 일치하였다(Fig 4).

3. 재조합 특이항원의 발현 및 순수분리

가. 재조합 단백질의 발현

pKD1 clone을 이용하여 재조합 34KDa 단백질을 발현시킨 결과, 재조합 34KDa 단백질의 C-terminal 단백질(14KDa)은 glutathione-S-transferase (GST; $M_r=26$ kDa)와 융합된 GST-34KDa 형태의 40 kDa의 단백질이 생산되었다. 발현량은 발현개시후 3시간까지 증가한 후 감소하였다(Fig 5).

나. 재조합 34KDa의 순수분리

재조합 GST-34KDa 단백질을 순수분리하기 위하여 Bulk GST Purification Module을 이용한 affinity chromatography를 실시한 결과, Fig 6에서와 같이 40 kDa에 해당하는 재조합 GST-34KDa 단백질이 순수분리되었다.

4. 재조합 특이항원의 항원성 평가

가. 재조합 34KDa 단백질의 Western blot

순수분리된 재조합 34KDa 단백질이 항원성을 갖는지를 확인하기 위하여, 재조합 GST-34KDa 단백질을 thrombin으로 소화시켜 gel chromatography로 순수분리한 34KDa 단백질 만을 항원으로 사용하고 polyclonal anti-*M. paratuberculosis* rabbit serum, 요네병균이 변에서 분리된 소의 혈청과 요

GGA TCC CAG CCG GGT GGT CAG CAG CAT TCG CCG CAG GGC TAC GGG TCG CAG TAC GGC GGT 60
 Gly Gly Gln Pro Gly Gly Gln Gln His Ser Pro Gln Gly Tyr Gly Ser Gln Tyr Gly Gly
 TAC GGC CAG GGC GGC GCT CCG ACC GGC GGT TTC GGT GCC CAG CCG TCG CCG CAG TCC GGC 120
 Tyr Gly Gln Gly Gly Ala Pro Thr Gly Gly Phe Gly Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ser Gly
 CCG CAA CAG TCC GCG CAG CAG CAG GGC CCG TCC ACA CCG CCC ACC GGC TTC CCC AGC TTC 180
 Pro Gln Gln Ser Ala Gln Gln Gln Gly Pro Ser Thr Pro Pro Thr Gly Phe Pro Ser Phe
 AGC CCG CCG CCC AAC GTC GGC GGG GGA TCG GAC TCC GGT TCG GCG ACC TCT AAT TAC TCC 240
 Ser Pro Pro Pro Asn Val Gly Gly Gly Ser Asp Ser Gly Ser Ala Thr Ser Asn Tyr Ser
 GAG CAG GCC GGT GGC CAG CAG TCC TAC GGC CAG GAG CCT TCT TCA CCG TCT GGG CCG ACG 300
 Gln Gln Ala Gly Gly Gln Gln Ser Tyr Gly Gln Glu Pro Ser Ser Pro Ser Gly Pro Thr
 ...
 CCC GCC TAA CGT GCC CTG TCG CGC CTA GTC GAC
 Pro Ala

Fig 4. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *pC34P*. The restriction enzyme sites were underlined in each end of the open reading frame of the C-terminal of 34KDa protein gene. ***: stop codon.

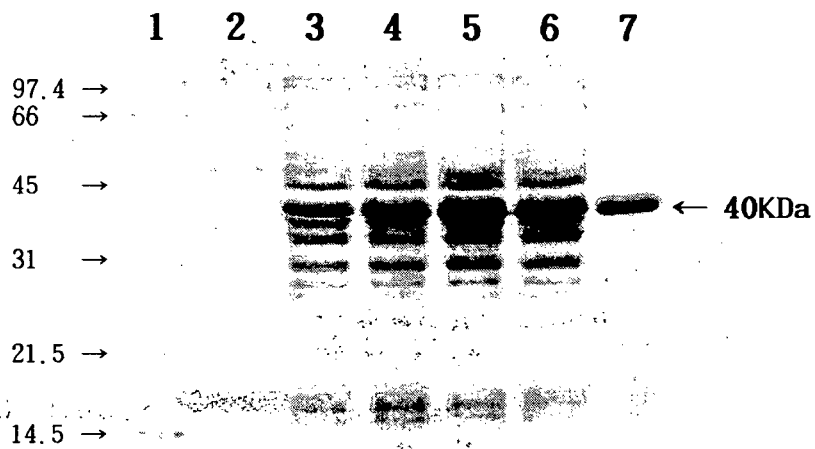


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of the recombinant GST-34KDa protein. Lane 1: molecular weight standard, lane 2: before induction of GST-34KDa, lane 3: 1 hour after induction, lane 4: 2 hours after induction, lane 5: 3 hours after induction, lane 6: 4 hours after induction. lane 7: purified GST-34KDa.

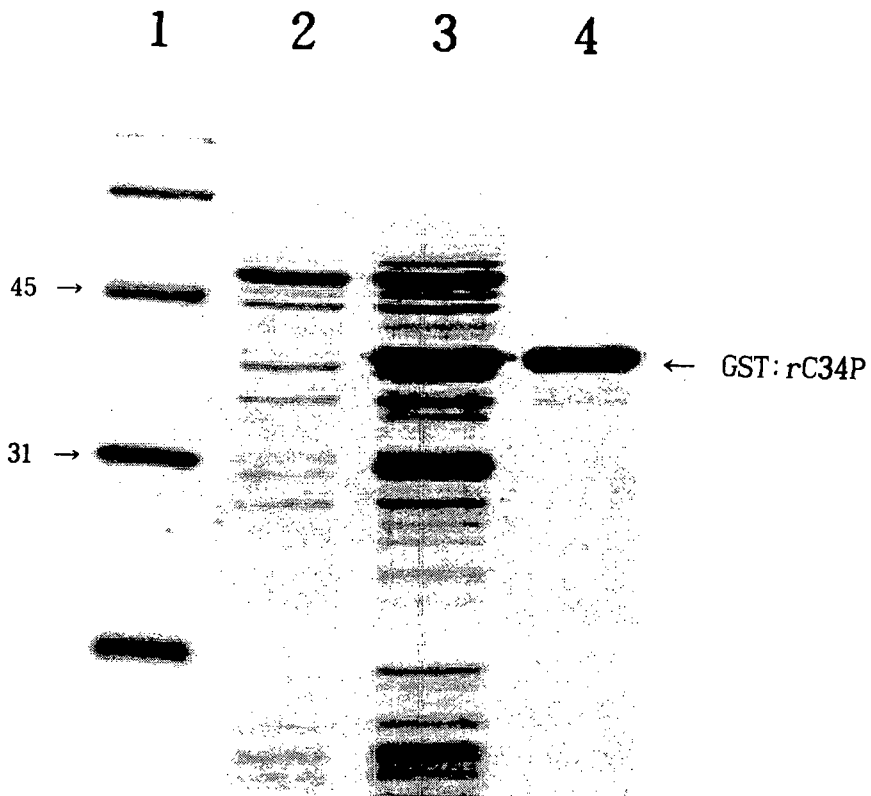


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of the recombinant GST-34KDa protein purified by affinity chromatography. Lane 1: molecular weight standard(Low Range, Bio-Rad), lane 2: before the induction of GST-34KDa, lane 3: 3 hours after the induction of GST-34KDa, lane 4: purified GST-34KDa.

네병 음성 소의 혈청을 1차 항체로 이용한 Western blot을 시행한 결과, 요네병균으로 면역시킨 토끼의 혈청과 요네병균에 감염된 소의 혈청에서만 면역반응이 특이적으로 나타났다(Fig 7).

제4절 결과요약

*Mycobacterium paratuberculosis*의 잘 규명되고 종특이적인 항원성분의 확인은 요네병의 면역학적 분석의 특이도와 민감도를 개선하는 수단이 될 수 있다. *M. paratuberculosis*의 종 특이적인 epitope을 함유하는 34KDa 단백질이 확인되었으며 이 단백질을 이용한 혈청학적 검사는 요네병의 모든 단계의 감염된 동물을 진단할 수 있다고 보고되었다.

본 연구에서는 *Mycobacterium paratuberculosis*의 종 특이적인 epitope인 재조합 34KDa 단백질을 대량 생산하여 요네병에 감염된 소 혈청의 항체를 효과적으로 검출할 수 있는 면역학적 검사법의 개발에 사용하고자 하였다.

본 연구에서는 *Mycobacterium paratuberculosis*의 균체내 단백질에서 요네병균 이외에서는 관찰되지 않는 특이적인 34KDa에 해당하는 단백질을 확인하였으며 재조합 34KDa 단백질의 대량생산을 위하여 34KDa protein의 면역학적 epitope에 해당하는 C-terminal 단백질의 gene을 PCR기법으로 증폭시킨 결과 348bp의 band가 증폭되었다. 증폭된 34KDa gene을 pGEX-4T-2에 ligation시키고 DH5 α *E. coli*에 형질전환시켜 제한효소와 sequencing으로 분석한 결과 C-terminal에 해당하는 333bp의 gene이 올바른 위치에 삽입된 것을 확인하였다.

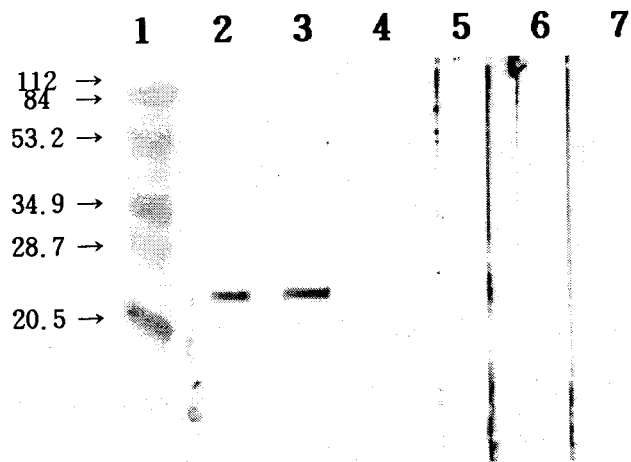


Fig. 7. Reactivity of the rC34P with serum from culture positive sera(lane 2-3) culture negative sera(lane 4-5), and tuberculin positive sera(lane 6-7) in immunoblotting. Lane 1 was the Prestained SDS-PAGE Standards(Low range, Bio-Rad)

재조합 34kDa -단백질의 C-terminal 단백질(14kDa)은 glutathione-S-transferase($M_r=26$ kDa)와 융합된 GST-34kDa 형태의 40 kDa의 단백질이었으며 발현량은 발현개시후 3시간까지 증가한 후 감소하였다.

재조합 GST-34kDa 단백질은 affinity chromatography에 의하여 40 kDa에 해당하는 재조합 GST-34kDa 단백질만이 순수분리되었다.

순수분리된 재조합 34kDa 단백질을 이용한 Western blot을 시행한 결과, 요네병균으로 면역시킨 토끼의 혈청과 요네병균에 감염된 소의 혈청에서만 면역반응이 나타나 요네병균에만 특이적 항원성을 나타내었다. 그러므로 본 연구에서 생산한 재조합 단백질은 요네병진단의 특이항원으로 판단되었다.

제 5 장 혈청학적 기법에 의한 요네병의 진단

제1절 서 설

요네병 진단법에는 분변배양법, 요닌의 피내방응법과 정맥주사법, 백혈구 유주 억제반응, 림프구 변성시험, 혈청학적 진단법인 보체결합반응, 한천겔반응, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 등이 있으며, 이외에도 방사선을 이용한 분변배양법과 유전자 진단법 등이 있다. 요네병은 한 가지 진단법으로 완벽하게 진단할 수 없기 때문에 임상증상, 역학적 상황, 세균분리와 혈청학적 진단을 종합하여 판단하여야만 보다 정확한 진단을 내릴 수 있다.

ELISA는 민감도와 특이도가 높고, 균분리 결과와 매우 높은 수준으로 일치하며, 특히 사용되는 항원의 특이성 정도에 따라 정확도도 증가하고 있어 세계적으로 요네병을 진단하기 위하여 가장 활발히 연구 이용되고 있는 방법이다. Collins 등(1991)은 Johne's absorbed EIA(enzyme immunoassay)라 불리는 kit를 개발하여 요네병에 대한 혈청학적 진단결과 99.0%의 특이도를 보여 역학적인 조사에 유용한 방법이라 보고하였다. Kesel 등(1990)은 major antigen complex인 A36을 분리하여 그 면역학적인 성상을 밝히고 그 중에 34KDa protein이 요네병의 혈청학적 진단에 특이적인 항원이라고 보고하였으며, Kesel 등(1993)은 34KDa gene을 cloning하고 발현시켜 요네병의 혈청학적 분석에 이용한 결과 70%의 민감도와 95%의 특이도를 나타내었다고 보고하였다.

국내 소의 요네병 항체양성률은 김 등(1994)이 보고한 바에 따르면 유우

에서 18.7%로 비교적 높은 편이었으며, 진단법에 따라 양성률에 차이가 있었다. 그러나 국내에서는 아직까지 요네병 진단을 위한 균분리 방법이나 혈청학적 진단에 필요한 확실한 기준이 설정되어 있지 않는 실정이다.

본 연구에서는 요네병의 혈청학적 진단에 특이적인 항원으로 확인되어 본 연구에서 생산한 재조합 34KDa 단백질을 ELISA 항원으로 사용하여 요네병 ELISA 기법을 확립하고 본 ELISA의 요네병 검출의 민감도와 특이도를 조사하는 한편, 재조합 34KDa 단백질을 immunoblotting의 항원으로 사용하여 이 검사의 민감도와 특이도를 조사하여 이 두가지 혈청학적 검사법의 요네병 진단의 효용성을 조사하였다.

제2절 재료 및 방법

1. Kinetic ELISA 기법 확립

혈청 중의 요네병 특이항체를 검출하기 위한 kinetic ELISA는 Voller 등과 Jacobson 등의 방법을 응용하여 BIO-TEK의 KC4 program을 사용하여 실시하였다. 재조합 34 KDa 단백질을 carbonate buffer pH 9.5로 1 μ g/ml 농도로 희석하여 96well flat bottom EIA plate(Costar Co, Cambridge, Mass)의 각 well에 100 μ l 씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 흡착시켰다. PBS-0.05% Tween 20으로 3회 세척한후 1% BSA in PBST 200 μ l을 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켜 blocking한 후 PBST로 3회 세척하였다. 0.5% BSA-PBST로 혈청을 200배 희석하여 각 well당 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양하였다. 각 well을 PBST로 3회 세척후에 PBST에 1:10,000으로 희석한 HRP conjugated anti-bovine IgG(Sigma, USA)를 100 μ l씩 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다. PBST로 3회 세척후에

o-phenylenediamine(Sigma, St Louis, Mo)과 과산화수소를 함유하는 기질용액 100 μ l를 분주한후 실온에서 2분 간격으로 3번 ELISA reader(Bio-Tec Instruments Inc, USA)에서 OD₄₅₀ 값을 읽은 다음 기질을 넣은 15분 후에 1M 황산용액 100 μ l씩을 가하여 반응을 중지시키고 다시 OD₄₅₀ 값을 읽었다. 각 plate에는 표준 양성과 음성 혈청을 포함시켰으며 각 혈청은 2반복으로 검사하였다. Kinetic ELISA에서 각 well의 correlation coefficient(r^2)가 0.950 미만의 경우에는 검사를 재 실시하였으며 2반복 well 사이의 coefficient of variation(CV)이 20% 이상인 경우에도 검사를 재 실시하였다.

각 혈청의 평균 OD 값을 계산하였으며, 각 혈청의 검사결과는 다음과 같은 공식에 의하여 EV %로서 표현하였다.

$$EV\%(ELISA\ value\ percentage)=$$

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

2. ELISA의 정확도 측정

ELISA의 정확도를 측정하기 위하여 세균학적 검사에서 *Mycobacterium paratuberculosis*가 배양되어 요네병으로 확진된 소의 30개 혈청과 요네병이 발병하지 않는 것으로 확인된 목장의 30두 소의 혈청을 미국의 Cornell 대학으로부터 제공받았다. 이들 혈청에 대한 EV% 자료는 ELISA에서 가장 높은 정확도를 얻을 수 있는 EV%를 구하기 위하여 receiver operating

characteristic(ROC) curve에 의하여 분석하였으며 이것에 의하여 양성
음성 사이의 cutoff point를 설정하였다.

3. Immunoblotting의 정확도

Immunoblotting의 정확도를 확인하기 위하여 ELISA 정확도의 측정에 사용한
세균배양 양성으로 확인된 30개 혈청과 요네병 음성으로 확인된 30개 혈청
을 사용하여 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용하여 다음과 같은 방법으
로 immunoblotting을 실시하였다.

즉, 순수분리된 재조합 34KDa 단백질을 SDS sample buffer와 섞어 100℃에
서 2분간 가열한후 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 항원을 전개
시켰다. 전기영동한 gel은 Transphor[®](Pharmacia Biotech, USA)를 이용하여
Western blot buffer[2.5mM Tris, 0.2M glycine, 20% methanol(vol/vol)]에서
4℃, 30V로 하룻밤 동안 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 재조
합 34KDa 단백질이 부착된 nitrocellulose membrane은 blocking solution(3%
gelatin in PBST pH 10.0)에 넣어 37℃에서 30분간 blocking시킨 후, PBST로
1:200으로 희석한 젖소의 혈청과 37℃에서 1시간 동안 반응시키고, horseradish
peroxidase-conjugated anti-bovine IgG(1:1000)(Sigma)와 실온에서 1시간 동안
반응시킨 후 4-chloro-1-naphtol 용액을 첨가하여 발색시켜 관찰하였다. 각 단
계의 반응 사이에 PBST로 10분간 2회씩의 세척을 실시하였다. 분자량은
prestained molecular size marker(Bio Rad, USA)를 지표로하여 확인하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. Kinetic ELISA 기법 확립

Coating에 적합한 항원농도, 혈청희석 배수와 conjugate 희석배수를 설정하기 위하여 요네병균 배양 양성 혈청과 요네병 음성 혈청을 사용한 checkerboard titration에서 면역반응은 혈청희석배수 1:200배, 항원농도 1 μ g/ml과 conjugate 희석배수 1:10,000에서 최적반응이 나타났으며 요네병 음성혈청에서는 특이적인 면역반응이 관찰되지 않았다(Fig 1). 또한 우결핵과의 교차반응을 확인하기 위하여 연세대학교 의과대학에서 제공받은 10개의 bovine tuberculin positive serum을 대상으로 본 연구에서 생산한 재조합 항원을 사용한 ELISA에서 모두 음성반응을 나타내었다.

2. ELISA의 정확도 측정

요네병 표준 양성 혈청과 음성 혈청을 사용하여 구한 ROC curve로부터 가장 적합한 cutoff로서 EV% = 50으로 결정하였다. 그리하여 EV%가 50 이상은 양성으로 간주하였다. 이 cutoff에서 30개 세균배양 양성 혈청 중 25개 혈청이 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 ELISA에서 양성을 보여 83.3%의 민감도를 나타내었다. 또한 세균배양 음성 혈청 30개 중 1개의 혈청이 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 ELISA에서 양성반응을 보였으며 29개 혈청이 음성반응을 보여 96.7%의 특이도를 보였다(Table 1). 또한 잠복기 감염우 혈청에 대하여는 68.1%의 민감도를 나타내었다.

3. Immunoblotting의 정확도

Immunoblotting의 정확도를 확인하기 위하여, 30개 세균배양 양성 혈청 중 25개 혈청이 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 immunoblotting에서 양성을 보여 83.3%의 민감도를 나타내었다. 또한 세균배양 음성 혈청 30개 중 30개 혈청 모두가 음성반응을 보여 100%의 특이도를 보였다(Table 2)

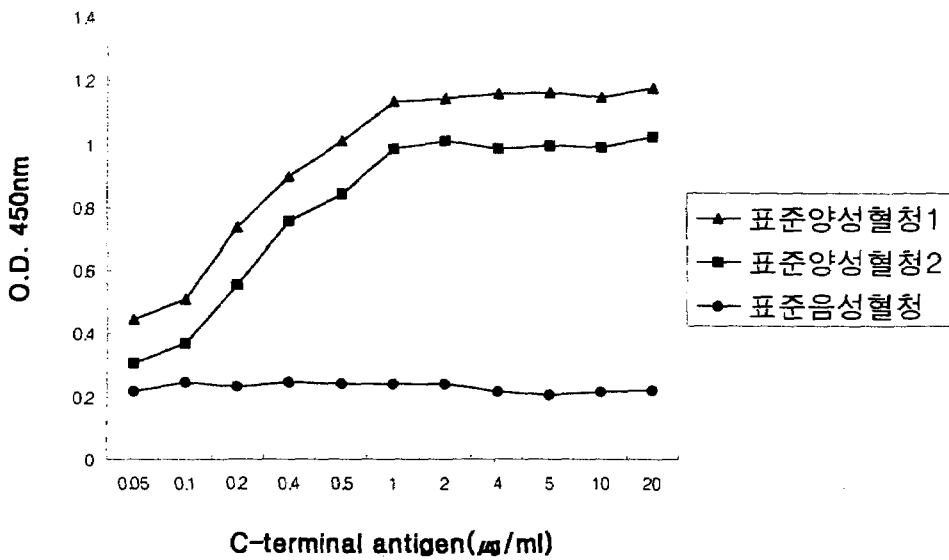


Fig 1. Reactivity of the recombinant 34KDa protein with sera of Johne's culture-positive or negative cattle. Values were represented the mean absorbences of duplicate measurements.

Table 1. Sensitivity and specificity of ELISA using rC34P,
 standard sera were obtained from cornell university

ELISA reaction	Culture positive sera	Latent infected sera	Culture negative sera
positive	25 (83.3%)	49 (68.1%)	1 (3.3%)
negative	5 (16.7%)	23 (31.9%)	29 (96.7%)
Total	30	72	30

Table 2. Sensitivity and specificity of Immunoblotting using rC34P,
 standard sera were obtained from cornell university

Immunoblotting reaction	Culture positive sera	Latent infected sera	Culture negative sera
positive	25 (83.3%)	7 (9.7%)	0 (0%)
negative	5 (16.7%)	65 (90.3%)	30 (100%)
Total	30	72	30

그리고 잠복기 감염우 혈청에 대하여는 9.7%의 민감도를 보였다. 우결핵 양성과의 교차반응을 확인하기 위하여, 연세대학교 의과대학에서 제공받은 10개의 bovine tuberculin positive serum을 대상으로 본 연구에서 개발한 재조합 항원을 사용한 immunoblotting에서 모두 음성반응을 나타내었다.

본 연구에서 개발한 재조합 34kDa 단백질을 항원으로 사용한 immunoblotting은 비특이적인 양성반응 없이 요네병균을 배설하는 소의 83.3% 검출해낼 수 있어 ELISA의 비특이적인 양성반응을 제거할 수 있는 방법으로 판단되며, 목장에서 도태가 필요한 요네병 양성우 선발에 적합한 검사법으로 판단되었다.

이상의 면역학적인 검사 결과에 따라 요네병에 이환된 목장과 개체를 ELISA에 의하여 screening하고 ELISA 양성우를 대상으로 immunoblotting과 세균배양을 실시한다면 도태의 대상이 되는 요네병균을 배설하는 소를 경제적이며 효과적으로 확인할 것으로 생각된다.

제4절 결과요약

요네병의 혈청학적 진단에 특이적인 항원으로 확인되어 본 연구에서 생산한 재조합 34kDa 단백질을 ELISA 항원으로 사용하여 요네병 ELISA 기법을 확립하고 본 ELISA의 요네병 검출의 민감도와 특이도를 조사하는 한편, 재조합 34kDa 단백질을 immunoblotting의 항원으로 사용하여 이 검사의 민감도와 특이도를 조사하여 이 두가지 혈청학적 검사법의 요네병 진단의 효용성을 조사하였다.

본 연구 ELISA의 면역반응은 혈청희석배수 1:200, 항원농도 1 μ g/ml와 conjugate 희석배수 1:10,000에서 최적반응이 나타났으며 요네병 음성혈청에서는 특이적인 면역반응이 관찰되지 않았다. 또한 우결핵과의 교차반응은 나타나지 않았다.

요네병 표준 양성 혈청과 음성 혈청을 사용하여 구한 ROC curve에 의하여 cutoff point는 EV% = 50이었으며 EV%가 50 이상은 양성으로 간주하였다. 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 ELISA의 민감도는 83.3%이었으며 특이도는 96.7%이었다. 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 immunoblotting의 민감도는 83.3%이었으며 특이도는 100%이었다. 또한 우결핵과는 교차반응이 나타나지 않았다. 본 연구의 immunoblotting은 비특이적인 양성반응 없이 요네병균을 배설하는 소의 83.3%를 검출해낼 수 있어 ELISA의 비특이적인 양성반응을 제거할 수 있는 방법으로 판단되며, 목장에서 도태가 필요한 요네병 양성우 선발에 적합한 검사법으로 판단되었다.

본 연구의 면역학적인 검사 결과에 따라 요네병에 이환된 목장과 개체를 ELISA에 의하여 screening하고 ELISA 양성우를 대상으로 immunoblotting과 세균배양을 실시한다면 도태의 대상이 되는 요네병균을 배설하는 소를 경제적이며 효과적으로 확인할 것으로 생각된다.

제 6 장 강원도지역 젖소의 요네병 진단

제1절 서 설

요네병은 결핵균과 유사한 *Mycobacterium paratuberculosis*에 의해 야기되는 질병이다. 이 질병은 대부분의 반추수에 발생하는 만성 소모성 전염병으로 국내에서는 제2종 법정전염병으로 지정되어 있고 축산업에 막대한 경제적인 손실을 초래하는 질병이며 일반적인 치료법으로 치료가 불가능하므로 적절한 방역관리대책이 이 질병으로 오는 경제적인 손실을 최소화하는 유일한 방법이다.

국내에서는 1980년대 초에 강원도 대관령지역의 외국에서 젖소를 도입한 목장에서 처음 임상형 요네병이 발생되었으며, 전 등(1983)이 원인균을 분리하여 그 발생이 처음 확인된 이후 이 질병에 대한 연구가 거의 이루어지지 않았으나 1994년에 수의과학연구소에서 면역학적인 방법에 의한 조사결과 전국에 걸쳐 상당히 높은 감염률을 보였다고 보고함으로써 이 질병에 대한 중요성이 다시 부각되었으며 또한 이 질병에 대한 적절한 방역관리대책이 요청되었다.

본 연구는 지난 2년 동안 본 연구과제에서 확립된 요네병진단에 필요한 세균배양법, PCR진단법, 요네병균에 대한 재조합 특이항원을 이용한 ELISA와 immunoblotting을 이용한 진단법으로 강원도지역의 젖소를 대상으로 요네병의 감염실태를 조사하여 전국적으로 적용할 수 있는 방역대책을 확립하고자 실시하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 시료의 채취

강원지역 젖소의 요네병의 감염실태를 조사하기 위하여, 강원도 가축위생시험소 지소 관할지역별로 1산 이상의 젖소 약 500두씩 검사를 목표로 하여 축주가 검사에 참여하기를 희망한 목장을 임의선정하였다. 1차적으로 총 162개 목장의 2,261두 젖소의 혈액을 채취하여 재조합 34kDa 단백질을 항원으로 사용한 ELISA와 immunoblotting으로 양성우를 screening하였으며, 변의 세균배양을 위하여 ELISA 양성우 110두의 변과 음성우 131두의 변을 채취하였다.

2. 혈청학적 방법에 의한 감염우 진단

가. Kinetic ELISA로 감염우 진단

1) 본 연구실에서 순수분리한 재조합 34kDa 단백질 항원과 국립수의과학검역원에서 생산한 항원을 coating buffer로 1 μ g/ml되게 희석하여 ELISA plate의 well당 100 μ l씩 분주한후 하룻밤 동안 4 $^{\circ}$ C에서 coating시켰다.

2) Plate를 PBS로 세척한후 1% BSA in PBST로 blocking시켰다.

3) 가검혈청을 0.5% BSA in PBST로 1:200으로 희석하여 2개의 well에 각각 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다.

4) PBS로 세척후 PBST로 1:10,000으로 희석된 horseradish conjugated anti-bovine IgG를 well당 100 μ l씩 분주한후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다.

5) PBS로 세척후 o-phenylenediamine(OPD)의 기질용액을 well당 100 μ l씩 가

하여 450nm에서 2분 간격으로 OD 값을 3회 읽었다. 기질을 넣은 15분후에 1.0M H₂SO₄를 well당 100 μ l씩 분주하여 반응을 정지시키고 다시 OD 값을 읽었다. 각 plate에는 표준 양성과 음성 혈청을 포함시켰으며 각 혈청은 2반복으로 검사하였다. Kinetic ELISA에서 각 well의 correlation coefficient(r^2)가 0.950 미만의 경우에는 검사를 재실시하였으며 2반복 well 사이의 coefficient of variation(CV)이 20% 이상인 경우에 검사를 재실시하였다.

각 혈청의 평균 OD 값을 계산하였으며 검사혈청의 결과는 다음과 같은 공식에 의하여 EV%로서 표현하였으며 EV% 50 이상을 양성으로 분류하였다.

EV%(ELISA value percentage)=

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

Mean OD positive control serum - Mean OD negative control serum

나. Immunoblotting에 의한 감염우 진단

ELISA 양성반응 젯소의 immunoblotting 반응을 확인하기 위하여, 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용하여 다음과 같은 방법으로 immunoblotting을 실시하였다.

즉, 순수분리된 재조합 34KDa 단백질을 SDS sample buffer와 섞어 100℃에서 2분간 가열한후 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 항원을 전개시켰다. 전기영동한 gel은 Transphor[®](Pharmacia Biotech, Sweden)를 이용하여 Western blot buffer[2.5mM Tris, 0.2M glycine, 20% methanol(vol/vol)]에서 4℃, 30V로 하룻밤 동안 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 재조

합 34kDa 단백질이 부착된 nitrocellulose membrane은 blocking solution(3% gelatin in PBST pH 10.0)에 넣어 37°C에서 30분간 blocking시킨 후, PBST로 1:200으로 희석한 젖소의 혈청과 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, horseradish peroxidase-conjugated anti-bovine IgG(1:1000)(Sigma)와 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 4-chloro-1-naphtol 용액을 첨가하여 발색시켜 관찰하였다. 각 단계의 반응 사이에는 PBST로 10분간 2회씩의 세척을 실시하였다. 분자량은 prestained molecular size marker(Bio Rad, USA)를 지표로하여 확인하였다.

3. 변의 배양법에 의한 요네병 감염우 진단

가. 배지의 제조

Mycobactin-J가 배지 리터 당 4mg의 수준으로 첨가된 Herrold's egg yolk medium과 mycobactin-J가 첨가되지 않은 대조배지를 제조하였다. 이 둘 두 배지에 오염 세균과 곰팡이의 증식을 억제하기 위하여 amphotericin B(50 μ g/ml), vancomycin(100 μ g/ml)과 nalidixic acid(100 μ g/ml)를 첨가하였다.

나. 변의 처리

직장에서 채취한 변 2 g을 35ml의 멸균증류수가 든 cornical tube에 넣고 잘 흔들어서 균질화시킨후 30분 정치시키고 상층액 5ml를 0.9% hexadecyl-pyridium chloride를 함유한 1/2 BHI broth가 25ml이 든 plastic tube에 첨가하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양된 변을 3,000 ×g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물에 amphotericin B(50 μ g/ml), vancomycin(100 μ g/ml)과 nalidixic acid(100 μ g/ml)의 1ml를 첨가하여 37°C에서 하룻밤 더 배양하였다.

다. 분변의 배양

Herrold's egg yolk medium에 mycobactin-J가 포함된 3개의 tube와 mycobactin-J가 포함되지 않은 1개의 tube 각각에 앞에서 처리된 분변 0.15ml 씩을 접종하여 37°C의 배양기에서 배양하면서 1주 간격으로 16주간 집락의 발육상태를 확인하였다.

4. PCR기법에 의한 요네병 감염우 진단

가. 요네병균의 chromosomal DNA 분리

Herrold's egg yolk medium에 변을 4주간 배양한 후와 육안적으로 집락이 확인된 후에 배지표면을 면봉으로 채취하여 TEN buffer로 세번 세척하고 subtilisin, lysozyme, proteinase K와 10% SDS로 차례로 소화시키고 RNase를 처리한 후에 phenol과 chloroform으로 DNA를 추출하여 최종적으로 TE buffer에 용해시켜 -20°C에 보존하였다.

나. PCR

요네균병균의 IS900 gene을 검출하기 위하여 네 가지의 200 μ M deoxynucleotide triphosphate(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1쌍의 IS900 primer, 2 unit의 Vent[®] DNA polymerase, 10 \times 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 100 μ l

가 되도록 조정하였다. PCR 반응액은 Thermal Cycler 9600(Perkins Elmer Cetus)을 이용하여, 94℃에서 10분간 가열한 후 94℃에서 1분, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분 간의 과정을 35회 반복하여 증폭시킨 후, 최종적으로 72℃에서 15분 동안 증폭된 DNA를 연장시켰다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide 용액으로 30분간 염색하여 UV-transilluminator에서 확인하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 혈청학적인 방법에 의한 감염우 진단

재조합 34KDa 단백질을 사용한 ELISA에서는 총 2,261개의 혈청 중 372개 혈청(16.4%)이 양성반응을 보였다. 그리고 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 immunoblotting에서는 ELISA 양성반응을 보인 총 372개의 혈청 중 75개(3.3%)의 혈청에서 양성반응을 보여 이들 75두의 젖소에서는 변검사에서 세균이 검출될 것으로 예측되었다(Table 1). 또한 요네병 혈청 양성우는 지역에 따라 양성률이 다소 차이를 나타내고 있어 본소 관할지역이 ELISA 양성률 13.1%로 가장 낮게 나타났으며 중부지소 지역의 양성률은 24.3%로 가장 높게 나타났다(Fig 1). 중부지소 지역에서 높은 항체 양성률을 보인 것은 이 지역이 국내에서 요네병이 가장 먼저 발생하여 지역 내에 장기간에 걸쳐 전파가 이루어진 때문으로 생각된다. 또한 지역에 따른 immunoblotting 양성률은 ELISA에서와 비슷한 경향으로 나타나 본소 지역이 가장 낮은 1.0%이었으며 남부지소 지역이 6.8%로 가장 높게 나타났다.

또한 우군별로 ELISA에 의한 요네병의 감염률을 조사한 결과 총 162개 목장 중 109개의 목장에서 1두 이상의 젖소가 양성우로 진단되어 67.3%의 양성율을 보였다(Table 2). 그리고 immunoblotting에 의한 요네병의 감염을 조사에서는 40개 목장에서 양성우가 진단되어 24.7%의 목장에서 요네병균을 배설하는 젖소를 보유하고 있는 것으로 추정되었다.

목장별 젖소의 ELISA에 의한 요네병 감염율을 162개 목장을 대상으로 조사한 결과(Fig 2), 53개 목장(32.7%)에서는 양성우가 검출되지 않았으며 61개 목장에서는 0에서 20%의 ELISA 양성율을 보였다. 그리고 20% 이상의 젖소 양성율을 보이는 목장의 수는 점차 감소하였으며 1개의 목장에서는 검사한 젖소 모두에서 ELISA 양성을 나타내었다.

또한 국립수의과학검역원에서 생산한 항원(ASP)을 사용하여 2,261두 젖소의 혈청에 대하여 수의과학검역원에서 권장하는 방법에 따라 ELISA를 실시한 결과 118두(5.2%)가 ELISA 양성반응을 보여 본 연구에서 생산한 항원을 이용한 ELISA 보나 낮은 검출율을 보였다(Table 3). 그리고 ASP 항원을 사용한 ELISA의 양성혈청은 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 immunoblotting의 양성반응과 일치율이 낮게 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 변으로 요네병균을 배설하는 immunoblotting 양성률은 낮은 수준(3.3%)이었으나, ELISA 반응에서 양성반응을 보여 요네병균에 감염된 감염초기 즉 잠복기로 판단되는 젖소는 상당히 높은 수준을 보여 이들 소가 스트레스를 받거나 나이가 들게되면 변으로 요네병균을 배설할 것으로 예상되어 적절한 요네병관리대책이 강구되어야 할 것으로 생각된다.

Table 1. District related incidence of paratuberculosis of dairy cows
in Kangwon area

District	No. of Cows	No of positive reactor(%)	
		ELISA	Immuno- blotting
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)
Northern branch	266	35(13.2)	6(2.3)
Southern branch	500	81(16.2)	34(6.8)
Total	2,261	372(16.4)	75(3.3)

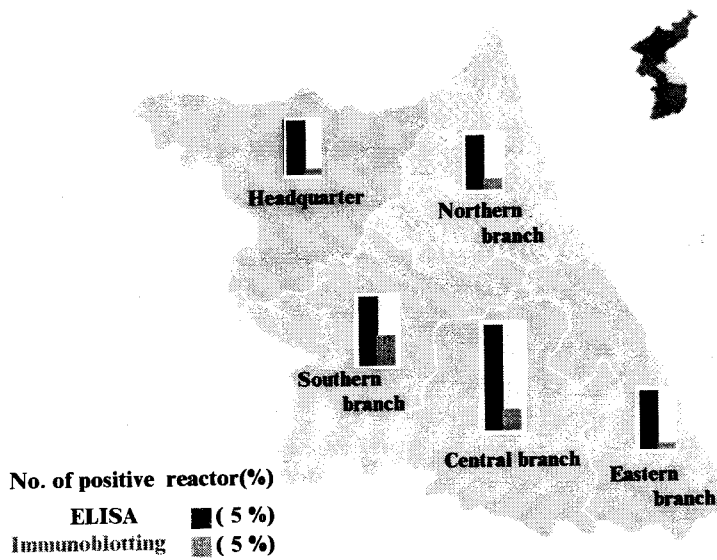


Figure 1. Geographic distribution of 2,261 Kangwon dairy cows tested for paratuberculosis.

Table 2. 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)
Northern branch	16	13 (81.3)	6 (37.5)
Southern branch	43	25 (58.1)	15 (34.9)
Total	162	109 (67.3)	40 (24.7)

Table 3. Comparison of ELISA reaction of 2,261 bovine serums from Kangwon area according to antigens of recombinant 34KDa protein or ASP

ELISA reaction	Positive	Negative	Total
Recombinant 34KDa antigen	372 (16.4%)	1,889 (83.6%)	2,261 (100%)
ASP antigen	118 (5.2%)	2,143 (94.8%)	2,261 (100%)

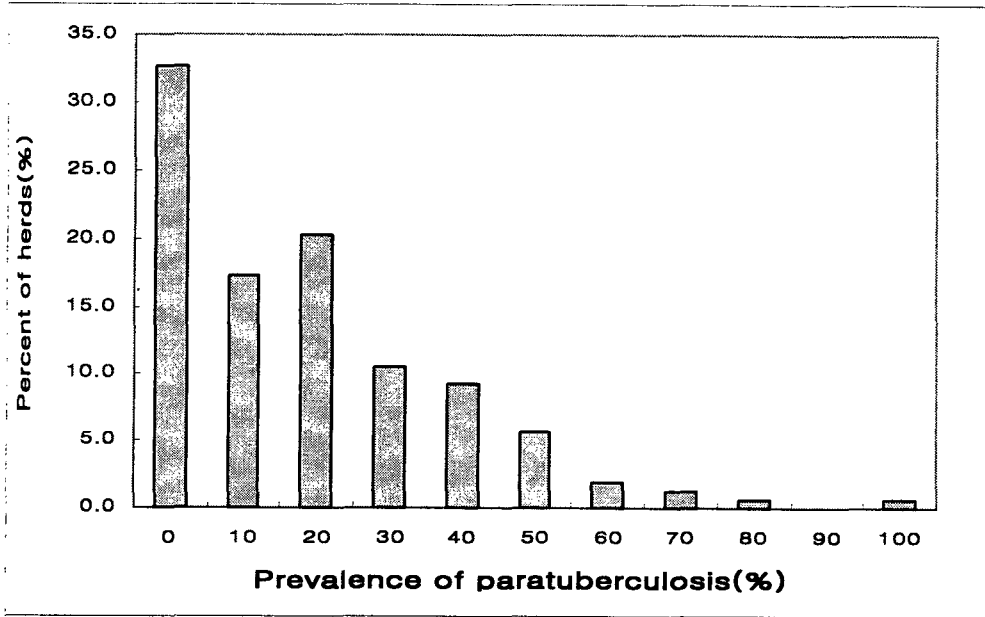


Figure 2. Histogram of the distribution of herd prevalence rates for paratuberculosis among 162 dairy herds in Kangwon area.

2. 변의 배양법에 의한 요네병 감염우 진단

표준균주인 *M paratuberculosis* 19698과 국내분리균주 3주를 사용한 배양 실험에서 배양 6주와 9주째에 세균의 증식이 확인되어 배양방법은 정상적인 것으로 확인되었다.

변의 세균배양을 위하여 ELISA 양성우 110두의 변과 음성우 131두의 변을 배양한 결과 배양 12주째에 ELISA 양성우 변 9개에서 요네병균의 배양이 확인되었으나 ELISA 음성우 변에서는 요네병균의 증식이 확인되지 않았다 (Table 4).

본 연구에서 ELISA 양성우의 세균 검출률이 낮게 나타난 이유는 첫째, 국내의 젖소에서 임상형 요네병의 발병이 적은 점으로 유추해볼 때 국내의 젖소들은 요네병균을 적은 숫자로 배출하기 때문으로 생각되고 둘째, 변배양의 민감도는 대체로 50% 미만인 것으로 밝혀져 세균을 적게 배출하는 젖소의 절반 이상에서 세균이 검출되지 않을 수 있는 때문으로 생각된다.

3. PCR기법에 의한 요네병 감염우 진단

표준균주인 *M paratuberculosis* 19698과 국내분리균 3주를 배양한 배지에서 추출한 chromosomal DNA로 실시한 PCR에서 IS900 gene의 229bp의 PCR 생산물이 확인되어 PCR기법은 정상적인 것으로 판단되었다.

변의 세균배양을 위하여 ELISA 양성우 110두의 변과 ELISA 음성우 131두의 변을 배양한 4주째에 배지표면을 세척하여 chromosomal DNA를 분리하여 PCR을 실시한 결과 ELISA 양성우 변 8개에서 PCR에 의하여 IS900 gene의 증폭이 확인되었으나 ELISA 음성우 변에서는 IS900 gene의 증폭이 확인되지 않았다(Table 4). 그리고 4주째 PCR에서 검출되지 않은 1개의 변에서도 집

Table 4. Result of fecal culture and PCR of 110 feces collected from ELISA positive cows in Kangwon area

District	No. of herds	No. of positive reactor	
		Fecal culture	PCR
Headquarter	25	2	1(1)
Central branch	12	2	2
Eastern branch	18	1	1
Northern branch	22	1	1
Southern branch	33	3	3
Total	110	9	8(9)

락이 육안적으로 확인된 배양 12주째 실시한 PCR에서 IS900 gene이 증폭되었다.

이상의 방법에서 변배양과 함께 배양 4주후에 PCR을 실시하는 경우에는 변배양시 세균의 증식을 확인하는 데 12주 이상이 소요되는 기간을 단축하여 배양 초기에 요네병균의 조기검출이 가능한 것으로 확인되었다.

4. ELISA, 배양법, PCR기법간의 상관관계분석

혈청의 ELISA에 의한 항체가 조사, 변의 배양법, PCR기법에 의한 요네병균 확인법의 각각에 대한 검사의 민감도와 특이도를 조사하였고, 각 검사의 장단점과 상관관계를 조사하였다.

본 연구에서 개발한 재조합 항원을 사용한 ELISA의 민감도는 83.3%이었으며 특이도는 96.7%이었다. 그리고 본 연구에서 개발한 재조합 항원을 사용한 immunoblotting의 민감도는 83.3%이었으며 특이도는 100%이었으나 같은 Mycobacterium 속에 속하는 결핵균과는 면역학적 교차반응을 보이지 않았다.

본 연구에서 확립한 ELISA는 변 내로 세균을 배출하지 않는 요네병의 잠복기 상태와 변 내로 세균을 배출하는 소를 모두 검출할 수 있었다. 그러나 양성우로 진단된 일부의 소(12두, 양성우 3.3%)는 비특이적인 반응에 의하여 요네병으로 오진된 것으로 판단되었다. 한편 immunoblotting은 100%의 특이성을 가지며 변으로 세균을 배설하는 83.3%의 소들을 검출할 수 있으므로 ELISA와 immunoblotting을 같이 적용한다면 도태의 대상이 되는 요네병균을 배설하는 소만을 검출할 수 있었다. 그러나 본 검사에서 확립한 ELISA와 immunoblotting의 민감도는 각각 83.3%로서 요네병균에 감염된 소의 16.7%의 소가 검사에서 음성으로 판정될 수 있으므로 요네병 감염 목적은 6개월마다 반복적으로 검사를 실시하여 immunoblotting과 세균배양에 양성반응을 보

이는 소를 도태하여 다른 소에 감염기회를 차단하여야 할 것으로 생각된다.

또한 IS900 gene을 검출하는 PCR기법은 배양된 요네병균만을 특이적으로 검출할 수 있으므로 Herrold's egg yolk medium에 오염된 세균을 감별할 수 있으며, 배양 4주후에 PCR을 실시하여 변으로 배출되는 요네병균을 조기에 정확하게 검출할 수 있으므로 요네병을 확진하는 데 검사기간을 단축시킬 수 있다.

변배양법은 혈청학적인 검사에서 양성을 보인 소의 요네병을 확진하는 방법으로 이용되지만 검사기간이 12주 이상 걸리며 검사의 민감도가 50% 미만이므로 요네병균을 배설하는 50% 이상의 소가 변검사에서 음성으로 판정될 수 있다.

본 연구에서 총 2,261개의 혈청 중 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 ELISA에서 372개 혈청(16.4%)이 양성반응을 보였다. 그리고 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 immunoblotting에서는 ELISA 양성반응을 보인 총 372개의 혈청 중 75개(3.3%)의 혈청에서 양성반응을 보였다. 또한 변의 세균배양에서 ELISA 양성우 110두중에 변 9개에서 요네병균의 배양이 확인되었으며 이 중 8개가 배양 4주째의 PCR에 의하여 확인되었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 국내의 젖소는 혈청학적인 검사에서 요네병이 외국의 수준 정도로 전국에 걸쳐 높게 이환되어 있는 것으로 추정되지만 젖소의 수명들이 짧기 때문에 임상형으로 진행되는 소는 상대적으로 적은 것으로 판단된다. 그러나 이들 혈청 양성우들은 준임상형으로 진행되다가 분만과 같은 스트레스를 받거나 나이가 들게되면 변으로 요네병균을 배출하는 임상형 요네병으로 진행되는 것으로 생각된다.

제4절 결과요약

본 연구는 지난 2년 동안 본 연구과제에서 확립된 요네병진단에 필요한 세균배양법, PCR진단법, 요네병균에 대한 재조합 특이항원을 이용한 ELISA와 immunoblotting을 이용한 진단법으로 강원도지역의 젖소를 대상으로 요네병의 감염실태를 조사하여 전국적으로 적용할 수 있는 방역대책을 확립하고자 실시하였다.

재조합 34KDa 단백질을 사용한 ELISA에서는 총 2,261개의 혈청 중 372개 혈청(16.4%)이 양성반응을 보였다. 그리고 재조합 34KDa 단백질을 항원으로 사용한 immunoblotting에서는 ELISA 양성반응을 보인 총 372개의 혈청 중 75개(3.3%)의 혈청에서 양성반응을 보였으며 요네병 혈청 양성우는 지역별로 볼 때 지역에 따라 양성율이 다소 차이를 나타내고 있었다. 또한 우군별로 ELISA에 의한 요네병의 양성율은 67.3%이었으며 immunoblotting에 의한 요네병의 양성율은 24.7%이었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 변으로 요네병균을 배설하는 immunoblotting 양성률은 낮은 수준(3.3%)이었으나, ELISA 반응에서 양성반응을 보여 요네병균에 감염된 감염초기 즉 잠복기로 판단되는 젖소는 상당히 높은 수준을 보여 이들 소가 스트레스를 받거나 나이가 들게되면 변으로 요네병균을 배출할 것으로 예상되어 적절한 요네병관리대책이 강구되어야 할 것으로 생각된다.

ELISA 양성우 110두의 변과 음성우 131두의 변을 배양한 결과 배양 12주째에 ELISA 양성우 변 9개에서 요네병균의 배양이 확인되었으나 ELISA 음성우 변에서는 요네병균의 증식이 확인되지 않았다. 변을 배양한 4주째에 배지표면을 세척하여 chromosomal DNA를 분리하여 PCR을 실시한 결과 ELISA 양성우 변 8개에서 PCR에 의하여 IS900 gene의 증폭이 확인되었으나 ELISA 음성우 변에서는 IS900 gene의 증폭이 확인되지 않았다. 변배양과 함께 배양 4주후에 PCR을 실시하는 경우에는 배양 초기에 요네병균의 조기검출이 가능한

것으로 확인되었다.

본 연구에서 확립한 ELISA에서 양성우로 진단된 일부의 소(12두, 양성우 3.3%)는 비특이적인 반응에 의하여 요네병으로 오진된 것으로 판단되었다. 한편 immunoblotting은 100%의 특이성을 가지며 변으로 세균을 배설하는 83.3%의 소들을 검출할 수 있었으므로 ELISA와 immunoblotting을 같이 적용하여 도태의 대상이 되는 요네병균을 배설하는 소만을 검출할 수 있었다. 그러나 본 검사에서 확립한 ELISA와 immunoblotting의 민감도는 각각 83.3%로서 요네병균에 감염된 소의 16.7%의 소가 검사에서 음성으로 판정될 수 있으므로 요네병 감염 목장은 6개월마다 반복적으로 검사를 실시하여 immunoblotting과 세균배양에 양성반응을 보이는 소를 도태하여 다른 소에 감염기회를 차단하여야 할 것으로 생각된다.

제 7 장 요네병의 방역대책 수립

국내의 요네병에 대한 연구의 결과 국내에도 10% 이상의 젖소가 요네병에 감염된 것으로 알려졌지만 요네병에 대한 인식은 아직도 부족한 실정이다. 그러므로 요네병에 대한 방역대책의 수립을 위해서는 요네병의 역학에 대한 지식이 필요하다. 그리고 요네병의 역학에 근거하여 이미 확립된 진단 기법을 활용하여 목장에 요네병 방역대책을 적용함과 아울러 감독하고, 국가적으로 요네병 인증 프로그램의 활용이 필요할 것으로 사료된다.

제1절 요네병의 역학

1. 요네병의 전파

가. 요네병의 임상증상을 나타내는 소는 분변 중으로 다수의 *M paratuberculosis*를 배설한다. 그리고 건강하게 보이는 준임상형은 주로 분변 중으로 소량의 균을 배설한다.

나. 초유, 정액과 기타 다른 분비물도 *M paratuberculosis*를 함유하나 분변에 의한 전파력보다는 약하다.

다. 어미소의 자궁에서 송아지에 감염이 이루어질 수 있어 임상증상을 보이는 어미 소의 새끼중 약 25%는 출산시 *M paratuberculosis*에 감염되어 있다. 준임상형의 어미로부터 수직감염률은 10% 이하로 낮은 편이다.

라. 송아지는 출생시에 *M paratuberculosis*에 대한 감수성이 가장 높으며 나이가 들수록 감수성이 낮아진다. 어미소가 감염되기 위해서는 많은 수의 *M paratuberculosis*에 노출되어야 한다.

마. 자연적으로 오염되거나 실험적으로 오염시킨 장소에서 *M paratuberculosis*의 분리율은 매우 낮으므로 오염된 초지나 운동장에서 요네병의 전파는 용이하지 않다.

바. 면양이나 산양도 *M paratuberculosis*에 감염될 수 있으며 이들은 설사는 하지 않지만 수척해진다. 그러므로 소가 면양이나 산양과 접촉하는 것도 *M paratuberculosis*에 감염되는 한가지 경로이다.

2. 감염으로부터 증상을 나타내기까지 과정

가. 1단계 - 불현성 감염

요네병균이 장점막에서 서서히 자라는 시기로서 어린 송아지를 포함한 2살까지의 육성우의 감염형태이다. 이 시기에는 *M paratuberculosis*에 감염되었을지라도 가장 민감한 실험실 검사로도 이 균을 증명할 수 없다.

나. 2단계 - 준임상형 보균기

이 시기의 소들은 설사는 하지 않으나 면역학적으로는 비정상적으로 혈청 내에 항체가 있거나 세포면역반응을 보인다. 이때의 동물들은 농장주위에 *M paratuberculosis*를 분변으로 배출하여 다른 동물들에게 오염시킬 수 있다. 이들 동물의 일부는 분변 배양에서 음성으로 나타날지라도 분변으로 균을 배출한다.

다. 3단계 - 임상형

전형적인 묽은 스프상태의 변을 배설하지만 혈변은 아니며 이급후증은 없다. 설사는 종종 몇 주 동안 간헐적으로 나타나지만 심박수, 호흡수와 체

온은 정상이다. 점차 수척해지고 악액질로 진행되며 유량은 감소하며 식욕은 정상이나 갈증이 증가한다. 이 시기의 대부분의 소들은 분변검사와 혈청학적 검사시 양성을 나타낸다.

라. 4단계 - 진행된 임상형

이 시기의 동물들은 보통 허약하며 수척하고 심한 설사를 한다. 설사가 심하면 저단백혈증이 나타나고 동물의 상태는 빠른 속도로 악화되며 하악부종이 특징적인 증상이다. 2단계에서부터 4단계까지는 수 주 이내에 진행될 수 있다. 이 단계에서 고기는 사람이 이용하기에 부적합할 수 있으며 대부분의 동물들은 도태해야하고 그렇지 않으면 설사와 점차적인 체력소모로 죽게 된다.

마. 병산 효과

4단계 - 진행된 임상형	1두
3단계 - 임상형	1-2두
2단계 - 준임상형 보균기	6-8두
1단계 - 불현성 감염	10-15두

계	15-25두

만약에 어떤 목장에서 한 마리의 소가 요네병의 특징적인 임상증상을 나타냈다면 이 목장은 약 15-25마리의 소가 요네병에 감염되어 있는 상태이며, 가장 민감한 검사로 발견할 수 있는 감염우는 이 중 25-50% 뿐이다. 그러므로 100마리의 착유우와 100마리의 육성우가 있는 목장에서 한 시점에서

2마리가 임상증상을 나타내는 경우는 나머지 30-50두가 감염되어 있으며 그 중 반 이하만 분변배양으로 검출 할 수 있다. 다른 관점에서 볼 때 성우의 25-30두가 일 회 세균배양시 양성을 나타내었다면 우군의 대다수가 감염되었을 가능성이 높다.

3. 소의 요네병 진단에 이용되는 검사

가. 원인균 분리동정

- 1) 분변배양
- 2) 분변의 현미경 검사
- 3) 회장과 임파절의 조직학적 검사
- 4) 조직으로부터 원인균 배양
- 5) DNA probe 검사
- 6) 분변의 PCR 검사

나. 항체 검사

- 1) 한천-겔 면역확산법(AGID)
- 2) 보체결합반응
- 3) ELISA : 항원으로 원혈질, 순수분리한 원형질, D-항원, 초음파 처리한 항원, LAM(lipoarabinomannan)과 재조합 항원을 사용한다.
- 4) 유즙을 이용한 ELISA

다. 세포매개면역 검사

- 1) Johnin 검사 - 피내 Johnin/정맥내 Johnin

2) Gamma Interferon - 1992년부터 이용되는 새로운 검사법이다.

라. 유전학적 검사

1) DNA probe

2) PCR

4. 요네병 임상증상을 보이는 소에 권장할 만한 진단 검사

가. 한천-겔 면역확산법(AGID): 이 검사는 빠른 시일(3-4일) 내에 수행할 수 있으며 임상형 요네병에 감염되어 있는 소의 95% 이상이 양성을 보인다. 음성으로 판정되었을 때 요네병을 배제할 수 없지만 요네병으로 진단될 가능성은 매우 낮다. 이 검사는 준임상형일 경우 민감도가 떨어진다.

나. ELISA 검사: 이 검사는 빠른 시일(3-4일) 내에 검사가 가능하며, 양성을 나타낸 50%가 배양에서도 양성을 보인다. 그러나 사용되는 항원의 종류에 따라 민감도와 특이도에 차이가 있다. AGID와 ELISA의 검사비용은 개체별 검사시 비슷하다.

다. DNA probe 검사: 이 검사법은 25개 이상의 시료를 검사할 때 실시하며 검사시 고도로 정교한 장비가 요구된다. 양성을 나타내는 동물의 98%가 분변 배양에서 양성을 나타내나 AGID처럼 민감도가 낮다.

5. 요네병에 대한 우군의 선별검사

가. ELISA 검사: 이 검사는 우균에서 요네병 감염우를 찾아내는데 손쉽게 이용되나 감염우를 검출하기 위해서는 권장되지 않는다. ELISA 검사는 다수의 균을 배설하는 감염우를 검출할 수 있으나 분변검사에 의해 감염우로 판정되는 20-30%의 소가 음성으로 판정될 수 있다.

나. 분변 배양 검사

1) 이 검사는 개체별 검사시 가장 민감하며 정확하다. 이 검사의 가장 큰 단점은 균 배양에 12주 이상의 기간이 소요된다는 것이다. 임상 증상이 나타나기 3년전에도 검출이 가능하다. 분변배양은 우균의 개체별 1회 검사시 감염우를 25-50% 정도 검출할 수 있다. 반면에 DNA probe 같은 다른 검사법은 감염우의 10%만을 검출할 수 있으며 혈청학적 검사는 감염우의 50-70%를 검출할 수 있으나 비감염우에서도 양성을 나타낼 수 있다. 12주의 배양시간이 소요된다는 단점을 감안하더라도 임상증상을 나타내기 1-2년 전에 감염우를 조기발견할 수 있다. 분변배양의 결과는 집락수로 나타내며 많은 수의 균을 배설하는 소는 우균으로부터 즉시 도태시킨다. 낮은 집락수를 나타내는 소는 질병을 전파시키는 위험이 상대적으로 낮으므로 도태가 시급하지는 않다.

2) 결과 판정: 음성은 *M paratuberculosis*가 분리되지 않았다는 것이 지 동물이 *M paratuberculosis*에 감염되지 않았다는 것은 아니다. 즉 감염된 동물에서 채취한 시료에서도 균이 검출되지 않을 수 있다. 4개의 시험관 중 하나라도 *M paratuberculosis*와 일치하는 균이 검출되는 개체는 감염되어 요네병균을 배설하는 것으로 간주해야 한다. 양성 판정은 시험관당 평균 집락 수를 기초로 하여 표시한다. 예상되는 집락수 범위는 시험관당 1에서 70 또는 그 이상이다.

3) 집락수 해석에 대한 지침

가) 매우 위험한 수준: 시험관당 집락수 70개 이상. 이 단계의 소들은 대부분 분변에 많은 균을 배설한다. 이 범주의 대부분 동물은 현재 임상증상을 보이거나 가까운 장래에 체중감소와 설사 같은 임상증상을 나타낸다. 최근의 한 연구는 이 단계의 소에서 갓 태어난 송아지의 25-33%가 태반 감염되었다고 보고하였다. 이들 동물의 우유와 초유는 모두 요네병균을 함유하고 있어 송아지에 감염원으로 작용한다. 이들 동물의 대다수는 AGID 검사에서 양성을 나타낸다.

나) 중등도 위험 수준: 시험관당 30-70개의 집락이 관찰된다. 대부분 다음 해에 임상증상을 나타낼 수 있다.

다) 약간 위험한 수준: 시험관당 5-30개의 집락이 관찰된다. 이들 중 50%는 6개월후에 시험관당 약 10개 정도의 숫적 증가를 보이며 50%는 6개월후에 10개 이하로 증가되거나 숫자가 감소된다.

라) 위험성이 낮은 수준 : 시험관당 4개 이하의 집락이 관찰된다. 다른 군과 비교하여 우군과 어린 동물에 전파될 가능성이 가장 적다. 이들 중 대략 10%는 6개월후에 재검사하면 매우 위험한 수준으로 증가하지만 대부분은 점차적으로 증가하여 12개월 내지 24개월 후에 임상증상을 나타낸다.

6. 요네병의 예상되는 감염율(양성우가 그 목장에서 육성되었을 경우)

가. 우군중 지난 해에 임상증상을 나타내었던 수(x)를 측정한다.

나. 가의 숫자(x)에 8-10을 곱하면 분변배양검사서 양성우 숫자가 된다.

다. 나의 결과에 2를 곱하면 우군중 배양시 양성을 나타내는 감염우와 감염되었지만 배양검사에서 검출되지 않은 소의 숫자가 된다.

라. 임상증상우 1두는 다른 16-25두의 소가 감염되었을 가능성을 암시하며 그중 50%는 분변 검사에서 검출될 수 있다.

7. 요네병 진단에 이용될 수 있는 다른 검사방법

가. 회장 또는 회맹 임파절 생검을 위한 우측검부 개복술: 회장의 원위부나 회맹장의 림프절 조직을 acid fast 염색하여 관찰하는 것이 임상형 소를 가장 빠르게 개체별 진단할 수 있는 검사법이다. 경제적 가치가 없는 소를 도태시킬 때 도축장에서 조직을 채취한다.

나. 조직으로부터의 원인균 배양: 요네병을 확진할 수 있는 가장 분명한 방법이나 12-16주가 소요되는 단점이 있다. 외과적으로나 도축장에서 채취한 조직을 이용한다.

다. Gamma interferon: 세포매개 면역의 평가방법으로 자극된 T cell로부터 방출된 gamma interferon을 측정하기 위하여 ELISA기법을 이용한 방법으로 대동물 진단에 새롭게 이용되고 있다. 헤파린으로 처리한 혈액에서 임프구를 분리하여 세포의 일부부를 대조군 시험관과 함께 *M avium*과 *M bovis*를 포함하는 mitogen과 함께 배양시킨다. 이들 각각의 시험관에서 T cell로부터 방출된 gamma interferon을 측정하여 비율을 비교한다. 높은 비율이 관찰되는 시료의 동물은 *M paratuberculosis*에 노출되었음을 암시한다.

제2절 목장의 요네병 관리대책

1. 일반적인 전략

요네병은 치료하지 않는다. 목장에서 요네병의 예방, 통제와 박멸을 위해서는 관리가 중요하다. 감염동물의 검출, 감염정도의 평가, 관리 대책의 강도의 결정과 관리효과의 진행과정을 평가하기 위해서 검사는 가치있는 수단이다. 목장에서 실행할 수 있는 감염우 확인, 적절한 관리와 위생과정을 채용하여 수행할 수 있는 3가지 주요 목표는 다음과 같다.

가. 감수성이 매우 높은 새로 태어난 송아지와 어린 개체가 감염 성우의 분변을 섭취하지 않도록 하고 어미나 오염된 환경 또는 사료로부터 격리시킨다.

나. 모든 감수성 개체들이 오염된 사료나 음수를 통하여 낮은 수준으로 감염된 분변을 섭취하지 않도록 예방한다.

다. 환경으로부터 세균을 제거하고 균을 배설하는 감염동물의 수를 감소시켜 *M paratuberculosis*의 목장내 수준을 감소시킨다.

처음과 두번째 목표는 위생과 목장에 이익이 되는 적절한 관리를 통하여 달성할 수 있다. 세번째 목표는 더 엄격한 위생관리, 그리고 요네병에 대한 특이적인 검사와 도태에 의해서 달성할 수 있다. 주어진 감염수준에서 질병의 초기 단계에 검사하고 도태할수록 우군에서 요네병을 조기에 감소시키거나 박멸시킬 수 있다.

2. 요네병의 특별관리 방법

소에서 요네병 관리대책의 특이성과 강도는 각 목장의 상황에 따라 다양하다. 적절하고 효과적으로 관리하기 위해서는 목장의 현재와 미래의 목표에 적합하고 이용가능한 자원에 부합되어야 한다. 많은 특별관리방법들이 위에서 제시한 세가지 목표를 달성하는데 이용되고 있으나 감염과정을 차단하기 위한 가장 효과적이고 실용적인 방법은 다음의 방법들이다.

가. 신생 송아지와 육성우의 관리는 가장 중요하며 가장 효과적이다. 어린송아지는 깔짚을 충분히 깔 건조하고 변이 없는 청결한 곳에서 분만시킨다. 한 장소에서 한 마리만 사육하거나 동시에 적은 수만 사육해야 한다. 어미와 유두와 유방은 청결하게 관리한다. 가장 효과적인 관리방법은 어미와 어미 사육환경에서 출생 즉시 송아지를 격리시켜 분변으로 감염될 기회를 차단한다.

초유는 유방과 우유에 *M paratuberculosis*가 함유되지 않은 건강한 어미로부터 채취하여 1시간이나 2시간 안에 급여한다. 대용유 급여는 전유나 집합유를 통한 송아지의 감염의 기회를 줄여준다. 대용유의 급여는 특히 심하게 감염된 우군에서 고려해 보아야 한다.

어린 송아지와 처녀우는 성우로부터 격리사육하며 성우의 분변에 직접적으로 접촉하지 않도록 한다. 사육시설을 분리시키는 것이 이상적이지만 공간을 구획으로 분리하거나 건조된 통로로 완충지역을 만드는 것이 효과적이다. 오염된 사료를 급여하지 말고, 관리자의 발이나 장비에 분변이 오염되지 않도록 주의한다.

나. 나이든 소가 낮은 수준의 세균에 노출되는 것을 막는 것이 중요하다. 사료나 음수가 분변에 오염되는 것을 예방한다. 분변을 치우는데 쓰는 장비를 사료를 취급하는 데 사용하지 말아야 한다. 음수용 자연수에 소들이

접근하지 못하도록 하고 넘쳐 흐르는 분변을 수거하여 처리한다.

다. 감염된 소를 확인하고 그 소와 분변을 함께 제거하는 것은 모든 가족이 지속적으로 요네병균에 노출되는 위험을 줄이는 중요한 수단이다. 균을 배설하는 감염우를 검출하기 위해 1산 이상의 우군 전체를 검사한다. 결과분석에 의거하여 경제적으로 허용하는 범위 내에서 많은 균을 배설하는 개체는 도태시킨다.

전체 우군을 검사한 후 과감히 도태하는 방법은 우군의 감염을 줄이는데 매우 효과적인 방법이다. 적절한 관리도 동시에 행하여야 한다. 적절한 관리와 함께 검사와 도태를 적용하면 요네병을 효과적으로 관리할 수 있고 부분적으로 시행하는 것보다 단시간에 관리할 수 있다. 검사와 도태의 횟수는 목장의 실정에 맞게 조정한다. 감염된 우군에서 간단하고 가장 효과적인 접근 방법은 모든 소들이 감염되었고 모든 분변에 균이 있다고 가정하고 소들을 관리하는 것이다. 검사와 도태가 적절하지 못한 목장에서는 이러한 관리 방침을 항상 적용하는 것이 중요하다. 임상증상을 보이는 소는 주변을 더 오염시키고 도태가치가 상실되기 전에 조기에 검사하여 도태시킨다. 이들은 매일 무수한 세균을 배설한다. 확실하지 않으면 격리하거나 확진검사를 실시하여 도태시킨다.

위생적 관리를 대체할 방법을 없다. 세균이 있을 가능성이 있는 분변은 가능하면 자주 제거하도록 노력한다. 같은 계절에 수확하거나 방목시킬 초지에 분변을 시비하지 않도록한다.

라. 새로 소를 입식시킬 때는 감염되지 않는 소를 입식한다. 구입할 소를 주의하여 검사한다. 검사결과 음성인 우군, 요네병 경력이 없는 우군과 청결한 목장으로부터 소를 구입한다. 소를 입식하기 전에 혈청학적 검사와

분변 배양 검사는 감염의 위험성을 줄인다.

3. 요네병관리대책의 목표

낮은 수준과 중등도로 감염된 우군에서는 검사와 도태 그리고 관리 대책을 조화롭게 실행하면 1-3년 안에 임상형 소를 모두 제거할 수 있으며, 모든 감염우는 5-7년 안에 없앨 수 있다. 그래서 세대를 반복할수록 감염동물이 적어질 것이며 점차 모든 소가 세균 비배출우가 되어 마침내 감염은 사라질 것이다. 감염우가 완전히 제거되는 것은 요네병 증상이 우군에서 관찰되지 않는 몇 년 후나 가능하다. 그러나 예방관리대책을 지속적으로 실시하지 않을 경우에는 요네병이 재발할 가능성이 있다. 감염이 보다 만연되어 더 심각한 우군은 집중적인 관리대책이 필요하고 요네병을 제거하기 위해서는 수 년이 걸린다. 그렇지만 실용적인 관리대책과 철저한 우군 관리는 목장에서 임상증상을 제거할 수 있으며 요네병으로 인한 경제적 손실을 최소한으로 줄일 수 있다.

제3절 요네병 인증 프로그램

이 프로그램은 1993년에 미국의 Animal Health Association에서 요네병 관리를 표준화하기 위하여 개발된 것으로 미국에서 뿐만 아니라 국제적으로 적용될 수 있도록 요네병관리를 위한 권장사항을 기술하고 있다. 국내에서는 국공립 기관이 관리하고 있는 목장이나 종축을 판매하는 목장의 형편에 따라 요네병 인증프로그램을 수정하여 활용할 수 있을 것이다.

1. 우군의 정의

가. 하나 또는 여러 시설(동)로 구성되어 하나의 소유 주체에 의하여 관리되는 모든 소들이 해당된다.

나. 둘 또는 그 이상의 시설(동)에서 사육되는 소들은 지리적으로는 나뉘어져 있지만 소들의 위치가 서로 바뀌거나 각 동 사이에 접촉할 수 있는 공간이 있는 곳에서 사육되는 모든 소들이 해당된다. 일반적으로 관리하는 각 동 사이의 동물은 특별히 축주나 관리자에 의하여 관리되지 않으면 접촉할 수 있다고 가정해야 한다.

2. 인증 등급

1등급: 한 번의 검사에서 전 우군이 음성

2등급: 두 번의 검사에서 전 우군이 음성

3등급: 세 번의 검사에서 전 우군이 음성

4등급: 네 번의 검사에서 전 우군이 음성

5등급: 5번의 검사에서 전 우군이 음성

감시중인 5등급: 여섯 번 이상의 검사에서 전 우군이 음성

3. 인증 프로그램에 참여하기 원하는 우군의 등급

가. 적어도 1년 이상된 우군 또는 요네병 인증 우군으로부터만 직접 모은 우군

나. 인증 우군으로부터 직접 모은 우군은 인증 등급이 가장 낮은 우군의 수준으로부터 시작한다. 새로 모은 우군의 첫번째 검사에서 음성이 나오면 다음 등급의 인증 등급을 부여한다.

4. 개체 표식

가. 모든 동물은 플라스틱 이표나 목걸이보다 더 영구적인 표식을 해야 한다.

나. 등록이나 가입번호가 기록된 귀의 문신, USDA의 표준 금속 이표, 또는 전자ID 같은 것이 영구적 표식에 해당된다.

5. 검사 대상 동물

가. 연차 인증검사: 24개월 이상된 모든 소는 검사를 받아야 한다.

나. 우군에서 제외시키기 위한 소: 요네병의 임상증상을 보여 우군에서 제외시킬 모든 소.

다. 우군에 입식시킬 소: 입식시키기 전에 혈청 항체 시험에서 음성이어야 하며 입식후 15일 이내에 *M paratuberculosis* 검출을 위한 분변시료를 실험실에 의뢰해야 한다.

6. 검사 간격

가. 인증우군은 14개월(± 2 개월)마다 검사받아야 한다.

나. 16개월 이내에 검사받지 않으면 인증자격을 상실하며 다음 검사에서 전 우군이 음성이면 1등급의 인증을 받는다.

7. 검사기관

가. 요네병 인증 프로그램을 위한 모든 검사는 공인된 실험실에서 실시하여야 한다. 실험실 공인은 해마다 실시하는 혈청항체검사와 *M paratuberculosis* 검출 검사의 만족스런 수행에 근거하여 주어진다.

8. 채취할 검사시료

가. 연차 인증검사

1) 1, 3, 5등급: *M paratuberculosis*의 혈청항체 검출(ELISA에 의한)을 위한 혈액

2) 2, 4등급: 변배양에 의한 *M paratuberculosis* 검출을 위한 변

3) 5등급: 축주의 의견에 따라 검사방법을 선택하여 모니터한다.

나. 요네병의 임상증상을 나타내어 제외시킬 소

혈청항체 검사를 위한 혈액과 원인균 검출을 위한 변을 채취한다.

9. 검사방법

가. 혈청항체 검사

소의 혈청에 있는 *M paratuberculosis* 항체를 검출하기에 충분한 정도의 민감도와 특이도를 갖는 어떠한 검사도 좋다. “충분한 정도의 민감도와 특이도”란 개념은 해마다 실시하는 check test의 실행결과와 프로그램에 의해 설정된 기준의 숙달 정도에 근거하여 정한다.

참조: 프로그램 초기에는 *M paratuberculosis* 검출을 위해 USDA에서 허가한 ELISA가 추천될 수 있다.

나. *M paratuberculosis* 검출 검사

소의 변에 있는 *M paratuberculosis*를 검출하기에 충분한 정도의 민감도와 특이도를 갖는 어떠한 검사도 좋다. “충분한 정도의 민감도와 특이도”란 개념은 해마다 실시하는 check test의 실행결과와 프로그램에 의해 설정된 기준의 숙달 정도에 근거하여 정한다.

참조: 프로그램 초기에는 변배양검사가 추천될 수 있다. 더 나아가 변배양은 check test를 능숙하게 실행하는 시험소는 반드시 실시하여야 한다.

10. 시료의 채취

모든 혈액과 변 시료는 공인된 수의사에 의해서 또는 감독하에 채취하여야 한다.

11. 수의사의 확인

검사시료를 채취하거나 채취를 감독한 수의사는 동물에서 채취한 시료가 시료에 기록한 번호와 동일하다는 것을 확인해야 한다.

12. 목장주/관리자의 확인

목장주나 관리자는 다음을 확인하여야 한다.

가. 최초 검사 시: 우군이 최소 1년 이상 존재하였거나 인증된 우군으로부터만 모은 우군인 사실

나. 매번 검사 시: 24개월 이상된 모든 소를 검사에 포함시키고 시료를 채취한다.

다. 매번 검사 시: 우군 중 전 번의 검사에서 제외된 동물의 목록

라. 매번 검사 시: 전 번 검사 이후 우군에 추가된 동물이나 새로 입식되어 검사할 동물의 목록

마. 매번 검사 시: 요네병 양성이나 임상증상을 나타내는 소가 우군에 남아있지 않다는 축주의 자필 확인서

13. 양성 동물의 정의

동물의 조직이나 변에 있는 *M paratuberculosis*가 검출검사서 확인되었을 때 양성으로 판정한다.

14. 우군 검사에서 양성 동물이 확인될 때

인증 우군 검사에서 양성 동물이 확인되면 인증자격이 상실된다. 다음 번 검사에서 우군이 음성으로 확인되면 1등급을 인증받게 된다.

15. 혈청항체 검사에서 양성 동물이 확인될 때

가. 혈청항체 시험에서 양성 동물은 가능한 빠르게 (혈액을 채취한 지 120일 이내에) *M paratuberculosis* 검출방법으로 재검사를 받아야한다.

나. 인증 우군은 *M paratuberculosis* 검출 검사 결과가 나올 때까지는 현 상태의 인증을 유지할 수 있다.

다. *M paratuberculosis* 검출검사서 음성이라면 우군의 등급을 한 등급 더 상승시킨다.

라. 혈청항체 검사 결과를 기다리는 동안에 우군에서 동물을 제거하려면 그 동물의 변 시료를 채취하여 실험실에 의뢰한다. 항체검사결과 양성이면 변에서 *M paratuberculosis*의 검출검사를 실시하여야 한다!

마. 120일 안에 재검사를 하지 않으면 인증자격을 상실하게 된다. 다음 검사에서 전 우군이 음성이면 1등급 인증을 받게 된다.

16. 인증 우군에서 사온 소가 양성으로 확인될 때

가. 음성으로 인증받은 우군에서 구입한 소가 구입한 지 16개월 이내에 균 검출 시험에서 양성으로 확인되면, 판매한 인증 우군은 통보받은 지 120일 이내에 모든 가능성이 있는 소를 대상으로 혈청항체 시험과 균 검출시험을 재실시하여야 한다.

나. 판매한 인증 우군은 검사 결과가 나올 때까지 현재의 인증 등급을 유지한다.

다. 우군의 재검사 결과가 음성이면 그 우군은 현재의 인증 등급을 유지한다. 그 우군의 목장주나 관리인은 현재의 검사일정을 유지하거나 재검

사 후 14개월까지는 다음 검사를 하지 않는 새로운 일정을 선택할 수 있다.

라. 양성우가 재검사 결과 양성우로 확인되면 판매한 우군은 인증자격을 상실한다. 다음에 음성으로 판정된다면 그 우군은 1등급의 인증을 받는다.

17. 우군관리방침

*M. paratuberculosis*는 여러 종류의 가축이나 야생 반추수에 감염되어 질병을 유발할 수 있다. 요네병 인증 우군에 외부의 유전인자를 도입하면서 외부로부터 요네병이 들어오는 위험을 최소화하기 위하여 다음과 같은 관리 방침을 추천한다.

가. 가축의 입식

인증되지 않은 우군으로부터 소를 입식하면 요네병이 도입될 위험이 크다. 따라서 완전히 폐쇄된 우군이 권장된다. 인증 우군에서 소를 새로 입식한다면 요네병 인증 등급이 동등하거나 높은 등급의 우군에서 소를 구입한다. 인증 등급이 같거나 높은 상태의 인증 우군으로부터 소를 구입하지 않았다면 목장으로 도입하기 전에 요네병의 혈청항체 검사에서 음성 판정의 소를 입식한다. 인증 우군에 도착하면 도착한지 120일 이내에 혈청항체 검사와 *M. paratuberculosis* 검출 검사를 재실시할 때까지는 1세 이하의 소와 격리시켜 관리한다.

나. 정액

정액을 통한 요네병 전파의 위험성은 적다. 그러나 요네병 임상증상을 보이는 감염된 숫소의 정액에는 *M. paratuberculosis*가 배출될 수 있다. 그러므로 요네병 임상 증상을 보이는 숫소에서 채취한 정액은 사용하지 말아

야 한다.

다. 태아

수정란이식을 통한 요네병 전파의 가장 큰 위험성은 요네병 감염 상태가 밝혀지지 않은 소를 공란우로 사용하는 것이다. 감염된 공란우는 목초지와 송아지 칸을 *M paratuberculosis*로 오염킬 수 있으며 송아지에게 감염을 전파시킬 수 있다. 그러므로 요네병 인증 우군으로부터 공란우를 선별하여야 한다. 수정란을 통한 요네병 전파의 위험성은 이론적으로 가능하지만 실제적으로는 가능하지 않다. 요네병 임상 증상이 있는 어미 소로부터 수정란을 이식받는 것은 요네병 전파의 위험성이 낮지만 권장되지 않는다.

라. 야생 반추수

목초지 또는 사육환경이 야생 반추수에 노출되는 것을 가능한 한 피한다.

마. 혼사

요네병 인증 우군은 양, 산양 또는 사슴과 혼사시키거나 방목되지 않게 한다.

바. 울타리

요네병 감염 상태가 밝혀지지 않은 동물과 울타리를 사이에 두고 접촉하는 것은 *M paratuberculosis*에 노출될 위험성은 낮다. 그렇지만 가능한 피하는 것이 좋다.

제4절 요약

요네병에 대한 방역대책의 수립을 위해서는 요네병의 역학에 대한 지식이 필요하다. 그러므로 요네병의 역학에 대하여 간단히 기술하고 목장의 요네병 방역대책과 요네병 인증 프로그램에 대하여 기술하였다.

1. 일반적인 전략

요네병은 치료하지 않는다. 목장에서 요네병의 예방, 통제와 박멸을 위해서는 관리가 중요하다. 감염동물의 검출, 감염정도의 평가, 관리 대책의 강도의 결정과 관리효과의 진행과정을 평가하기 위해서 검사는 가치있는 수단이다. 목장에서 실행 할 수 있는 감염우 확인, 적절한 관리와 위생과정을 채용하여 수행할 수 있는 3가지 주요 목표는 다음과 같다.

가. 감수성이 매우 높은 새로 태어난 송아지와 어린 개체가 감염 성우의 분변을 섭취하지 않도록 하고 어미나 오염된 환경 또는 사료로부터 격리시킨다.

나. 모든 감수성 개체들이 오염된 사료나 음수를 통하여 낮은 수준으로 감염된 분변을 섭취하지 않도록 예방한다.

다. 환경으로부터 세균을 제거하고 균을 배설하는 감염동물의 수를 감소시켜 *M paratuberculosis*의 목장내 수준을 감소시킨다.

요네병 인증 프로그램은 1993년에 미국의 Animal Health Association에서 요네병 관리를 표준화하기 위하여 개발된 것으로 미국에서 뿐만 아니라 국제적으로 적용될 수 있도록 요네병관리를 위한 권장사항을 기술하고 있다. 국내에서는 국공립기관이 관리하고 있는 목장이나 종축을 판매하는 목장의 형편에 따라 요네병 인증프로그램을 수정하여 활용할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

제 1 장

Abbas B, Reiman HP, Lonnerdal B. Isolation of specific peptides from *Mycobacterium Paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's Disease) in cattle. *Am J Vet Res*, 1993;44:2229-2236.

Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Frandsen PL, et al. Comparison of subjective and objective test evaluations for use of *Mycobacterium phlei*-adsorbed serum in a dot-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Am J Vet Res*. 1992;53:1386-1391.

Chiodini RJ, Kruiningen HJ, Van Merkel RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's Disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet*, 1984;74:218-262.

Cho SN, Brennan PJ, Yoshimura HH, et al. Mycobacterial aetiology of Crohn's disease: serologic study using common mycobacterial antigens and a species-specific glycolipid antigen from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Gut*. 1986;27:1353-1356.

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*, 1993;31:947-954.

Dilisle GW, Sequin P, Samagh BS, et al. Bovine paratuberculosis, I. A herd study using complement fixation and intradermal tests, *Can J Comp Med*, 1980;44:177-182.

Gilot P, De Kesel M, Machtelincky L. Isolation and sequencing of the gene coding for an antigenic 34-Kilodalton protein of *Mycobacterium Paratuberculosis*. *J Bacteriol*, 1993; 175:4930-4935.

Jeon YE, Lee BW, Kim JB, et al. Isolation and identification of mycobactin dependent acid-fast bacteria (*Mycobacterium paratuberculosis*) from bovine fecal material. *Korean J Vet Res*, 1984;24:58-63.

Johnson IY, Kaneene JB. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am J Vet Res*. 1999;60:589-596.

Kim, YG, Nielsen SB, Gordon JC, et al. Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am J Vet Res*, 1989;50:1110-1113.

Koh SH, Dobson KJ, Tomsovic A. A Johne's disease survey and comparison of diagnostic tests. *Australian Vet J*, 1988;65:160-161.

Larsen AB, Staheim OHB, Hughes DS, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *JAVMA*, 1981;179:169-171.

Milner AR, Mack WN, Coates KJ, et al. The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Vet Microbiol*, 1990;25:193-198

Nordlund KV, Goodger WJ, Pelletier J, et al. Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc*. 1996;208:1872-1876.

Rohde RF, Shulaw WP. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. *JAVMA*, 1990;11:1482-1483.

Sherman DM, Markham RJF, Bates F. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 1984;185:179-182.

Spangler L, Nielsen SB, Heider IS. A prospective evaluation of an

enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and agar gel immunodifusion test(AGIT) relative to fecal culture in the diagnosis of clinical and subclinical paratuberculosis in cattle in central Ohio. *Acta Vet Scand S*, 1988;84:243-245.

Sugden EA, Corner AH, Samagh BS, et al. Serodiagnosis of ovine paratuberculosis using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res*, 1989;50:850-854.

Whitlock RH, Hutchinson LT, Glickman LT, et al. Paratuberculosis (Johne's Disease) update. *The bovine practitioner*, 1986;21:24-30.

Yokomizo Y, Merkal RS, Lyle PAS. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 1983;44:2205-2207.

김종만, 안종삼, 우승룡, 조동희, 조윤상, 박정문, 윤용덕, 장국현. 면역학적인 방법에 의한 한우와 유우의 요네병 발생조사. *대한수의학회지*, 1994;34(1):93-97.

제 2 장

Kim, YG, Nielsen SB, Gordon JC, et al. Comparison of two methods for

isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am J Vet Res*, 1989;50:1110-1113.

Koenig GJ, Hoffsis GF, Shulaw WP, et al. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. *Am J Vet Res*, 1993;54:1441-1445.

Shin S, Lein D. New methods for reduction in bacterial and fungal contamination from fecal culture for *Mycobacterium Paratuberculosis*. *US Ani Health Assoc Mtg Las Vegas*, 1989.

Sockett DC, Carr DJ, Collins MT. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in cattle. *Can J Vet Res*, 1992;56:148-153.

Streeter RN, Hoffsis GF, Beck-Nielsen S, Shulaw WP, et al. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res*, 1995;56:1322-1324.

Sweeney RW, Whitlock RH, Hamir AN, et al. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am J Vet Res*, 1992;53:1312-1314.

Taylor TK, Wilks CR, McQueen DS. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet Rec*, 1981;109:522-533.

Whipple DL, Callihan DR, Jarnagin JL. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J Vet Diagn Invest*, 1991;3:368-373.

Whitlock RH, Rogenberger A, Spencer PA. Laboratory culture technique for Johne's disease: A critical evaluation of contamination and incubation times. *Proc 93rd Annu Mtg Us Animal Health Assoc*, 1989:383-386.

제 3 장

Bucher PD, McFadden JJ, Taylor JH. Investigation of mycobacteria in Crohn's disease tissue by southern blotting and DNA Hybridisation with cloned mycobacterial genomic DNA probes from a Crohn's disease isolated mycobacteria. *Gut*, 1988;29:1222-1228.

Collins DM, Gabric DM, De Lisle GW. Identification of two group of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol*, 1990;28:1591.

Dell'Isola B, Poyart C, Goulet O, et al. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. *JID*, 1994;169:449-451.

Gelfand DH. Taq DNA Polymerase. In: PCR technology: principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press, 1989:17-22.

Green EP, Tizard MLV, Moss MT, et al. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, 1989;17:9063-9073.

Hung T, Mak K, Fong K. A specific enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1990;18:4953.

Loewy ZG, Pottathil R. Polymerase chain reaction and its use in diagnostics. In: diagnostics in the year 2000. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993:389-410.

Poupart P, Coene M, Heuverswyn HV, et al. Preparation of a specific DNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J Clin Microbiol*, 1993;31:1601-1605.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer directed enzymatic

amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988;239:487-491.

Sockett DC, Carr DJ, Collins MT. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in cattle. *Can J Vet Res*, 1992;56:148-153.

Thoen CO, Haagsma J. Molecular techniques in the diagnosis and control of paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1996;209:734-737.

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. 1990;28:933-937.

Whipple DL, Karke PA, Andrews RS. Analysis of restriction endonuclease fragment pattern of DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol*, 1989;19:189-194.

제 4 장

Abbas B, Riemann HP, Lonnerdal B. Isolation of specific peptides from *Mycobacterium paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of

paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. *Am J Vet Res.* 1983;44:2229-2236.

Bech-Nielsen S, Burianek L, Spangler E, et al. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* antigenic proteins. *Am J Vet Res.* 1985;46:2418-2420.

Brooks BW, Young NM, Watson DC, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* Antigen D: Characterization and evidence that it is a bacterioferritin. *J Clin Microbiol*, 1991;29:1652-1658.

Chiodini RJ. Biochemical characteristics of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 1986;47:1442-1445.

Cho SN. Expression of the MPB70 protein of *Mycobacterium bovis* and use in the serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Kor J Vet Publ Hlth*, 1998;22:103-112.

Colston A, McCornell L, Bujdoso R. Cloning and expression in *E. coli* of DNA encoding a 60 kDa stress protein of *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease. *Microbiology*, 1994;140:3329-3336.

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*, 1992;36:201-212.

De Kesel M, Gilot P, Misonne MC, et al. Cloning and expression of portions of the 34-Kilodalton protein gene of *Mycobacterium aratuberculosis* : its application to serological analysis of Johne's disease. *J Clin Microbiol*, 1993;31:947-954.

EL-Zaatar EK, Naser SA, Engstrand L, et al. Identification and characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant protein expressed in *E. coli*. *Current Microbiol*, 1994;29:177-183.

El-Zarrtari EK, Naser SA, Graham DY. Characterization of a specific *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant clone expressing 35,000-Molecular-Weight antigen and reactivity with sera from animals with clinical and subclinical Johne's disease. *J Clin Microbiol*, 1997;35:1794-1799.

Gilot P, De Kesel M, Machtelincky L. Isolation and sequencing of the gene coding for an antigenic 34-Kilodalton protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Bacteriol*, 1993; 175:4930-4935.

Mutharia LM, Moreno W, Raymond M. Analysis of culture filtrate and cell wall-associated antigen of *Mycobacterium paratuberculosis* with monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 1997;65:387-394.

Sugden EA, Asmagh BS, Bundle DR, et al. Lipoarabinomannan and lipid free arabinomannan antigens of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect Immun*, 1987;55:762-770.

Sugden EA, Brooks BW, Young NM, et al. Chromatographic purification and characterization of antigen A and D from *Mycobacterium paratuberculosis* and their use in enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Paratuberculosis in sheep. *J Clin Microbiol*, 1991;29:1959-1963.

White WB, Whipple DL, Stabel Jr, et al. Comparison of cellular and extracellular proteins expressed by various by isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* and other mycobacterial species. *Am J Vet Res*, 1994;55:1399-1405.

제 5 장

Burnside DM, Rowley BO. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Am J Vet Res*. 1994;55:465-466.

Collins MT, Angulo A, Buergelt CD, et al. Reproducibility of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis among eight laboratories. *J Vet Diagn Invest*.

1993;5:52-55.

Collins MT, Socket DC, Ridge S, et al. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J Clin Microbiol.* 1991;29:272-276.

Collins MT, Socket DC. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1993;203:1456-1463.

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.* 1991;68:157-160.

Milner AR, Mack WN, Coates KJ, et al. The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Vet Microbiol.* 1990;25:193-198

Sockett DC, Conard TA, Thomas CB, et al. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1134-1139.

Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, et al. Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium*

paratuberculosis in milk. *Am J Vet Res.* 1994;55:905-909.

Vannuffel P, Gilot P, Limbourg B, et al. Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1211-1216.

Woodruff TS, Shulaw WP, Bech-Nielsen S, et al. Serodiagnosis of bovine paratuberculosis by use of a dot enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res.* 1991;52:217-221.

Yokomizo Y, Merkal RS, Lyle PAS. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res,* 1983;44:2205-2207.

제 6 장

Braun RK, Burgelt CD, Littell R, et al. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. *J Am Vet Med Assoc.* 1990;196:1251-1254.

Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ, et al. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *JAVMA,* 1994;204:636-641.

Goodger WJ, Collins MT, Nordund KV, et al. Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;208:1877-1881..

Green EP, Tizard MLV, Moss MT, et al. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, 1989;17:9063-9073.

Hines SA, Buergelt CD, Wilson JH, et al. Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *JAVMA*, 1987;6:681-683.

Johnson IY, Kaneene JB. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am J Vet Res.* 1999;60:589-596.

Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, et al. Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am J Vet Res.* 1994;55:905-909.

김종만, 안종삼, 우승룡, 조동희, 조윤상, 박정문, 윤용덕, 장국현, 면역학적인 방법에 의한 한우와 유우의 요네병 발생조사. *대한수의학회지* 1994;34(1):93-97.

제 7 장

Benedictus G, Bosha J. Paratuberculosis: A surgical method of diagnosis in practice, *Vet Qrt*, 1985;7:217-221.

Centikaya B, Egan K, Harbour DA, et al. An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in cattle in south west England. *Epidemiol Infect*, 1996;116:373-379.

Chiodini RJ, Kruiningen HJ, Van Merkel RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's Disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet.*, 1984;74:218-262.

Collins MT, Socket DC. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*. 1993;203:1456-1463.

Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ, et al. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *JAVMA*, 1994;204:636-641.

Goodger WJ, Collins MT, Nordund KV, et al. Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1996;208:1877-1881.

Gay JM, Sherman DM. Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. *Vet Medicine*, 1992:133-1139.

Hietala SK. The options in diagnosing ruminant paratuberculosis. *Vet Med*, 1992:1122-1131.

Johnson IY, Kaneene JB. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am J Vet Res*. 1999;60:589-596.

Koh SH, Dobson KJ, Tomsovic A. A Johne's disease survey and comparison of diagnostic tests. *Australian Vet J*, 1988;65:160-161.

Kreeger JM. Ruminant paratuberculosis - a century of progress and frustration. *J Vet Diagn Invest*, 1991;3:373-383.

Larsen AB, Merkal RS, Cutlip RC. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 1975;36:255-257.

Merkal RS, Larsen AB, Booth GD. Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res*. 1975;36:837-833.

Merkal RS, Whipple DL, Sacks JM, et al. Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the

United States. *JAVMA*, 1987;190:676-680.

Spangler E, Heider LS, Bech-Nielsen S, et al. Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. *Am J Vet Res*. 1991;52:1197-1200.

Thoen O, Baum KH. Current knowledge on paratuberculosis. *JAVMA*, 1988;192:1609-1611.

Whipple D. Quest continue for fast, reliable test for bovine paratuberculosis. *JAVMA*, 1990;3:299-304.

Whitlock RH, Hutchinson LT, Glickman LT, et al. Paratuberculosis (Johne's Disease) update. *The bovine practitioner*, 1986;21:24-30.

부록 1

변에서 *M paratuberculosis* 검출을 위한 배양 방법

변 2g을 채취

↓

원심분리용 튜브에 35ml의 증류수와 혼합하고, 상온에서 30분간 놓아둔다

↓

상청액 5ml를 채취

↓

25ml의 0.9% HPC in 1/2 × BHI broth solution이 들어있는 50ml 원심분리용 tube에 섞는다.

↓

35-37°C에서 18-24시간 동안 배양한다.

(Germination step - I)

↓

10°C에서 3000g의 상대원심력으로 20분간 원심분리한다.

↓

상청액을 제거하고, 1ml의 항생제 혼합액으로 다시 현탁시킨다.

(BHI + 100, 100, 50 μ g [NVM])

↓

35-37°C에서 하루밤 동안 배양한다.

(Germination step - II)

↓

HEY/AB W/J 배지 3tube와 HEY/AB W/O/J 배지 1tube에 0.15ml씩 접종한다.

* 항생제 혼합액: 시약 준비 참조

* HEY/AB W/J(Herroid's egg yolk medium에 항생제와 mycobactin-J 첨가)

* HEY/AB W/O/J(Herroid's egg yolk medium에 항생제를 첨가하고 mycobactin-J 첨가하지 않음)

배지와 변 처리에 필요한 시약

Amphotericin B (Fungizone) - 100mg per vial (Sigma, Catalog # A 9528)

Vancomycin hydrochloride (Sigma, Catalog # V 2002)

Nalidixic acid sodium salt (Sigma, Catalog # N 4382)

Brain heart infusion broth powder(BHI) (BBL, Catalog # 99070)

Cetypyridinium chloride (Hexadecylpyridium Chloride, HPC) (Sigma,
Catalog # C 9002)

Malachite green (Oxalate salt) (Sigma, Catalog # M 6880)

Mycobactin-J (Allied Monitor Inc, Fayette, MO 65248)

Glycerin

Peptone (Difco, Catalog # 0118-01-8)

NaCl

Noble-agar (Difco, Catalog # 0142-01-8)

Beef extract powder (BBL, Catalog # 12303)

Sodium pyruvate (Sigma, Catalog # P-2256)

항생제를 투여하지 않는 닭으로부터 생산된 2일 이내의 무정란.

배양 용기 - 20×125 mm flat bottom, screw cap

원심분리용 튜브 - 50ml, Corning plastic tube

Liquipettes - 5ml

시약준비

모든 시약과 배지는 3차 증류수로 준비한다.

1. 항생제

Vancomycin과 Nalidixic acid을 10mg/ml로 희석하여 적당한 양씩 분주하여 -20℃에 보관한다. Amphotericin B가 100mg 들어있는 vial에 10ml의 증류수를 넣어 희석한다.

2. 1/2 × BHI-HPC 용액:

Brain heart infusion broth 18.5g에 981.5ml의 증류수를 첨가한다. 교반하여 용해시키고 20분간 멸균한다. 1/2 BHI Broth를 식히고, HPC를 9 g 넣어 준다. 교반하여 용해시킨다. 용액이 약간 뿌옇게 될 것이다. 50ml 원심분리용 tube에 25ml씩 분주한다. 상온에서 보관한다. 1주일 이내에 사용한다. HPC가 침전되므로 냉장시키지 않는다.

3. 1/2 × BHI + 항생제 (항생제 혼합액):

Brain Heart Infusion Broth 18.5g에 981.5ml의 증류수를 첨가한다. 교반하여 용해시키고, 20분간 멸균한다. 식힌 후 975ml에 무균적으로 다음의 항생제를 넣어준다.

5ml amphotericin B (10mg/ml)

10ml vancomycin (10mg/ml, 냉동보관)

10ml nalidixic acid (10mg/ml, 냉동보관)

원심분리된 분변 침전물에 1ml의 항생제 혼합액을 첨가한다. 이 혼합액은 적당히 분주하여 -20℃에서 냉동보관한다.

4. Malachite green (2%):

100ml의 증류수에 2g의 malachite green을 첨가하고 용해될 때까지 열을 가해준다. 여과나 20분간 autoclave하여 멸균한다. 4℃에 보관한다. 배지 1 liter당 5.1ml를 사용한다. 제조 후 한 달 이내에 사용한다.

5. 품질관리(quality control)용 균주 희석:

모든 Herrold's media를 품질관리하기 위해 M. paratuberculosis(ATCC 19698)과 M. intracellulare(ATCC 13950)를 사용한다.

표준균주는 0.2% bovine serum albumin을 사용하여 McFarland #2가 되도록 현탁한다. 균희석액을 1ml씩 분주하여 -70℃에 보관한다.

항생제 첨가 Herrold's egg yolk medium의 제조

1. 계란:

계란은 생산된지 2일 이내의 무정란이어야 하고, 항생제가 투여되지 않은 닭으로부터 생산된 것이라야 한다. 배지 1 liter당 100ml의 난황을 사용한다(계란 약 10개).

2. 배지를 준비하기 전에 다음의 재료들을 준비한다.

가. Mycobactin-J: 2mg vial의 mycobactin-J에 4ml의 95% ethanol을 첨가한다. Mycobactin-J를 첨가하는 배지 1 liter당 한 vial을 준비한다. 7:01

나. Amphotericin B: Amphotericin B 10mg이 들어있는 용기에 10ml의 증류수를 첨가한다. 배지 1 liter 당 1/2 vial을 사용한다.

3. 배지를 만들기 위하여 다음과 같은 재료들의 무게를 잰다.

	<u>1 Liter</u>
Peptone	9.0 g
NaCl	4.5 g
Noble agar	15.3 g
Powdered beef extract	2.7 g
Sodium pyruvate	4.1 g

27ml의 glycerin과 870ml의 증류수를 첨가한다. 열을 가하여(45℃-50℃) 성분들을 녹인다. pH 조정은 배지의 양에 따라 달라진다. 배지의 양이 3 liter이면 pH의 조정범위는 7.7-7.9이다. 배지의 양이 5 liter이면 8.0-8.2이다. 계란이나 증류수의 pH에 따라 pH가 변화한다. Autoclave에서 25분간 멸균한다. 56℃로 식혀준다.

배지가 멸균되면, 다음과 같이 계란을 준비한다:

- 가. 세제와 함께 솔로 문질러서 계란을 닦아준다.
- 나. 완전이 행구어낸다.
- 다. 70% isopropyl alcohol에 30분간 담궈둔다.
- 라. Alcohol을 빨아들이기 위한 towel을 채우고 건조기에서 alcohol을 제거하고 다른 towel을 이용하여 공기로 건조시킨다.
- 마. 멸균된 forcep을 이용하여 난각의 윗 부분을 깨어 제거한다.
- 바. 난백을 forcep으로 제거한 다음 난황막을 제거한다.
- 사. 난황을 주의하여 균질화하고, 멸균된 메스 실린더에 넣는다.
- 아. 1 liter의 배지 당 100ml를 사용한다.

식힌 배지 1 liter에 다음의 재료들을 첨가한다.

- 가. 난황, 100ml

- 나. 2% malachite green, 5.1ml
- 다. Mycobactin J, 1 vial (2mg)
- 라. Amphotericin B, 5ml (5mg)
- 마. 냉동 보관했던 vancomycin, 5ml (50mg)
- 바. 냉동 보관했던 nalidixic acid, 5ml (50mg)

배지를 완전히 섞어주고, 필요하면 pH를 조정한다. pH는 7.0-7.5이어야 한다. 튜브에 배지를 9ml씩 분주한다(18×125 mm의 멸균 screw cap tube). 튜브를 경사지게 하고, 하룻밤 동안 상온에서 굳히고 건조시킨다. 튜브를 aluminum foil로 감싸 빛을 차단한다. Lot number를 기록하고 품질관리를 마칠 때 까지 4℃에서 보관한다.

품질관리 과정

튜브 전체의 1%를 실시한다.

1. 배지를 상온에서 하룻밤 놓아둔 후, surface electrode를 이용하여 pH를 측정한다. pH는 7.0-7.5이어야 한다.
2. 멸균검사와 성장품질관리를 위해 튜브를 선택한다.

가. 멸균검사 - 접종하지 않은 튜브를 37℃에서 48시간 동안 호기성으로 배양한다. 오염되었는지 검사하고 기록한다.

나. 성장 품질관리 - 각각의 품질관리용 균주를 빠르게 녹인다.

0.2% BSA 1ml를 첨가하여 1:2로 희석한다.

vortexing하고 5분간 세워둔다.

각각의 균 100 μ l를 각 튜브에 접종한다.

뚜껑을 느슨히 하여 배지의 경사면이 건조될 수 있

도록 하고, 37℃에서 호기성으로 배양한다. 매주 관찰한다.

집락은 4-5주에 관찰되어야 한다.

Colony 수를 배지제조 checklist에 기록한다.

해석:

1. 3튜브(HEY/NVA/J) 중 2개의 튜브는 12주 동안 오염이 없어야 한다.
2. 2개나 3개의 튜브(HEY/NVA/J)가 양성이고, w/o/J 튜브가 음성이라면, mycobactin-J 의존성의 재확인 없이 M. paratuberculosis 양성으로 기록한다.
3. 하나의 튜브만 양성이고, w/o/J 튜브가 음성이라면, mycobactin-J 의존성 검사를 실시한다.
4. Mycobactin-J 의존성이 의심되는 모든 Mycobacterium은 DNA probe, protein profile이나 생화학적 검사로 확인해야 한다.

1 liter 배지 제조준비 checklist

날짜: _____ 배지종류: _____
 HEY w/MJ w/AB _____ HEY w/MJ wo/AB _____
 제조량: _____ HEY wo/MJ w/AB _____ HEY wo/MJ wo/AB _____

품질관리 사항

최초의 pH _____
 첨가한 10N NaOH (또는 5N HCl) _____ 방울
 멸균 전에 조정된 pH: _____ (8.0-8.2이어야 한다)
 분주시 pH: _____ (7.0-7.5이어야 한다)
 실온에서 24시간 방치후 pH: _____ (7.0-7.5이어야 한다)
 37°C에서 48시간 이후 멸균상태: _____
 M para를 접종한 날짜 : _____ 성장이 확인된 날짜 : _____ CFU _____
 M intra를 접종한 날짜 : _____ 성장이 확인된 날짜 : _____ CFU _____

모든 배지에 첨가하여야 할 성분:

1. 3차증류수		870.0 mls	_____
2. Glycerin		27.0 mls	_____
3. 건조성분:	Peptone	9.0 gms	_____
	NaCl	4.5 gms	_____
	Noble agar	15.3 gms	_____
	Powdered beef extract	2.7 gms	_____
	Sodium pyruvate	4.1 gms	_____
4. 50°C에서 배지의 pH: 반드시 8.0 - 8.2 범위이어야 한다			_____

A. Mycobactin-J 첨가 배지, (59°C로 식을 때 첨가한다)

1. Egg yolks (계란 10개)	100.0 mls /1 liter	_____
2. Malachite green	5.1 mls	_____
3. Amphotericin B	5.0 mls (100mg Fungizone의 1/2 vials)	_____
4. Mycobactin J	1 vial	_____

B. Mycobactin-J 비첨가 배지, (59°C로 식을 때 첨가한다)

1. Mycobactin-J를 빼는 것 이외에 A와 같다 _____

C. Mycobactin-J와 항생제 첨가 배지, (59°C로 식을 때 첨가한다)

1. A와 같이 첨가하고 나서 다음을 추가한다: _____
 2. Vancomycin 5.0 mls _____
 3. Nalidixic acid 5.0 mls _____

D. Mycobactin-J 제외, 항생제 첨가 배지, (59°C로 식을 때 첨가한다)

1. Mycobactin-J를 제외하는 것 이외에 C와 같다 _____

주간별 배양결과 판독 Schedule

		주																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
0																		
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
0																		
비고:	배양일자:																	
	Week 1:										Week 9:							
	Week 2:										Week 10:							
	Week 3:										Week 11:							
	Week 4:										Week 12:							
	Week 5:										Week 13:							
	Week 6:										Week 14:							
	Week 7:										Week 15:							
	Week 8:										Week 16:							

부록 2

Kinetic ELISA

1. 항원(100 μ g/ml)를 0.1M carbonate buffer(pH 9.5)로 100배 희석하여 96 well flat bottom ELISA plate(Costar Co, USA)에 100 μ l 씩 분주한다. 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 coating시킨다(또는 37 $^{\circ}$ C에서 2시간).
2. PBST로 3회 세척한다.
3. 1% BSA in PBST를 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 blocking한다.
4. 각 well을 PBST로 3회 세척한다.
5. 가검혈청을 0.5% BSA in PBST로 1:200으로 희석하여 100 μ l씩 2 well에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다.
6. 각 well을 PBST로 3회 세척한다.
7. Anti-bovine IgG peroxidase conjugate(Sigma, USA)를 PBST로 1:10,000으로 희석하여 100 μ l씩 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다.
8. 각 well을 PBST로 3회 세척한다.
9. Working citrate buffer로 희석한 o-phenylenediamine(OPD) 용액 100 μ l를 가하고 ELISA reader로 실온에서 2분 간격으로 3회 OD₄₅₀ 값을 읽는다.
10. OPD 용액을 넣은 15분 후에 1M 황산용액 100 μ l씩을 넣어 반응을 정지시킨다.
11. ELISA reader의 450nm에서 OD를 다시 측정한다.

*** Kinetic ELISA는 BIO-TEK의 KC4 program이 장착된 ELISA reader(BIO-TEC Instruments Inc, USA)을 사용하여 실시한다. 각 plate에는 표준 양성과 음성 혈청

을 포함시키고 각 혈청은 2반복으로 검사한다. Kinetic ELISA에서 각 well의 correlation coefficient(r^2)가 0.950 미만의 경우에는 검사를 재실시하며 2반복 well 사이의 coefficient of variation(CV)가 20% 이상인 경우에도 검사를 재실시한다.

* Carbonate buffer(adsorption buffer)

0.2M NaHCO ₂	8ml
0.2M Na ₂ CO ₃	17ml
DW	75ml

1M NaOH나 1M HCl로 pH가 9.6이 되게 조정한다. 3차 증류수를 1000ml가 되게 채운후 filter를 사용하여 멸균한다.

* 0.2M NaHCO₃(Sodium bicarbonate stock)

NaHCO ₃	16.8 g
DW	qs 1,000 ml

* 0.2M Na₂CO₃(Sodium carbonate stock)

Na ₂ CO ₃	21.2 g
DW	qs 1,000 ml

* PBS(Physiological buffered saline) pH 7.4

NaCl	8.5 g
NaH ₂ PO ₄	0.22 g
Na ₂ HPO ₄	1.19 g
DW	qs 1,000 ml

* PBST

PBS	1,000 ml
Tween 20	0.5 ml

완전히 녹인다.

* Citrate buffer

Citric acid	5.11 g
NaH ₂ PO ₄	9.15 g
DW	qs 1,000 ml

* 30% H₂O₂

35% H ₂ O ₂	8.57 ml
DW	1.43 ml

* OPD solution

OPD	4 mg
Citrate buffer	10 ml

* Substrate solution

OPD solution	10 ml
30% H ₂ O ₂	5 μ l

* 1M H₂SO₄

9.74M H ₂ SO ₄	51.4 ml
DW	468.9 ml

부록 3

Immunoblotting

1. 재조합 34KDa 단백질의 C-terminal 항원을 SDS sample buffer에 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 희석하여 12% SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) mini-gel에 well 당 $20\mu\text{l}$ 씩 loading한 후 200V에서 1시간 동안 전기영동한다. 전기영동된 단백질을 nitrocellulose membrane에 이동시킨다.
2. Membrane을 TBST(pH 10)로 10분간 세척한다.
3. Membrane을 3% gelatin in TBST로 37°C에서 30분간 blocking한 후 TBST로 10분간 세척한다.
4. Membrane을 miniblotted(Immunetics, USA)에 장착한다.
5. 가검혈청을 1% gelatin in TBST로 1:30으로 희석하여 miniblotted의 각 hole에 주입하고 37°C에서 1시간 동안 membrane과 반응시킨다. 반응후 TBST(pH 10.0) 500ml로 각 hole을 세척하고 miniblotted를 분리한후 membrane을 TBST로 10분간 더 세척한다.
6. Horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG(Sigma)를 TBST(pH 7.5)로 1:500으로 희석하여 membrane과 실온에서 1시간 반응시키고 TBST(pH10.0)로 5분간 세척한후 TBS(pH7.5)로 5분씩 2회 세척한다.
7. 발색기질액(4-chloro-1-naphthol, Sigma)과 membrane을 반응시키면서 band의 출현상태를 확인한후 기질액을 버리고 3차 증류수로 membrane을 3회 정도 세척하여 반응을 정지시킨다. 종이타월을 사용하여 membrane의 습기를 제거한후 빛을 차단한 상태에서 건조하여 보관한다.

부록 4

IS900 gene의 검출을 위한 PCR

1. *Mycobacterium paratuberculosis*의 chromosomal DNA 분리

- 가. *M. paratuberculosis* cell을 1.5ml eppendorf tube에서 500 μ l의 TEN으로 vortexing하여 세척한다. 13,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 침전시키며 3번 반복한다.
- 나. Cell pellet을 2.5mg의 subtilisin(protease type VIII; Sigma; Catalog # P-5380)을 첨가한 175 μ l의 TEN(최종 농도는 10 mg/ml)에 부유시켜 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 소화시킨다.
- 다. TEN으로 희석(10 mg/ml)한 lysozyme 250 μ l을 첨가한다. 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 추가 배양한다.
- 라. Proteinase(12.9 mg/ml) 175 μ l와 10% SDS 75 μ l를 첨가한다. 50 $^{\circ}$ C에서 18시간 반응시킨다.
- 마. RNase(20 mg/ml) 5 μ l를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨다.
- 바. 동량의 phenol로 2회 추출하고 chloroform으로 1회 더 추출하여 상층액을 수거한다.
- 사. 1/10 부피의 2.5 M sodium acetate 용액과 2배 부피의 100% ice cold ethanol을 첨가한다. -70 $^{\circ}$ C에서 1시간이나 -20 $^{\circ}$ C에서 하룻 밤 동안 반응시킨다.
- 아. 4 $^{\circ}$ C에서 13,000rpm으로 15분간 동안 원심분리하고 상층액을 버린후 70% ethanol로 세척한후 13,000rpm으로 5분 동안 원심분리한다.
- 자. Pellet을 진공에서 건조시키고 30 μ l의 1X TE buffer에 녹인다.

차. 분광광도계를 이용하여 농도를 측정한다(OD_{260} 에서 $1.0 = 50\mu\text{g/ml}$)

카. PCR 반응이 좋지 않으면 1X TE buffer로 투석한다.

* TEN의 조성

50mM Tris pH 8.0
100mM EDTA
150mM NaCl

2. IS900 gene의 검출을 위한 PCR 과정

가. PCR 반응액 조성

H ₂ O	42 μl
dNTP	16 μl
10X buffer	10 μl
Primer 401	10 μl
Primer 402	10 μl
NP40	10 μl
Taq DNA polymerase	1 μl
Sample DNA	1 μl

100 μl

↓

나. 13,000 rpm에서 2 초 동안 원심분리한다.

↓

다. Mineral oil 100 μl 를 반응액 상층에 추가한다.

↓

라. Thermal cycler에서 다음과 같이 반응시킨다.

94 $^{\circ}\text{C}$ 10분간 denaturation을 1회 실시하고

94 $^{\circ}\text{C}$ 1분간 denaturation

50 $^{\circ}\text{C}$ 1분간 annealing

72℃ 1분간 extension의 과정을 35회 반복한다.

마지막으로 72℃에서 15분 동안 extension시킨다.

마. 2% agarose gel에서 전기영동을 실시한후 ethidium bromide 용액에서 염색하여 UV-transilluminator에서 229bp의 생산물을 확인한다.