

충남 서산·태안지역에서 착유중인 젖소의 M.R.T.용 집합유에 대한 요네병 감염률 조사

전동민* · 육심용 · 남이현 · 이미성 · 한우수 · 강형주 · 이재봉
충청남도 가축위생연구소 태안지소

(접수 2009. 8. 25, 게재승인 2009. 9. 22)

Prevalence of *M. paratuberculosis* antibody in dairy cattle in Seosan-Taeon areas for M.R.T. samples

Dong-Min Jeon*, Sim-Yong Yook Nam-I Hyun, Mi-Sung Lee, Woo-Soo Han,
Hyeong-Joo Kang, Jea-Bong Lee

Taeon branch of the Chungnam Veterinary Research Institute, Taeon 305-904, Korea

(Received 25 August 2009, accepted in revised from 22 September 2009)

Abstract

This survey was carried out to investigate the prevalence of the antibody for bovine paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle in Seosan-Taeon area. From February to August in 2009, 254 M.R.T. samples were collected from 57 farms in the regions and enzyme immuno-sorbent assay (ELISA) was conducted. Among 254 samples, 13 (5.1%) M.R.T. samples of 3 (5.2%) farms were positive by ELISA. In regional analysis, 1 (3.1%) of 34 farms in Seosan and 2 (8.6%) of 23 farms in Taeon were positive in ELISA. According to the raising scale of dairy farms, the farm with below 30 heads showed the higher positive rate (2 out of 3 positive farms) than the farms with over 30 heads (1 out of 3 positive farms).

Key words : *Mycobacterium paratuberculosis*, Dairy cattle, Chronic enteritidis, M.R.T., ELISA

서 론

요네병(Johne's disease)은 소, 양, 사슴 등 반추수 및 돼지에서 지속성장염을 일으키는 만성소모성 질병으로(McFadden 등, 1987), 1895년 독일의 수의학자 Johne등(1985)에 의해 처음 보고되었고, 이후 Twort등(1912)이 그 원인균인 *Mycobacterium (M.) paratuberculosis*를 처음으로 분리하였다. 감염에 따른 임상증상으로 만성적 완고한 설사와 더불어 특히 사료효율의 저하, 쇠약증세, 증체율 감소, 산유량 감소, 수태율

저하를 나타낸다고 보고하였다(Vary 등, 1990; Yokomizo 등, 1985).

*M. paratuberculosis*는 동물 체내에 감염되어 주로 장벽과 장간막 림프절에 들어가 세포면역을 일으켜 과민반응을 유도하고, 그 결과 지속적인 설사 및 영양분 흡수불량이 발생하며, 장관으로 단백질 혈장성분이 유출되어 만성 소모성 상태가 지속되어 결국 영양분 흡수 억제에 의해 폐사하게 된다.

또한 요네병에 감염된 개체는 뚜렷한 임상증상 없이 오랜 잠복기와 함께 진행되면서 병원체를 지속적으로 배출하므로 강력한 방역대책 없이는 근절이 어려운 실정므로, 요네병의 이러한 특징으로 말미암아 미국 젖

*Corresponding author: Dong-Min Jeon, Tel. +82-41-675-4349,
Fax. +82-41-675-4348, E-mail. dvmjeon@korea.kr

소산업에 있어 1년에 약 1억 달러 정도의 경제적 손실을 가져오는 것으로 추정되며, 미국, 유럽에서는 소 전염병 중 가장 막대한 경제적 피해를 주는 만성 질병 중의 하나라고 규정짓고 있다.

국내 발생은 이 등(1982)이 강원도 대관령 목장의 수입 젖소에서 처음으로 임상형 요네병의 유입을 보고하였고, 전 등(1984)이 젖소에서 요네병균을 분리하여 국내 요네병의 발생을 공식 확인하였다. 김 등(1994)은 한우와 젖소에 대해 면역학적인 방법으로 요네병을 조사한 결과 상당히 높은 감염율(13.9%)을 보고함으로써 요네병에 대한 중요성을 부각시켰으며, Kim과 Park(1999)은 요네병의 특이적인 항원인 재조합원인 4KDa 단백질을 생산하여 요네병의 혈청학적인 진단에 활용 가능성을 보고하였다.

본 조사에서는 혈청학적 진단법 중 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 검사방법을 이용하여 충남 서산, 태안지역 착유젖소의 Milk Ring Test (M.R.T.)용 집합유에 대해 요네병 항체 양성률을 조사하였고, 그 결과를 토대로 요네병으로 인한 농가 피해를 경감시키는 물론 방역지도 및 질병 예방을 위한 기초 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료

2009년 2월부터 2009년 8월까지 관내 착유농장에서 M.R.T. 검사의뢰 된 246건의 집합유에 대해 *M. paratuberculosis* 항체 양성률을 조사하였다. 사용된 집합유는 M.R.T. 검사에서 모두 음성을 보였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

M.R.T.시료를 통한 요네병검사는 이 등(2009)의 검사방법을 응용하였으며, *Mycobacterium paratuberculosis* Antibody Test Kit (IDEXX Pourquier® M. pt. Antibody Test Kit)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 검사하였다.

요약하면 가검 집합유 100 μ l를 샘플 희석액 100 μ l로 2배 희석하여 15분간 정치하고, 희석유즙 100 μ l와 비희석 양성 대조 및 음성 대조 100 μ l를 항원이 코팅된 마이크로 플레이트에 분주한 뒤 21°C 45분간 배양 후 300 μ l의 세척액으로 3회 세척하고 Horseradish peroxi-

dase (HRPO)-conjugation 100 μ l를 분주하고 21°C 45분간 배양시켰다. 다시 세척액으로 3회 세척하고 tetramethylbenzidine base (TMB) 100 μ l를 분주하고 21°C 10분간 배양하였다. Stop solution 100 μ l를 분주하고 ELISA reader (TECAN Sunrise Reader)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 플레이트에는 표준 양성 대조 및 음성 혈청을 포함시켰으며 각 혈청의 검사결과는 다음과 같은 공식에 의하여 Sample to Positive (S/P) ratio로서 표현하였다. S/P ratio가 30% 미만일 경우 음성, 30~40%인 경우 의양성, 40% 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

$$S/P = \frac{\text{검사시료} - \text{평균음성대조}}{\text{평균양성대조} - \text{평균음성대조}}$$

결 과

지역별 요네병 항체 양성률

공시된 254건의 M.R.T.용 집합유 시료에 대해 ELISA법으로 지역별 요네항체 양성율을 검사한 결과는 Table 1과 같다.

요약하면, 254건의 집합유 시료 중에 13건이 검출되었으며, 서산지역에서는 5건(3%), 태안지역에서 8건(8.6%)이 검출되어 태안지역이 높게 검출되었다.

착유농가에 따른 요네병 항체 양성률

공시된 254건의 M.R.T.용 집합유 시료에 대해 ELISA

Table 1. The positive rate of *M. paratuberculosis* antibody in dairy cattle in Seosan-Taeon areas by ELISA test for M.R.T. samples

Regions	No. of tested samples	No. of positive samples	Positive rate (%)
Seosan	162	5	3
Taeon	92	8	8.6
Total	254	13	5.1

Table 2. The positive rate of *M. paratuberculosis* antibody by dairy farms in Seosan-Taeon areas

Region	No. of tested farms	No. of positive farms	Positive rate (%)
Seosan	34	1	3.1
Taeon	23	2	8.6
Total	57	3	5.2

Table 3. The positive rate of *M. paratuberculosis* antibody by raising scale in Seosan-Taean areas

Raising scale	No. of tested farms	No. of positive farms	Positive rate (%)
<30	25	2	8.0
>30	32	1	3.1
Total	57	3	5.2

법으로 착유농가별 요네항체 양성율을 검사한 결과는 Table 2와 같다.

지역별 양성 농가수는 서산이 1호, 태안이 2호 이었으며, 지역내 착유농가수에 비해 태안지역이 보다 높은 양성률을 보였다.

사육규모에 따른 양성률

사육규모를 30두 미만과 30두 이상으로 나누어 분석한 결과 *M. paratuberculosis* 항체 양성농가 3호에 대한 사육규모는 Table 3과 같았다. 사육규모가 적은 소규모 농가에서 비교적 높은 양성률이 나타났다.

고 찰

젖소 및 한우에서 만성소모성 질환을 일으키는 대표적인 질병인 결핵병과 요네병은 그 원인균 및 임상증상의 특징도 비슷할 뿐만 아니라 두 질병 모두 치료 및 근절이 어려워 소 사육농가에 막대한 피해를 주는 질병이다. 이러한 이유로 일부 국가에서는 결핵병, 요네병, 네오스포라, 백혈병, 바이러스성 설사병을 젖소의 생산성과 잠재적 경제 손실의 위험 질병으로 지정하여 근절을 위해 지속적인 노력하고 있는 실정이다 (VanLeeuwen 등, 2006; Hendrick 등, 2005; VanLeeuwen 등, 2001).

또한 *M. paratuberculosis*는 사람에서 Crohn's disease를 일으키는 공중보건학 상 중요한 인수공통전염병의 원인균으로, Crohn's disease는 주로 대장 및 소장에서 만성 육아종성 염증을 일으키고 소화관, 피부, 간, 관절 등에 병변을 나타낸다고 알려져 있다 (Gitnick 등, 1989; Graham 등, 1987; McFadden 등, 1987).

요네병의 진단에는 임상증상, 병리조직학적 검사, 세균배양을 이용한 원인체의 확인 및 다양한 방법을 이용한 면역학적인 반응검사가 있다. 또한 gene probe (Vary 등, 1990), interferon- γ 검출을 기초로 한 세포면

역활성 검사 (Billman-Jacobe 등, 1992), IS900 gene을 확인하는 PCR (Colstin 등, 1994; el-Zaatari 등, 1994)과 ELISA 기법을 기초로 한 혈청학적인 검사 (Yokomozo 등, 1985; Milner 등, 1987; Tsai 등, 1989; Cox 등, 1991) 등도 있다.

동물 군에서 전형적인 임상증상이 나타나는 경우에는 임상적인 수준에서 확정적 진단을 할 수 있다. 감염 초기에는 요닌 진단법과 같은 세포면역 반응에 의해서 진단이 가능하며 이후에는 보체결합반응, 효소 면역항체법 같은 혈청반응에 의해서 진단한다. 또한 분변 또는 병변조직을 배양하여 균을 분리 동정하는 방법도 있다. 이중 ELISA를 이용한 혈청학적 검사 방법은 요네병균의 혈청항체에 대한 가장 민감하고 특이성이 높은 시험법으로 알려져 있다 (Tsai 등, 1989; Cox 등, 1991).

본 조사에서도 비교적 우유내에서 민감도가 높은 ELISA 검사 방법 (IDEXX Pourquier® *M. pt.* Antibody Test Kit)을 응용하여 검사한 결과 양호한 성적을 보여 조사방법으로 활용하였다.

현재 우리나라는 요네병을 제 2종 가축전염병으로 지정하여 관리하고 있으며, 특별히 요네병이 의뢰된 농가에 대해서 검사를 실시하고 있으나, 양성농가의 사후관리에 대한 적용이 모호하여 농가지도에 어려움이 많다. 또한 혈청과 분비물을 통한 요네병 항체 양성률에 대해 조사는 이루어지고 있으나 전 개체에 대한 체계적인 검진이나 요네병 항체가 조사는 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 점차 대단위 사육농가 및 전업농의 증가로 인해 젖소 및 한우의 사양관리의 중요성이 확대되고 있으며, 그만큼 대단위 사육농가 일수록 질병에 한 번 노출되면 확산이 빠르고 근절이 어려워 차단방역이 강조되고 있다. 그러나 사안의 중요성에도 불구하고 요네병 감염 실태에 대한 조사 및 연구는 세부적으로 지역적으로 보고된 자료가 부족한 상황이다.

국내에서 김 등 (1994)은 1994년 강원, 경기, 충남 전북 지역의 2,719두를 ELISA로 검사한 결과 363두 (13.4%)가 양성반응을 나타내었고, 지역별로는 강원, 충남, 전북이 11.4~15.7%로 큰 차이는 나타나지 않았다고 보고하였다. 또한 김 등 (2002)이 강원지역 젖소 2,261두를 ELISA로 검사한 결과 372두 (16.4%)가 양성반응을 보였다고 보고하였다. 2007년 울산지역의 젖소 ELISA를 실시하였으며 총 452두 중 24두 (5.3%)가 ELISA 검사 양성률 나타내었다 (박 등, 2007) 특히 최근

이 등(2009)은 경북 동부지역 젖소와 한우혈액에서 요네병 감염율이 6.9%라고 보고하여 지역에 따라 다양한 역학적 양상을 나타내고 있다.

본 조사 결과 서산지역 관내 착유젖소 M.R.T. 시료에 대한 요네병 항체 양성률은 총 254건 중 13건(5.1%), 착유농가 총 57호 중 3호(5.2%)로 조사되었다. 양성농가에서 3호 중 2호는 사육두수 30두 미만의 소규모 농가였고, 1농가는 30두 이상을 사육하는 대규모 사육농가로 조사되어 비교적 소규모농가에서 높은 감염률을 나타내고 있어 요네병 관리에서는 소규모 농가를 위주로 방역대책이 이루어져야 함을 시사하고 있다.

본 조사에서는 전국적으로 요네병 검사를 확대하여 착유중인 사육농가에 대한 정기적인 요네병검사를 실시하여 양성축은 색출하여 도태를 유도하는 방역대책이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

충남 서산·태안지역 젖소 착유 농가를 대상으로 M.R.T.용 집합유를 이용한 요네병 ELISA 검사를 실시한 결과 아래와 같은 결과를 얻었다. M.R.T.용 집합유에 대한 요네병 항체 검사에서 총 254건의 시료 중 13건이 양성으로 검출되었다. 지역별 감염률은 서산 5건, 태안 8건이 각각 검출되었으며, 사육규모별 요네병 항체 양성농가 수는 30두 미만 소규모 농가가 2호, 30두 이상 대규모 농가가 1호로 나타났다.

이상의 결과로 충남 서산·태안 지역에서 착유농가에 대한 요네병 항체 양성률은 서산 3.1%, 태안 8%로 서산에 비하여 태안이 높게 나타났으며, 30두 이상 착유 농가에 비해 30두 미만의 소규모 착유농가에서 높은 양성률을 보였다. 이는 영세 농장의 특징상 착유우의 회전이 느리고 사육 및 착유시설이 미비하며, 방역의식이 낮아 요네병의 발생률이 더 높은 것으로 사료된다. 또한 사육규모가 큰 농가일수록 가축위생 및 방역에 더욱 철저를 기한 것으로 추측되나 정확한 원인 규명을 위해서는 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

김 두, 전관준, 김종택, 신광순, 신명균, 장국현, 김정기.

2002. 강원지역 젖소의 요네병 감염실태. 대한수의학회지 42(1): 81-88.
- 김종만, 안종삼, 우승룡, 조동희, 조운상, 박정문, 윤용덕, 장국현. 1994. 면역학적인 방법에 의한 한우와 유우의 요네병 발생조사. 대한수의학회지 34: 93-97.
- 박혜연, 원상민, 장지택, 정성진, 문수평, 함유식. 2007. 울산지역 젖소의 요네병 감염실태 조사, 울산광역시 보건환경연구원보 4: 462-473.
- 이방환, 임봉호, 하창수, 성홍룡. 1982. 국내 발생의 우 파라결핵병(Johne's disease)에 대한 임상병리학적 추적조사 보고. 대한수의사회지 19(2): 8-20.
- 이선미, 김미숙, 장영술, 전령훈, 박노찬. 2009. 경북 동부지역 젖소 및 한우의 요네병 감염실태조사 한국가축위생학회지 32(2): 171-176.
- 전운성, 이방환, 김종배, 최철순, 김진구. 1984. 우유에 Mycobactin 의존성 항산성세균(M. paratuberculosis)의 분리동정. 대한수의학회지 24(1): 58-63.
- Billman-Jacobe H, Carrigan M, Cockram F, Corner LA, Gill IJ, Hill JF, Jessep T, Milner AR, Wood PR. 1992. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 69(2): 25-28.
- Colstin A, McConnell I, Bujdso R. 1994. Cloning and expression in *Escherichia coli* of DNA encoding a 60kDa stress protein of *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease. *Microbiology* 140: 3329-3336.
- Cox JC, Drane DP, Jones SL, Ridge S, Milner AR. 1991. Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 68: 157-160.
- el-Zaatari FA, Naser SA, Engstrand L, Hachem CY, Graham DY. 1994. Identification and characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant proteins expressed in *E. coli*. *Curr Microbiol* 29: 177-184.
- Gitnick G, Collins J, Beaman B, Brooks D, Arthur M, Imaeda T, Palisechesky M. 1989. Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 34(6): 925-932.
- Graham DY, Markesich DC, Yoshmura HH. 1987. Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Result of culture. *Gastroenterology* 92: 436-442.
- Hendrick S, Duffield T, Leslie K, Lissemore K, Archmbault M, Kelton D. 2005. The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds in Ontario. *Can Vet J* 46(12): 1126-1129.
- Johne HA, Frothingham L. 1895. Ein eigenthuemlicher Fall von TuberKulose beim Rind. *Deutsche Zeitschifr Tiermed Pathol* 21: 438-454.
- Kim D, Park HW. 1999. Experssion of the C-terminal of 34KDa protein of *Mycobacterim paratuberculosis*. *Korean J Vet Res* 0: 86-93.
- McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J.

1987. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 25(5): 796-801.
- Milner AR, Lepper AW, Symonds WN, Gruner E. 1987. Analysis by ELISA and Western blotting of antibody activities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M phlei*. *Res Vet Sci* 42: 140-144.
- Tsai SJ, Hutchinson LJ, Zarkower A. 1989. Comparison of dot immunobinding assay, enzyme-linked immunodiffusion for serodiagnosis of paratuberculosis. *Can J Vet Res* 53: 405-410.
- Twort FW, Ingram GLY. 1912. A method for isolating and cultivating *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis fo bovines, *Proc Royal Soc London* 84: 517-543.
- VanLeeuwen JA, Keefe GP, Tremblay R, Power C, Wichitel JJ. 2001. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canada dairy cattle. *Can Vet J* 42(3): 193-198.
- VanLeeuwen JA, Tiwari A, Plaizier JC, Whiting TL. 2006. Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in beef and cattle in manitoba. *Can Vet J* 47(8): 783-786.
- Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, McFadden JJ. 1990. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol* 28(5): 933-937.
- Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nippon Juigaku Zasshi* 47: 111-119.