

경북 동부지역 젖소 및 한우의 요네병 감염실태 조사

이선미 · 김미숙 · 장영술 · 전령훈 · 박노찬*

경북가축위생시험소 동부지소

(접수 2009. 5. 12, 게재승인 2009. 6. 26)

Seroprevalence of paratuberculosis of dairy cattle and Korean cattle in Eastern-Gyeongbuk area

Seon-Mi Lee, Mee-Sug Kim, Young-Sul Jang, Ryoung-Hoon Chon, No-Chan Park*

Eastern Branch, Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory

(Received 12 May 2009, accepted in revised from 26 June 2009)

Abstract

Johne's disease is a chronic inflammatory bowel disease of cattle, sheep, goats and other ruminants, and *Mycobacterium paratuberculosis* is the etiologic agent of this disease. Many studies have been carried out on paratuberculosis from dairy cattle and Korean native cattle in multiple areas around nation, but there is no report in Eastern-Gyeongbuk area. The purpose of this study is to investigate the seroprevalence of bovine paratuberculosis in Eastern-Gyeongbuk area. From July to December in 2007, blood samples were collected from 363 dairy cattle of 27 farms and 281 Korean cattle of 114 farms and the ELISA was conducted. 25 (6.9%) dairy cattle of 6 (22%) farms and 19 (6.8%) Korean cattle of 8 (7.0%) farms were positive in ELISA. In regional analysis, 25 (8.3%) out of 300 dairy cattle in Gyeongju were positive and Pohang were negative in this research. 12 (16.4%) out of 73 Korean cattle in Gyeongju and 7 (9.6%) out of 73 Korean cattle in Uljin were positive. Pohang and Youngdeok of Korean cattle were negative in this research. According to raising scale of dairy cattle, 4 (66.7%) farms out of 6 farms were raising 30 below and 2 (33.3%) farms out of were raising 30~70. And there were negative raising scale more than 70. In Korean cattle, 6 (75%) farms out of 8 were raising below 10 and 2 (25%) farms were raising 10~30. And there were negative raising scale more than 30. The rate of seropositive of paratuberculosis dairy cattle and Korean cattle were similar and the positive rate of Eastern-Gyeongbuk area is reported lower than that of any other region.

Key words : *Mycobacterium paratuberculosis*, ELISA, Cattle

서 론

요네병(Johne's disease)은 1895년 독일의 수의학자 Johne와 Frothingham에 의해 처음 보고되었고, 1910년 Twort와 Ingram에 의해 그 원인균인 *Mycobacterium (M.) paratuberculosis*가 처음으로 분리되었다(Johne과

Frothingham, 1895; Twort와 Ingram, 1912). 요네병은 소, 양, 사슴 등 반추수 및 돼지에서 만성장염을 일으키는 만성소모성 질병으로(McFadden 등, 1987), 이에 따른 주증상은 만성의 완고한 설사와 더불어 사료효율의 저하, 쇠약증세, 증체율 감소, 산유량 감소, 수태율 저하를 나타낸다(Vary 등, 1990; Yokomizo 등, 1985). 한국에서는 1983년 이 등(1982)이 강원도 대관령 목장의 수입 젖소에서 처음으로 임상형 요네병의 유입을 보고

* Corresponding author: No-Chan Park, Tel. +82-54-748-6624, Fax. +82-54-748-6683, E-mail. pnochan@gb.go.kr

하였고, 1984년 전 등(1984)이 젖소에서 요네병균을 분리하여 국내 요네병의 발생을 공식 확인되었다. 김 등(1994)은 한우와 젖소에 대해 면역학적인 방법으로 요네병을 조사한 결과 상당히 높은 감염률(13.9%)을 보고함으로써 요네병에 대한 중요성을 부각시켰으며, Kim과 Park(1999)은 요네병의 특이적인 항원인 재조합 34KDa 단백질을 생산하여 요네병의 혈청학적인 진단에 활용 가능성을 보고하였다.

*M. paratuberculosis*은 동물 체내에서는 주로 장벽과 장간막 림프절에 들어가 세포면역을 일으켜 과민반응을 유도하고, 그 결과 지속적인 설사 및 영양분 흡수 불량에 발생하며, 장관으로 단백질 혈장성분이 유출되어 만성 소모성 상태가 지속되어 결국 영양분 흡수 억제에 의해 죽게 되는 것이다. 또한 분변이나 조직에 형성된 균 덩어리는 분뇨와 함께 배출되는데, 이 균은 심한 온도의 변화나 건조 등 외부환경에 저항성이 높고 일반 소독제에 저항성이 높다. 현재 요네병은 전 세계적으로 발생하고 있으며, 감염된 개체는 뚜렷한 임상 증상 없이 오랜 잠복기와 함께 진행되면서 병원체를 지속적으로 배출하므로 강력한 방역대책 없이는 근절이 어렵다. 요네병의 이러한 특징으로 말미암아 미국, 유럽에서는 소 전염병 중 가장 막대한 경제적 피해를 주는 만성 질병 중의 하나라고 규정짓고 있다.¹⁰⁾

또한 *M. paratuberculosis*는 사람에서 Crohn's disease를 일으키는 병원체로 공중보건학 상 중요한 의미를 가지는 질병이다. Crohn's disease는 주로 대장 및 소장에서 만성 육아종성 염증을 일으키고 소화관, 피부, 간, 관절 등에 병변을 나타낸다(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), interferone- γ 검출을 기초로 한 세포면역활성 검사(Billman-Jacobe 등, 1992), IS900 gene을 확인하는 PCR(Colston 등, 1994; el-Zaatari 등, 1994)과 ELISA 기법을 기초로 한 혈청학적인 검사(Yoko-mozo 등, 1985; Milner 등, 1987; Tsai 등, 1989; Cox 등, 1991) 등도 있다.

동물군에서 전형적인 임상증상이 나타나는 경우에는 임상적인 수준에서 확정적 진단을 할 수 있다. 감염 초기에는 요넨 진단법과 같은 세포면역 반응에 의해서 진단이 가능하며 이후에는 보체결합반응, 효소 면역항체법 같은 혈청반응에 의해서 진단한다. 또한 분변 또

는 병변조직을 배양하여 균을 분리 동정하는 방법도 있다. 요네병균이 분변으로 다량 배출시 요네병균 유전자중 특이적인 primer (IS 900 등)를 작성하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용하면 분변에서 신속하고 민감하게 요네병균을 검출할 수 있다. 개체의 혈액을 PPD항원으로 자극시켜 분비되는 interferone- γ 의 양을 측정을 통한 진단법은 가장 최근에 개발된 진단법으로 특이성과 민감성이 가장 뛰어난 것으로 알려져있다. 또한 ELISA를 이용한 혈청학적 검사 방법은 요네병균의 혈청항체에 대한 가장 민감하고 특이성이 높은 시험법으로 알려져있다.

본 연구에서는 혈청학적 진단법 중 하나인 ELISA 검사 방법을 이용하여 경북 동부지역 젖소 및 한우의 요네병 항체 양성률을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

경북 동부지역 젖소 및 한우의 요네병 감염 실태를 조사하기 위하여 2007년 7월부터 12월까지 브루셀라병 검사로 의뢰된 포항, 경주의 젖소 27농가 363두 및 포항, 경주, 영덕, 울진 한우 114농가 281두의 혈청을 검사 전까지 -20°C 냉동보관 하여 혈청학적 진단에 사용하였다. 사용된 혈청은 로즈벡갈 진단액을 이용한 브루셀라병 검사에서 모두 음성을 보였다.

실험방법

Mycobacterium paratuberculosis Antibody Test Kit (IDEXX ELISA USA)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 검사를 실시하였다. 가검 혈청 10 μl 를 혈청 희석액 190 μl 로 20배 희석하여 30분간 정치하고, 희석 혈청 100 μl 와 비희석 양성 대조 및 음성 대조 100 μl 를 항원이 코팅된 마이크로 플레이트에 분주한 뒤 실온에서 30분간 배양한 뒤 300 μl 의 세척액으로 3회 세척하고 HRPO-conjugation 100 μl 를 분주하고 상온에서 30분간 배양시켰다. 다시 세척액으로 3회 세척하고 TMB 100 μl 를 분주하고 상온에서 15분간 배양하였다. Stop solution 100 μl 를 분주하고 ELISA reader (ANTHOS, USA)를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 plate에는 표준 양성과 표준 음성 혈청을 포함시켰으며 각 혈청의 검사 결과는 다음과 같은 공식에 의하

여 S/P ratio로서 표현하였다. S/P ratio가 0.25 미만일 경우 음성, 0.25이상인 경우는 양성으로 판정하였다.

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

결 과

축종별 양성률

경북 동부지역 관내에서 사육되는 젖소 및 한우의 요네병 발생 상태를 조사하기 위하여, 젖소 27호 363두, 한우 114호 281두에 대해 ELISA 검사를 실시한 결과는 Table 1과 같다. 젖소 농장 27호 중 6호(22%)가 양성을 나타내었고, 한우 농장 114호 중 8호(7.0%)가 양성을 나타내었다. 개체별 결과는 젖소 363두 중 25두(6.9%)가 양성을, 한우 189두 중 19두(6.8%)가 양성을 나타내었다.

사육시군별 양성률

경북 동부지역의 시군별 젖소 및 한우 사육농가에

Table 1. *M. paratuberculosis* seropositive ratio dairy cattle and Korean cattle

		Positive/Test	Positive (%)
Dairy cattle	Farms	6/27	22
	Heads	25/363	6.9
Korean cattle	Farms	8/114	7.0
	Heads	19/281	6.8

Table 2. The positive rate of daily cattle of *M. paratuberculosis* according to region in Eastern-Gyeongbuk area

	ELISA test		
	Positive/Farms	Positive/Heads	% (Heads)
Pohang	0/5	0/63	0
Gyeongju	6/22	25/300	8.3
Total	6/27	25/363	6.9

Table 3. The positive rate of Korean cattle of *M. paratuberculosis* according to region in Eastern-Gyeongbuk area

	ELISA test		
	Positive/Farms	Positive/Heads	% (Heads)
Pohang	0/30	0/73	0
Gyeongju	5/30	12/73	16
Ulsan	3/30	7/73	9.6
Youngdeok	0/24	0/62	0
Total	8/114	19/281	6.8

대한 요네병 검사 결과는 Table 2 및 Table 3과 같다. 젖소 검사 결과, 포항 5호 63두는 전두수 음성을, 경주는 22호 300두 중 6호(27.2%) 25두(8.3%)가 양성을 나타내었다. 한우는 포항과 영덕에서는 전두수 양성이었다고, 경주는 30호 73두 검사 중 5호(16.75) 12두(16.4%), 울진은 30호 73두 검사 중 3호(10%) 7두(9.6%)에서 양성을 나타내었다.

사육규모별 양성률

경북 동부지역 관내 사육 규모별 요네 발생율은 Table 4 및 Table 5와 같다. 젖소 사육 농가의 규모를 30두 미만(유량 0.5T이하), 30두 이상 70두 미만(유량 0.5~1T), 70두(유량 1T이상) 사육의 3단계로 나누어 분석한 결과 30두 미만 사육농가 9호 43두 중에서 4호(44%) 18두(41.9%)의 항체 양성률을 보였다. 또한 30두 이상 70두 미만 사육농가 9호 100두 중 2호(22%) 7두(16.2%)가 항체 양성률을 나타내었다. 본 실험에서는 70두 이상 사육 농가에서는 요네병 항체 양성우가 없었다.

한우 사육 농가의 규모를 10두 미만, 10두 이상 30두 미만, 30두 이상 사육의 3단계로 나누어 분석한 결과 10두 미만 사육농가에서 24호 60두 중에서 6호(25%) 15두(25%)가 항체 양성률을 보였다. 또한 10두 이상 30두 미만 사육농가 30호 90두중 2호(6.7%) 4두(4.4%)가 양성반응을 나타내었고, 30두 이상 사육농가에서는 요네병 항체 양성우가 없었다.

Table 4. The positive rate of daily cattle of *M. paratuberculosis* according to raising scale

	ELISA test		
	Positive/Farms	Positive/Heads	% (Heads)
< 30	4/9	18/43	41.9
30~70	2/9	7/100	7
> 70	0/9	0/220	0
Total	6/27	25/363	6.9

Table 5. The positive rate of Korean cattle of *M. paratuberculosis* according to raising scale

	ELISA test		
	Positive/Farms	Positive/Heads	% (Heads)
< 10	6/24	15/60	25
10~30	2/30	4/90	4.4
> 30	0/30	0/131	0
Total	8/114	19/281	6.8

고 찰

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

현재 우리나라는 젖소를 대상으로 매년 1회 이상 결핵검진을 실시하여 우결핵 발생시 양성축을 살처분하고 양성농가에 대한 지속적인 검사 및 근절 정책을 추진하고 있으며, 점차 한우에 대해서도 검진을 확대하려고 하는 실정이다.

요네병의 경우 제2종 가축전염병으로 지정되어 있으며, 특별히 요네병이 의뢰된 농가에 대해서 검사를 실시하고 있으나, 양성농가의 사후관리에 대한 적용이 모호하여 농가지도에 어려움이 많다. 또한 지역별 또는 농가 단위의 산발적인 요네 항체 양성률에 대해 조사는 이루어지고 있으나 전 개체에 대한 체계적인 검진이나 요네병 항체가 조사는 거의 이루어지지 못하고 있다. 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 경북 동부지역에 대한 요네병 감염 실태 조사 및 연구는 잘 알려져 있지 않다.

미국의 Thoen과 Baum(1988)은 5~20%의 소가 요네병에 감염된 것으로 추정하였고, Florida의 4,500두의 혈청을 ELISA를 이용하여 검사한 결과, 젖소의 17.1%와 육우의 8.6%가 양성반응을 나타내었다고 보고하였다. 그리고 1994년 미국의 Collins 등(1994)은 Wisconsin 지역의 158개 젖소 목장 4,990두를 ELISA를 이용한 검사에서 50%의 목장에서 1두 이상이 요네병 양성반응을 보였고 7.29%의 소가 양성반응을 나타내었다고 보고하였다. Johnson-Ifearulundu와 Kaneene(1999)는 Michigan주의 121개 목장의 3,886두를 ELISA kit (IDEXX Laboratories Inc, USA)를 이용하여

검사한 결과 80개의 목장에서 1두 이상의 양성우가 진단되었고, 총 267두가 양성우로 진단되어 6.9%의 발생률을 나타내었다고 보고하였다. 국내에서 김 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 강원 지역 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 양성을 나타내었다(박 등, 2007).

본 실험의 결과 경북 동부지역 소 관내 젖소의 요네 항체 양성률은 총 363두 중 25두(6.9%), 한우의 요네 항체 양성률은 총 281두 중 19두(6.8%)였다. 또한 농장별 항체 양성률은 젖소 27호 중 6호(22%), 한우 114호 중 8호(7.0%)였다. 젖소 개체별 양성률과 한우 개체별 및 농장별 항체 양성률 모두 타 지역(10~20%)에 비해 다소 낮게 나타났지만 젖소 농장별 항체 양성률은 22%로 다소 높게 나타났다.

시군별 양성률 비교 조사 결과, 젖소 27호를 대상으로 한 검사 결과 양성농가 6호가 모두 경주에서 나타났고 포항에서는 양성농가가 없었다. 한우를 대상으로 한 항체검사 결과, 114호 중 양성 6호는 경주에서, 양성 2호는 울진에서 나왔다. 포항과 영덕에서는 전두수 음성을 나타내었다. 이러한 시군별 양상의 원인을 알기 위해서는 더 많은 지리적 여건과 조사가 이루어져야 할 것으로 사료되나, 경주지역과 같이 젖소 및 한우 밀집 사육지에서 요네병 항체가 인근 시군보다 많이 나타나고 있었다.

또 젖소 요네 양성농가 6호 중 4호가 사육두수 30두 미만의 소규모 농가였고, 한우 역시 양성 농가 8호 중 6호가 10두 미만 사육농가였다. 조사 대상농가 중 젖소 70두 이상 사육 농가 및 한우 30두 이상 대규모 사육농가에서는 요네병의 양성우가 발생하지 않았다. 이는 영세 농장의 특징상 사육우의 회전이 느리고 사육 시설이 미비하며 방역 의식이 낮아 요네병의 발생률이 더 높은 것으로 사료되고 사육 규모가 큰 농가일수록 가축위생 및 방역에 더욱 철저를 기한 것으로 추측되거나 정확한 원인규명을 위해서는 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

2007년 7월부터 12월까지 경북 동부지역의 젖소 및 한우의 요네 항체 양성률을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 젖소 27호 363두, 한우 114호 281두에 대한 검사 결과 젖소 27호 중 6호(22%)가 양성음, 한우 114호 중 8호(7.0%)가 양성음 나타내었다. 개체별 결과는 젖소 363두 중 25두(6.9%), 한우 189두 중 19두(6.8%)가 양성음 나타내었다.

2. 시군별 젖소 및 한우 사육농가에 대한 요네병 검사 결과, 젖소의 경우 포항은 5호 63두모두 전두수 음성음, 경주는 22호 300두 중 6호(27.2%) 25두(8.3%)가 양성음 나타내었다. 한우는 포항과 영덕에서는 양성우가 없었고, 경주는 30호 73두 검사 중 5호(16.75) 12두(16.4%), 울진은 30호 73두 검사 중 3호(10%) 7두(9.6%)에서 양성음 나타내었다.

3. 사육 규모별 요네 발생을 분석 결과 젖소의 경우 양성 호수 6호 중 4호가 30두 미만사육 농가에서 나타났고, 나머지 2호는 30두 이상 70두 미만 사육농가에서 나타났으며 70두 이상 사육농가에서는 양성우가 나타나지 않았다. 한우의 경우 양성농가 8호 중 6호가 10두 미만 사육농가에서 나왔으며, 2호는 10두 이상 20두 미만 사육농가에서 나왔으며, 30두 이상 사육농가에서는 양성우가 없었다.

참 고 문 헌

김 두. 1999. 요네병의 진단기법 개발. 농림부 연구보고서: 1-139.
 김 두, 전관준, 김종택, 신광순, 신명균, 장국현, 김정기. 2002. 강원지역 젖소의 요네병 감염실태. 대한수의학회지 42(1): 81-88.
 김종만, 안중삼, 우승룡, 조동희, 조윤상, 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, 울산광역시보건환경연구원보 4: 462-473.
 이방환, 임봉호, 하창순, 성홍룡. 1982. 국내 발생의 우 파라결핵 병례(Johne's disease)에 대한 임상병리학적 추적조사 보고. 대한수의사회지 19(2): 8-20.
 전윤성, 이방환, 김종배, 최철순, 김진구. 1984. 우유래 Mycobactin 의존성 항산성세균(*M. paratuberculosis*)의 분리 동정. 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.
 Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ, Conrad TA, Thomas CB, Carr DJ. 1994. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am Vet Med Assoc* 204(4): 636-641.
 Colston A, McConnell I, Bujdosó R. 1994. Cloning and expression in *Escherichia coli* of DNA encoding a 60 kDa stress protein of *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease. *Microbiology* 140: 3329-3336.
 Cox JC, Drane DP, Jones SL, Ridge S, Milner AR. 1991. Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 68: 157-160.
 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, Palieschesky 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, Yoshimura HH. 1987. Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Results of culture. *Gastroenterology* 92: 436-442.
 Hendrick S, Duffield T, Leslie K, Lissemore K, Archambault 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 Zeitschrift Tiermed Pathol* 21: 438-454.
 Johnson-Ifeorlundu Y, Kaneene JB. 1999. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am J Vet Res* 60: 589-596.
 Kim D, Park HW. 1999. Expression of the C-terminal of 34KDa protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Korean J Vet Res* 40: 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.
 McFadden JJ, Butcher PD, Thompson J, Chiodini R, Hermon-Taylor J. 1987. The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Microbiol* 1(3): 283-291.

- Milner AR, Lepper AW, Symonds WN, Gruner E. 1987. Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M phlei*. *Res Vet Sci* 42: 140-144.
- Thoen CO, Baum KH. 1988. Current knowledge on paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc* 192(11): 1609-1611.
- Tsai SJ, Hutchinson LJ, Zarkower A. 1989. Comparison of dot immunobinding assay, enzyme-linked immunosorbent assay and 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 of bovines. *Proc Royal Soc London* 84: 517-543.
- VanLeeuwen JA, Forsythe L, Tiwari A, Chartier R. 2006. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. *Can Vet J* 46(1): 56-58.
- VanLeeuwen JA, Keefe GP, Tremblay R, Power C, Wichtel 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 dairy 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.
- 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: 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.
- Yokomozo 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.