J Vet Clin 27(1) : 23-28 (2010)

Journal of Veterinary Clinics
www.ksvc.or.kr

한우 혈액에서 PCR을 이용한 *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis*의 검출

김광현* · 곽길한* · 송희종 · 조정곤[1]
*전라북도 축산위생연구소, 전북대학교 수의학대학 및 생체안전성연구소

(게재승인: 2010년 2월 16일)

Detection of *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* in Korean Cattle by the Polymerase Chain Reaction

Kwang-Hyun Kim*, Kil-Han Kwak*, Hee-Jong Song and Jeong-Gon Cho[1]

**Chonbuk Livestock Development and Research Institute, Jeonju, 560-860, Korea*
College of Veterinary Medicine and Biosafety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756, Korea

Abstract : *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis,* intracellular bacteria that can cause chronic granulomatous enteritis in cattle, continues to pose significant economic losses and health problem with high prevalence. The purpose of this study is the polymerase chain reaction (PCR)-base strategy for early detection of *M. avium* ssp *paratuberculosis* in whole blood. Blood samples were collected from korean cattles in Jeonbuk, Korea. The 16 out of 88 serum samples were detected *M. partuberculosis* by ELISA. Then samples of infected 8 Korean cattles were amplified by PCR. The PCR amplified targets are 16s rDNA and heat shock protein 65kDa (*hsp 65*). The 16s rDNA provided a highly sensitive and specific tool for the direct detection of mycobacteria. In addition *M. avium* was confirmed characteristically by the hsp65. Finally there were sure to *M. avium* ssp *paratuberculosis* by IS900 PCR. The restriction fragment length polymorphism was identified by PCR amplifications and subsequence restriction enzyme digestions with Pst I of a *hsp65*. These results indicate that confirm *M. avium* with 16s rDNA, *hsp65* and a restriction fragment length polymorphism in the *hsp65* gene can be seem the other pattern. Therefore, these results can be used for clinical direct detections of *M. avium* ssp *paratuberculosis* in whole blood of Korean cattle and also to be used epidemiological researches.

Key words **:** *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis,* polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism.

서 론

사람에서 대장과 소장에 만성 육아종성 염증을 일으키고, 때로는 소화관, 피부, 간, 관절 등에 병변을 가지는 Crohn's disease가 있다. 아직 Crohn's disease 환자에서 *M. paratuberculosis* 원인체의 존재 유무가 논란이 되고 있지만(4,6,7,12, 15,20,25), 이와 동일한 원인체로 알려진 소 요네병(Johne's disease)은 소, 산양, 면양, 사슴 등 모든 종류의 반추수류에서 장염, 설사와 쇠약이 특징인 만성 염증성 장관 증후군을 일으키는 질병이다.

요네병의 원인체인 *M. paratuberculosis*의 주요 특징은 항산성, 호기성균으로 운동성이 없는 막대모양(0.4-1.0 × 1.0-10.0 μm)의 간균이며 아포, 협막, 편모를 가지고 있지 않다. 발육온도는 37-38°C이며 5-10%의 CO_2 환경 하에서 발육한다. 생체 외에서 배양시 매우 까다롭고 10주-16주 이상 배양기간이 요구되어 신속하고 정확한 진단법의 개발이 필요하다(17,30,37).

요네병에 감염된 소의 주요 증상은 간헐성 설사가 특징적인 임상증상이며 설사로 인한 탈수와 영양분의 불완전 공급으로 인한 피모의 광택소실 및 극도의 삭수가 일어난다. 젖소의 경우 비유량 감소 및 비유정지 현상이 나타나고 유방은 축소된다. 일부는 요네병이 진행됨에 따라 단백뇨가 나타나고 하악에는 현저한 부종이 나타난다(1,33).

요네병의 진단에는 지연성과민반응(delayed type hypersensitivity)을 이용한 요닌(Johnin) 피내 검진과 혈청 및 유즙을 이용한 ELISA, Gene probe, Interferon-γ를 이용한 세포면역능 검사, 한천-겔 면역확산법(AGID), 보체결합반응, 분변의 개량된 세균학적 배양방법, IS900 gene을 확인하는 PCR과 ELISA 기법을 기초로 한 혈청학적 검사 등을 들 수 있

[1]Corresponding author.
E-mail : cho2555@chonbuk.ac.kr

다(2,3,5,8,9,16,18,19,22-32,35).

최근에는 PCR을 이용한 방법으로 요네병 진단 연구에 많이 이용되고 있다. PCR은 시료 채취 후 세균 수가 적을 때 세균의 유전자를 인위적으로 다량 증폭시켜 진단하는 방법이다. *M. paratuberculosis*을 검출하기 위하여 *M. paratuberculosis*의 대응하는 특징적인 primer를 제작하고 분변으로부터 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 수행한다. Mycobacteria속 중에는 항원성이 유사한 종이 많으며 *M. paratuberculosis*와 *M. avium*는 항원성이 거의 유사하기 때문에 이를 동정하기 위해서는 유전자 진단법이 유용하다(3,19,24). IS900을 기본으로 여러 종류의 항산성균의 유전자를 조사한 결과 *M. paratuberculosis* 만이 양성반응을 나타냈다고 보고하였고, IS900은 여러 종류의 mycobacteria DNA sample을 조사한 결과 요네병을 일으키는 세균에 매우 특이성이 높다고 보고하였다(8,27). 김 등(32)과 김 등(29)이 강원지역과 경기도 충청도 일대에서 사육되는 동물의 분변을 이용해서 IS900 분석을 시도한 바 있다. 또한 Plikaytis 등(23)과 Telenti 등(26)은 mycobacteria의 heat shock protein (65kDa)을 사용한 PCR을 통해 440bp DNA 분절을 증폭한 후 제한효소를 처리하여 mycobacteria의 종의 수준까지 구별하려 하였으며, el-Zaatari 등(10)은 *hsp65*의 유전자 염기서열 분석을 통해 *M. paratuberculosis*을 구분하고자 하였다. 그 후 Eriks 등(11)은 *M. avium*과 *M. paratuberculosis*까지 제한효소를 이용하여 분류하고자 하였으며, RNA polymerase의 B subunit를 코딩하는 유전자로 rifampin 내성이 있다고 알려진 *rpoB* 유전자를 통하여 mycobacteria의 종에 대한 분류를 시도하였다(5,10,11,17,22,23,26,29,32).

이 연구는 분변 외 혈액 속 단핵구 PCR법을 이용하여 mycobacteria의 검출을 시도하였다. 또한 세 가지 primer를 사용한 것은 먼저 16s rDAN, *hsp65*을 확인하여 다른 mycobacteria의 교차반응을 보완하였고, 이에 따라 IS900에 의한 *M. paratuberculosis*를 확인하기 위하여 실시하였다. 그리고 *hsp65*의 PCR 증폭산물을 제한효소 처리하여 잘려진 패턴을 분석하여 *M. paratuberculosis*의 역학적 조사 활용에 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

대상동물

2009년 전라북도 익산시에 소재한 A농장을 대상으로 요네병 검사를 실시하였다. A농장은 88두의 한우를 사육하고 있으며, 전 두수를 채혈하여 ELISA법에 의하여 요네병 진단을 실시하였다. 이 중 요네병 양성으로 판정된 한우를 대상으로 본 실험을 수행하였다. 그 중 ELISA법을 이용한 요네병 검사에서 양성으로 판정된 소는 16두였다.

ELISA 양성우 검출

Elisa Paratuberculosis Antibody Screening Test Kit (Institut POURQUIER)를 사용하여 제조사의 설명에 따라 ELISA를 실시하였다. 각 plate에는 표준 양성과 표준 음성 혈청을 포함시켰으며 각 혈청의 검사 결과는 다음과 같은 공식에 의하여 S/P ratio로서 표현하였다. S/P ratio가 60% 미만일 경우 음성, 70% 이상일 경우에는 양성으로 판정하였다.

S/P = (검사시료 - 평균음성대조) / (평균양성대조 - 평균음성대조)

핵산추출

ELISA의 양성우의 경정맥에서 혈액을 채취한 후 혈액 3 ml을 Lymphoprep (gravity 1.077 ± 0.001, Nycomed Phama AS) 3 ml 위에 중층시킨 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 단핵구층을 분리하였다. 분리한 단핵구를 PBS로 세척한 후 원심분리하여 cell pellet을 얻었다. 분리한 pellet은 Wizard SV Genomic DNA Purification System kit를 사용하였으며, 제조사의 설명에 따라 핵산을 분리하였다.

16S rDNA, hsp65에 대한 PCR

Mycobacteria에 적당한 PCR primer를 Table 1과 같이 제작하여 다음과 같은 조건하에서 PCR을 수행하였다(11,14). 16s rDNA유전자의 반응조건은 95°C에서 10분 변성 후, 95°C에서 1분, 53°C에서 1분, 72°C에서 1분, 35 cycle 반응 후 최종 extension을 72°C에서 10분간 수행하였다. 또한 *hsp65* 유전자를 증폭하기 위해서 반응조건은 95°C에서 10분 간 변성 후, 95°C에서 45초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분, 40cycle 반응 후 최종 extension을 72°C에서 10분간 수행하였다. 각각의 PCR 산물 5 μl를 ethidium bromide가 첨가된 2% agarose gel에서 100V에서 30분간 전기영동하여 확인하였다.

IS*900*에 의한 PCR

추출한 핵산 5 μl와 각 각의 primer 1 μl (10pmol/μl), 3 μl의 멸균증류수를 HS Prime Tag Rrimix에 첨가하고 PCR을 수행하였다. 반응조건은 94°C에서 10분 변성 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초, 35 cycle 반응 후 최종 extension을 72°C에서 10분간 수행하였다. PCR 산물 5 μl

Table 1. Oligonucleotide primers used in PCR . The 16s rDNA provided a highly sensitive and specific tool for the direct detection of *Mycobactera* spp. And the *hsp65* was confirmed *M. avium* characteristically.

Primer name	Sequence(5'-3')	Locus	Annealing temp(°C)	Product size(bp)
16SRNAF	AGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rDNA	72	543
16SRNAR	GTATTGCCGCGGCTGCTG			
Tb-13	GGCTACATCTCGGGGTACTTC	Hsp65	55	960
65-1400	CTCGGTGGTCAGGAACAGC			

를 ethidium bromide 가 첨가된 2% agarose gel에서 100V 에서 30분간 전기영동하여 확인 하였다. 본 실험에 사용된 primer는 다음과 같이 제작하였다(27).

IS900/150C : CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG

IS900/921 : AATCAACTCCAGCAGCGCGGCCTCG

제한효소 처리

65kDa의 hsp65 PCR 산물을 Pst I(제한효소)을 처리하였다. 즉 PCR 산물 10 μl에 제한효소 0.5 μl(5U), 제한효소버퍼 2.5 μl와 증류수 12 μl 혼합하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 제한효소 반응산물 5 μl를 ethidium bromide가 첨가된 4% metaphore agaros에서 100V, 45분간 전기영동하여 확인하였다.

결 과

육안적 소견

조사에서 요네병 양성으로 판정된 소는 4-7세까지의 다양한 연령대로 분포되었다. 발생된 사육장 내에서 임상증상은 묽은 스프상태의 변을 보이는 개체가 있었으나 설사가 심하거나 수척해지면서 악액질로 변하는 개체는 보이지 않아 준임상형 보균단계에서 임상형으로 진행되는 단계로 보였다.

ELISA 결과

ELISA 실험법은 보편적인 요네병 실험방법으로 실행되어져 왔다. 그러나 ELISA법은 높은 민감성과 특이성을 가지고 있지만 유사 균체에 대한 교차반응이 나타나는 단점을 가지고 있다. 소의 혈청에 대한 ELISA법에서 양성은 value 값이 60% 미만일 경우는 음성으로, 70% 이상일 경우에는 양성으로 판정하였다. 그 결과 대상 검사우 88두의 요네병 검사 의뢰 중 16두(18%)가 양성반응을 보였으며 16두의 양성우 중 8두를 본 조사에 공시 하였다.

PCR 결과

16S rDNA, *hsp65*에 대한 PCR 결과

고안된 16S rDNA, *hsp65* primer(11,14)를 이용하여 PCR을 시행하였고, 16s rDNA는 mycobacteria를 확인할 수 있는 primer로 543bp의 산물을 얻을 수 있었으며(Fig 1), *hsp65*는 *M. avium*의 960bp PCR 산물을 얻을 수 있었다(Fig 2). 이 결과로 mycobacteria 확인과 *M. avium*까지 확인 할 수 있었다.

IS*900* PCR 결과

먼저 16s rDNA, *hsp65*를 이용하여 *M. avium*을 확인하였고, 이어서 IS900 primer를 이용하여 *M. avium* ssp *tuberculosis*를 확인하였다. 이 특이 primer는 Crohn's disease 환자에서 분리된 *M. paratuberculosis* 균주로부터 클론닝 된 pMB22의 genomic library에서 가지고 있던 것을 사용하여 제작된 것으로 우리나라에서는 분변에서 PCR 확진시 사용되고 있는 primer 이다(27). 확인 진단을 위해 고안된 IS900/150C, IS900/921를 이용한 PCR에서는 229bp의 산물을 얻을 수 있었다(Fig 3). 이 결과는 *M. avium* ssp *paratuberculosis* 임을 확인 할 수 있었다.

제한효소 처리 결과

*M. paratuberculosis*을 IS900에 의해 확인된 소에서 *hsp65* gene를 PCR을 통해 증폭한 결과 960bp의 증폭산물을 성공

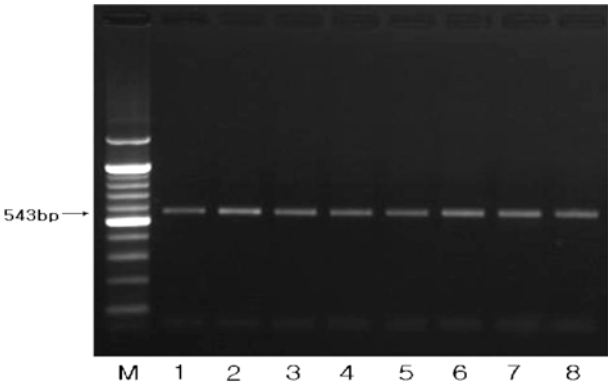

Fig 1. Detection of *Mycobacteria* spp. 16S rDNA gene (543bp) in blood samples: analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis. Lane 1, size marker; Lane 2-9, Iksan 1-8.

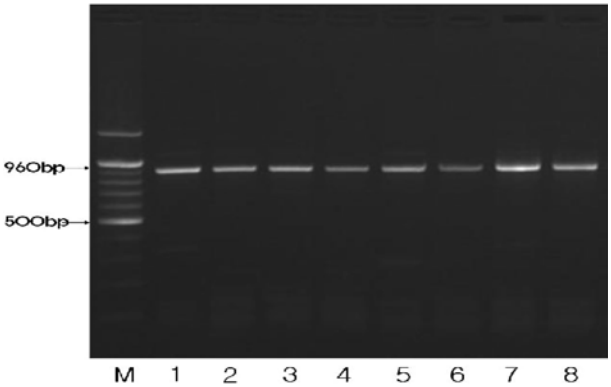

Fig 2. Detection of *M. avium hsp65* gene(960bp). Lane 1, size marker; Lane 2-9, Iksan 1-8.

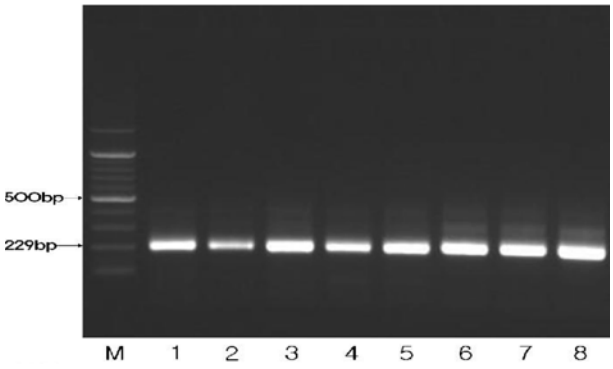

Fig 3. PCR detection of IS900-specific sequences are designed to amplify a 229 bp target sequence.

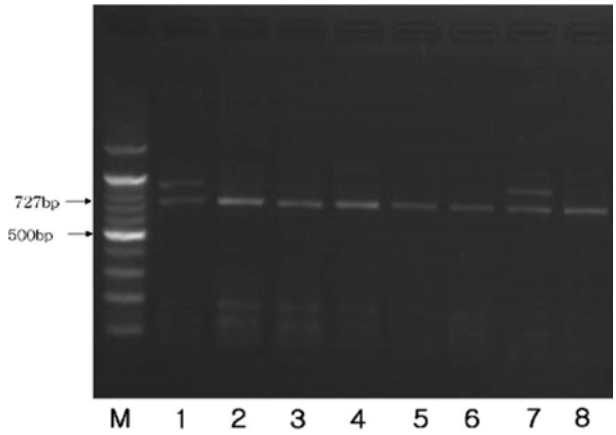

Fig 4. Analysis of *hsp65*kda gene digested by Pst I. Lane 1 size marker, Lane 2-9, Iksan 1-8.

적으로 증폭할 수 있었다. 증폭된 산물을 Pst I효소를 이용하여 처리한 후 metaphore agaros에서 전기영동한 결과 Pst I에서 727bp로 잘라진 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

요네병은 젖소의 유량 감소와 육우의 증체율 저하 등 경제적 피해를 주며, 인수공통전염병으로 공중보건학상 매우 중요한 질병으로 법정전염병 2종으로 지정되어 있다. 우리나라에서 1983년 처음으로 강원도 대관령 목장의 수입 젖소에서 임상형 요네병의 유입을 보고한 것을 시작으로 전 등(36)이 젖소에서 요네병균을 분리하여 국내 요네병의 발생을 공식 확인하였다. 그 후 요네병은 당대, 후대, 육성농장의 검증이나 개별의 병성감정에 의해 검사를 실시하고 있으나 감염된 개체는 뚜렷한 임상증상 없이 오랜 잠복기를 통해 병원체를 지속적으로 배출하므로 점차 질병이 확산되었다.

우리나라에서 김 등(31)은 강원, 경기, 충남, 전북 지역의 2,719두를 ELISA 검사한 결과 363두(13.4%)가 양성반응을 보인다고 보고하였다. 강원 지역 젖소 2,261두를 ELISA로 검사한 결과 372두(16.4%)가 양성 반응을 보였다(29). 울산지역의 젖소에서는 ELISA 검사시 총 452두 중 24두(5.3%)가 양성을 나타내었으며(34), 경북지역은 젖소 363두 중 25두(6.9%), 한우 189두 중 19두(6.8%)가 양성을 나타내었다(34, 35). 경북 북부지역과 동부지역의 요네병의 발생을 보면 경북 북부지역(안동, 영주, 봉화, 의성, 영양, 청송)에서 2006년부터 2009년까지 ELISA 조사 결과 농장 394호 중 24호(6.1%)가 발생하고 1,964두 중 29두(1.5%)가 양성이었으며, 경북 동부지역에서는 2007년 7월부터 12월까지 141호 중 14호(10%)가 발생하고, 644두 중 44두(14.6%)가 양성으로 나타나는 등 요네병 검진률이 높아질수록 발생률이 증가하였다(35,38,39).

현재 요네병 근절을 위한 표준 검사방법은 ELISA법이다. ELISA검사법은 비교적 높은 민감도와 특이도를 가지고 있지만 혈청학적 검사시 양성으로 판정되기까지 상당한 시간이 소요되어 질병의 신속 진단에 어려움이 있다. 따라서 ELISA법에 대한 문제점을 보완하기 위해 분변, 정액, 초유 및 혈액을 통한 PCR 진단법들이 고안되고 있다(13,21). 본 연구에서는 요네균의 세균학적 특성에 착안하여 초기에 균이 지속적으로 배출되는 분변을 통한 PCR 검사를 동원하여 진단을 실시하고자 하였다. 하지만 분변의 특성상 다른 세균의 오염 등 균의 분리동정을 통하지 않고서는 빠른 진단을 위한 직접 실험으로 확진의 어려움이 있었다. 따라서 요네병과 같은 원인체로 생각되어지고 있는 Crohn's diseas 환자의 혈액 buffy coat 층에서 *M. paratuberculosis* DNA를 분리하여 확인한 보고가 있었고(21), 면양의 전혈에서 균체를 PCR로 확인한 보고(13,28)가 있어 감염우 혈액에서도 PCR을 통해 균체를 확인할 수 있다는 고안을 하게 되었다.

결국 오염을 최소화하면서 직접 검사에 따른 용이성과 현재 요네병 진단에 이용되고 있는 ELISA검사 보다 신속하고 정확하게 요네병을 증명하고자 혈액에서 PCR검사를 실시하였다. 본 실험에서 원인균의 분리 배양을 수행하지 않고 혈액을 직접 PCR을 수행하였기에 기존의 PCR법과 다른 annealing 온도 수정과 hot start taq을 이용한 방법을 통하여 증폭하였다. Pst I으로 제한효소 처리한 결과 Eriks(11)가 제시한 효소 패턴인 515bp와 415bp로 나누어지는 것과 다른 패턴인 727bp을 확인하였다. IS900으로 확인된 sample에서 다른 패턴을 확인한 것이다. 따라서 본 실험의 양상도 *M. paratuberculosis*의 패턴이라고 생각된다. 혈청의 ELISA을 통하여 검사하는 현 방법에서의 문제점을 보완하고자 혈액 중 세균이 잠재되어 있을 가능성이 있는 단핵구를 통하여 *M. avium* ssp *paratuberculosis*의 존재를 확인하였다.

요네병의 검진은 지금까지 당대, 후대 및 육성우의 검진에만 매달려와 그와 관련된 대단위 사육농가에는 질병을 파악하지 못하고 피해만 확산되어왔을 것이라 추측된다. 그에 따라 대단위 사육농가의 검진을 장려하고 만성감염이나 잠재감염되어 있는 개체를 색출하기 위해 혈액의 PCR 방법을 이용한 적극적 방법이 동원되어야 할 것이다. 또한 요네병이 발생한 농장은 혈액에서 PCR를 통한 조기진단과 함께 제한효소의 처리를 통한 균의 특성 확인 및 발생된 타농장의 비교 등의 역학적 자료로 사용하여 요네병의 적절한 관리지침과 신속한 방역정책에 이용될 수 있도록 강구되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

전북 익산 소재 육성농장에서 사육중인 한우 88두를 대상으로 ELISA법을 이용하여 요네병(Johne's disease) 양성율을 조사하였다. 요네병 양성 한우의 단핵구를 분리하여 DNA를 추출하고, 16s rDNA, *hsp65* 및 IS900에 대한 PCR을 수행하여 *M. avium* ssp *paratuberculosis*를 확인하고자 하였고 제한효소(Pst I)를 처리하여 원인균의 특성을 조사한 성적은 다음과 같다.

88두의 한우 혈청을 대상으로 ELISA법으로 실시한 결과

16두가 요네병 양성으로 조사되어 감염률은 18.2%이었다. 요네병 양성 한우 16두 중 8두를 선발하여 단핵구를 분리하여 추출한 DNA templete를 대상으로 16s rDNA 유전자를 이용한 PCR 검사 결과 *Mycobacteria* spp의 존재를 확인하였다. 동일한 DNA templete를 대상으로 *hsp65* 유전자를 이용한 PCR 검사 결과 *M. avium*의 존재를 확인하였다. 동일한 DNA templete를 대상으로 IS900 유전자를 이용한 PCR 검사 결과 *M. avium* ssp *paratuberculosis*의 존재를 확인하였다. *hsp65* 유전자 증폭 후 제한효소(Pst I)를 처리한 결과 모두 727bp의 밴드를 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4th ed, JB Lippincott Company Philadelphia 1992: 703-755.
2. Billman-Jacobe H, Carrigan M, Cockram F, Corner LA, Gill IJ, Hill JF, Jessep T, Milner AR, Wood PR. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. Aust Vet J 1992; 69: 25-28.
3. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC. Detection and identification of Mycobercteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1990; 28: 1751-1759.
4. Cellier C, De Beenhouwer H, Berger A, Penna C, Carbonnel F, Parc R, Cugnenc PH, Le Quintrec Y, Gendre JP, Barbier JP, Portaels F. Mycobacterium paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp. silvaticum DNA cannot be detected by PCR in Crohn's disease tissue. Gastroenterol Clin Biol 1998; 22: 675-678.
5. Cheunoy W, Prammananan T, Chaiprasert A, Foongladda S. Comparative evaluation of ploymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: Two amplified targets, hsp65 and rpoB, for identification of cultured mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51: 165-171.
6. Chiba M, Fukushima T, Horie Y, Iizuka M, Masamune O. No Mycobacterium paratuberculosis detected in intestinal tissue, including Peyer's patches and lymph follicles, of Crohn's disease. J Gastroenterol 1998; 33(4): 482-487.
7. Clarkston WK, Presti ME, Petersen PF, Zachary PE, Jr, Fan WX, Leonardi CL, Vernava III, Longo WE, Kreeger JM. Role of Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease : a prospective, controlled study using polymerase chain reaction. Dis Colon Rectum 1998; 41: 195-199.
8. Colston A, McConnell I, Bujdoso R. Cloning and expression in Escherichia coli of DNA encoding a 60 kDa stress protein of Mycobacterium paratuberculosis, the causative agent of Johne's disease. Microbiology 1994; 140: 3329-3336.
9. Dei R, Tortoli E, Bartoloni A, Simonetti MT, Lillini E. HPLC does not differentiate Mycobacterium paratuberculosis from Mycobacterium avium. Vet Microbiol 1999; 65: 209-213.
10. el-Zaatari FA, Naser SA, Engstrand L, Burch PE, Hachem CY, Whipple DL, Graham DY. Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from Mycobacterium paratuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 1995; 2(6): 657-64.
11. Eriks IS, Munck KT, Besser TE, Cantor GH, Kapur V. Rapid Differentiation of Mycobacterium avium and M. paratuberculosis by PCR and restriction enzyme analysis. J Clin Mycrobiol 1996; 34(3): 734-737.
12. Fidler HM, Thurrell W, Johnson NM, Rook GA, McFadden JJ. Specific detection of Mycobacterium paratuberculosis DNA associated with granulomatous tissue in Crohn's disease. Gut 1994; 35: 506-510.
13. Gwóźdź JM, Reichel MP, Murray A, Manktelow W, West DM, Thompson KG. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in ovine tissues and blood by the ploymerase chain reaction. Vet Microbiol 1997; 57(2-3): 233-244.
14. Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1637-1650.
15. Kanazawa K, Haga Y, Funakoshi O, Nakajima H, Munakata A, Yoshida Y. Absence of Mycobacterium paratuberculosis DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. J Gastroenterol 1999; 34(2): 200-206.
16. Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, Lee SH, Cha CY, Kook YH, Kim BJ. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (hsp65) gene for differentiation of Mycobacterium spp. J Microbiol Methods 2005; 62(2): 199-209.
17. Kubica GP. Clinical microbiology. In: The Mycobacteria : a Sourcebook, Park A, Edited by Kubia GP, Wayne LG. New York: Marcel Dekker 1984: 133-175.
18. Lee KW, Jung BY, Hwang IY, Lee SH, Kim JY, Kim YH, Lee SH, Moon OK, Lee OS. Agreement of two ELISAs for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in cattle in Korea. Korean J Vet Res 2009; 49(2): 121-125.
19. Marsh IB, Whittington RJ. Genomic diversity in Mycobacterium avium: single nucleotide polymorphisms between the S and C strains of M. avium subsp. paratuberculosis and with M. a. avium. Mol Cell Probes 2006; 21(1): 66-75.
20. Mishina D, Katsel P, Brown ST, Gilberts EC, Greenstein RJ. On the etiology of Crohn's disease. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 9816-9820.
21. Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. Lancet 2004; 364 (9439): 1039-1044.
22. Obata S, Zwolska Z, Toyota E, Kudo K, Nakamura A, Sawai T, Kuratsuji T, Kirikae T. Association of rpoB mutations with rifampicin resistance in Mycobacterium avium. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(1): 32-39.
23. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakrus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, Shinnick TM. Differentiation of slowly growing Mycobacterium species, including Mycobacterium tuberculosis, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 1992; 30(7): 1815-1822.
24. Rogall T, Flohr T, Böttger EC. Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA. J Gen Microbiol 1990; 136(9): 1915-1920.
25. Sanderson JD, Moss MT, Tizard MLV, Hermon-Taylor J. Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue. Gut 1992; 33: 890-896.

26. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993; 31(2): 175-178.
27. Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, McFadden JJ. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect Mycobacterium paratuberculosis in Johne's disease. J Clin Microbiol 1990; 28(5): 933-937.
28. Woo SR, Heintz JA, Albrecht R, Barletta RG, Czuprynski CJ. Life and death in bovine monocytes: The fate of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Microb Pathog 2007; 43(2-3): 106-113.
29. 김 두, 전관준, 김종택, 신광순, 신명균, 장국현, 김정기, 정재영, 김옥성. 강원지역 젖소의 요네병 감염실태. 대한수의학회지 2002; 42(1): 81-88.
30. 김 두. 요네병의 진단과 관리 대책. 한국수의공중보건학회. 1995; 19(4): 377-383.
31. 김종만, 안종삼, 우승룡, 조동희, 조윤상, 박정문, 윤용덕, 장국현. 면역학적인 방법에 의한 한우와 유우의 요네병 발생조사. 대한수의학회지 1994; 34(1): 93-97.
32. 김태종, 김윤식, 김재천, 윤화중, 이원창, Shin SJ, Chang YF. 분자생물학과 면역학적 방법에 의한 소 요네병 진단의 연구. 대한수의학회지 1996; 37(2): 349-358.
33. 배유찬, 김하영, 김희진, 윤순식, 박중원, 진영화, 조경오, 강문일. 무플론 요네병 발생 사례. 대한수의학회지 2006; 46(3): 271-274.
34. 박혜연, 원상민, 장지택, 정성진, 문수평, 함유식. 울산지역 젖소의 요네병 감염실태 조사, 울산광역시보건환경연구원보 2007; 4: 462-473.
35. 이선미, 김미숙, 장영술, 전령훈, 박노찬. 경북 동부지역 젖소 및 한우의 요네병 감염실태 조사. 한국가축위생학회지 2009; 32(2): 171-176.
36. 전윤성, 이방환, 김종배, 최철순, 김진구. 우유래 Mycobacterium 의존성 항상성세균(M. paratuberculosis)의 분리동정. 대한수의학회지 1984; 24(1): 58-63.
37. 최원필, 송희종, 김순재. 수의전염병학. 경북대학교출판부, 대구 1986: 70-72.
38. 황의경, 진영화, 손현주, 문운경, 김재훈, 배유찬, 박중원, 최상호, 윤상보. 한우 요네병 발생 증례 보고. 농업과학논문집 1997: 113.
39. 황지영, 성명숙, 손준형, 김정일, 김순태, 김상윤. 경북지역 한우에서 Mycobacterium paratuberculosis 대한 혈청항체가 조사. 한국가축위생학회지 2009; 32 (3 부록): 21.