

분자생물학과 면역학적 방법에 의한 소 요네병 진단의 연구

김태종 · 김윤식 · 김재천 · 윤화중 · 이원창 · SJ Shin* · YF Chang*

건국대학교 축산대학 수의학과, 동물자원연구센터
미국 Cornell 대학교 수의과대학*
(1996년 10월 7일 접수)

Studies on Molecular Biological and Immunological Diagnosis of Johne's Disease

Tae-jong Kim, Yun-sik Kim, Jae-chun Kim, Wha-joong Yoon, Won-chang Lee,
SJ Shin* , YF Chang*

*Department of Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry and Animal Resources Research Center,
Kon-Kuk University*

*College of Veterinary Medicine, Cornell University, USA**

(Received Oct 7, 1996)

Abstract : Mycobacterium paratuberculosis is the etiologic agent of Johne's disease, a chronic inflammatory bowel syndrome in ruminants. The attempts to control or eradicate the disease were severely hampered by the inadequacies of present diagnostic methods. The first purpose of this study was to detect Johne's disease out of 577 cows in the province of Kyunggi, Chungchong, Gangweon and the second purpose was to compare the results of non-absorbed ELISA, absorbed ELISA, PCR, and conventional culture methods. The third purpose was to increase diagnostic specificity, accuracy and rapidity.

When non-absorbed ELISA test was conducted with Mycobacterium paratuberculosis antigen, the prevalence of positive was 10.9%. To increase diagnostic specificity, absorbed ELISA test with Mycobacterium phlei was used. In this test, the positive prevalence was 1.7%.

For the specific detection of Mycobacterium paratuberculosis, PCR was applied to bacterial culture obtained from fecal samples of cattle. The DNA sequences derived from IS900 were used to prepare DNA primers for detection and identification of Mycobacterium paratuberculosis by PCR.

PCR for *M paratuberculosis* isolated from fecal cultures amplified specific target DNA.

PCR was much more rapid than that obtained by conventional culture technique in diagnosis of Johne's disease.

Key words : *Mycobacterium paratuberculosis*, ELISA, PCR, fecal culture, sequence.

본 연구는 한국과학재단 지정 건국대학교 동물자원연구센터의 연구비 지원으로 수행된 것임.

Address reprint requests to Dr Tae-Jong Kim, College of Animal Husbandry and Animal Resources Research Center, Kon-kuk University, 93-1, MoJin-Dong, KwangJin Ku, Seoul 143-701, Republic of Korea.

서론

요네병(Johne's disease)은 *Mycobacterium paratuberculosis* (이하 *M paratuberculosis*)가 원인체이며 소, 산양, 면양, 사슴 등 모든 종류의 반추수에 발생하는 만성 소모성 전염병으로써¹ 만성적 완고한 설사와 쇠약 및 장점막의 비후와 추벽 형성을 주증으로 하는 전염병이다². 이 원인체에 기인하여, 증체량 및 유량의 현저한 감소와 수태율 저하, 고질적 유방염 등 각종 복합 감염으로 인하여 전 세계적으로 축산업에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다³.

뿐만아니라 사람에게에는 Crohn's disease를 발생시켜 주로 대장과 소장에 만성 육아종성의 염증을 일으키고 때로는 소화관, 피부, 간, 관절 등에 병변을 가져온다⁴⁻⁶. 요네병은 대부분의 나라에서 발생하고 있으며 국내에서의 요네병 발생상황은 혈청반응 양성 분포율이 6.7~13.4%에 달한다고 한다⁷.

이 병의 중대한 문제점은 비임상적으로 오랜 잠복기와 함께 병이 진행되면서 지속적으로 원인균을 분변으로 배출하기 때문에 질병을 퍼지게 한다. 분변에서 배출되는 이 세균은 생체 외에서 배양시킬 때 매우 까다롭고 10주에서 16주 이상을 배양해야 분리 가능하므로⁸⁻¹⁰ 신속하고 정확한 진단법과 예방법의 개발이 요청되어 왔다. 이에 대한 요구로 분변이나 조직표본에서 직접적으로 원인균을 검출하는 방법^{11,12}, 흔히 사용되는 보체결합 반응에 의해 혈청중 항체를 찾아내는 방법^{13,14}, 아가젤면역확산법¹⁴⁻¹⁶, 효소면역항체법^{10,17} 등 수종의 진단법들이 소의 요네병을 진단하기 위하여 개발되어 이용되고 있다.

혈청학적 진단법은 신속하고 수행하기에 편리하지만 이런 방법들은 민감도와 특이성이 충분하지가 못하다^{8, 18-20}. 최근 효소 면역 항체법을 보완한 방법으로 요네병 음성균에서 100%에 가까운 특이성을 나타내는 흡수성 효소 면역 항체법(absorbed ELISA test)이 개발되었다²¹.

또한 가장 최근에 등장한 진단기법으로서 핵산 중합 연쇄반응을 이용한 방법이 이용되고 있다². Sample중에 균수가 적게 존재할 때에는 각종 진단법의 감수성이 낮은 점에 착안하여 적은 균의 유전자를 인위적으로 다량 증폭시켜 진단하는 방법이다. *M paratuberculosis*를 검출하기 위하여 PCR primer를 *M paratuberculosis*의 염기서

열로 만들고 분변으로 부터 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 행한다. *Mycobacterium*속 중에는 성상이나 항원성이 유사한 종이 많으며 *M paratuberculosis*는 *M avium*과는 항원성이 거의 동일하기 때문에 이를 동정하기 위해서는 유전자 진단법이 유용하다. Vary *et al*² 과 김²²은 IS900을 기본으로 하여 여러종류의 항산성균의 유전자를 조사한 결과 *M paratuberculosis* 만이 양성반응 결과를 나타냈다고 보고하였고, IS900은 요네병을 일으키는 세균에 매우 특이성이 높다고 보고하였다.

PCR의 연구 동향으로 여러 *Mycobacterium*속에 대한 유전자를 이용한 분자생물학적 기법에 의한 질병연구가 활발히 진행되어 왔다.

따라서, 본 연구자는 개량된 효소 면역 확산법과 핵산 중합 효소 연쇄 반응에 의한 균 검출방법을 동시에 수행하여 균특이성을 높힘으로써 본 질병 뿐만아니라 유사타 질병에 대한 진단, 예방 그리고 임상 미생물학의 연구 자료를 제공하고자 하였으며 그 기법에 매우 유용한 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 : 실험에 사용한 표준균주는 미국 Comell 대학에서 분양받은 *M paratuberculosis* ATCC 19698을 사용하였으며, absorbed ELISA 반응시 교차반응을 줄이기 위하여 수의과학연구소에서 *M phlei*를 분양받아 사용하였다. 강원도, 경기도, 충청도 일대에서 사육되는 소의 혈청과 분변을 이용하여 ELISA 반응, PCR 반응과 분변배양검사를 실시하였다.

실험방법 :

(1) 항원 제조 :

① *M paratuberculosis* 항원 제조 : Yokomizo *et al*²³의 방법으로 ELISA 검사를 위한 *M paratuberculosis* 항원을 제조하였다.

② *M phlei* 제조 : 흡착시험에 사용할 항원인 *M phlei*를 Herrold's egg yolk medium(HYM) 사면에 접종한 후 37℃에서 30일간 배양하였다. 배양된 세균은 2차 증류수로 부유시켜 수거했으며, 50w로 10분간 얼음 속에서 초음파 분쇄를 시켰다. 이것을 6겹 gauze로 여과하여 3,000rpm으로 20분간 원침하고, 침전물을 다시 2차 증류수에 부유시켜서 동결 건조한 후 *M phlei* powder를 autoclave 멸균하여 사용하였다.

(2) 효소 면역 항체법(ELISA test) :

① Non-absorbed ELISA test : ELISA 반응에 이용한 혈청은 56℃에서 30분간 비동화시킨 후 -70℃에 보관하면서 사용하였다. ELISA 측정시험은 김 등⁷의 방법에 따라서 실시하였다. 각 plate마다 control로 음성 혈청과 흡광도를 비교하여 P/N ratio가 2.0 이상을 양성, 1.5~1.9는의 양성으로 판정하였다.

② Absorbed ELISA test : 흡착법은 Miller *et al*²⁴의 방법에 따라 실시하였는데 이를 요약하면 100배 희석된 가검 혈청 1ml에 분말로 만든 *M phlei*를 40mg씩 첨가하였다. 4℃에서 2시간 간격으로 vortex 하면서 혈청내 비특이 항체를 흡착시킨 후 10,000rpm으로 5분간 원심하고 상층액으로 ELISA 검사를 하였다.

(3) PCR 법에 의한 진단 :

① *M paratuberculosis* chromosomal DNA 분리 : PCR에 이용될 template DNA는 Vary *et al*²의 방법에 따라 분리하였다.

② 중합 효소 연쇄반응(PCR) : 합성 oligonucleotide PCR primers(IS900)는 *Mycobacterium*종의 균주를 참고로 하여 미국 Cornell 대학 Applied biosystems에서 분석합성한 것을 다시 한국의 Perkin-Elmer Cetus사에 합성의뢰하여 사용하였다(Fig 1). PCR은 Saiki *et al*²⁵의 방법으로 실행하였다. 10mM Tris hydrochloride(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 200μM deoxynucleoside triphosphate와 1μM의 primers와 2.5U의 Taq Polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk Conn USA)을 각각 200μl Eppendorf tube에 100ng template DNA와 함께 넣고 최종 용량이 100μl가 되게 하였다. 35주기를 실행했으며, 94℃에서 5분간 predenaturation, 94℃에서 1분간 denaturation, 60℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension을 설정하여 DNA를 증폭시켰다. extension 시간을 5분동안 연장반응시켰으며, 이것은 Thermal cycler(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk Conn USA)를 사용하여 실행되었다. 또한 조건을 새로 설정하여 annealing은 64℃, 45초로 total cycle은 40회로 하고 template DNA는 100ng을 넣어서 좀더 특이한 검출을 유도하고자 하였다.

IS900/150C : CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG
IS900/921 : AATCAACTCCAGCAGCGCGCCTCG

Fig 1. Primers for PCR DNA primers were used for the synthesis of new strands complementary to the target DNA sequences.

③ Agarose 전기영동상에서 PCR 산물의 확인 : PCR에 의해 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel을 이용하여 50volt에서 70분간 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator로 확인하였다.

④ PCR 산물의 염기배열 분석 : 증폭 산물의 염기배열은 Sanger *et al*²⁶이 보고한 dideoxy chain termination method에 근거하여 분석하였다. Template DNA는 특이 band를 나타낸 균의 chromosomal double strand DNA를 사용하였다.

(4) 분변배양에 의한 균 분리, 동정 :

① 분변배양 : Germination을 2단계 실시한 후, 배양액을 Herrold's egg yolk medium(HYM)에 접종하였다. 배양은 Mycobactin J(Allied Monitor, Inc, USA)가 포함된 HYM 배지 3개와 Mycobactin J가 포함되지 않은 HYM 배지 1개를 이용하였다.

② 균의 분리, 동정 : HYM 배지에서 12주 배양후 같은 배지에 1주 계대 배양하였고 다시 Middlebrook H₇ Medium (Difco)에 배양하였다. 이 세균의 염색성, 집락의 특성, Mycobactin 요구성, 성장속도, 각 온도에서의 성장성, niacin 생산능, nitrate 환원능, tween 80의 가수분해능, 5% sodium chloride의 내성, urease와 catalase의 활성과 tellurite의 환원능을 검사하였다²⁷.

(5) 항균제 감수성 검사

항균제 감수성 시험은 Chiodini *et al*^{8,27}의 방법에 따라 실시하였으며, Ethambutol, Isoniazid(INH), Neotetrazolium chloride(NT), Rifampicin(RIF), Streptomycin(SM)과 Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide(TCH)를 일정한 희석농도로 첨가하여 tissue culture flask에 배양하였다. 항균제 감수성은 성장여부에 의하여 판정하였으며 대조군으로서는 항균제를 포함하지 않는 배지에 세균을 1 : 100으로 희석하여 접종한 후 비교하였다.

결 과

1. Non-absorbed ELISA test에 의한 양성우 분포 : 경기도, 강원도, 충청도 일대에서 사육되는 소 577두에 대하여 ELISA test를 실시한 결과, 지역별 감염율은 Table 1과 같다. 양성판정인 개체는 총 577두 중 63두(10.9%)로 나타났고, 의양성 반응은 13.9%, 음성반응은 75.2%로 나타났다. 경기도 지역의 양성우는 12.0%를 나타내 충청지역 6.9%와 강원지역 8%에 비교해 높게 나타났다.

Table 1. Local incidence of Johne's disease by non-absorbed ELISA test

Regions	Results			Total
	Positive	False-positive	Negative	
Kyunggi	48(12.8%)	34(9.0%)	294(78.2%)	376
Chungchong	7(6.9%)	6(6.0%)	88(87.1%)	101
Gangweon	8(8.0%)	40(40.0%)	52(52.0%)	100
Total	63(10.9%)	80(13.9%)	434(75.2%)	577

2. Absorbed ELISA test에 의한 양성우 분포 : 경기도, 강원도, 충청도 일대의 소 혈청을 갖고서 ELISA 검사를 실시한 결과, 양성판정인 63개체에 대하여 혈청을 *M phlei*로 흡착시키고 난 후 ELISA test를 실시한 결과, 양성은 10개체(1.7%), 의양성은 18개체(3.1%), 음성은 35개체(6.1%)로 나타났다(Table 2).

Table 2. Comparison of the prevalence between non-absorbed ELISA test and absorbed ELISA test

Method	Results			Total
	Positive	False-positive	Negative	
Non-absorbed ELISA	63(10.9%)	80(13.9%)	434(75.2%)	577(100%)
Absorbed ELISA	10(1.7%)	18(3.1%)	35(6.1%)	63(10.9%)

* : The number of positive cows by non-absorbed ELISA test.

3. Non-absorbed ELISA test와 absorbed ELISA test에 의한 양성우 분포의 비교 : Fig 2에서는 non-ab-

sorbed ELISA test와 absorbed ELISA test에 의한 결과의 분포율을 비교하여 graph로 나타낸 것이다. 양성우 의양성의 반응에서 두 진단법에 의한 오차는 각각 9.3%와 10.6%를 나타내었다.

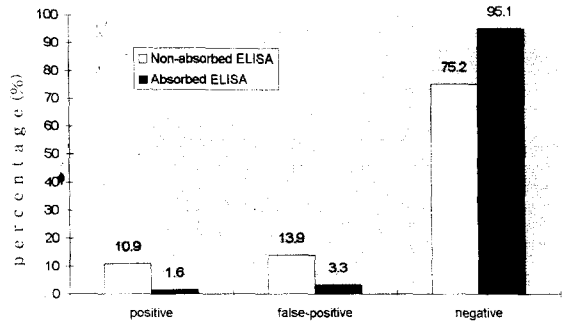


Fig 2. The graph showing comparison of incidences of Johne's disease by non-absorbed ELISA test and absorbed ELISA test.

4. 중합효소 연쇄반응에 의한 증폭 산물의 확인 : Non-absorbed ELISA test 결과, 양성우의 분변을 배양하여 균을 수거한 후 DNA를 분리하였고 분리한 DNA에 대하여 중합효소 연쇄반응을 시켰다.

Fig 3에 나타나는 바와 같이 표준균주인 *M paratuberculosis* ATCC 19698의 염색체 DNA와 같은 위치에서 sample의 염색체 DNA가 확인되었으며 PCR 결과, target DNA도 표준균주와 같은 위치에서 band가 나타났으

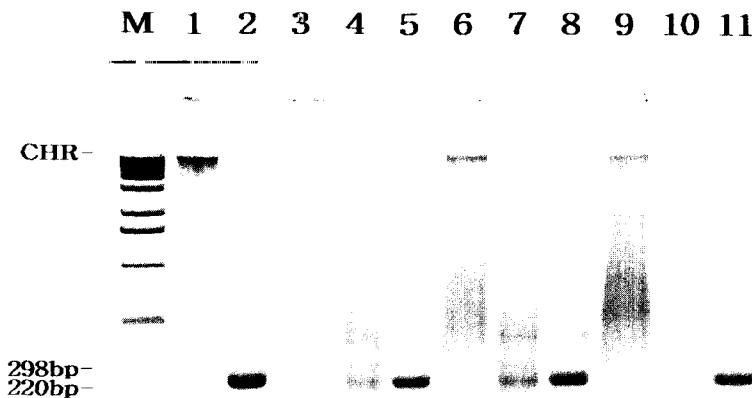


Fig 3. The photograph showing the detection of *M paratuberculosis* chromosomal DNA, PCR products after 1.5% agarose gel electrophoresis. M: 1Kb DNA Ladder, Lane 3: chromosomal DNA of standard, Lane 2, 5, 8, 11: PCR product of standard, Lane 3, 6, 9: chromosomal DNA of samples, Lane 4, 7, 10: PCR product of samples.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Fig 4. The photograph of amplification products of bacteria having specific band by using PCR primers IS900/150C and IS900/921. M: $\phi \times 174$ RF DNA/Hae III Fragments, Lane 1: PCR product of standard, Lane 2~10: PCR product of Samples, Lane 11: control without template DNA.

<<INFORMATION>> MAXIMUM HOMOLOGY : 97x

FILE ₁ NAME	START	END	MODE	FILE ₂ NAME	START	END	MODE
IS900.DNA	1	1451	NORMAL	SAMP.DNA	1	229	COMPLEMENT

FILE NAME	121	130	140	150	160	170	180
IS900.DNA	GGTCCCGCGACGACTCGACCGCTAATTGAGAGATGCGATTGGATCGCTGTGTAAGGACAC						
SAMP.DNA	GGCGATTAACTCTCTAGGCTAACCTAGCGACACATTCTCTGTG						
	-17	-8	2	12	22	32	42

FILE NAME	181	190	200	210	220	230	240
IS900.DNA	GTGGCGTGGTCGTCTGCTGGGTTGATCTGGACAATGACGGTTACGGAGGTGGTTGTGGC						
SAMP.DNA	CAGCCGACACCAGCAGACGACCCAACTAGACCTGTTACTGCCAATGCCTCCACCAACACCCG						
	43	52	62	72	82	92	102

FILE NAME	241	250	260	270	280	290	300
IS900.DNA	ACAACCTGTCTGGGCGGGCGTGGACGCGGTAAAGCCGACCACTACTGCATGGTTAATAA						
SAMP.DNA	TCTTGGACAGACCCGCCCCGACCTGCGGCCATTCCGGCTGGTAATGACGTACCAATAATT						
	103	112	122	132	142	152	162

FILE NAME	301	310	320	330	340	350	360
IS900.DNA	CGACGACGCGCAGCGATTGCTCTCGCAGCGGTGGCCAAACGACGAGGCGCGCTGCTGGA						
SAMP.DNA	GCTGCTGCGCGTGCCTAACGNGNGCGTGCCT??C?G?TTG??GCTGGCGCGAAGGACT						
	163	172	182	192	202	212	222

FILE NAME	361	370	380	390	400	410	420
IS900.DNA	GTTGATTGCGCGGTGACGACGTTGGCCGATGGAGCGAGGTCACTGGGCGATCGACTT						
SAMP.DNA	GACTAA.....						
	223	232	242	252	262	272	282

Fig 5. The comparison of nucleotidesequence of IS9000 in pMB22 with nucleotide sequence of PCR product (GCTGCTGCGCGTGCCTAACGNGNGCGTGCCT??C?G?TTG??GCTGGCGCGAAGGACT): used primer.

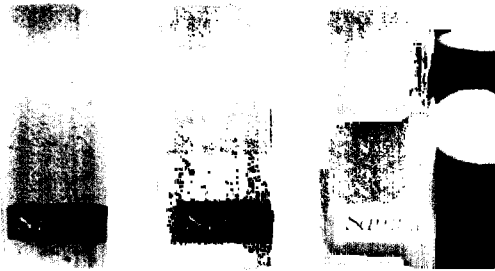


Fig 6. *M. paratuberculosis* isolated from fecal culture on Herrold's egg yolk medium which had been incubated for 12 weeks at 37°C.

며 그 크기는 각각 229bp의 크기였다. 그러나 표준균주는 선명한 band가 나타나 보였으나, samples에서는 band들이 희미하게 나타나 다시 조건을 설정하여 PCR을 실시하였다.

Fig 4는 조건을 새로 설정하여 증합효소 연쇄반응을 실시한 것으로, 이 때에는 PCR 산물 모두가 229bp에서 specific한 band가 나타났다. Fig. 4는 229bp의 specific한 band를 나타낸 것만을 전기영동한 사진이며, Lane 11은 control로서 template DNA는 넣지 않고 PCR 반응을 시킨 것이다.

5. PCR 산물의 염기 배열 분석 : 핵산 증합 연쇄반응 산물의 염기배열을 분석한 결과는 Fig. 5과 같다. Fig. 5에서는 229bp의 염기서열이 해석되어 있는데, PCR 반응에 사용한 IS900/150C primer와 IS900/921 primer는 그 림에서와 같이 나타났다. 증폭 산물의 1bp에서 229bp까지의 229bp 중 G/C Average는 59.4%인 것으로 나타났다. 또한 Green *et al*²⁸이 분석한 IS900의 1451bp의 염기배열과 증폭한 229bp DNA의 homology를 DNASIS program에 의해 비교 분석한 결과, 증폭된 sample의 229bp DNA중 194, 195, 197, 199, 203, 204번 위치의 base에서 염기배열이 다르게 나타나 97%의 homology를 나타냈다.

6. 분변배양에 의한 요네균의 분리 및 성장 검사 : 분변배양 8주 후에 육안으로 관찰가능한 균의 집락이 나타났다. 균의 집락은 작고, 거칠고 회백색이었다(Fig. 6). 분변배양후 나타나는 균의 집락을 slide glass 위에 도말하



Fig 7. Ziehl-Neelsen acid-fast stain of a smear prepared from fecal culture.

여 Ziehl Neelsen 염색을 실시하였으며 분변배양에서 분리된 균은 항산성 성질에 의하여 적색으로 바탕은 푸른색으로 염색되었다(Fig. 7).

계대한 배양물에 대하여 Table 3에 의거 성장조사를 실시하여 요네균을 분리해내었다. 요네균은 Mycobactin 요구성이었으며, 성장검사에서 음성으로 나타난 것은 42°C에서의 성장능, niacin 생산능, nitrate 환원능, 5% NaCl에서의 저항성, urease 생산능, tellurite 환원능의 검사이었고, catalase는 양성, tween 80은 가수분해하였다.

Table 3. Characteristics of *M. paratuberculosis* isolated from the fecal samples of cattle

Characteristics	Results
Staining	Acid-fast
Microscopic shape	Bacilli
Bacteria size	0.5×1.5µm
Colony morphology	Rough
Colony diameter	0.5-1.0mm
Mycobactin J requirement	+
Growth rate	12 weeks
Growth at 37°C	optimum
at 42°C	-
Niacin production	-
Nitrate reduction	-
Tween 80 hydrolysis	+
5% Sodium chloride tolerance	-
Urease	-
Catalase activity	+
Tellurite reduction	-

7. Non-absorbed ELISA 방법, absorbed ELISA 방법, PCR 방법, 분변배양법에 의한 결과 비교 분석 : 다음의 Table 4는 non-absorbed ELISA 방법, absorbed ELISA 방법, PCR 방법 그리고 분변배양법에 의한 각각의 결과들을 비교 분석한 것이다. Table 4에서 보는 바와 같이 분변배양 결과, absorbed ELISA 방법에서 양성으로 판명된 10마리의 소중 9마리의 분변에서 *M paratuberculosis* 가 배양되었으며, PCR법에 의한 결과와 일치하였다.

Table 4. Profile of results from tested herd

Non-absorbed ELISA	Absorbed ELISA	RCR	Fecal culture	No. of animals in 577 cows
-	-	-	-	434
±	-	-	-	80
+	-	-	-	35
+	±	-	-	18
+	+	-	-	1
+	+	+	+	9

- : netative, ± : false positive, + : positive.

8. 항균제 감수성 검사 : 분리한 균과 표준균주에 대하여 항균제 감수성 검사를 실시한 결과, 다음 Table 5와 같다. Isoniazid(10µg/ml), Neotetrazolium chloride(1:40,000), Rifampicin(0.25µg/ml), Streptomycin(2µg/ml), Thiophene-2-carboxylic acid(10µg/ml), Ethambutol(5µg/ml)를 일정한 농도로 포함한 배지에 첨가한 후 배양여부를 조사하여 감수성을 결정하였다.

이 중 Neotetrazolium chloride(1:40,000), Rifampicin(0.25µg/ml), Streptomycin(2µg/ml)에서는 감수성이 있는 것으로 밝혀졌다.

Table 5. Antibiotic susceptibility test of *M paratuberculosis*

Antibiotics	Concentration	Susceptibility
Ethambutol	5µg/ml	-
Isoniazid	10µg/ml	-
Neotetrazolium chloride	1:40,000	+
Rifampicin	0.25µg/ml	+
Streptomycin	2µg/ml	+
Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide	10µg/ml	-

고 찰

요네병 진단에 있어 가장 일상적으로 사용되는 혈청학적 진단법은 보체결합반응과 한천 혈 확산반응, 효소 면

역 항체법이다²⁹. 효소 면역 항체법에 의한 검사결과, 63두(10.9%)에서 양성반응을 보였으며, 이는 김 등⁷이 보고한 ELISA 양성 13.4%(363/2719)와 근소한 차이를 보였다. 또한 지역별로는 경기도(6.9%)가 타 도에 비교하여 낮은 분포율을 보였으나⁷ 본 연구에서는 경기도의 평균 양성율은 12.0%로 타 도에 비교해 4~5% 정도 높게 나타났다. 이는 근래에 경기도 지역에서 다두 밀집사육이 늘어나면서 전염원이 확산된 데에 기인한 것으로 보인다.

효소 면역 항체법에 의한 진단은 신속하고 경비가 적게 드는 장점이 있으나 민감성과 특이성이 충분하지 못하다²⁹. Milner *et al*²⁴은 absorbed ELISA를 개발하였는데 이 방법은 Yokomizo *et al*³⁰ 등이 개발한 진단법에 기본을 두고 있다. 이 진단법은 사용되는 항원의 순수 정제도에 따라 정확도가 증가하고, 공통 항원에 대한 항체를 혈청 흡착반응으로 제거함으로써 교차반응을 줄여 특이성을 높이고 있다²⁹. 따라서 본 연구자도 이러한 교차반응을 줄이기 위한 시도로 *M phlei*로 흡착시킨 혈청으로 ELISA test를 실시했으며 위의 교차반응의 결점이 훌륭하게 보완되었다. 그 결과 non-absorbed ELISA test에 대한 특이성은 84.4% 였으나 absorbed ELISA test 결과, 특이성은 96.8%로 나타났다. Absorbed ELISA test에 의하여 Milner(1990)와 Yokomizo(1983)는 각기 98.9%라고 보고하였고 Cox(1991)는 Absorbed EIA 시험에서 특이성이 99.8%에 이른다고 보고하였다²⁹. 본 연구에서도 non-absorbed test와 비교해 볼 때 이와같이 특이성이 크게 증가되었으며 absorbed ELISA에 대한 진단으로 의양성 반응이 크게 감소된다는 Milner *et al*²⁴과 Yokomizo *et al*³⁰의 결과들을 확인했다.

또한 최근 개발된 PCR 방법으로 *M paratuberculosis*의 DNA를 예민하게 검출할 수 있게 되었고 다른 항산성균을 검출하는 데에도 응용이 되고 있다^{31,32}. 그러나 *M paratuberculosis*는 *M avium* complex 특히 *M avium*의 특성과 유사하다^{1,6,33}. *M avium*과 *M paratuberculosis*와의 유전자 차이는 1에서 2%의 염기 구성성분만이 다를 뿐이다^{1,6}. 현재까지 시도되었던 여러가지 primer들 중에서 균 검출의 민감도와 특이도를 동시에 만족시켜 주는 IS900에 의한 진단연구가 많이 보고되었다^{2,28}. Green *et al*²⁸ 등은 *M paratuberculosis*에 있어서 IS900의 완전한 염기배열이 정해졌으며, 1451bp로 구성되며 G+C 함량은 66%에 해당한다고 하였다. 또한 IS900은 사람과 동물질병에서 *M paratuberculosis*의 정확한 진단을 위한 매우 특이적인

Marker임을 보고했다²⁸. Vary *et al*^{1,6} 등은 Mycobacteria의 삽입 배열인 IS900을 포함하고 있는 clone pMB22를 증명했는데 이것은 *M paratuberculosis*와 *M avium*을 구별하는데 사용되었다. IS900과 유사한 배열이 몇 mycobactin 의존성 *M avium*에서 발견되지만 IS900은 조사된 모든 *M paratuberculosis strain*에만 존재한다고 Green *et al*²⁸이 보고하였다.

Vary *et al*²은 IS900을 기본으로 하여 여러 종류의 Mycobacterial DNA sample을 조사한 결과, *M paratuberculosis*만이 양성결과가 나타났다고 보고하였다. 본 연구자들은 non-absorbed ELISA test에서 양성으로 나온 개체의 분변을 배양도중 PCR을 실시한 후 특이적인 band가 나타난 것을 Fig 4에 나타내었다. 그림에서 나타나는 바와 같이 *M paratuberculosis*의 특이적인 gene이 증폭되어 229bp 크기에서 band가 나타났다. 그리고 control로써 사용한 반응에서는 Lane 11과 같이 band가 출현하지 않았다.

Homology를 비교해본 결과 Fig. 5에서 보는 것과 같이 1451bp의 IS900과 97%가 일치하는 것으로 나타났다. 이에 대한 심도깊은 연구가 되어야 한다고 보며, 이는 국내 요네균 유전자의 변형으로 인해 해외 요네균과 차이점이 나타나는 것으로 사료된다.

분변배양에서 분리한 균은 천천히 성장하여 집락을 형성했으며, 집락은 비색소성이, 그 크기는 대략 0.5-1.0mm 정도 였다. 검경에서 항산성 간균을 나타냈고, 균은 0.5×1.5µm 의 크기였다. 이는 Control인 표준균주와 비교해 거의 같은 결과가 나왔으며 성장검사에서도 표준균주와 같은 결과였다. 천천히 성장하는 집락들을 분리하여 Mycobactin 의존성과 생화학적 제 성장들을 비교하여 균을 동정하였다. Nielsen *et al*³⁴도 요네균의 분변 배양에서 Mycobactin P 의존성과 성장시간 및 집락의 형태를 진단의 기준으로 보았다.

요네병의 진단은 분변 또는 병변조직에서 균을 분리하여 동정하는 방법이 가장 확실하다고 인정받고 있다. 그러나 임상적으로 감염된 동물은 질병기간동안 간헐적으로 원인균을 배출하기 때문에 위음성 반응이 일어날 수 있다고 한다².

항균제 감수성 시험결과 *in vitro*에서는 Neotetrazolium Chloride와 Streptomycin, Rifampicin 등에 감수성이 있지만 *in vivo*에서는 이 균 자체가 WBC에 탐식되어도 그 속에서 증식하면서 오히려 혈중항체, 항균제 등에 의한

영향으로부터 보호를 받게 되어 근본적인 치료가 불가능하게 된다. 미국은 사균백신, 유럽은 약독생균백신을 실시하나 우리나라는 백신을 실시하지 않고 있다. 이유는 백신접종시 양성축과의 감별진단이 어려워지고, 결핵진단시 교차반응에 의한 가양성 반응이 많이 발생하기 때문에 진단시 장애요소로 작용하기 때문이다. 또한 감염우에 대한 치료는 사람의 결핵치료와 같이 장기간 실시해야 하므로 경제성도 없고 치료기간동안 병균을 전파시킬 수도 있기 때문에 치료를 시도하여서는 안된다.

따라서 요네병을 근절하기 위한 신속하고 신뢰도 높은 진단법이 요구되어 왔으며³⁵ 유일하게 신빙성이 있는 방법은 6개월마다 모든 개체의 분변으로부터 균을 배양하여 배양 양성개체를 도태시키는 방법이었다³⁶.

본 질병의 조기 검색진단법으로서 가장 널리 사용되는 방법은 균분리배양법과 Polymerase Chain Reaction (PCR)의 병용 및 absorbed ELISA 방법을 동시에 사용하는 것이다. 따라서 absorbed ELISA 와 PCR 및 균분리 배양법을 병용함으로써 효과적인 조기 진단을 하여 이 질병으로부터 오는 피해를 미연에 방지하여야 할 것이다.

DNA probe에 의한 hybridization 기술에 의한 신속진단과 *M paratuberculosis*의 항원성을 결정하는 gene을 cloning 하여 발현되는 protein에 의한 효과적인 진단 및 예방책을 개발하는 데에도 심도깊은 연구가 필요하며 본 진단법의 자료는 국내 요네병의 예방 및 박멸대책으로서 일익을 담당하리라 기대한다.

결 론

경기도, 강원도, 충청도 일대의 소 577두에 대하여 *M paratuberculosis* 항원에 대한 non-absorbed ELISA test, absorbed ELISA test로 혈청 항체가를 조사하였다. 그리고 non-absorbed ELISA 반응의 항체 양성우에 대한 분변배양을 실시하여 배양중인 균을 PCR 반응시켰으며, 계대 배양을 하며 분리동정하였다. 요네병 진단을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

① 경기도, 강원도, 충청도 일대의 소 혈청을 갖고서 non-absorbed ELISA test를 실시한 결과, 양성판정 개체는 577두중 63두(10.9%)로 나타났고, 의양성 반응은 13.9%, 음성반응은 75.2%로 나타났다.

② 양성판정 개체의 혈청을 *M phlei*로 흡착시킨 후 ELISA test를 실시한 결과, 63두 양성우 중 10두(1.7%)가

양성반응을 보였다.

③ 분변에서 배양된 *M paratuberculosis*를 사용하여 증합 효소 연쇄 반응결과 9개체(1.6%)에서 229bp의 specific한 target DNA가 검출되어 양성 판정되었다.

④ 분변배양에 의한 균 분리, 동정 결과 9개의 samples에서 *M paratuberculosis*가 검출되었다. 효소 면역 항체법(ELISA)에 의한 방법은 다른 *Mycobacterium* 속균과의 교차 및 비특이적인 반응에 의한 위양성 반응의 결점이 있음이 지적되었다.

⑤ 각각의 진단법을 비교 분석한 결과, absorbed ELISA 반응은 교차반응을 줄일 수 있었고, PCR법은 세균 배양법보다 훨씬 빠른 시간내에 요네병을 진단할 수 있었다.

⑥ 항균제 감수성 시험 결과, neotetrazolium chloride와 rifampicin, streptomycin에서 감수성인 것으로 나타났다. 그러나 약물치료는 권장되지 않고 조기진단에 의한 도태방식을 따라야 한다.

참고 문헌

1. McFadden JJ, PD Butcher, J Thompson, *et al.* The use of DNA probes identifying restriction fragment-length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Microbiol*, 1: 283~291, 1987.
2. 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. *J Clin Microbiol*, 28: 933~937, 1990.
3. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A Method for Avoiding False-Positive Reactions in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Jpn J Vet Sci*, 47: 111~119, 1985.
4. Gitnick G, Collins J, Beaman B, *et al.* Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci*, 34: 925~932, 1989.
5. Graham DY, Markesich DC, Yoshimura HH. *Mycobacteria* and inflammatory bowel disease. Results of culture. *Gastroenterology*, 92: 436~442, 1987.
6. McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, *et al.* Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin Microbiol*, 25: 796~801, 1987.
7. 김종만, 안종삼, 우승룡 등. 면역학적 방법에 의한 한우와 유우의 요네병 발생조사. *대한수의학회지*, 34(1):93~97, 1994.
8. Chiodini RJ, HJ van Kruinigen, RS Merkal. Ruminant paratuberculosis(Johne's disease) : the current status and future prospects. *Cornell Vet*, 74: 218 262, 1984.
9. Merkal RS. Paratuberculosis : advances in cultural, serologic and vaccination methods. *J Am Vet Med Assoc*, 184: 939~943, 1984.
10. Tsai SJ, Hutchison LJ, Zarkower A. Comparison of a Dot immunobinding assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunodiffusion for serodiagnosis of paratuberculosis. *Can J Vet Res*, 53: 405~410, 1989.
11. Collins MT, Kenefick KB, Sockett DC, *et al.* Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* using filter concentrated fecal specimens. *J Clin Microbiol*, 28: 2514 2519, 1990.
12. Kim YG, Bech-Nielsen S, Gordon JC, *et al.* Comparison of two method for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am J Vet Res*, 50(7): 1110~1113, 1989.
13. National Veterinary Services Laboratory Staff : Microtitration complement fixation techniques, p1~18, National Veterinary Services Laboratory, Ames Iowa, 1986.
14. Sherman DM, JM Gay, DS Bouley, *et al.* Comparison of the complement fixation and agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res*, 51: 461~465, 1990.
15. Sherman DM, B Bray, JM Gay, *et al.* Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis. *Am J Vet Res*, 50: 525~530, 1989.
16. Sherman DM, RJF Markham, F Bates. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 185: 179~182, 1984.
17. Collins MT, DC Sockett, S Ridge, *et al.* Evaluation of

- a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J Clin Microbiol*, 29: 272-276, 1991.
18. Colgrove GS, CO Thoen, BO Blackburn, *et al.* Paratuberculosis in cattle : a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Vet Microbiol*, 19: 183-187, 1989.
 19. de Lisle GW, BS Samagh, JR Duncan. Bovine paratuberculosis II . A comparison of fecal culture and the antibody response. *Can J Comp Med*, 44: 183-191, 1980.
 20. Goudswaad J, NJL Gilmour, RG Dijkstra, *et al.* Diagnosis of Johne's disease in cattle: a comparison of five serological tests under field conditions. *Vet Rec*, 98: 461~462, 1976.
 21. Yokomizo Y. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) using *Mycobacterium phlei*-absorbed serum for the diagnosis of bovine paratuberculosis in a field study. *Jpn Agric Res Q*, 20: 60~67, 1986.
 22. 김태중. 중합효소 연쇄반응을 이용한 소의 요네병 진단에 관한 연구. *건국대학교 생명과학지*, 1:21, 1994.
 23. Yokomizo Y, Merkal RS, Lyle PAS. Enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 44(11): 2205, 1983.
 24. Milner AR, Lepper AWD, Symonds WM, *et al.* 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, 1987.
 25. Saiki R, D Gelfand, S Stoffel, *et al.* Primer-directed enzyme amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487~491, 1988.
 26. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463~5467, 1977.
 27. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2, p1435~1457.
 28. Green EP, MLV Tizzard, MT Moss, *et al.* Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *M paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res*, 17: 9063~9072, 1989.
 29. 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. *Australian Veterinary Journal*, 68(5): 157-160, 1991.
 30. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS(1983a). In *Proceedings of the International Colloquium on Research in Paratuberculosis*, edited by Merkal RS, National Animal Disease Centre Ames Iowa, p94.
 31. Hance A, B Grandchamp, V Levy Frebault, *et al.* Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol*, 37: 843~849, 1989.
 32. Hartskeerl R, YM de Wit, P Klatser. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol*, 155 :2357~2364, 1989.
 33. Hurlley S, GA splitter, RA Welch. Deoxynucleotide acid relationships of *Mycobacterium paratuberculosis* to other members of the family *Mycobacteriaceae*. *Int J Syst Bacteriol*, 38: 143~146, 1988.
 34. S Bech-Nielsen, J Berg Jorgensen, P Ahrens, *et al.* Diagnostic Accuracy of a *Mycobacterium phlei*-Absorbed Serum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis in Dairy Cows. *J Clin Microbiol*, 30(3): 613~618, 1992.
 35. JWB van der Giessen, RM Haring, E vauclore, *et al.* Evaluation of the Abilities of Three Diagnostic Tests Based on the Polymerase Chain Reaction To Detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Cattle: Application in a Control Program. *J Clin Microbiol*, May: 1216~1219, 1992.
 36. Merkal RS, AB Larsen, KE Kopecky, *et al.* Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculosis in cattle. *Am J Vet Res*, 29: 1533~1538, 1968.