

## 완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제( )

(과제번호 : PJ008970)

### 소 요네병 농장 청정화모델 개발 연구

(Research of Johne's disease control program in cattle farms)

서울대학교

연구수행기간

2012.05 ~ 2016.12

농촌진흥청

## 제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “소 요네병 농장 청정화모델 개발 연구”(개발기간 : 2012. 05. ~ 2016. 12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 유전체 정보를 활용한 요네병 발현 양상 기전 연구

제2세부연구과제 : 소 사육농장의 요네병 근절모델 개발 연구

2017. 2. 28.

제1세부/협동연구기관장명 : 서울대학교

제1세부/협동연구책임자 : 유한상

참여연구원 : 차승빈, 신민경, 정명환, 박홍태, 박현의,  
심수진

제2세부/협동연구기관장명 : 국립축산과학원

제2세부/협동연구책임자 : 정영훈

참여연구원 : 강석진, 한태석, 임석기, 임현주, 김태일,  
최창용, 김의형, 도윤정, 한재익, 김재명

주관연구책임자 : 유한상



주관연구기관장 : 서울대학교 산학협력단장



농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서  
열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제번호	PJ008970		연구기간	2012. 05. 01. ~ 2016. 12. 31.
연구사업명	단위사업명	농업공동연구		
	세부사업명	친환경안전농축산물생산기술개발		
	내역사업명	가축질병예방기술개발		
연구과제명	주관과제명	소 요네병 농장 청정화모델 개발 연구		
	세부(협동) 과제명	(1세부) 유전체 정보를 활용한 요네병 발현 양상 기전 연구 (1협동) 소 사육농장의 요네병 근절모델 개발 연구		
연구책임자	구분	연구기관		소속
	1세부	서울대학교		서울대학교 수의 과대학
	1협동	국립축산과학원		국립축산과학원 낙농과
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 18 명 내부: 9 명 외부: 9 명	총 연구개발비	정부: 750,000 천원 민간: 0 천원 계: 750,000 천원	
위탁연구기관명 및 연구책임자			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:		상대국 연구기관명:	
본 연구에서는 유전체 정보를 활용한 요네병 발현양상 기전 연구를 통해 소 요네병의 농장 청정화 모델을 확립하기 위하여 대규모 소사육농장에서 요네병 발생실태를 조사하였으며 요네병의 실험동물 감염모델을 확립하고 국내 분리주를 확보함. 이후 요네병의 목적동물인 소를 대상으로 감염모델을 확립하고 한국형 요네병 근절 프로그램을 개발함. 또한 <i>M. paratuberculosis</i> 의 국내 분리주 확보 및 특성을 분석하기 위하여 국내 분리주의 세균학적 및 유전학적 특성분석을 병행함. 이후 biomarker를 발굴하여 이에 대한 감염시기에 따른 유효성을 분석하였으며, 이를 이용하여 면역학적 진단기법을 개발하고 한국형 요네병 근절프로그램을 적용함. 이후 개발된 진단기법의 효능을 국내 가점혈청을 이용하여 평가하고 요네병 양성우의 생체지표 변화를 관찰함. 최종적으로 개발된 진단기법의 상호 연계성을 분석하고 현장 적용 시 발생된 문제점을 보완함.		보고서 면수 255쪽		

## 〈 국 문 요 약 문 〉

<b>연구의 목적 및 내용</b>	<p>본 연구에서는 유전체 정보를 활용한 요네병 발현양상 기전 연구를 통해 소 요네병의 농장 청정화 모델을 확립하기 위하여 대규모 소사육농장에서 요네병 발생실태를 조사하였으며 요네병의 실험동물 감염모델을 확립하고 국내 분리주를 확보하였다. 이후 요네병의 목적동물인 소를 대상으로 감염모델을 확립하고 한국형 요네병 근절 프로그램을 개발하였다. 또한 <i>M. paratuberculosis</i> 의 국내 분리주 확보 및 특성을 분석하기 위하여 국내 분리주의 세균학적 및 유전학적 특성분석을 병행하였다. 이후 biomarker를 발굴하여 이에 대한 감염시기에 따른 유효성을 분석하였으며, 이를 이용하여 면역학적 진단기법을 개발하고 한국형 요네병 근절 프로그램을 적용하였다. 이후 개발된 진단기법의 효능을 국내 가검혈청을 이용하여 평가하고 요네병 양성우의 생체지표 변화를 관찰하였다. 최종적으로 개발된 진단기법의 상호 연계성을 분석하고 현장 적용 시 발생된 문제점을 보완하였다.</p>
<b>연구개발성과</b>	<p>요네균 감염 마우스 및 소에서 요네병균 감염에 따른 유전체(transcriptomes) 발현 양상 분석을 통해 요네병감염과 상관성이 높다고 판단되는 유전자들을 발굴하고, 이들 유전자들 중 요네병 감염을 탐색할 수 있는 지표물질로서의 가치가 높은 물질을 후보물질로 발굴하였다. 또한 감염 단계 및 ELISA 수치에 따른 biomarker 후보물질의 발현 경향을 살펴보았으며 총 44두의 양성 및 음성 개체의 전혈에서 biomarker 유전자의 발현을 분석하여 감염 여부를 진단하였다. 분변에서 균 검색기법의 개발 및 확립을 위해 Guanidine thiocyanate 및 DNA spin column을 이용한 DNA 추출방법을 개발하였으며 IS900 및 ISMAP02를 목표로 하는 real-time PCR 기법을 확립하였다. 또한 기존의 배양법에 비해 짧은 시간에 균의 동정이 가능하고 실시간 모니터링이 가능한 Versa-TREK ParaJem system을 확립하였다. 국내에서 분리된 요네균 분리주를 IS1311 PCR-REA typing, MIRU-VNTR typing, MLSSR typing 을 이용하여 문자역학적 특성을 분석하여 외국의 분리주와는 다른 역학적 특성을 나타내는 것을 확인하였다. 대규모 소농장 요네병 유병율 조사 및 관리 프로그램의 적용을 통해 정기적인 요네병의 유병율 모니터링으로 우군 내 질병 현황분석을 하였으며 요네병 양성유의 가계도 작성 및 생체지표 변화 모니터링을 통해 수직, 수평감염의 변화를 관찰하였다. 또한 소 요네병 양성개체에서의 항체가 변화를 주기적으로 관찰하고 목장 내 오염도를 측정하여 질병 전파의 위험요소를 분석하였다.</p>
<b>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-대규모 소 사육농장 한국형 요네병 근절프로그램 확대 적용</li> <li>-요네병 인증제 도입을 위한 정책 자료로 활용</li> <li>-유전체 분석을 통해 소 요네병 발현 양상을 유전, 면역학적으로 규명함으로써 이 질병발생에 관련된 숙주동물의 면역반응 등 체내 반응의 규명을 통해 소 요네병 발병기전을 바탕으로 한 예방기법 확립을 위한 기</li> </ul>

	초자료 제공 -첨단기술인 유전체 분석기법을 이용해 습득한 유전정보 및 관련정보를 현장에서 질병예방을 위해 활용할 수 있는 know-how 확립				
중심어 (5개 이내)	요네병	청정화모델	유전체 발현	발병기전	

## 〈 Summary 〉

Purpose& Contents	<p>In this study, we investigated the pathogenesis of Johne's disease using the transcriptomic approach. In order to establish a control model for paratuberculosis infection, first we investigated distribution of paratuberculosis in large-scale cattle farm. Second, we established a infection model in experimental animal and natural host. Also, we analyzed bacteriological and genetic characteristics of field isolates of <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>. Evaluation of biomarker candidates was performed according to the infection stages. Also diagnostic method based on biomarkers was developed. After that, the efficacy of the developed diagnostic technique was examined with field samples. Also, change of the biomarkers in paratuberculosis infected cattle was anaylzed. Finally, we analyzed interconnection of developed diagnostic methods and optimization of diagnostic method was also performed.</p>
Results	<p>Transcriptomic study of paratuberculosis infection in mice and cows identify the genes that are highly correlated with infection.These biomarker candidate genes were evaluated as an indicator of infection according to the infection stage and ELISA level. Application of biomarker candidates was performed with 44 positive and negative animals to detect infection. We developed a DNA extraction method using guanidine thiocyanate and DNA spin column and established a real-time PCR technique targeting IS900 and ISMAP02. In addition, we have established Versa-TREK ParaJem system which enables identification of bacteria in a shorter time than conventional culture method and real-time monitoring using computer. Molecular epidemiological characteristics of isolates from Korea were analyzed using IS1311 PCR-REA typing, MIRU-VNTR typing and MLSSR typing. Through the monitoring of the prevalence rate of large-scale cattle farms and the prevalence rate of the disease the analysis of the disease status in the herd was carried out. We also analyzed the risk factors of disease transmission by periodically observing the changes of antibody level of the herds and measuring the pollution levels in the pasture, fence, and playground in the pasture.</p>
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Application of control program of Johne's disease to large scale cattle farm.</li> <li>-Use as policy data for introducing certification system of Johne's disease</li> <li>-Provide basic information for establish of paratuberculosis through the identification of the pathogenesis of paratuberculosis using the</li> </ul>

	genome analysis -Establishment of know-how to utilize genetic information and related information acquired by using high-tech genetic analysis techniques for disease prevention in the field				
Keywords	Johne's disease	Control model	Genome expression	Pathogenesis	

## 〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	13
제 3 장 연구수행 내용 및 결과 .....	19
제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도 .....	229
제 5 장 연구결과의 활용계획 등 .....	236
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	237
제 7 장 연구개발성과의 보안등급 .....	245
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황 .....	246
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	247
제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	248
제 11장 기타사항 .....	250
제 12장 참고문헌 .....	251

# 제 1 장 연구 개발 과제의 개요

## 제1절 연구 개발 목적

- 소 요네병의 실험동물 및 숙주동물(소)의 감염모델을 확립한다.
- 요네병균 감염에 따른 숙주동물의 유전체 및 단백체 분석을 통한 biomarker를 발굴한다.
- 발굴 biomarker 을 이용한 진단 기법을 개발한다.
- 현장 적용을 통한 개발 진단기법의 효율성을 평가한다.
- 국내 분리 *M. paratuberculosis* 의 세균학적, 유전학적 및 역학적 특성을 분석한다.
- 국내 소 요네병 청정화 및 예방을 위한 기초 자료를 제공한다.
- 한국형 요네병 근절 프로그램을 개발하여 적용한다.

## 제2절 연구 개발의 필요성

요네병(Johne's Disease, Bovine paratuberculosis)은 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*에 의한 세균성 질병이며 6개월 이전 송아지에 감수성이 높으며 감염 후 긴 잠복기 후 만성의 설사, 쇠약, 급격한 체중감소, 산유량 감소 등의 만성소모성 임상증상 발현 후 폐사하며 유효한 치료법이 없는 실정이며 국내에서는 제2종 가축전염병으로 규정하여 관리하고 있다.

요네병은 우리나라뿐만 아니라 미국, 유럽 등 여러 나라에서 중요한 만성, 소모성 질병으로 인식되고 있다. 매우 긴 잠복기(2~3년)를 가지는 것이 특징으로 감염우는 초기 뚜렷한 임상증상 발현 없이 감염우의 분변을 통해 다량의균을 배설하여 사료, 음수, 우유 등을 오염시킴으로서 중요한 전파원으로 작용한다. 이 질병의 전파는 오염된 사료, 음수, 우유 등의 섭취에 의한 경구감염, 직접접촉감염, 임신우에서의 태반감염, 감염 숫소와의 교미, 정액등을 통해서 암소에 감염 등 다양한 경로를 통해 전파될 수 있다.

일반적으로 생후 4개월 이내의 어린 송아지가 가장 감수성이 높으나, 임상증상은 보통 감염 후 2~4년이 지난 후에 나타나게 된다. 특히 요네병균은 우유의 저온 살균에도 저항성을 나타내어 공중위생학적으로도 매우 중요한 질병이다. 또한 최근 사람에서 면역매개 염증성 장질환인 Chron's Disease의 원인중 하나가 *M. paratuberculosis* 와의 연관성이 제기되고 있어서 공중보건학적으로도 매우 중요한 질병중 하나이다 (Abubaker 등 2008).

분변으로 배출된 원인균은 물, 사료, 우유, 초지 등을 오염시켜 농장 내 지속·순환감염이 발생되며 또한 외부에서 요네병 양성축이 입식 시 전파된다. 요네병에 감염된 개체들은 우유생산의 감소, 성장을 저하, 감염동물의 도태 등으로 많은 경제적인 피해를 유발하고 있다. 현재 미국에서 요네병균의 혈청양성률이 젖소 22%, 육우 8%, 영국은 젖소 34.7%의 양성률을 보여, 낙농선진국에서 약 50%의 농장이 감염되어 있을 것으로 추정되며, 감염된 농장의 손실액은 성우

1두당 연간 75~100\$로 추정하고 있다. 이로 인한 경제적인 피해는 미국의 경우 연간 2.2억 (\$220 million)달러로 추정하고 있으나, 국내에서의 피해상황은 정확하게 조사된 바는 없지만 그 경제적인 피해가 수천억 원 정도로 추정하고 있다.

국내에서 요네병연구는 1967년 국내발생이 보고된 이후로 진단법개발 및 역학 조사를 중심으로 진행되어 왔다. 1968년 0.96% 이었던 혈청양성율이 1994년 6.7%, 2003년 6.7~7.1%로 추정하였고, 2009년 경남지역조사에서는 개체별 감염은 3.3%이나, 농장별 감염율은 13.8%로 점차 확산일로에 있는 것으로 추정되고 있다. 특히 흑염소에서 조사결과 개체별 4.6~15.3%, 농장별 감염율은 18.2~38.2%로 추정되어 소 이외의 다른 반추동물에서도 그 감염이 증가하고 있다. 요네병의 임상증상을 보이는 개체로 병성감정결과 소 요네병으로 확진한 것이 2008년 48건(90두), 2009년 111건(277두), 2010년 168건(432두), 2011년 157건(353두)로 발생이 계속적으로 증가하고 있다. 그러나 이러한 발생의 증가와 더불어 감염초기 또는 준임상형 상태의 동물이 분변으로 균을 배출하여 감염원으로 작용하는 동물수의 증가에 대한 정확한 보고는 없는 실정이다.

현재 요네병의 진단은 임상증상을 바탕으로 한 임상진단, 병리조직학적 검사, 분변에서의 균 배양 및 검출, Johnin 을 이용한 intradermal test, interferon- $\gamma$  검출을 기초로 한 세포면역활성 검사, 요네병균 항원을 이용한 ELISA기법 및 IS900 gene을 확인하는 PCR 기법 등이 활용되고 있다. 그러나 이러한 방법들은 감염초기 또는 준임상형 (sub-clinical)의 감염우들을 검출하기 어려운 단점이 있어서, 이러한 개체들을 검출할 수 있는 새로운 진단 기법의 개발이 요구되고 있다.

낙농 선진국에서는 막대한 경제적인 피해를 줄 뿐만 아니라, 공중보건학적으로도 매우 중요한 소 요네병을 근절하기 위하여 역학적 연구, 발병기전(pathogenesis)에 관한 연구, 진단법 개량연구, 예방대책에 대한 연구 등 다양한 연구가 진행되어 왔다. 최근 소 요네병 전파원을 가장 중요한 준임상형 상태에서 균을 배출하는 개체(fecal shedder in subclinical stage)를 검출하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 이는 유전체 또는 단백체 분석을 통하여 감염개체가 감염초기에 발현하는 biomarker를 발굴함으로서 이를 이용한 진단에 활용하는 연구들이다. 그러나 우리나라에서는 소 요네병에 대하여 이러한 연구가 전무한 상태이다. 현재 우리나라로 소 요네병이 만연되어 있고, 또한 확산일로에 있는 것으로 추정되는 상황에서 유전체 및 단백체 분석을 활용한 발병기전에 대한 연구를 통하여 감염개체를 감염초기에 효율적으로 발굴할 수 있는 기법을 개발하여, 현장에 적용함으로서 소 요네병에 의한 피해를 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

국내 요네병 진단 및 발생에 관한 실태조사는 간헐적으로 실시되고 있으나 양성 농가의 사후관리가 모호하고 국가단위의 지속가능한 요네병 방역 정책은 미흡한 실정이다. 또한 국내 소 사육두수의 증가, 밀집 및 대규모·전업화에 의한 요네병 감염 위험요인이 증가되고 있으며 요네병 근절을 위한 농장 단위 양성우 유무 조사 및 조기진단법 개발이 필요하며 한국형 요네병 근절적용 프로그램 개발 및 적용이 시급한 실정이다.

## 제3절 연구 개발 범위

### <제 1 세부: 유전체 정보를 활용한 요네병 발현 양상 기전 연구>

#### 1. 소 요네병의 실험동물 및 숙주동물의 감염모델 확립

마우스에서 요네병균의 접종 용량 및 투여 방법을 확립하며, 실험동물에서 요네병 평가를 위한 면역학적 및 병리학적 평가 지표를 확립하고, 요네병의 감염 수준별 평가에 따른 숙주동물 실험대상을 확보한다.

#### 2. 요네병균 감염에 따른 숙주동물의 유전체 분석을 통한 biomarker 발굴 및 가치평가

요네병 감염 수준별에 따른 혈중의 유전체(transcriptomes) 발현 양상을 분석한 뒤 요네병균 감염의 주요 지표 물질(biomarker)을 발굴하며 이후 biomarker 후보물질의 요네병 감염단계에 따른 상관성을 분석한다.

#### 3. biomarker 후보물질에 대한 면역학적 진단기법 개발

biomarker 후보물질의 단백질 발현 및 항체를 생산하며, biomarker 후보 유전자의 real-time PCR 기법을 개발한다. 또한 재조합단백질 및 항체를 이용한 ELISA 등 면역학적 검사기법을 개발하며, 요네균체 항원을 이용한 ELISA 등 면역학적 검사기법을 개발한다.

#### 4. 발굴 biomarker 등을 이용하여 개발된 진단기법의 야외 효능 평가

국내 가검 혈청을 이용한 개발 진단기법의 적용 및 효능평가를 실시하며, 이후 국내 소 요네병 발생농장에서 현장 적용을 수행한다.

#### 5. 국내 분리 요네병균의 세균학적, 역학적 특성 분석

국내 분리주의 분자 유전학적 특성을 분석하며 국내 분리주와 외국의 분리주와의 역학적 상관관계를 분석한다.

#### 6. 국내 소 요네병 청정화 및 예방을 위한 기초자료 제공

국내 요네병 발생 상황을 분석하며 요네병 예방 정책을 제안한다.

## <제 2 세부: 소 사육농장의 요네병 근절모델 개발 연구>

### 1. 요네병 발생 실태 조사

대규모 소 사육농장을 대상으로 한 요네병 항체가 분석 및 발생실태 조사를 수행한다.

### 2. 한국형 요네병 근절 프로그램 개발 및 적용

축산 선진국 요네병 근절정책을 분석하며, 농장 위험도 분석, 가축질병 보증이력제, 정책 홍보를 수행한다. 또한 방역 수칙 확립, 사양관리 방법 제시 및 분석을 실시한다.

### 3. 요네병 근절 프로그램 적용 전후 질병 발생 모니터링

정기 시료 채취 및 분석을 수행하며, 이후 양성축군 pedigree 작성 및 분석을 실시한다. 또한 농장 사양관리별 위험도 분석을 수행한다.

### 4. 요네병 양성우 생체지표 및 면역학적 모니터링

임상증상 전후 생리적 변화 조사·분석를 수행하며, 혈액 및 우유 등 다양한 시료에 대한 항체가 변화 모니터링을 실시한다. 또한 혈액 면역학적 변화 모니터링을 수행한다.

### 5. 요네병 근절 프로그램 적용 평가 및 경제성 분석

농장 만족도 및 경제적 가치 분석을 실시하며 요네병 관리 모델 확대 적용 자료를 제시한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 연구 현황

#### 1. 역학적 조사연구

국내에서 역학적 조사연구는 검역본부를 중심으로 요네병 발생조사, 항원 특이성 및 우유, 분변 검사 진단 및 분포 연구가 수행되어 왔다. Kim 등 (1994)은 면역학적 방법에 의한 한우와 유우의 요네병 발병에 대해 조사하였고 이어 ‘소 요네병 항원분석 및 특이성연구 ('06~'07)', '우유를 이용한 요네병 진단기술 개발 ('08~'09)', '국내 반추류 및 야생멧돼지에서의 요네균 분포와 분자생물학적 특성연구 ('10~'11)' 등의 연구과제가 수행되었다. 지자체 연구기관에서도 지역별로 요네병의 항체 양성을 대한 조사 및 연구가 수행되었다. 울산지역에서는 ‘울산지역 젖소의 요네병 감염실태 조사 (울산시보건환경연구원, 2007)’ 연구가 수행된 바 있으며 경상북도 동부 지역에서 젖소 및 한우의 요네병 감염실태 조사 결과 항체 양성을 각각 6.9%와 6.8%이며 양성농장은 각각 22%와 7%로 나타났다는 보고가 있다 (Lee 등, 2009).

#### 2. 발병기전에 관한 연구

국내에서 소 요네병의 발병기전에 관한 연구는 초기 단계에 머물고 있는 실정이다. 본 연구팀이 수행한 마우스 모델 및 임상적으로 요네병에 감염된 소의 microarray를 이용한 유전체 분석 및 그에 따른 functional network 분석 및 canonical pathway 분석을 통해 감염 초기의 무증상 fecal shedder 그룹에서 reactive oxygen species(ROS) 발현 유전자가 상대적으로 감소한 것을 알 수 있었고 ELISA 양성 그룹에서 LXR/RXR 및 보체 시스템의 활성이 일어난 것을 확인할 수 있었다 (Shin 등, 2015a; Shin 등, 2015b).

#### 3. 진단법에 관한 연구

국내에서 소 요네병이 1967년 최초보고 이후 초기에는 요네병의 검진을 위한 진단액개발을 통한 진단법개량에 초점이 맞추어졌다. 소 요네병을 세포성면역에 기초한 피내반응(intradermal test)으로 진단하였기 때문에 이를 위한 Johnin의 순수정제하기 위한 정제기법 개량 등에 관한 연구와 비특이 *Mycobacterium* 속균 감염을 감별진단하기 위한 진단법 개량에 중점적으로 진행되었다 (Choi 등, 1968b). 그러나, 세포성 면역에 기초한 피내반응법을 이용한 요네병의 진단이 현실적으로 여려가지 어려움이 있기 때문에 이를 극복하고자, 다량의 가검물을 처리하기 위하여 체액성 면역에 기초한 혈청학적 진단법 개발에 관한 연구가 진행되어 agar gel immunodiffusion (AGID), complement fixation (CF) test, ELISA 기법등 다양한 혈청학적 진단방법들이 개발이 시도 되었다 (Kim 등, 1994, Kim 등 1997, Kim 등 2002). 특히 동시에 다량의 혈청을 처리할수 있는 ELISA 기법의 specificity 와 sensitivity 를 높이기 위해 *M. paratuberculosis* 의 sonicated antigen, Johnin, 쟈조합항원등의 다양한 항원의 개발이 시도 되

었고, *M. paratuberculosis* ModD 단백질의 C-terminal region 을 분석하여 B-cell epitope 와 상관관계를 분석하였으며, 비특이 *Mycobacterium* 속균 감염과의 감별진단을 위한 interferon- $\gamma$  assay 법등의 개발이 시도 되었다 (Kim 등 2002, Park 등, 2006, Cho 등 2007, Cho 등 2010). 또한 소 요네병진단의 golden standard 인 분변으로 요네병균의 배양 및 검색율을 향상시키기 위하여 배양배지의 개량, PCR 기법 적용, Bactec 의 이용등 다양한 방법이 시도 되었다 (Jeon 등 1984, Kim 등 1997, Lee 등 2009).

현재까지 국내에서 소 요네병에 대한 다양한 연구가 진행되었으나, 아직까지 체계적인 역학조사도 이루어지지 않았고, 특히 질병근절을 위하여 가장 필수적이라고 생각되는 발병기전에 대한 연구는 전무한 실정이다. 진단법도 다양한 방법들을 이용하여 개량하고자 많은 연구가 진행되었으나, 이 또한 현실적으로 적용할수 있는 효과적인 방법이 거의 전무한 상태이다.

## 제2절 국외 연구 현황

### 1. 역학적 조사 연구

외국에서는 요네병이 발견된 이후 요네병에 의한 경제적 피해의 심각성을 인식하고 이 질병에 대한 체계적인 연구가 진행되어 왔다. 특히 낙농선진국을 중심으로 많은 연구가 진행되었다. 현재 미국에서 지역에 따라 5~20%의 소가 요네병에 감염된 것으로 추정하고 있다. Florida 지역의 소 4,500두에 대하여 ELISA 기법을 이용한 혈청학적 검사결과 유우는 17.1%, 육우는 8.6% 가 양성이었고 (Thoen 와 Baum, 1988), Wisconsin 지역의 158 개 젖소 목장에서 4,990 두에 대하여 ELISA 검사 결과 농장별로는 50%, 개체별로는 7.29% 가 양성으로 확인되었다 (Collins 등, 1994). 유럽의 여러 국가에서 소 요네병 감염률을 ELISA 기법으로 조사한 결과 검사방법과 국가에 따라서 다소 차이는 있었으나, 개체별 감염율이 독일에서는 24.1~14.7%, 오스트리아에서는 19.0%, 노르웨이에서는 7.7%, 이탈리아에서는 2.4~6.8% 등으로 나타나 스웨덴을 제외한 유럽의 전역에 실질적으로는 매우 높은 비율로 소 요네병이 감염되어 있을 것으로 추정하고 있다 (Nielsen 과 Toft, 2009). 또한 균 배양법, PCR 기법을 이용하여 균을 분리 배양 또는 검색한 결과 스위스에서는 MAP F57 PCR 기법으로 검사한 결과 개체별로 19.8%, 터키에서는 IS900 PCR 기법으로 분변에서는 검출이 없었으나, 우유에서는 5%의 양성률을 나타내었다. 영국에서는 IS900 PCR 기법으로 소의 림프절에서 3.5% 의 양성률을 나타내었다 (Nielsen 과 Toft, 2009).

요네병 상재국가에서 오염원을 찾기 위하여 MAP의 유전자를 다양한 방법으로 분석하여 균주 간의 상관관계를 규명하고자 하는 많은 연구가 진행되었다. 즉, restriction endonuclease analysis and DNA hybridization, mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU), Multilocus short sequence repeat sequencing (MLSSR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), MIRU-VNTR, IS900-RFLP 등의 유전자 분석기법을 하나 또는 복합적으로 활용하여 분리된 균주들 간에 문자 유전학적인 상관관계를 비교 분석하였고, 이러한 방법을 통해 전염원등 발생의 위험요소 (risk factor) 분석 및 야생동물에 의한 전파원을 규명하

기 위한 다양한 분자 역학적 방법이 개발되어 적용되었다 (Biet 등, 2012; Oakey 등, 2014; Rónai 등, 2014; Gioffré 등, 2015; Bryant 등, 2016).

축산선진국의 경우 요네병 관리를 위한 국가별 프로그램을 운영하고 있다. 미국에서는 'National Johne's disease program', 'Risk assessments and management plan' 등을 운영하고 있고 호주에서는 'National Johne's disease control program', 'Johne's disease market assurance program' 등을 운영하고 있다. 또한 영국에서는 'Assessment of surveillance and control of Johne's disease', 'Guidance on control of Johne's disease in dairy herds' 등의 프로그램을 운영하며 요네병의 확산을 방지하기 위해 노력하고 있다. 이러한 요네병 방역프로그램을 수행하며 근절프로그램 적용 농가를 지속적으로 증가시켜나가고 있다. 요네병 발생 억제 연구 수행 결과에 따르면 요네병 프로그램 적용농장수는 2000년 1,952개 농장에서 2003년에는 3,248개로 증가하였고 2008년에는 6,019개 농장으로 증가하는 등 지속적으로 적용농가수가 증가하였으며 이에 따라 요네병 음성 농장수도 2000년 390개에서 2003년 543개, 2008년 1,014개로 점차 증가하였다 (United States Animal Health Report, 2008).

## 2. 발병기전에 관한 연구

외국에서 소 요네병의 발병기전에 대한 연구는 오래전부터 다양한 실험적 감염 실험을 통하여 이루어져 왔다. 초기에는 감염경로의 규명을 위하여 MAP의 침입경로에 대한 연구를 시작하여 MAP의 침입경로를 크게 두 가지로 구분하여 규명하였다. 규명된 침입경로는 다음과 같다. 다량의 균이 편도를 통해서 침입한 후 인후두림프절에 모인 후 혈관 또는 림프관을 통해서 장간막 림프절과 회장 (ileum)으로 전파된다. 반면에 적은 양의 균이 침입하였을 때는 회장을 통해 균이 침입하게 된다 (Gilmour 등, 1965; Buergelt 등, 1978; Sweeney 등, 2006) 이후 회장에서 M cells 을 통해서 소장상피를 통과 하여 소장상피의 점막 하 조직에서 대식세포에 의해 탐식된 이후 대식세포 내에서 생존하며 증식한다 (Koets 등, 2015).

요네병의 진행과정 중 감염 후 granulomatous lesion 의 생성과 관련된 염증반응의 양상의 변화가 질병의 진행에 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 즉 Th1-type에서 Th2-type 으로의 면역반응이 전환되면서 IL-4, IL-10 등의 생성이 증가되며, 이로 인한 MAP에 대한 항체가 생성되기 시작한다. 최근 연구에 따르면 적은 양의 균이 감염된 focal lesion에서는 M1 type 의 대식세포가 발견되며 iNOS 와 TNF $\alpha$  가 증가되었다. 반면에 많은 양의 균이 감염된 diffuse multibacillary lesion 에서는 M2 type 의 대식세포가 발견되며 CD163, IL-10, TGF- $\beta$ , Nramp-1 및 MHC class II antigens 이 증가된 것이 확인되었다 (Fernández 등, 2016). 이러한 연구를 통해 침입하는 MAP의 양에 따라 대식세포의 표현형이 달라지면서 숙주의 면역반응이 변화하는 것을 확인 하였다.

신생 송아지 (neonatal calf)를 이용한 소 요네병의 모델을 개발하여 MAP의 감염 초기의 세포성 면역반응의 marker를 조사한 결과 T-cell 활성화 marker 인 CD25, CD26, CD45RO 및 CD5 의 발현이 감염된 송아지에서 유의적으로 증가하였다. 또한 경구 감염 시 항원에 특이적인 lymphocyte 의 증식이 감염 후 9개월과 12개월에서 발견되었으며, iNOS의 분비가 감염 후

6개월과 12개월에서 증가하였다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 MAP에 감염된 송아지에서 특이적인 IFN- $\gamma$ 에 관련된 면역반응이 증가하고, CD25와 CD45RO가 발현된 T-cell 들이 증식한 이후에 CD26 과 CD5<sup>bright</sup> marker의 발현이 감염의 후기에 증가하는 것을 확인하였다. 이는 MAP의 감염 후 숙주에서 나타나는 초기 면역반응을 해석하는데 유익한 기초자료를 제공하였다 (Stabel 등, 2011).

또한 MAP가 감염된 이후 병리조직학적인 변화를 살펴보기 위해 ileal loop 방법을 사용하여 신생 송아지에 MAP을 감염시켰을 때 회장에서 0.5시간이 지난 이후부터 균의 침입이 관찰되었으며, mononuclear cell과 degenerate polymorphonuclear neutrophils 의 이동이 확인되었다. 또한 그리고 intestinal-trefoil factor, profilin, lactoferrin, enteric  $\beta$ -defensin 의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 MAP에 대한 초기 반응을 확인할 수 있는 ileal loop 모델을 확립하였다 (Khare 등 2009).

요네병을 예방하기 위한 백신에 대한 연구는 약독화 백신을 중점으로 하여 연구가 이루어지고 있다. *M. tuberculosis* 와 *M. bovis* 의 병원성 인자로 알려진  $\Delta$ relA,  $\Delta$ lsr2, 및  $\Delta$ pknG 에 대한 변이주를 allelic exchange 기법을 이용하여 제작하였으며, 이에 대한 병원성 약독화 여부 및 백신의 효용성을 소와 염소의 ileal cannulation 모델을 통해 평가하였다.  $\Delta$ relA 변이주는  $\Delta$ pknG 변이주에 비해 병원성 약독화 및 방어효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다 (Park 등, 2008; Park 등, 2011). 또한 subunit 백신에 대한 연구 역시 지속적으로 이루어지고 있다. 다양한 항원들이 백신 후보로 제시되어 평가되었는데 heat shock protein 70 (Hsp70), antigen 85 complex proteins (Ag85A, Ag85B, Ag85C), lipoproteins (LprG, MAP0261c) 및 PPE family proteins (MAP1518, MAP3184)과 같은 것들이 대표적이다 (Koets 등, 1999; Huntley 등, 2005; Shin 등, 2005). 현재까지 백신 후보 항원 중 Hsp70 단백질이 가장 많이 연구되었는데, Hsp70 을 이용한 subunit 백신을 접종하였을 때, 실험적으로 감염된 개체에서 요네병균의 숫자가 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Koets 등, 1999).

최근에는 MAP와 숙주와의 상호작용에 대하여 차세대 염기서열 분석법을 통해 분석하는 많은 연구들이 이루어지고 있다. Machugh 등은 monocyte-derived macrophage 를 MAP에 감염시킨 후 시간의 경과에 따른 유전자 발현의 변화를 microarray 기법을 사용하여 분석하였다. 감염 후 발현이 변화한 유전자들은 주로 inflammatory response, cell signalling pathways 및 apoptosis 에 관련된 것으로 분석되었다. 또 다른 연구에서는 MAP에 감염된 소에서 대식세포를 분리하여 RNA-Seq 을 통해 유전자 발현을 분석하였고, 발현이 변화된 유전자들을 대상으로 기능적 분석을 실행하였다. 감염 후 주로 IL-10 signaling pathway 및 CD40 signaling pathway 가 활성화 된 것을 확인하였다 (Casey 등, 2015).

MAP이 숙주에 최초로 침입하는 부위인 회장-맹장 연접부에서의 유전자 발현에 대한 연구 역시 수행되고 있다. 요네병에 자연 감염된 소의 회장-맹장 연접부의 조직을 채취하여 RNA를 추출 후 RNA-Seq 을 통해 유전자 발현의 변화를 확인하였다. 임상형 개체에서는 T-and B-cell receptor signaling, apoptosis, NOD-like receptor signaling, 및 leukocyte transendothelial migration pathways 가 활성화되었으며, 준임상형 개체에서는 metabolism 에

관련된 pathway 가 활성화되었다 (Hempel 등, 2016). 이러한 연구들을 통해 요네병이 자연 감염 되었을 때 나타나는 숙주의 초기 반응을 해석할 수 있다.

위와 같이 외국에서는 소 요네병의 발병기전에 대하여 세균학적, 병리학적, 면역학적 등 다양한 측면에서 연구가 진행되었다.

### 3. 진단법에 관한 연구

미국, 호주, 유럽 등 방목을 주로 하는 국가에서는 Johnin을 이용한 피내접종법보다는 혈청학적 진단법, 분변에서 MAP의 배양, PCR 기법을 이용한 검출 등을 많이 사용하고 있으며, 또한 농장의 요네병 감염수준, 박멸계획 등에 따라서 다양한 진단법들이 적용되고 있다 (Collins 등 2011).

분변 내의 MAP를 검출하기 위하여 MAP 특이적인 유전자를 대상으로 한 다양한 PCR 기법이 개발되어 있다. IS900 PCR 기법은 우유샘플 중 10~100 CFU/ml 까지 검출할 수 있어 배양법에 비해 높은 민감도를 보였다. 그러나 샘플 내의 PCR 방해물질 때문에 샘플에 따라서 특이성과 민감성이 낮아질 수 있어 그 효율이 떨어지는 문제점을 가지고 있었다. 그러나 PCR 기법의 발달로 그 검출 효율은 점차 높아지고 있다. 최근 특이성과 민감성이 매우 높아 진단의 효율을 높일 수 있는 triplex real-time PCR 기법이 개발되어  $2.5 \times 10^2$  microorganism/g of feces 까지 검출할 수 있다 (Irenge 등, 2009). 또한 PCR 기법을 이용한 진단의 정확성을 높이기 위해 DNA 추출 방법의 최적화 역시 많은 연구자들에 의해 진행되고 있다 (Park 등, 2014; Timms 등, 2015; Mita 등, 2016).

혈청학적인 진단방법으로는 MAP에 대한 항체를 탐지하는 ELISA 가 대표적으로 개발되어 왔다. 검사기법의 특이도를 높이기 위해 *Mycobacterium phlei* 와 혈청을 반응시켜 교차 반응하는 항체를 제거하는 방법이 개발되었으며(Yokomizo 등, 1983), MAP을 formaldehyde 로 처리한 후 항원으로 사용하여 민감도와 특이도를 개선시킨 ELISA 가 개발되어 95.6% 의 민감도와 100%의 특이도를 보였다 (Speer 등, 2006). 또한 MAP가 발육초기 (early-to mid-log-phase) 에 분비하는 항원을 이용한 ELISA 법을 개발하여 효율성을 평가하였고, 기존에 상품화되어 있는 3 가지의 요네병 진단 kit 와 비교 분석을 실시하였으며, 준임상형 상태로 감염되어 있는 소를 혈청과 우유를 이용하여 효율적으로 검출할 수 있었다 (Shin 등, 2008). 또한 야외에서 분리된 MAP을 이용하여 양의 혈청에서 요네병을 기존의 상품화되어 있는 진단 kit 보다 경제적으로 검사할 수 있는 방법을 개발하였다 (Gurung 등, 2015). ELISA에 사용되는 항원에 대한 연구도 계속되었다. MAP의 protoplasmic antigen을 활용한 기존의 진단 kit 보다 높은 민감도와 특이도를 보이는 PPA-ELISA를 개발하여 준임상형 개체들의 일부를 진단 할 수 있었다 (Fernández 등, 2012).

또한 소 요네병의 발병기전 규명을 통한 진단법 개발을 위해 MAP에 감염되었을 때 숙주에서 발현되는 특이적 유전자 및 물질을 이용한 진단법을 개발하려는 노력이 지속적으로 이루어지고 있다. 감염개체의 조직 또는 감염 대식세포에서 발현되는 transcriptomes, stressomes 을

분석하였으며, 관련성 있는 biomarker를 발굴하여 감염 초기의 조기진단을 위한 biomarker로서의 가능성을 제시하였다 (Wu 등, 2007; Zhu 등, 2008; Bannantine 등, 2010; Janagama 등, 2010).

위와 같이 외국에서는 소 요네병의 발병기전에 대하여 세균학적, 병리학적, 면역학적등 다양한 측면에서 활발한 연구가 진행되고 있으며 진단법의 개발에 있어서도 혈청학적진단기법의 개발과 감염초기 준임상형의 fecal shedder 를 검출하기 위한 분변 검색방법 및 최근에는 transcriptomes, proteomes 등을 분석하여 감염지표 (biomarker) 를 발굴함으로서 초기 감염지표를 바탕으로 한 진단법 개발에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.

### 제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

#### <제 1 세부: 유전체 정보를 활용한 요네병 발현 양상 기전 연구>

##### 1. 유전체 분석을 위한 요네병의 실험동물 모델 확립

###### 가. 요네병의 실험동물 모델 개발

###### (1) 마우스 유래 macrophage에서 요네병균 감염에 따른 유전체(transcriptomes) 발현 양상 분석

마우스 유래의 macrophage에 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain ATCC 19698을 감염시킨 후 6시간, 24시간, 48시간, 120시간 후에 각각 경시적으로 세포를 수확하여, 요네병균 접종에 따른 유전자 발현양상을 분석하기 위하여 Janagama 등 (2010) 과 Wu (2007) 등의 방법에 준용하여 실시하였다. 즉, macrophage에서 total RNA을 분리하여 정제한 후 이를 이용하여 유전자 발현양상을 microarray 기법을 통하여 분석하였다. Macrophage에서 total RNA는 RNeasy kit를 이용하여 정제한 후 SuperScript Plus Direct cDNA Labeling System 을 이용하여 cDNA 을 합성한 후 hybridization 을 시행하였다.

결과의 분석은 microarray image analysis software 을 이용하여 실시하였으며, 각각의 실험군 (비감염, 감염 후 6시간, 감염 후 24시간, 감염 후 48시간, 감염 후 120시간) 간에 유전자 발현 차이를 microarray 용 chip 을 (Macrogen 또는 Affimetryix) 사용하여 비교 및 분석 하였고, microarray 에서 유의적인 변화는 fold change 가  $\pm 2$  이상이고, 통계학적으로  $P > 0.05$  일 때로 하였다. 이 때 유의적인 변화를 보이는 유전자 군에 대하여 Quantitative Real-time PCR 기법을 이용하여 microarray 에 의한 유전자 발현의 차이에 대한 유효성을 확인하였다.

###### (가) Microarray 분석을 통한 유전자 발현 차이 분석

각각의 감염 후 시간대별의 군과 감염을 시키지 않은 군을 비교하였을 때, 감염 후 6시간에는 224개의 유전자가 증가하였고 184개의 유전자가 감소하였으며, 감염 후 24시간 후에는 75개의 유전자가 증가하였고 147개의 유전자가 감소하였으며, 감염 후 48시간 후에는 20개의 유전자가 증가하였고 2개의 유전자가 감소하였으며, 감염 후 120시간에는 261개의 유전자가 증가하였고 241개의 유전자가 감소하였다. 흥미롭게도 감염초기 (감염 후 6시간, 24시간)의 그룹들은 감염을 시키지 않은 음성 대조군과 비교했을 때 보다는 감염후기 (감염 후 120시간)의 그룹들과 비교하였을 때 더 많은 유전자 변화를 보였다. 즉, 감염 후 6시간 후에는 감염 후 120시간과 비교하였을 때 570개의 유전자가 증가하였고 593개의 유전자가 감소하였으며, 감염 후 24시간에는 감염 후 120시간과 비교하였을 때 519개의 유전자가 증가하였고 586개의 유전자가 감소하였다. 이에 반해, 감염 초기의 그룹들 간 (감염 후 6시간과 감염 후 24시간 비교) 에는 증가한 유전자 61개였고 감소한 유전자가 4개로 상대적으로 적은 차이를 보였다 (Figure 1). 각 비교조합에서 gene의 expression level을 scatter plot으로 분석하였다 (Figure 2). 감염 후 6시간, 24시간, 48시간과 감염 후 120시간을 비교하였을 때 많은 유전자 expression level 변화가

일어남을 확인하였다. 또한 Hierarchical clustering 분석을 통하여 각 샘플들에 대한 gene의 유사성을 그룹화하여 분석하였다 (Figure 3).

감염 시기 전반적으로 걸쳐서 Immunity and defense mechanism에 관여하는 유전자에서의 변화가 일어났다 (Figure 4). 하지만 *Ifit3* (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3) 유전자는 감염 후 6시간째에는 24배정도 증가하였으나 감염 후 24시간째에는 2.7배 그리고 감염 후 48시간, 120시간째에는 주목할 만한 차이를 보이지 않았다. 또한, *Cx3cr1* (CX3C chemokine receptor 1)과 같은 유전자는 감염 후 6시간, 24시간째에는 up-regulation 되었으나, 감염 후 48, 120시간에는 down-regulation 되었으며, 이는 macrophage의 survival을 조절하여 세포내에서 기생할 수 있는 MAP의 생존 전략과 연관이 있다고 사료된다. 감염 후 24시간, 48시간째에는 감염 후 6시간, 120간 째보다 주목할 만한 변화를 보인 유전자 수가 적었으며, 특히 감염 후 48째에는 음성대조군과 거의 비슷한 유전자 발현 양상을 보였다. 실제로 목적동물인 소에서의 감염 cycle, 잠복기 등을 고려할 때 120시간을 감염 후기라 규정하기는 어렵지만, 본 연구를 통하여 6시간 및 120시간에만 해도 수많은 유전자 발현에 차이가 있음을 볼 수 있었다.

이렇듯 본 연구를 통하여 MAP 감염시 시간대별로 나타나는 mouse macrophage에서의 유전자 변화를 살펴보았는데 감염 기간 내내 up 및 down regulation 되는 유전자의 종류가 다름을 알 수 있었으며, 감염기간내내 꾸준한 증가를 보인 유전자, 감염기간내내 꾸준한 감소를 보인 유전자, 감염초기엔 증가, 감염 후기엔 감소된 유전자 그리고 감염초기엔 감소, 감염후기엔 증가된 유전자를 관찰할 수 있었다 (Table 1, 2, 3, 4). 이를 바탕으로 감염 시 biomarker로 사용할 수 있는 후보 유전자를 선발하였다 (Table 5).

#### (나) Quantitative Real-time PCR 기법을 이용한 유전자 발현 차이 유효성 확인

선발된 후보들의 microarray data를 검증하기 위하여, 후보들의 specific한 primers를 제작하고 (Table 6), real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR 결과, microarray 결과와 거의 일치하는 것을 확인하였다 (Figure 5).

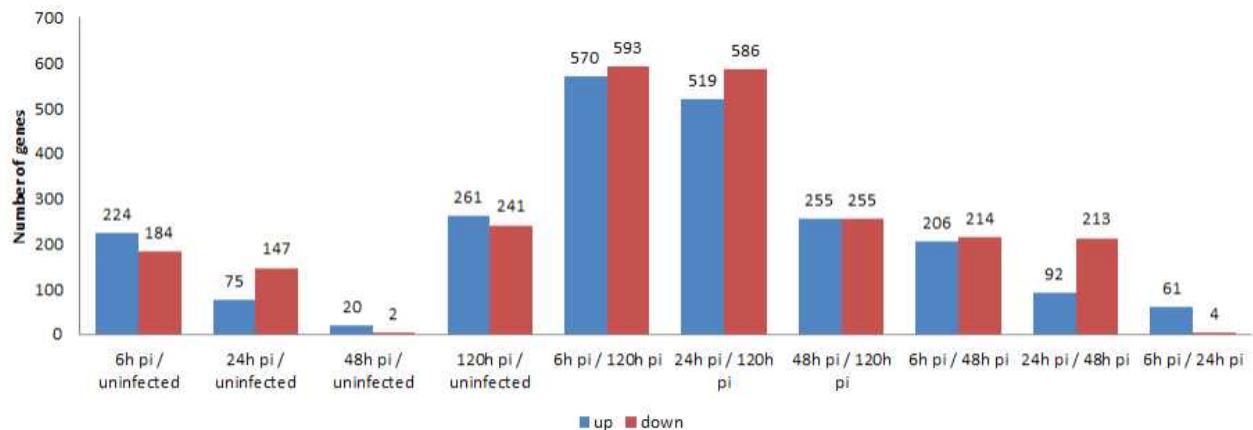


Figure 1. 각 비교 조합에서 fold change 가  $\pm 2$  이상, 그리고  $P < 0.05$ 를 동시에 만족하는 유전자의 개수

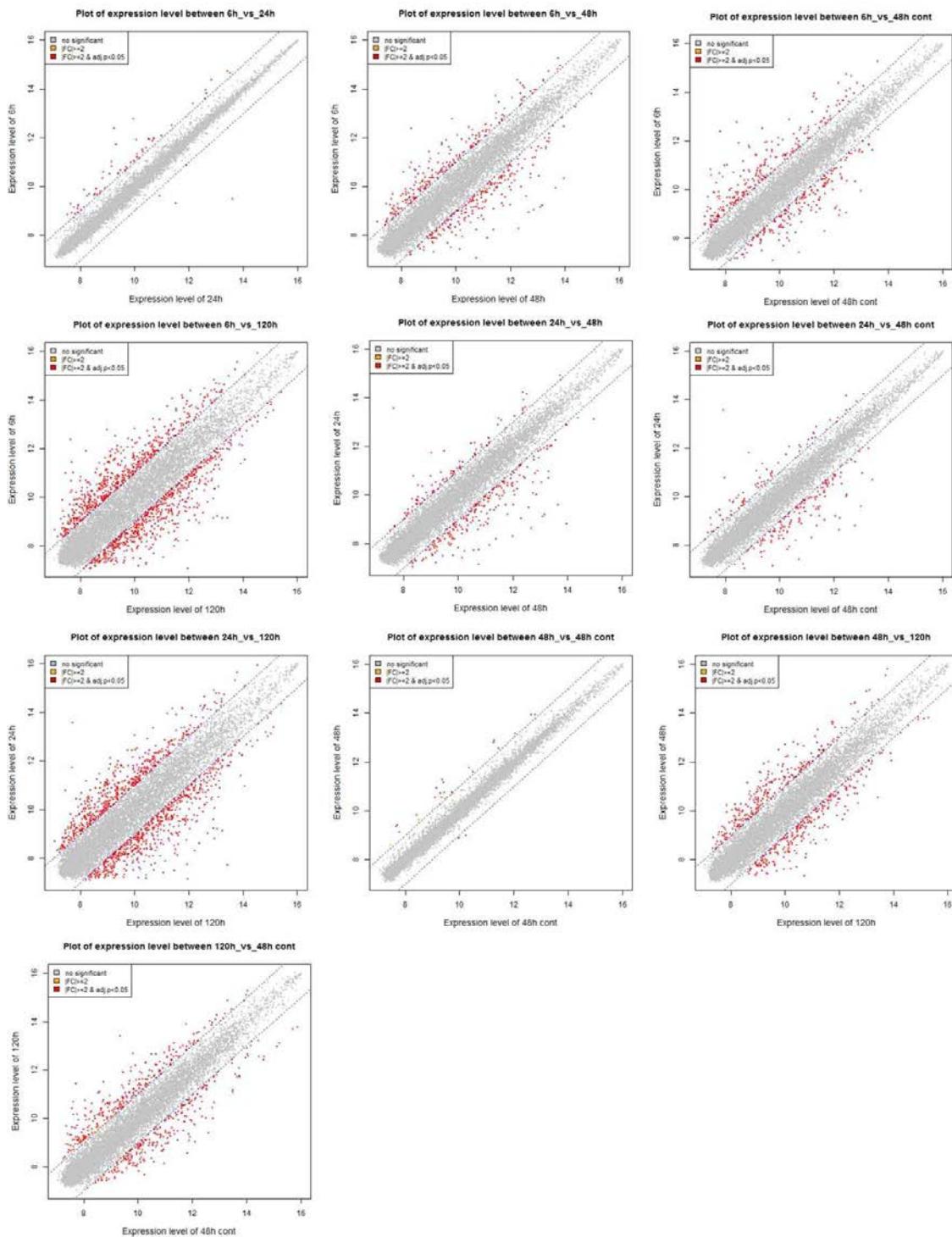


Figure 2. Gene expression level을 scatter plot으로 분석

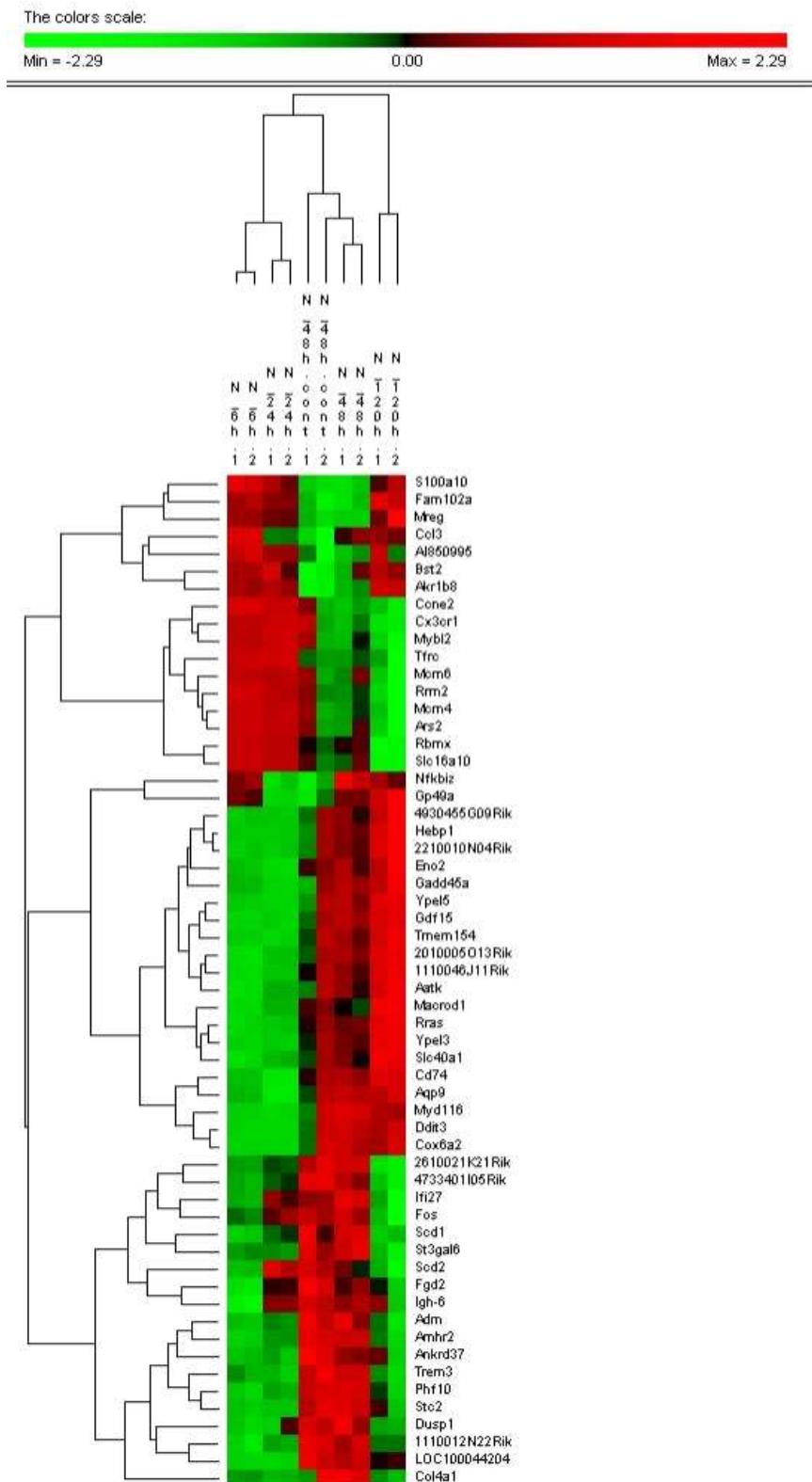


Figure 3. Hierarchial clustering 분석을 통하여 샘플들에 대한 gene의 유사성을 그룹화

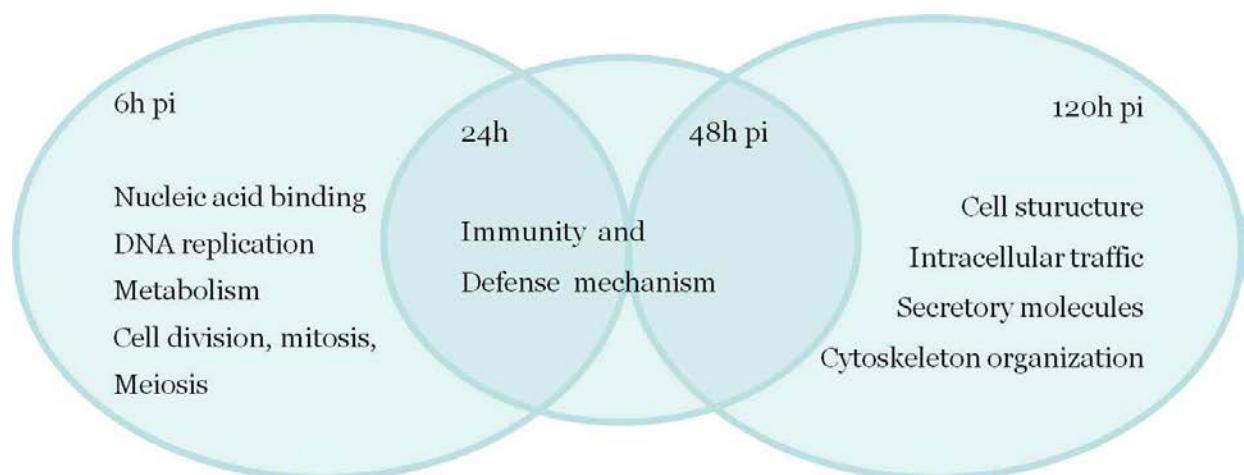


Figure 4. 감염 시기별 murine macrophage에서 발현된 유전자의 기능적 분류

Table 1. 감염기간 내내 꾸준한 증가를 보인 유전자

Gene symbol	Description	6h pi / nc		24h pi / nc		48h pi / nc		120h pi / nc	
		FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value
S100a10	Mus musculus S100 calcium binding protein A10 (calpastatin) (S100a10), mRNA.	3.2023 32	6.17E -09	2.1790 92	0.0017 96231	1.0012 94	1	2.1875 18	0.0179 62143
Ccl3	Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 3 (Ccl3), mRNA.	4.1579 86	0	1.8492 1	0.0005 48406	2.5002 81	0.0002 70906	2.6703 75	2.37E -07
AI850995		2.9521 38	2.31E -08	2.3110 57	0.0002 69835	1.2726 79	1	2.0573 7	0.0301 25125
Bst2	Mus musculus bone marrow stromal cell antigen 2 (Bst2), mRNA.	2.4183 07	2.89E -05	2.4230 57	0.0001 75062	1.7225 05	1	2.3915 05	0.0047 30188
Mreg	Mus musculus melanoregulin (Mreg), mRNA.	2.3657 67	0.0007 16332	2.0002 66	0.0279 73109	-1.03 1006	1	3.4077 35	8.85E -05
Akr1b8	Mus musculus aldo-keto reductase family 1, member B8 (Akr1b8), mRNA.	2.2641 13	8.57E -06	2.2842 44	5.05E -05	1.4396 42	1	2.5860 34	0.0001 2628
Nfkbiz	Mus musculus nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta (Nfkbiz), mRNA.	2.2084 56	0.0001 70195	-1.00 8359	0.9999 8692	3.3895 51	6.86E -06	2.1557 02	0.0176 35575
Gp49a		2.0557 47	3.76E -05	-1.15 648	0.8954 55183	2.1423 14	0.0129 24062	4.4884 73	2.23E -13
Fam102a	Mus musculus family with sequence similarity 102, member A (Fam102a), mRNA.	2.0344 03	0.0001 01642	1.8273 02	0.0023 1576	1.0394 23	1	2.4539 61	8.51E -05

Table 2. 감염기간 내내 꾸준한 감소를 보인 유전자

Gene symbol	Description	6h pi / nc		24h pi / nc		48h pi / nc		120h pi / nc	
		FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value
2610021K21Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 2610021K21 gene (2610021K21Rik), mRNA.	-2.07 111	0.0067 35349	-1.72 5753	0.0994 26307	-1.00 5724	1	-3.00 141	0.0005 05814
Adm	Mus musculus adrenomedullin (Adm), mRNA.	-2.12 4257	0.0037 18024	-1.80 3488	0.0539 81323	-1.12 277	1	-2.06 8839	0.0484 69664
Scd1	Mus musculus stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (Scd1), mRNA.	-2.20 5277	9.23E -06	-1.54 8767	0.0971 82265	1.1453 68	1	-2.13 2468	0.0100 95729
Ifi27	Mus musculus interferon, alpha-inducible protein 27 (Ifi27), mRNA.	-2.27 3637	2.37E -06	-1.13 5387	0.9152 37986	1.6770 24	0.7897 45839	-3.45 6302	1.64E -06
Trem3	Mus musculus triggering receptor expressed on myeloid cells 3 (Trem3), mRNA.	-2.27 4411	3.16E -05	-2.58 3886	5.28E -07	-1.09 7751	1	-2.47 0023	0.0014 45298
Scd2	Mus musculus stearoyl-Coenzyme A desaturase 2 (Scd2), mRNA.	-2.28 2274	7.36E -06	1.0700 51	0.9999 8692	-1.44 2723	1	-2.76 9486	0.0002 30448
St3gal6	Mus musculus ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6 (St3gal6), mRNA.	-2.31 8697	2.44E -06	-2.29 9285	3.74E -05	1.2347 11	1	-3.48 779	2.31E -06
Fos	Mus musculus FBJ osteosarcoma oncogene (Fos), mRNA.	-2.38 9761	4.77E -07	-1.35 116	0.3554 24241	1.0137 3	1	-6.44 6452	5.45E -14
Phf10	Mus musculus PHD finger protein 10 (Phf10), mRNA.	-2.42 616	3.85E -09	-2.07 1471	4.42E -06	1.0538 2	1	-2.00 7597	0.0023 72892
Col4a1	Mus musculus procollagen, type IV, alpha 1 (Col4a1), mRNA.	-2.47 9565	0.0001 62974	-2.98 924	1.94E -06	1.9469 35944	0.3571 35944	-2.70 853	0.0016 61358
Dusp1	Mus musculus dual specificity phosphatase 1 (Dusp1), mRNA.	-2.67 7656	1.64E -08	-2.00 6515	0.0011 4693	1.0616 54	1	-2.22 466	0.0075 22033
4733401I05Rik		-2.78 7969	2.03E -09	-2.12 5382	0.0002 5692	-1.49 765	1	-3.53 7934	1.86E -06
Fgd2	Mus musculus FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2 (Fgd2), mRNA.	-2.80 9745	5.26E -08	-1.68 1152	0.0315 21701	-1.53 9469	1	-2.07 4235	0.0188 54552
Stc2	Mus musculus stanniocalcin 2 (Stc2), mRNA.	-2.81 0207	1.72E -09	-2.74 8401	1.88E -07	1.0123 73	1	-2.13 2691	0.0094 14358
Ankrd37	Mus musculus ankyrin repeat domain 37 (Ankrd37), mRNA.	-2.81 1992	5.24E -08	-2.70 0841	1.40E -07	-1.63 5732	0.9729 16391	-2.32 8636	0.0037 82212
Amhr2	Mus musculus anti-Mullerian hormone type 2 receptor (Amhr2), mRNA.	-2.90 2307	5.42E -08	-2.26 847	7.61E -05	-1.13 1771	1	-2.53 0115	0.0013 38083
1110012N22Rik		-5.40 0876	1.13E -21	-3.59 8843	7.96E -13	-1.36 7733	1	-2.90 8453	7.36E -05
Igh-6		-6.85 1386	7.54E -29	-1.50 9956	0.1000 82252	-1.33 0427	1	-2.47 1486	0.0004 44749
LOC100044204	PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100044204 (LOC100044204), mRNA.	-9.65 7534	6.36E -39	-9.66 8777	6.17E -41	-1.46 8295	1	-3.21 2598	1.08E -05

Table 3. 감염초기엔 증가, 감염 후기에는 감소된 유전자

Gene symbol	Description	6h pi / nc		24h pi / nc		48h pi / nc		120h pi / nc	
		FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value
Ccne2	Mus musculus cyclin E2 (Ccne2), transcript variant 1, mRNA.	2.9090 94	9.56E -07	2.4380 34	0.0004 69618	-1.54 4774	1	-2.23 2141	0.0245 76572
Cx3cr1		2.3518 69	2.90E -07	2.8899 71	1.03E -10	-2.31 8773	0.0023 91796	-5.79 6131	6.53E -13
Tfrc	Mus musculus transferrin receptor (Tfrc), mRNA.	3.0756 84	2.66E -12	3.3207 4	0	1.0508 72	1	-2.08 6558	0.0027 07197
Mcm6	Mus musculus minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae) (Mcm6), mRNA.	1.9907 45	0.0001 22463	1.9113 24	0.0005 96348	1.0157 17	1	-2.93 9154	7.33E -05
Rbmx	Mus musculus RNA binding motif protein, X chromosome (Rbmx), mRNA.	1.9392 9	0.0001 91626	1.7861 79	0.0069 78154	1.1379 38	1	-2.84 2493	0.0001 16448
Rrm2		1.9201 29	0.0009 25953	1.6279 92	0.0761 45366	-1.19 244	1	-2.66 9542	0.0006 79333
Slc16a 10		1.9170 86	0.0007 60731	1.8151 55	0.0124 44464	1.0774 37	1	-2.68 0646	0.0005 67252
Mcm4	Mus musculus minichromosome maintenance deficient 4 homolog (S. cerevisiae) (Mcm4), mRNA.	1.8419	0.0013 12691	1.7248 11	0.0090 33932	-1.12 0696	1	-2.12 9144	0.0064 81059
Ars2	Mus musculus arsenate resistance protein 2 (Ars2), mRNA.	1.8131 21	0.0019 70871	1.7259 48	0.0090 78672	-1.04 6081	1	-2.18 0025	0.0070 26053
Mybl2	Mus musculus myeloblastosis oncogene-like 2 (Mybl2), mRNA.	1.7367 16	0.0471 13027	1.9878 6	0.0185 63428	-1.23 5526	1	-2.34 4409	0.0147 59438

Table 4. 감염초기엔 감소, 감염 후기에는 증가된 유전자

Gene symbol 1	Description	6h pi / nc		24h pi / nc		48h pi / nc		120h pi / nc	
		FC	P-val ue	FC	P-val ue	FC	P-val ue	FC	P-val ue
4930455 G09Rik		-2.005 298	0.0004 48444	-2.016 922	0.0006 61662	1.0769 14	1	2.4095 42	0.0001 4113
Macrod 1	Mus musculus MACRO domain containing 1 (Macrod1), mRNA.	-2.079 312	0.0085 65019	-1.688 782	0.1408 30095	-1.179 314	1	2.1117 12	0.0486 78157
Eno2	Mus musculus enolase 2, gamma neuronal (Eno2), mRNA.	-2.111 959	3.17E- 05	-2.553 206	1.66E- 06	1.1250 74	1	2.1025 47	0.0025 36979
Hebp1	Mus musculus heme binding protein 1 (Hebp1), mRNA.	-2.155 202	0.0001 27045	-2.156 79	0.0001 2595	1.2039 8	1	2.9498 61	8.59E- 07
2210010 N04Rik		-2.159 241	0.0031 46742	-2.131 57	0.0052 9207	1.1362 12	1	2.8128 48	0.0005 22271
Ypel5	Mus musculus yippee-like 5 (Drosophila) (Ypel5), mRNA.	-2.213 354	0.0001 17079	-2.355 569	1.93E- 05	1.3765 97	1	2.3374 92	0.0006 45241
Gadd45 a	Mus musculus growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha (Gadd45a), mRNA.	-2.233 656	0.0006 74512	-3.158 79	1.02E- 07	2.5281 06	0.0032 32305	5.6851 44	0
2010005 O13Rik		-2.692 352	1.58E- 07	-2.065 789	0.0003 76356	1.2001 69	1	2.1404 86	0.0017 9326
Rras	Mus musculus Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R (Rras), mRNA.	-2.696 238	2.01E- 05	-2.352 738	0.0004 49449	-1.008 797	1	2.3488 15	0.0070 26053
Aatk	Mus musculus apoptosis-associated tyrosine kinase (Aatk), mRNA.	-2.743 035	1.09E- 07	-1.873 442	0.0039 80791	1.0374 02	1	2.2996 33	0.0005 22628
Cd74	Mus musculus CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated) (Cd74), transcript variant 1, mRNA.	-2.791 096	1.19E- 12	-4.160 22	4.61E- 21	1.2028 9	1	2.0415 71	0.0002 30625
Tmem1 54	Mus musculus transmembrane protein 154 (Tmem154), mRNA.	-3.148 895	7.19E- 10	-3.363 8	1.72E- 11	1.0415 55	1	2.2549 4	0.0006 22252
Slc40a1	Mus musculus solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 (Slc40a1), mRNA.	-3.190 251	1.60E- 10	-2.178 448	0.0001 44908	-1.048 03	1	2.7910 83	3.56E- 06
Myd116	Mus musculus myeloid differentiation primary response gene 116 (Myd116), mRNA.	-3.540 297	5.98E- 13	-3.787 198	5.30E- 13	2.2047 4	0.0110 06853	1.3583 85	0.4903 08207
Aqp9	Mus musculus aquaporin 9 (Aqp9), mRNA.	-3.730 274	3.42E- 13	-7.328 445	1.98E- 30	1.7590 33	0.4573 44422	2.0516 66	0.0036 76721
Ypel3	Mus musculus yippee-like 3 (Drosophila) (Ypel3), mRNA.	-3.925 938	5.22E- 14	-3.708 295	8.25E- 13	-1.068 626	1	3.3602 6	1.76E- 08
1110046 J11Rik		-4.133 292	3.86E- 15	-3.234 716	9.73E- 11	-1.079 779	1	2.5208 78	4.85E- 05
Gdf15	Mus musculus growth differentiation factor 15 (Gdf15), mRNA.	-6.235 33	1.43E- 23	-6.002 706	1.58E- 23	1.9945 72	0.0782 26543	4.6553 4	4.16E- 13
Ddit3	Mus musculus DNA-damage inducible transcript 3 (Ddit3), mRNA.	-6.977 738	6.20E- 29	-7.192 442	8.72E- 30	2.1736 11	0.0129 24062	1.9790 2	0.0067 88846
Cox6a2	Mus musculus cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 2 (Cox6a2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	-8.232 709	2.27E- 34	-8.501 559	6.96E- 36	1.8304 9	0.2196 54503	2.0158 47	0.0039 79253

Table 5. Biomarker 후보 유전자 선발 목록

감염기간 내내 꾸준한 증가를 보인 유전자	<i>S100a10, Ccl3, AI850995, Bst2, Mreg, Akr1b8, Nfkbia, Gp49a, Fam102a</i>
감염기간 내내 꾸준한 감소를 보인 유전자	<i>2610021K21Rik, Adm, Scd1, Ifi27, Trem3, Scd2, St3gal6, Fos, Phf10, Col4a1, Dusp1, 4733401I05Rik, Fgd2, Stc2, Ankrd37, Amhr2, 1110012N22Rik, Igh-6, LOC100044204</i>
감염초기엔 증가, 감염 후기에는 감소된 유전자	<i>Ccne2, Cx3cr1, Tfrc, Mcm6, Rbmxa, Rrm2, Slc16a10, Mcm4, Ars2, Mybl2</i>
감염초기엔 감소, 감염 후기에는 증가된 유전자	<i>4930455G09Rik, Macrodl, Eno2, Hebp1, 2210010N04Rik, Ypel15, Gadd45a, 2010005O13Rik, Rras, Aatk, Cd74, Tmem154, Slc40a1, Myd116, Aqp9, Ypel3, 1110046J11Rik, Gdf15, Ddit3, Cox6a2</i>

Table 6. Nucleotide sequence of primers

Name	Primer sequences (5'-3')	Size (bps)
Tfrc (NM_011638.4)	F: AGTAGGAGGCCAGAGAGACG	61
	R: TGTTCACACTGGACTTCG	
Cox6a2 (NM_009943.2)	F: AGCCCTCTGCTCCCTTAAC	83
	R: GGATGCGGAGGTGGTGATAC	
Cx3cr1 (NM_009987.2)	F: ACAAGAGACTCCACGCTGAC	177
	R: GTGCAAGAACAGAGTTGGG	
ypel3 (NM_025347.1)	F: CTGTCGCTGACATCCACTGT	72
	R: TGCTCTCAAAGGCTTGCTCA	
Gadd45a (NM_007836.1)	F: AGACCGAAAGGA TGGACACG	118
	R: GGGTCTACGTTGAGCAGCTT	
Avil (NM_009635.2)	F: AGGACTCCTCCCAAGACGAA	137
	R: CTGCTTGAAGTAGCCACCGA	
Lcn2 (NM_008491.1)	F: GGCCAGTTCACTCTGGGAAA	91
	R: TGGCGAACTGGTTGTAGTCC	
Cdca3 (NM_013538.4)	F: CTCTAGCTGGTGTTCGGGC	73
	R: AACCCATCTCCACTGGGGC	

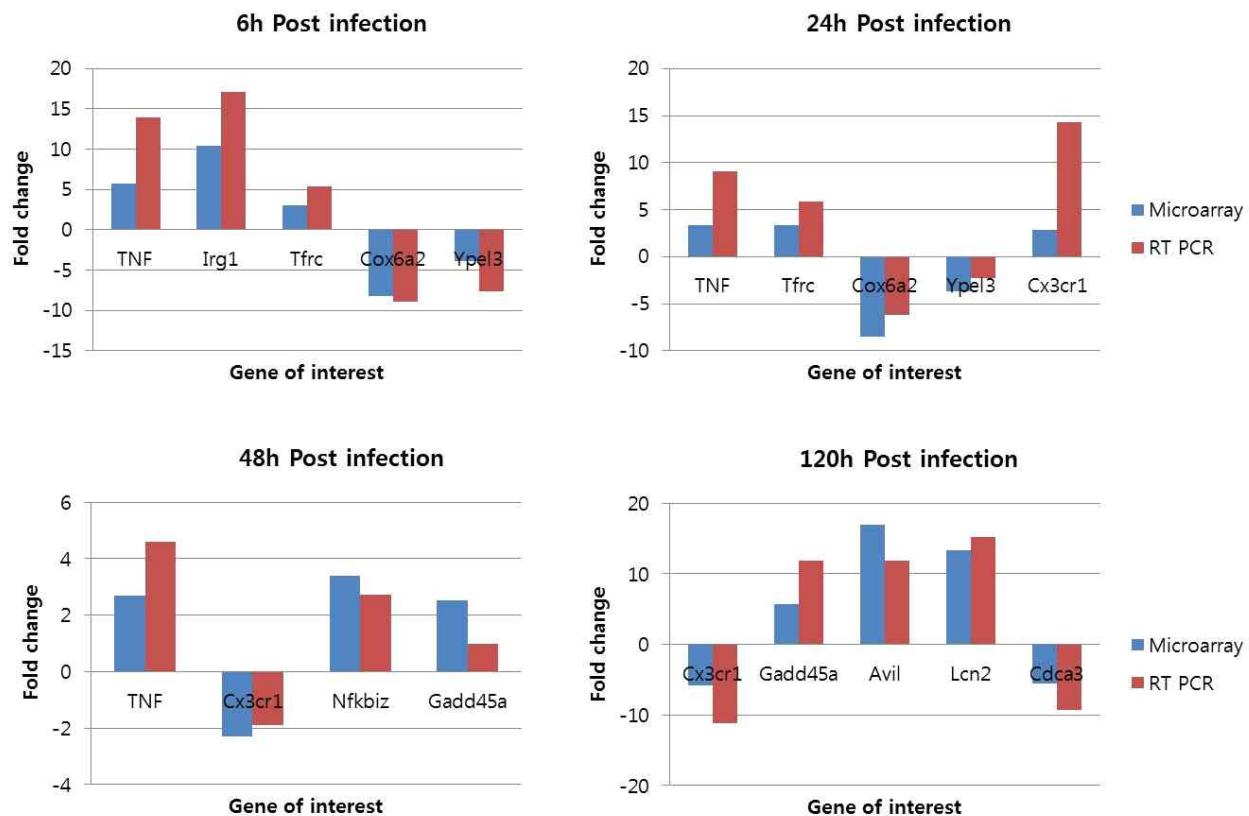


Figure 5. Quantitative real-time PCR을 이용한 후보 biomarker에 대한 microarray 결과 확인

## (2) 실험동물에서 pathogenesis 연구를 위한 면역학적 및 병리학적 평가

### (가) 실험동물에서 요네병 감염의 병리학적 평가

① H&E 염색을 통하여 조직병리학적 변화를 관찰하였다. 감염동물의 장기 (Liver, spleen)에서 granulomatous inflammatory reaction을 관찰한 결과 lymphocyte가 혼합된 macrophage가 aggregation되어 얇은 fibrous connective tissue로 둘러싸인 전형적인 granulomatous inflammatory response를 나타내었다 (Figure 6, 7). 마우스에서 요네 감염 시간에 따른 조직 병리학적 변화 양상을 평가하였다 (Figure 8). 감염 후 3주차 비장 및 간에서 가장 severe한 감염 소견이 관찰되었다. 비장에서는 정상 white pulp와 red pulp 구조가 소멸되고 대다수의 macrophages가 침투한 것을 확인하였다. 또한 간에서는 hepatic parenchyma의 portal triads 주변에 많은 macrophages와 lymphocytes이 침투한 것을 확인하였다. 감염 후 6주차 비장 및 간에서 moderate한 감염 소견이 관찰되었다. 비장에서 white pulp의 소멸과 함께 많은 macrophages가 침투 소견을 보였다. 또한 간에서는 portal triads 주변에 small number의 macrophages와 moderate number의 lymphocytes이 침투한 것을 확인하였다. 감염 후 12주차 비장 및 간에서 mild한 감염 소견이 관찰되었다. 비장의 parafollicular areas에 침투한 macrophages 관찰되었다. 또한 간의 portal triads 주변에 Small numbers의 lymphocytes 와 plasma cells이 관찰되었다.

② Acid-fast 염색을 통해 조직에서 요네균의 분포를 관찰하였다. 각 장기 (spleen, liver, intestine)에서 요네병균의 분포 검색 후 요네균 분포 정도에 따른 양상을 분석하였다 (Figure 9).

### (나) 실험동물에서 요네병 감염의 면역학적 (cytokine) 평가

요네균 감염 마우스의 비장에서 추출된 RNA를 이용하여 cytokine의 양을 경시적으로 측정하여 생성양상을 분석하였다. 마우스에서 생성되는 cytokine의 양은 Quantitative Real-time PCR 기법을 이용하여 cytokine gene expression 정도를 측정하였다. 측정대상의 cytokine은 IFN- $\gamma$ , IL-1b, IL-2, TNF- $\alpha$  등 cell-mediated immunity, humoral immunity 에 관여하는 cytokine 과 inflammatory cytokine을 측정하여 요네병균 감염에 따른 면역반응의 변화양상을 분석하였다 (Figure 10).

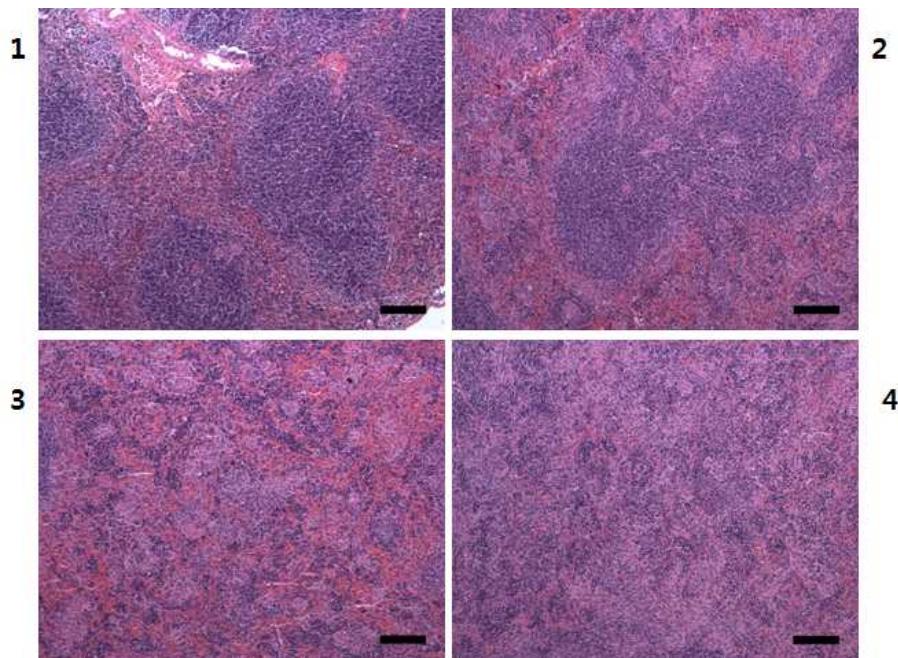


Figure 6. 요네균 감염 마우스 비장에서의 조직병리학적 변화 관찰. 1. Control group, 2 infected group in 12 weeks after infection, 3 infected groups in 6 weeks after infection and 4. infected groups in 3 weeks after infection.

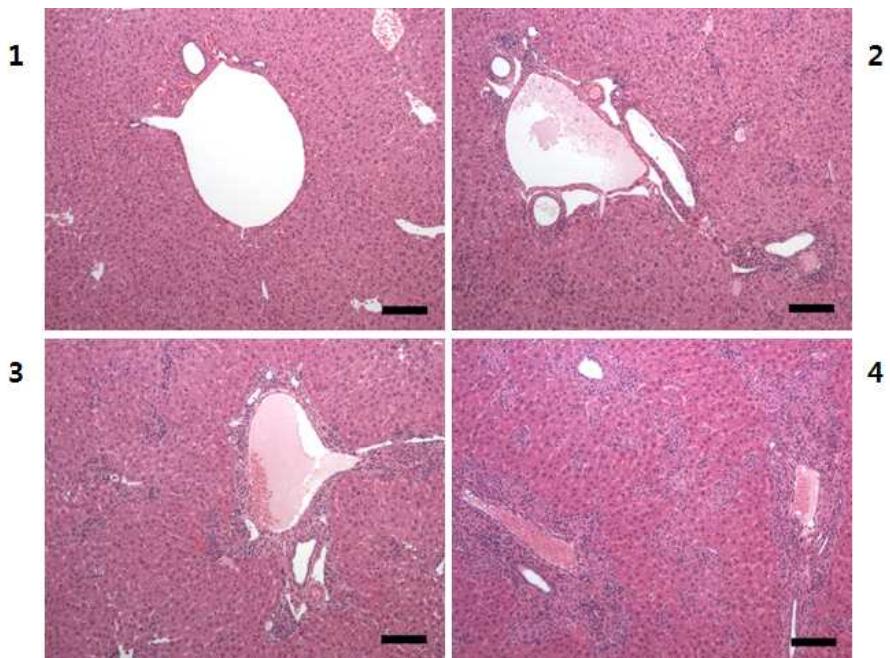
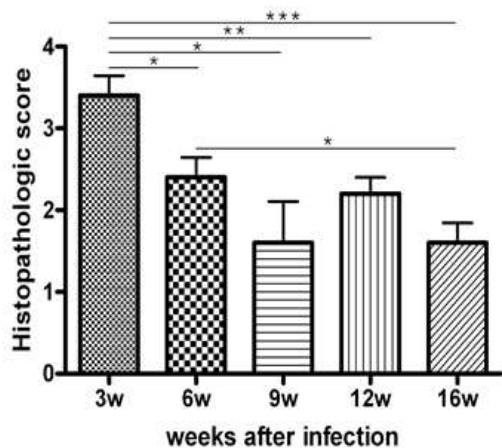


Figure 7. 요네균 감염 마우스 간에서의 조직병리학적 변화 관찰. 1. Control group, 2 infected group in 12 weeks after infection, 3 infected groups in 6 weeks after infection and 4. infected groups in 3 weeks after infection.

(1) Liver



(2) Spleen

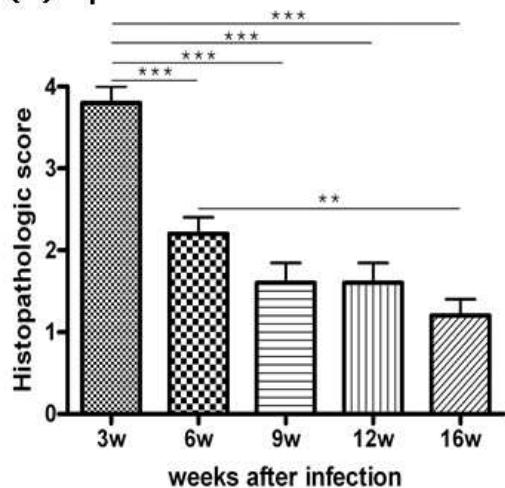


Figure 8. 마우스 각 조직에서의 시기별 병리조직학적 변화 양상

### Acid fast stain

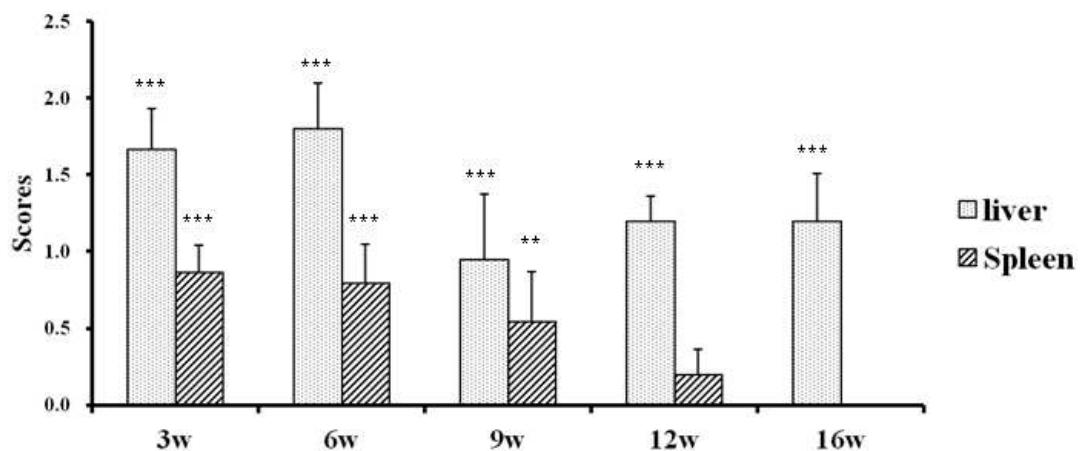


Figure 9. 마우스 조직에서 감염 시기별 요네균의 분포 정도 비교. Not detectable in control group. Between groups were analyzed with the Mann-Whitney U test (\*\*\*, p<0.001; \*\*, p<0.01).

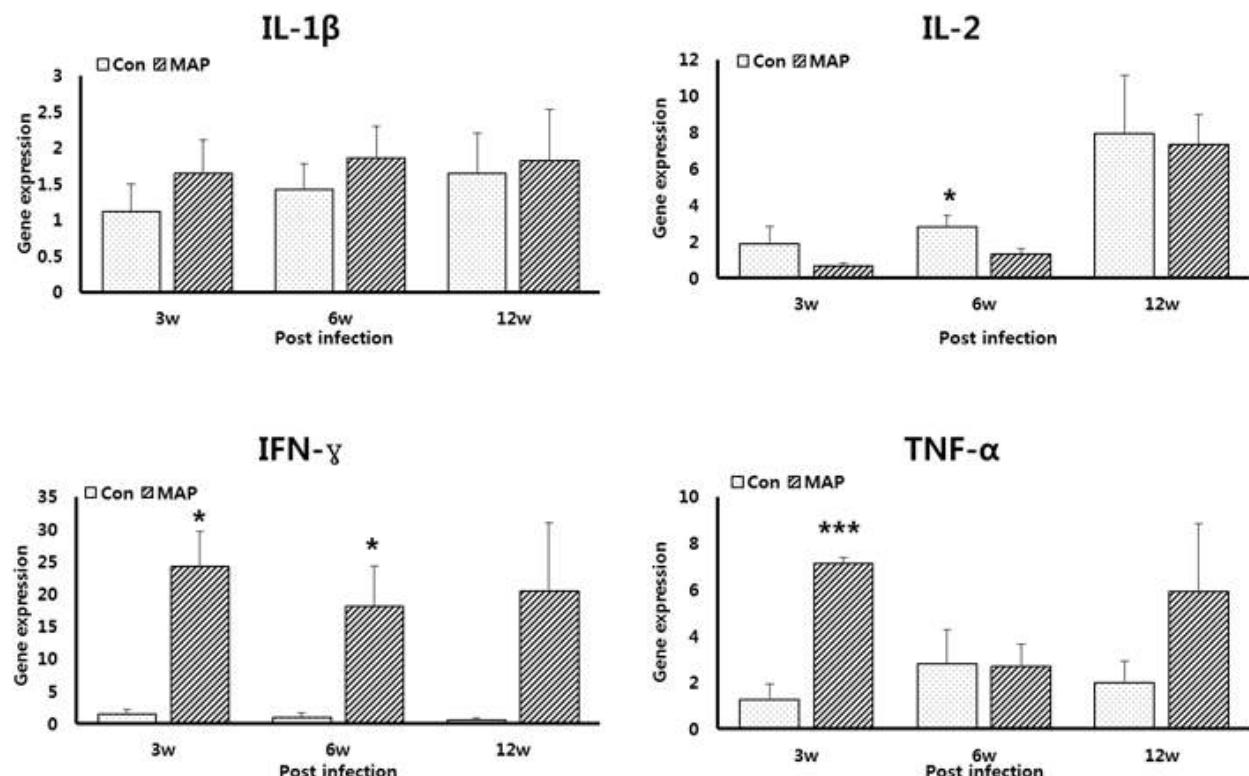


Figure 10. 요네균 감염 마우스 비장에서 cytokine에 대한 Quantitative real-time PCR 결과.

## 나. 마우스에서 요네병균 감염 유전체 발현 양상 분석

### (1) 요네병균 감염에 따른 유전체(transcriptomes) 발현 양상 분석 및 주요 지표 물질(biomarker) 발굴

마우스 (C57BL/6)에 요네균 감염 시킨 후 감염 시기별 (3주, 6주, 12주)로 채취한 spleen의 total RNA를 추출하여 정제한 후 SuperScript Plus Direct cDNA Labeling System 을 이용하여 cDNA 을 합성한 후 hybridization 을 시행하여 감염군과 대조군 간의 유전자 발현 차이를 분석하였다.

결과의 분석은 microarray image analysis software 을 이용하여 실시하였으며, 각 시기의 대조군 및 실험군간에 유전자 발현 차이를 Illumina expression beadchip (MouseWG-6 v2.0) 을 사용하여 비교 및 분석 하였고, microarray 에서 유의적인 변화는 fold change 가  $\pm 2$  이상이고, 통계학적으로  $P > 0.05$  일 때로 하였다. 이 때 유의적인 변화를 보이는 유전자 군에 대하여 Quantitative Real-time PCR 기법을 이용하여 microarray 에 의한 유전자 발현의 차이에 대한 유효성을 확인하였다.

유전체 분석을 통해 요네병감염과 상관성이 높다고 판단되는 유전자들을 발굴하고, 이를 유전자들 중 요네병 감염을 탐색할 수 있는 지표물질로서의 가치가 높은 물질을 후보물질로 발굴하고, 소에서 요네균 감염에 대한 biomarker 발굴에 기초자료가 될 수 있도록 정리하였다.

#### (가) Microarray 분석을 통한 유전자 발현 차이 분석

① 감염 후 3주, 6주, 12주 군과 감염을 시키지 않은 군을 비교하였을 때, 감염 후 3주에는 788 개의 유전자가 증가하였고 571개의 유전자가 감소하였으며, 감염 후 6주에는 938개의 유전자가 증가하였고 646개의 유전자가 감소하였으며, 감염 후 12주에는 383개의 유전자가 증가하였고 70개의 유전자가 감소하였다. 감염 후 12주와 비교하여 감염 후 3주 및 6주에서 더 많은 유전자 변화를 보였다 (Figure 11). 또한 벤다이어그램을 통해서 공통으로 변화한 유전자를 분석한 결과, 감염 후 3주 와 6주가 공통으로 증가 및 감소한 유전자가 많았다 (Figure 12). 각 그룹에서 유전자의 expression level을 scatter plot으로 분석하였다 (Figure 13).

공통으로 증가된 유전자 303개 및 감소된 유전자 49개의 특성 파악을 위해 Panther classification system(<http://www.pantherdb.org/>) 이용하여 Biological functions classification (Figure 14)와 Molecular process classification (Figure 15)에 대해 분석하였다. 또한 Ingenuity systems® (Ingenuity systems, Inc. Redwood City, CA)의 IPA Biomarker Discovery 프로그램을 이용하여 biomarker로서 의미있는 후보물질을 탐색하였다.

② 감염 후 3주, 6주, 12주 군과 감염을 시키지 않은 군을 비교하였을 때, 변화한 유전자 개수 수준과 마찬가지로 감염후 3주 및 6주에서 biological functions 이나 molecular precess의 양상이 비슷한 패턴을 보였다. 특히 감염 후 3주, 6주에서 변화한 유전자들이 metabolic process, cellular process, cell communication 및 immune system process와 관련되었음을 확인하였다. 감염 후 3주, 6주 및 12주의 변화한 유전자 개수나 발현량 수준을 비교해보면 3주, 6주의 발현 양상이 비슷하고 또한 6주에서 변화 정도가 가장 컸으며, 12주부터는 그 양상이 감소 혹은 변

화하는 것으로 보여진다. 또한 앞에서 분석한 병리학적, 면역학적 분석 결과도 동일한 것으로 보여지기 때문에 감염 후 3주, 6주의 상태를 요네균 감염 초기 단계로 판단하게 된다.

이렇듯 본 연구를 통하여 MAP 감염시 시기별로 나타나는 마우스 비장에서의 유전자 변화를 살펴보았으며, 감염 기간 내내 up 및 down regulation 되는 유전자의 종류가 다름을 알 수 있었다. 변화된 유전자에 대하여 fold-change와 p-value에 대하여 BioLayout Express3D 프로그램을 이용하여 clustering을 실시하였다 (Figure 16). 유전자들의 intensity 경향에 따라 크게 4개의 cluster로 이루어짐을 확인하였다. 감염기간 내내 꾸준한 증가를 보인 유전자, 감염기간 내내 꾸준한 감소를 보인 유전자, 감염초기엔 증가, 감염 후기엔 감소된 유전자, 그리고 감염초기엔 감소, 감염후기엔 증가된 유전자를 관찰할 수 있었다 (Table 7, 8, 9).

③ IPA biomarker discovery system을 이용하여 biomarker 후보 물질을 탐색하였으며 (Table 10), 이를 바탕으로 감염시 biomarker로 사용할 수 있는 후보 유전자를 선발하였다 (Table 11).

#### (나) Quantitative Real-time PCR 기법을 이용한 유전자 발현 차이 유효성 확인

선발된 후보들의 microarray data를 검증하기 위하여, 후보들의 specific한 primers를 제작하고 (Table 12), real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR 결과, microarray 결과와 거의 일치하는 것을 확인하였다 (Figure 17).

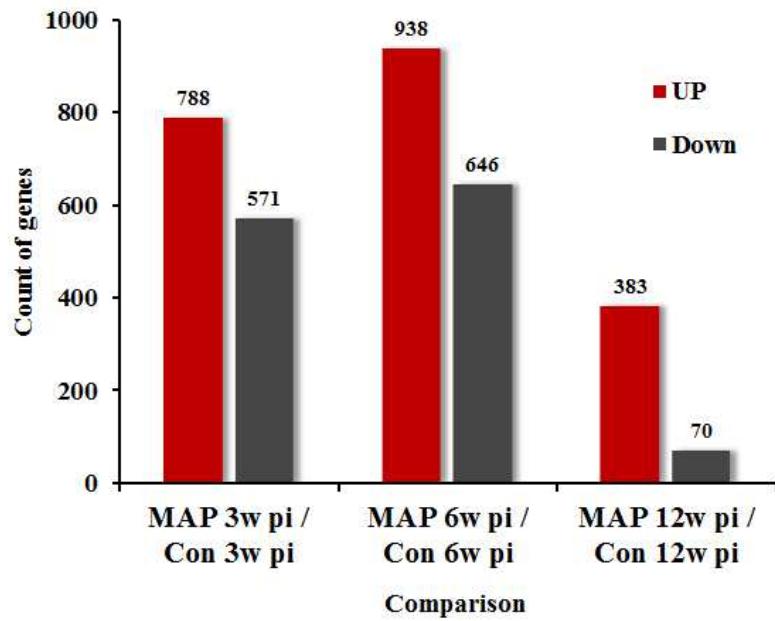


Figure 11. 각 비교 조합에서 fold change 가  $\pm 2$  이상, 그리고  $P < 0.05$ 를 동시에 만족하는 유전자의 개수

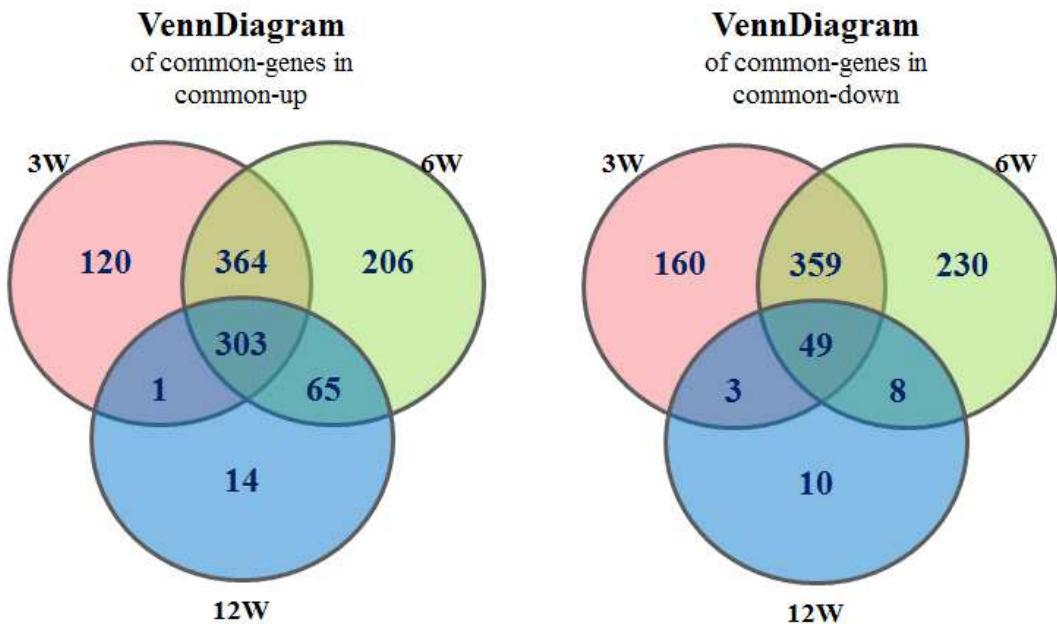


Figure 12. 각 비교 조합에서 공통으로 변화하는 genes 개수

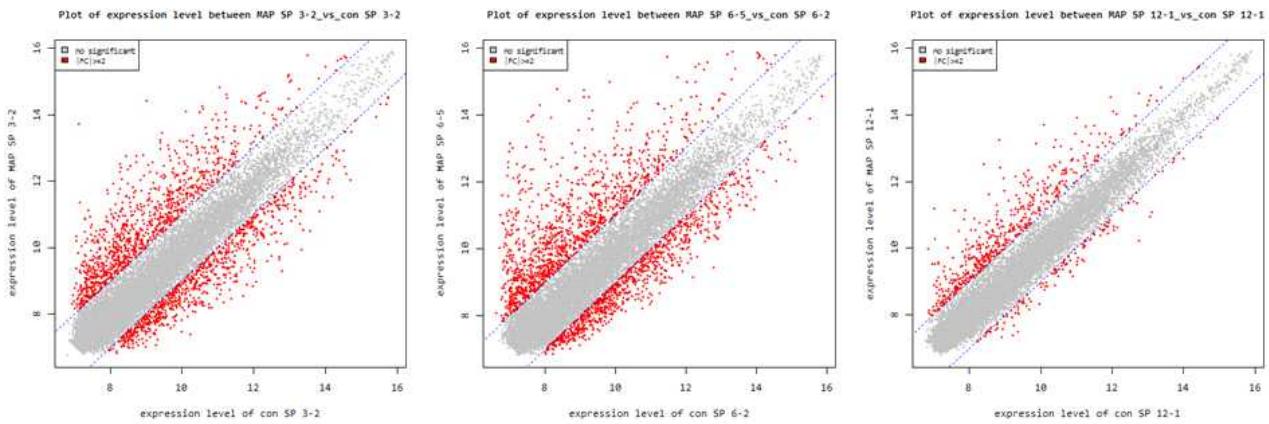


Figure 13. Gene expression level을 scatter plot으로 분석

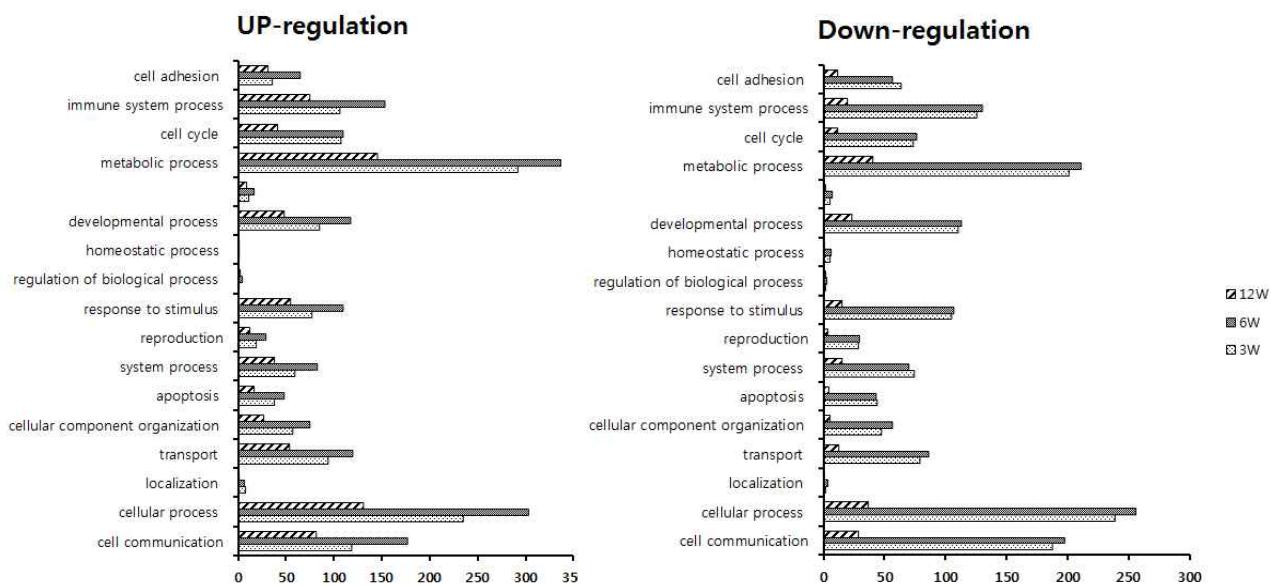


Figure 14. 요네균 감염 마우스 비장에서의 증가 및 감소된 유전자의 biological functions classification.

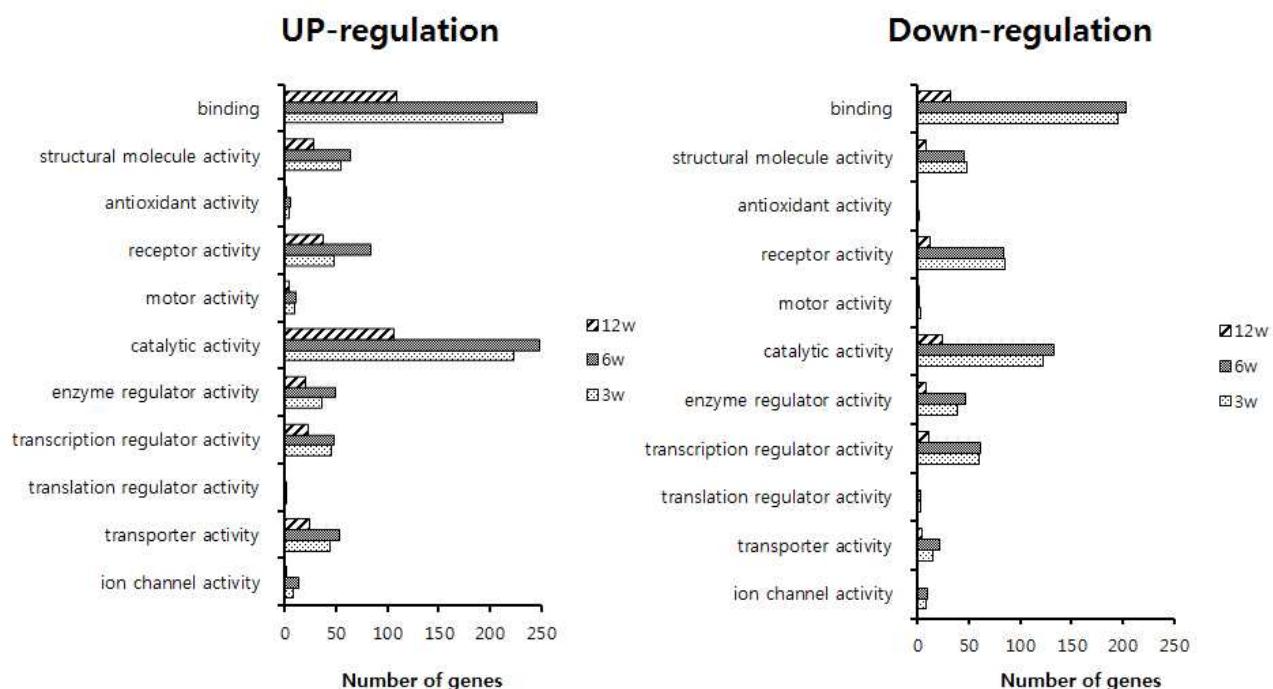


Figure 15. 요네균 감염 마우스 비장에서의 증가 및 감소된 유전자의 Molecular process classification.

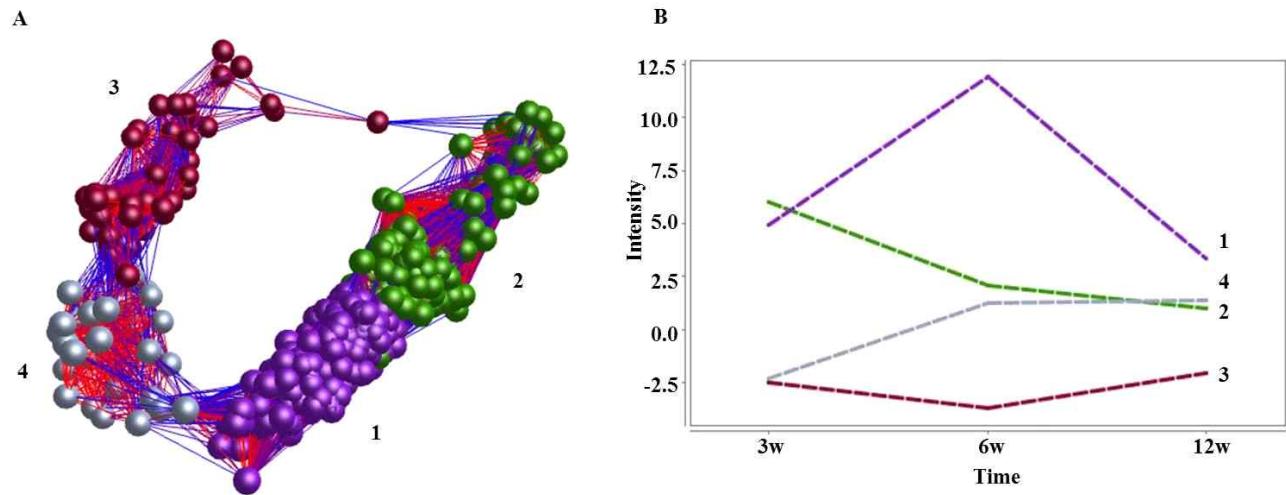


Figure 16. 요네군 감염 마우스에서 변화된 유전자에 대한 BioLayout Express3D 을 이용한 clustering.

Table 7. 감염기간 내내 꾸준한 증가를 보인 유전자

Target ID	Gene Symbol	DEFINITION	3w	6w	12w
ILMN_27 72632	Saa3	Mus musculus serum amyloid A 3 (Saa3), mRNA.	70.540766	30.976321	14.513833
ILMN_12 52157	A330102K04Rik	PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA A330102K04 gene (A330102K04Rik), misc RNA.	35.012969	67.738615	10.06848
ILMN_12 33293	Gbp1	Mus musculus guanylate binding protein 1 (Gbp1), mRNA.	19.012846	15.174789	9.346859
ILMN_26 68996	Kel	Mus musculus Kell blood group (Kel), mRNA.	14.974003	33.227362	3.41466
ILMN_27 15601	Ank1	Mus musculus ankyrin 1, erythroid (Ank1), mRNA.	14.878119	25.016496	2.569307
ILMN_26 48669	Gpnmb	Mus musculus glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnmb), mRNA.	14.223115	5.490992	2.954452
ILMN_12 25587	Abcg4	Mus musculus ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4 (Abcg4), mRNA. XM_989296 XM_989324	13.969968	18.526204	3.363435
ILMN_12 44879	LOC100046690	PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC100046690 (LOC100046690), mRNA.	13.87882	24.076478	2.567146
ILMN_12 39447	Hemgn	Mus musculus hemogen (Hemgn), mRNA.	13.864176	34.112088	6.785314
ILMN_26 96696	Gypa	Mus musculus glycophorin A (Gypa), mRNA.	13.572649	65.984906	5.676428
ILMN_12 42457	Fpr2	Mus musculus formyl peptide receptor 2 (Fpr2), mRNA.	12.938024	23.262968	8.516863
ILMN_12 57143	Ermap	Mus musculus erythroblast membrane-associated protein (Ermap), mRNA.	12.582242	25.160499	3.721624
ILMN_29 60325	Ctse	Mus musculus cathepsin E (Ctse), mRNA.	12.103317	41.418822	4.762776
ILMN_29 44824	Hp	Mus musculus haptoglobin (Hp), mRNA.	11.877181	23.852819	3.481842
ILMN_26 60754	Spnb1		11.857828	25.940484	2.495619
ILMN_28 60699	Epb4.9	Mus musculus erythrocyte protein band 4.9 (Epb4.9), mRNA.	11.781978	20.465495	3.619348
ILMN_27 45515	Rhag		11.729131	16.112964	4.420774
ILMN_12 45717	Epb4.9	Mus musculus erythrocyte protein band 4.9 (Epb4.9), mRNA.	11.674374	20.54477	2.701451
ILMN_28 39788	Tal1	Mus musculus T-cell acute lymphocytic leukemia 1 (Tal1), mRNA.	11.637396	25.69745	4.241614
ILMN_24 77324	Trim10	Mus musculus tripartite motif-containing 10 (Trim10), mRNA.	11.461168	21.52136	4.860197

외 655 genes

Table 8. 감염기간 내내 꾸준한 감소를 보인 유전자

Target ID	Gene Symbol	DEFINITION	3w	6w	12w
ILMN_1212 982	Zfp318	Mus musculus zinc finger protein 318 (Zfp318), transcript variant 1, mRNA.	-2.66122	-3.331653	-1.9699
ILMN_1213 030	Map4k2	Mus musculus mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2 (Map4k2), mRNA.	-2.21784	-2.35692	-1.696736
ILMN_1213 286	Ccl21a	Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 21A (Ccl21a), mRNA.	-4.487045	-4.938388	-1.773855
ILMN_1213 809	Gpr18	Mus musculus G protein-coupled receptor 18 (Gpr18), mRNA.	-2.654076	-2.891068	-1.653097
ILMN_1214 118	Plekha2	Mus musculus pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2 (Plekha2), mRNA.	-2.601959	-2.532342	-1.615614
ILMN_1214 950	Mef2c	Mus musculus myocyte enhancer factor 2C (Mef2c), mRNA.	-4.103625	-4.712583	-2.149534
ILMN_1215 779	A530021J0 7Rik	PREDICTED: Mus musculus Riken cDNA A530021J07 gene (A530021J07Rik), misc RNA.	-2.599251	-2.300326	-1.809367
ILMN_1215 859	Serpina1b	Mus musculus serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1b (Serpina1b), mRNA.	-2.414275	-2.218521	-2.298151
ILMN_1216 322	Hmgcs2	Mus musculus 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (Hmgcs2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	-3.535074	-2.683007	-1.536305
ILMN_1216 368	B3gnt5	Mus musculus UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 (B3gnt5), mRNA.	-5.4082	-3.66354	-1.554747
ILMN_1216 522	Nfatc1	Mus musculus nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (Nfatc1), transcript variant 2, mRNA.	-2.597675	-2.660302	-1.867429
ILMN_1217 913	D230007K 08Rik	PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA D230007K08 gene, transcript variant 5 (D230007K08Rik), mRNA.	-2.683926	-3.096475	-1.74149
ILMN_1218 037	Tmie	Mus musculus transmembrane inner ear (Tmie), mRNA.	-2.691264	-3.459766	-1.754255
ILMN_1219 551	Klk1b21	Mus musculus kallikrein 1-related peptidase b21 (Klk1b21), mRNA.	-2.376907	-2.015615	-1.684985
ILMN_1219 564	Larp6	Mus musculus La ribonucleoprotein domain family, member 6 (Larp6), mRNA.	-2.228974	-2.449993	-1.553469
ILMN_1219 591	Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 1300014I06 gene (1300014I06Rik), mRNA.	-3.98702	-3.057583	-1.666895
ILMN_1219 840	2310033F1 4Rik		-2.035029	-2.265327	-1.547579
ILMN_1220 101	Ebi2		-5.211078	-5.019166	-1.845031
ILMN_1220 726	Satb1	Mus musculus special AT-rich sequence binding protein 1 (Satb1), mRNA.	-3.898432	-3.847349	-1.898121
ILMN_1221 820	Faim3	Mus musculus Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (Faim3), mRNA.	-5.636979	-4.152857	-1.727314

외 302 genes

Table 9. 감염초기엔 감소, 감염 후기에는 증가된 유전자

Target ID	Gene Symbol	DEFINITION	3w	6w	12w
ILMN_293 0707	Tcf21	Mus musculus transcription factor 21 (Tcf21), mRNA.	-1.542843	3.81746	3.163392
ILMN_263 1505	LOC3844 15		-7.235208	1.538533	2.925947
ILMN_272 4942	Ptgis	Mus musculus prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase (Ptgis), mRNA.	-1.80973	2.793154	2.677319
ILMN_125 4159	Igk-V38		-2.241495	1.1868	2.467252
ILMN_123 4165	Clec4g	Mus musculus C-type lectin domain family 4, member g (Clec4g), mRNA.	-4.684538	4.158053	2.380601
ILMN_122 6583	LOC3844 22		-1.863699	-1.044021	2.25755
ILMN_269 9898	Itgae	Mus musculus integrin alpha E, epithelial-associated (Itgae), transcript variant 1, mRNA.	-1.771106	-1.476975	2.05996
ILMN_123 8932	Igk-V38		-1.645541	-1.046581	2.043598
ILMN_123 0194	LOC6369 44	PREDICTED: Mus musculus similar to Ig kappa chain V-V region K2 precursor (LOC636944), mRNA.	-1.649965	1.790598	2.005339
ILMN_122 2531	Ighg	PREDICTED: Mus musculus Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide) (Ighg), mRNA.	-1.757221	2.884056	1.949337
ILMN_122 9263	LOC1000 46496	PREDICTED: Mus musculus similar to Ig kappa V-region 24B (LOC100046496), mRNA.	-2.792134	1.046446	1.948011
ILMN_261 1798	LOC2320 67		-3.617472	-1.031195	1.916713
ILMN_269 0611	LOC6263 47	PREDICTED: Mus musculus similar to Ig kappa chain V-III region MOPC 63 precursor (LOC626347), mRNA.	-2.864267	1.21482	1.894927
ILMN_249 9056	IGKV2-1 37_AJ231 263_Ig_kappa_variable_2-1 37_15		-2.303227	1.023451	1.894255
ILMN_294 8552	Xcl1	Mus musculus chemokine (C motif) ligand 1 (Xcl1), mRNA.	-2.259377	-1.576714	1.763428
ILMN_246 7429	D6Mit97		-3.090522	1.002857	1.680581
ILMN_265 8908	Cxcl12		-2.272732	2.753876	1.598069
ILMN_263 1763	LOC3844 19		-3.060876	1.079996	1.546959
ILMN_264 9286	LOC2434 31	PREDICTED: Mus musculus similar to Ig kappa chain V-V region MOPC 41 precursor (LOC243431), mRNA.	-3.051988	1.001235	1.535867
ILMN_123 9346	Klre1	Mus musculus killer cell lectin-like receptor family E member 1 (Klre1), mRNA.	-2.946505	1.061446	1.526925

Table 10. Selected biomarkers using Ingenuity system

Symbol	Entrez Gene Name	Location	Illumina	Fold Change			Biomarker Application(s)
				3W	6W	12W	
CD68	CD68 molecule	Plasma Membrane	ILMN_2689785	2.611	2.296	1.246	diagnosis,efficacy
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Nucleus	ILMN_2634083	2.627	1.739	1.374	diagnosis,efficacy,prognosis,response to therapy
IFNG	interferon, gamma	Extracellular Space	ILMN_2685712	3.219	2.624	1.992	diagnosis,efficacy,unspecified application
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Cytoplasm	ILMN_2726371	2.212	2.141	1.607	diagnosis,unspecified application
S100A8	S100 calcium binding protein A8	Cytoplasm	ILMN_2710905	4.997	64.762	16.716	diagnosis,efficacy,response to therapy,unspecified application
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	Cytoplasm	ILMN_2650280	2.351	1.772	1.193	diagnosis,disease progression,prognosis,unspecified application
IL1B	interlukin 1, beta	Extracellular Space	ILMN_2777498	1.547	2.191	1.474	diagnosis,efficacy, prognosis, safety
MMP9	Matrix metallopeptidase 9, 92 kDa type IV collagenase, 92 kDa gelatinase or gelatinase B	Extracellular Space	ILMN_2711075	1.791	2.832	1.681	diagnosis,disease progression,efficacy,prognosis, unspecified application
Trf	transferrin	Extracellular Space	ILMN_2485323	-1.237	2.835	1.252	diagnosis,efficacy, prognosis
VCAM1*	vascular cell adhesion molecule 1	Plasma Membrane	ILMN_2778655	1.78	2.035	1.355	diagnosis,disease progression,efficacy,prognosis, unspecified application
VWF	Von Willebrand factor	Extracellular Space	ILMN_2519673	1.376	9.194	1.504	diagnosis,efficacy,prognosis
MMP14	Matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)	Extracellular Space	ILMN_1240726	2.135	1.632	-1.102	diagnosis,prognosis,unspecified application

Table 11. Biomarker 후보 유전자 선별 목록

	Gene	Accession no.	3 weeks	6 weeks	12 weeks
Up-regulation	S100a8	NM_013650.2	5.00	64.76	16.72
	Ifng	NM_008337.3	3.22	2.62	1.99
	Sod2	NM_013671.2	2.35	1.77	1.19
	Vwf	NM_011708.3	1.38	9.19	1.50
	Mmp9	NM_013599.2	1.79	2.83	1.68
	Il1b	NM_008361	1.55	2.19	1.47
	Tfrc	NM_011638.3	9.12	11.13	3.78
	Tnfaip2	NM_009396.1	5.56	5.78	2.21
Down-regulation	Cox6a2	NM_009943.2	-4.33	-3.31	-2.77
	Vpreb3	NM_009514.4	-7.33	-5.16	-2.06
	Siglec1	NM_011426.2	-1.53	-1.65	-2.39
	Scara3	NM_172604.3	-2.60	-3.35	-2.09

Table 12. Nucleotide sequence of primers

RefSeq_NM	GeneSymbol		Sequence (5'->3')	Size (bps)
NM_013650.2	S100a8	Forward	CGAGGAGTTCCCTTGCGATGG	84
		Reverse	CTAGGCCAGAAGCTCTGCTAC	
NM_013671.2	Sod2	Forward	GTGTCTGTGGGAGTCCAAGG	81
		Reverse	GCAGGCAGCAATCTGTAAGC	
NM_013599.2	Mmp9	Forward	GTCCAGACCAAGGGTACAGC	107
		Reverse	ATACAGCGGGTACATGAGCG	
NM_009514.4	Vpreb3	Forward	CTAGGTCGGCCTTCTGCTT	121
		Reverse	AAGACTGAGAACGCGTCAGG	
NM_011426.2	Siglec1	Forward	CCGCATTGCAGCCATAAGTC	77
		Reverse	TGGCAATAGCTGTGTGGG	
NM_172604.3	Scara3	Forward	AAACAGCTCACCTCCCCCTA	117
		Reverse	GGTAGCTATCCCTTCCCCCA	

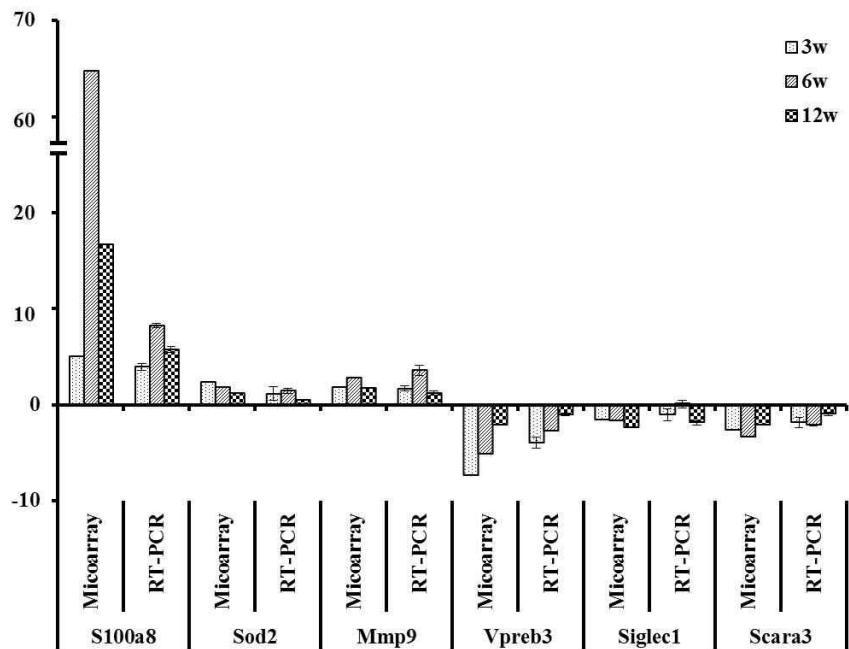


Figure 17. Quantitative real-time PCR을 이용한 후보 biomarker에 대한 microarray 결과 확인

## 2. 숙주동물(소)에서 유전체 정보를 활용한 biomarker 탐색

### 가. 요네병 감염 수준별에 따른 숙주동물(소) 실험대상 확보

#### (1) 요네병 감염 수준 평가

총 275두의 소를 대상으로 분변을 채취하여 분변 속에 *M. paratuberculosis*의 존재 유무를 PCR 방법을 통해 확인하였다. 250mg의 분변 샘플로부터 DNA extraction 후 IS900 real-time PCR 및 ISMAP02 nested PCR 수행하여 분변으로부터의 *M. paratuberculosis*의 shedding 여부를 판정하였다 (Table 13). 또한 총 275두의 소를 대상으로 혈액을 채취하여 ELISA 검사를 실시하였다. 연령, Fecal shedding 여부와 혈중 항체가 양성 여부에 따라 요네병 감염 단계를 구분하였다 (Table 14).

Table 13. 분변 PCR 결과에 따른 최종 실험 후보축 선정

No.	개체번호	IS900 Real-time PCR (SYBR Green)			ISMAP02 nested PCR				IS900 rt PCR (TaqMan)		ELISA
1	80xx	+ 29.9	- -	- -	+ +	+ -	- -	- -	28.43 40.78	= -	
2	030xx	+ 35.31	- -	- -	+ +	- -	- -	- -	42.99 -	= +	
3	100xx	+ 34.67	- 36.96	- -	+ +	+ -	- -	- -	33.5 42.97	= +	
4	70xx	+ 34.27	- 37.3	- 36.97	- -	+ +	- -	- -	32.73 -	= +	ELISA 양성
5	61xx	+ 33.83	- 34.69	- -	+ +	+ -	- -	- -	33.57 -	= +	
6	70xx	+ 32.28	- -	- -	- +	- -	- -	- -	36.64 39.01	= +	
7	100xx	+ 34.19	- -	- -	- +	- -	- -	- -	35.2 -	= +	
8	61xx	+ 35.22	- 32.15	- 32.63	+ +	- -	+ +	+ +	35.27 31.86	= +	ELISA 양성
9	100xx	+ 35.92	- -	- -	- -	- -	- -	- -	35.19 -	= +	ELISA 양성
10	100xx	+ 35.72	- 37.02	- -	+ +	+ -	- -	- -	- -	= -	
11	81xx	+ 35.17	- -	- -	- -	- -	- -	- -	30.15 -	= +	ELISA 양성
12	90xx	+ 34.33	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	= -	
13	80xx	+ 33.69	- 28.43	- 28.99	+ +	+ -	+ -	+ +	32.25 28.91	= +	ELISA 양성
14	100xx	+ 35.02	- 35.95	- -	- +	- +	- -	- -	38.33 44.88	= +	
15	100xx	+ 36.18	- 37.23	- 40.4	- -	- -	+ +	- -	34.57 37.38	= +	ELISA 양성
16	80xx	+ 26.6	- 35.41	- 37.38	+ +	- -	- -	- -	35.43 39.26	= +	
17	40xx	+ 35.74	- 34.66	- 40.29	+ +	- -	- -	- -	- -	= -	
18	110xx	+ 35.51	- 41.16	- -	- -	- -	- -	- -	- -	= -	
19	120xx	+ 35.32	- 40.96	- -	+ +	+ -	- -	- -	37.34 -	= +	
20	101xx	+ 36.44	- -	- 38.89	+ +	- -	- -	- -	- -	= -	
21	120xx	+ 36.53	- -	- 39.04	+ +	+ -	- -	- -	37.04 -	= +	
22	120xx	+ 35.33	- -	- -	+ +	- -	- -	- -	- -	= -	
23	120xx	+ 35.03	- -	- 39.87	- +	+ -	- -	- -	38.94 -	= +	
24	120xx	+ 35.08	- -	- 39.41	+ +	- -	- -	- -	- -	= -	
25	101xx	+ 35.18	- -	- -	+ +	- -	- -	- -	39.29 -	= +	
26	110xx	+ 35.09	- 30.55	- 30.76	+ +	- -	- -	- -	- -	= +	
27	110xx	+ 35.67	- -	- 40.29	- -	- -	- -	- -	36.8 -	= +	
28	071xx	+ 35.51	- -	- 42.6	- -	+ +	- -	- -	41.62 -	= +	
29	081xx	+ 34.76	- -	- 38.1	- -	- -	- -	- -	38.52 -	= +	
30	90xx	= -	- -	- 38.39	- -	- -	- -	- -	- -	= +	ELISA 양성
31	90xx	= -	- 38.39	- 41.29	- -	- -	- -	- -	37.14 -	= +	ELISA 양성
32	70xx	= -	- 37.25	- -	- -	- -	- -	- -	38.73 -	= +	

Table 14. 실험 대상축 선정

개체번호	분변 PCR	ELISA	감염 단계에 따른 그룹
100xx, 120xx	+	-	A
90xx, 90xx	-	+	B
61xx, 80xx	+	+	C
80xx, 70xx	-	-	Control group

## 나. 요네병 감염 수준별에 따른 혈중 면역세포에서 유전체(transcriptomes) 발현 양상 분석

### (1) 실험대상 (소)에서 유전체(transcriptomes) 발현 양상 분석

요네병 감염수준 평가를 통해서 선발된 실험대상 (소)에서 혈액을 채취하였다. 혈액에서의 RNA quality를 유지하기 위하여 Paxgene blood tube (PreAnalytiX)를 이용하여 채취하였다. 또한 채취한 혈액은 사용 전까지 -70°C에서 저장하였다. 또한 샘플 tube를 상온에 2시간 이상 incubation한 후, Paxgene blood RNA kit (PreAnalytiX)를 이용하여 매뉴얼대로 실행하여 RNA 분리하였다. 분리한 RNA는 purity (A260/230), purity (A260/280) 및 rRNA ratio가 1.7 이상이었으며, RNA Integrity Number (RIN)가 8이상으로 QC를 충족하였다. 요네병 감염 수준별 유전자 발현양상을 분석하기 위하여 microarray 기법을 통하여 분석하였다. 정제된 RNA는 the Agilent's QuicI Amp Labeling kit를 이용하여 cDNA을 합성한 후 Agilent expression microarray에 hybridization을 시행하였다. Microarray는 Agilent Technologies G2600D SG12494263으로 스캔하였다.

결과의 분석은 Agilent Feature Extraction v11.0.1.1을 이용하여 실시하였으며, 통계적 유의성은 R 2.15.1 software을 이용하여 분석함. 각각 실험 대상 그룹 A, B 및 C 간에 유전자 발현 차이를 비교 및 분석 하였고, microarray에서 유의적인 변화는 fold change 가  $\pm 2$  이상이고, 통계학적으로  $p > 0.05$  일 때로 하였다. 이 때 유의적인 변화를 보이는 유전자 군에 대하여 Quantitative Real-time PCR 기법을 이용하여 microarray에 의한 유전자 발현의 차이에 대한 유효성을 확인하였다.

### (가) Microarray 분석을 통한 유전자 발현 차이 분석

그룹 A, B, C에서 fold change 가  $\pm 2$  이상, 그리고  $p < 0.05$ 를 동시에 만족하는 유전자의 개수 (Figure 20)와 공통으로 변화하는 genes을 조사하였다 (Figure 21). 각각의 A, B 및 C 그룹과 control 그룹을 비교하였을 때, 그룹 A는 374개의 유전자가 증가하였고 337개의 유전자가 감소하였으며, 그룹 B는 872개의 유전자가 증가하였고 413개의 유전자가 감소하였으며, 그룹 C는 850개의 유전자가 증가하였고 400개의 유전자가 감소함을 확인하였다. 그룹 B와 그룹 C가 그룹 A보다 변화한 유전자의 개수나 수준이 높았다. 또한 벤 다이어그램으로 분석한 결과, 그룹 B와 그룹 C의 공통된 유전자가 각각 증가된 유전자 431개 와 감소된 유전자 147개로 그룹 A와의 공통 유전자 개수 보다 많았다. 각 그룹에서 유전자의 expression level을 scatter plot으로 분석하였다 (Figure 22).

그룹 B 와 그룹 C는 둘 다 ParaTB-ELISA 결과가 양성이며, 분변 PCR의 결과가 각각 음성, 양성인 그룹인데, ELISA 결과 음성, 분변-PCR 결과 양성인 그룹 A와 비교하였을 때 더 많은 유전자 변화를 보였다. 또한 Hierarchical clustering 분석을 통하여 각 그룹에 대한 유전자 발현의 유사성을 clustering하여 분석하였다 (Figure 23). 흥미롭게도 ELISA, 분변 PCR의 결과가 모두 음성인 control 그룹과 그룹 A, 그리고 그룹 B와 그룹 C가 같은 cluster로 분석되었다.

그룹 A, B, C에서 모두 증가한 유전자 및 모두 감소한 유전자에서 그의 functions annotation에 대하여 조사하였다 (Figure 24). 그룹 A, B, C에서 모두 2-fold-change 이상 증가한 유전자들에 대한 biological functions을 조사한 결과 metabolic process (GO:0008152),

cell communication (GO:0007154), cellular process (GO:0009987) 및 immune system process (GO:0002376)과 관련됨을 확인하였다. 또한 그룹 A, B, C에서 모두 -2-fold-change 이하 감소한 유전자들에 대한 biological functions은 cell communication, cellular process 및 metabolic process와 관련되었음을 확인하였다.

이렇듯 본 연구를 통하여 MAP 감염 단계별로 선정한 실험 대상 소의 혈중 유전자 변화를 살펴보았는데 그룹별로 up 및 down regulation 되는 유전자의 종류가 다름을 알 수 있었으며, 모든 그룹에서 증가를 보인 유전자, 모든 그룹에서 감소를 보인 유전자, 그룹 A는 증가, 그룹 B, C는 감소된 유전자 그리고 그룹 A는 감소, 그룹 B, C는 증가된 유전자를 관찰할 수 있었다 (Table 15, 16, 17, 18). 이를 바탕으로 감염 시 biomarker로 사용할 수 있는 후보 유전자를 선발하였다 (Table 19).

#### (나) Quantitative Real-time PCR 기법을 이용한 유전자 발현 차이 유효성 확인

선발된 후보들의 microarray data를 검증하기 위하여, 후보들의 specific한 primers를 제작하고 real-time PCR을 수행하였다 (Table 20). Real-time PCR 결과, microarray 결과와 거의 일치하는 것을 확인하였다 (Figure 25).

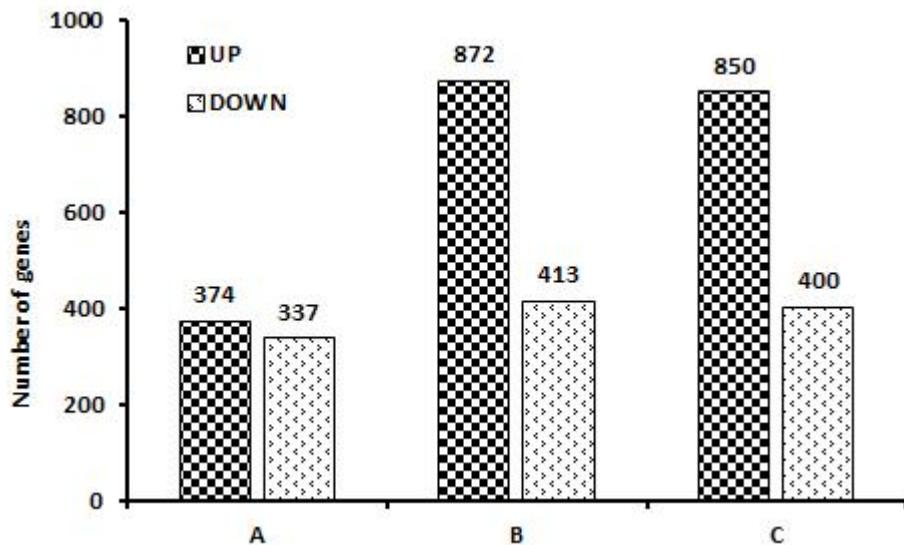
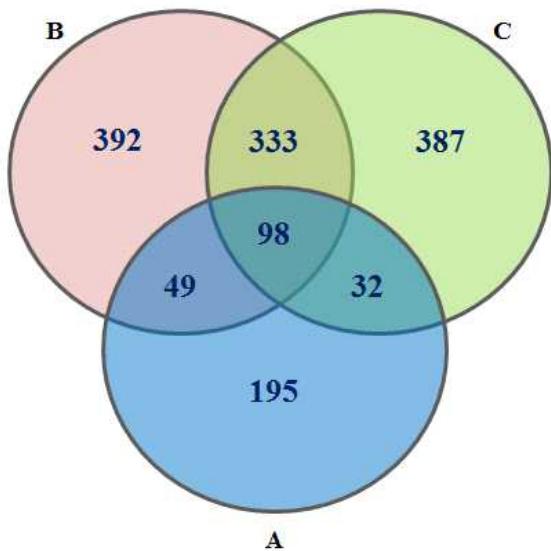


Figure 20. 각 비교 조합에서 fold change 가  $\pm 2$  이상, 그리고  $P < 0.05$ 를 동시에 만족하는 유전자의 개수

VennDiagram  
of common-genes in  
common-up



VennDiagram  
of common-genes in  
common-down

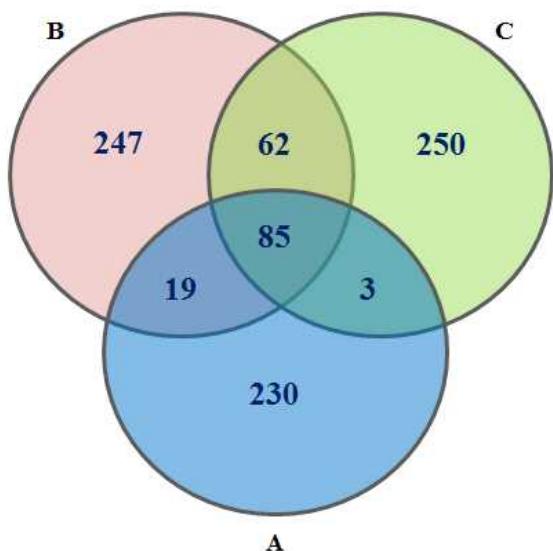


Figure 21. 각 비교 조합에서 공통으로 변화하는 genes 개수

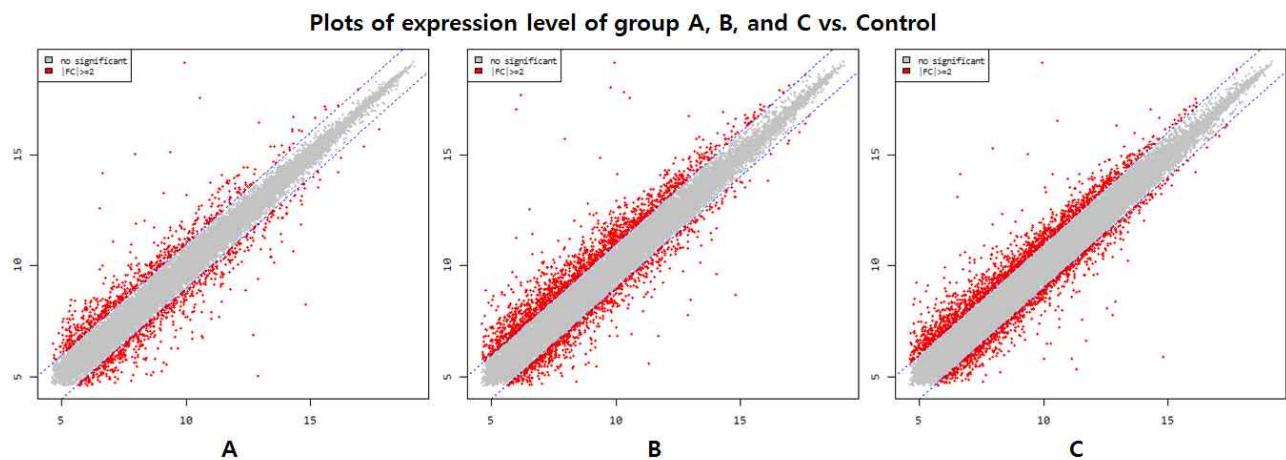


Figure 22. Gene expression level을 scatter plot으로 분석

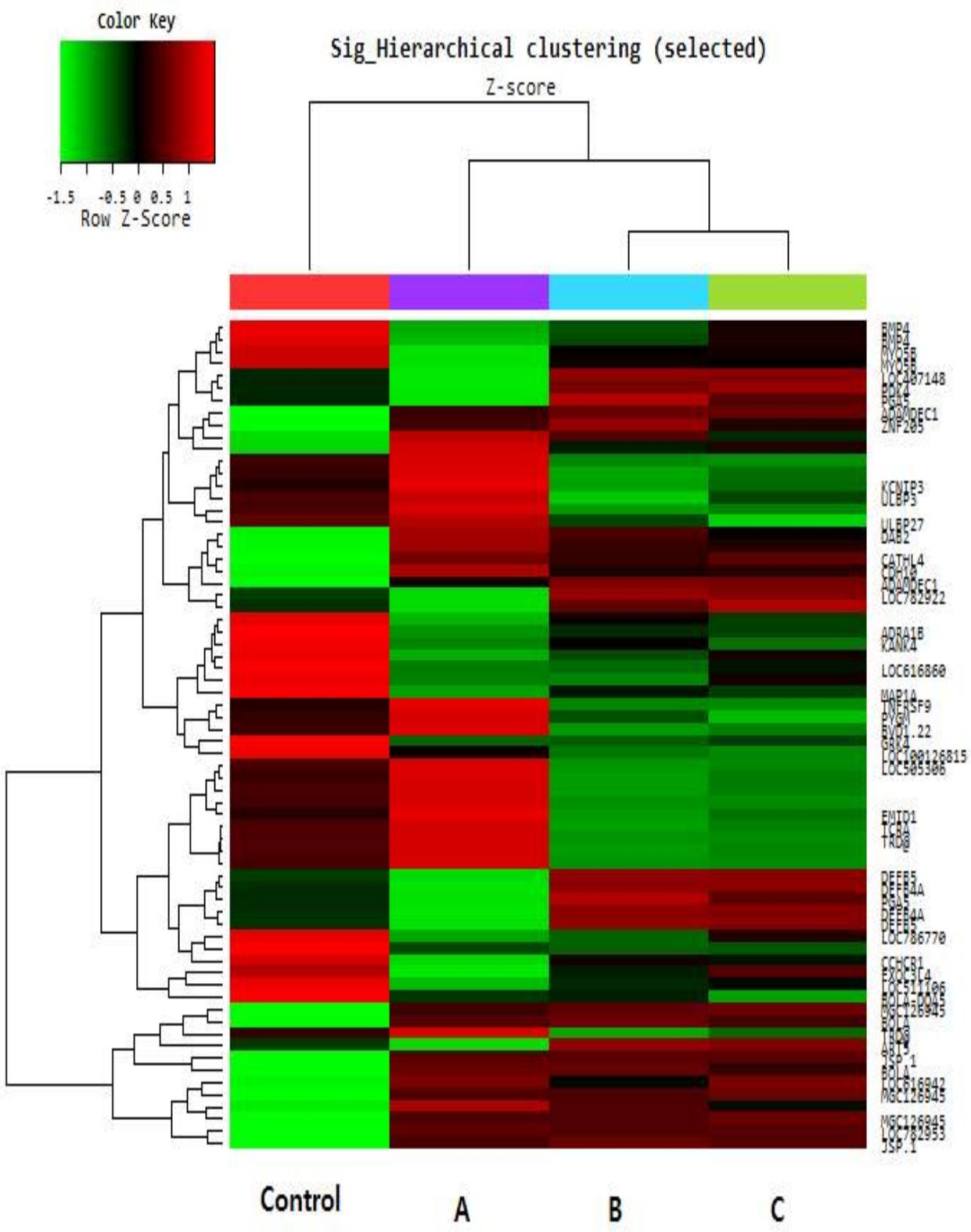


Figure 23. Hierarchical clustering 분석을 통하여 샘플들에 대한 gene의 유사성을 그룹화

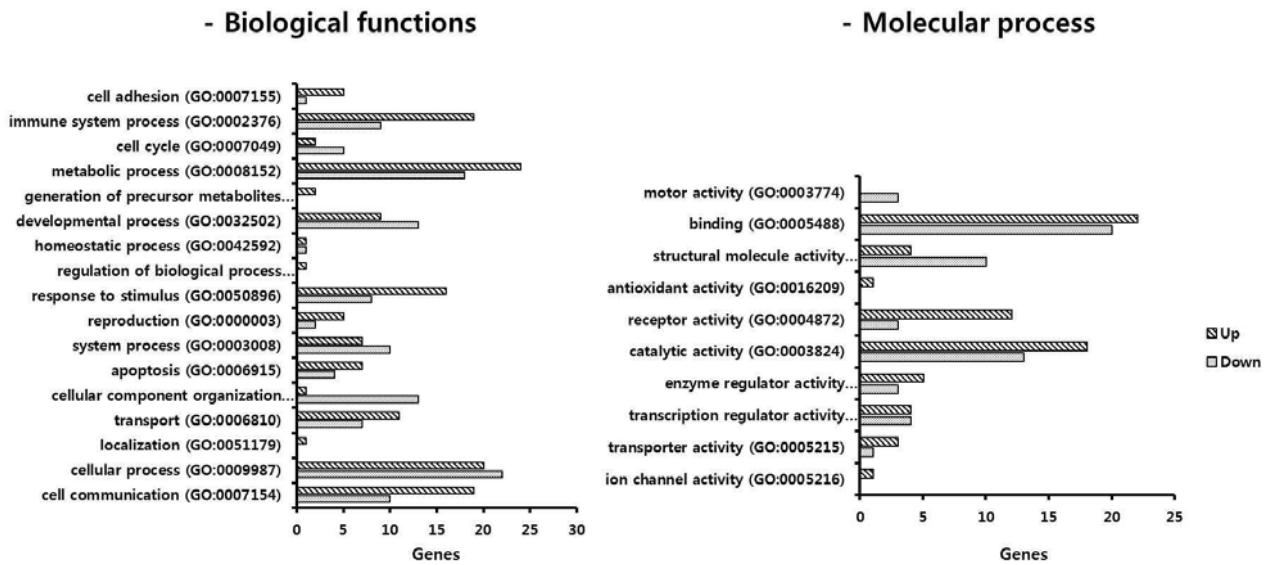


Figure 24. 유전자 변화 양상에 따른 기능적 분류.

Table 15. 그룹 A, B, C에서 모두 증가한 유전자

ProbeID	Gene Symbol	Description	Fold-changes		
			A	B	C
A_73_P296616	JSP.1	Bos taurus MHC Class I JSP.1 (JSP.1), mRNA [NM_001040498]	578.6751	578.6751	578.6751
A_73_108267	LOC616942	Bos taurus major histocompatibility complex, class I, A-like (LOC616942), mRNA [NM_001206459]	185.3669	27.40571	185.3669
A_73_P047531	JSP.1	Bos taurus MHC Class I JSP.1 (JSP.1), mRNA [NM_001040498]	135.3531	215.5339	135.3531
A_73_P107911	BOLA	Bos taurus MHC class I heavy chain (BOLA), mRNA [NM_001193296]	130.7652	130.1911	130.7652
A_73_102649	MGC126945	Bos taurus uncharacterized protein MGC126945 (MGC126945), mRNA [NM_001076983]	67.01472	66.18701	67.01472
A_73_P068953	LOC782953	GB	53.45733	45.03175	53.45733
A_73_P056651		Bos taurus ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4, mRNA (cDNA clone IMAGE:7944880), partial cds. [BC126635]	17.88323	9.021615	17.88323
A_73_P054881		PREDICTED: Bos taurus ABCC4 protein-like (LOC527057), partial mRNA [XM_605444]	16.15468	8.142734	16.15468
A_73_P435441	MGC126945	Bos taurus uncharacterized protein MGC126945 (MGC126945), mRNA [NM_001076983]	13.03907	13.03907	13.03907
A_73_P109228	BOLA	Bos taurus MHC class I heavy chain (BOLA), mRNA [NM_001193296]	11.30759	13.83099	11.30759
A_73_100345	ADAMDEC1	Bos taurus ADAM-like, decysin 1 (ADAMDEC1), mRNA [NM_001206371]	10.34647	14.63331	10.34647
A_73_103209		PREDICTED: Bos taurus leucine rich repeat and Ig domain containing 2, transcript variant 1 (LINGO2), mRNA [XM_590571]	9.930993	2.777325	9.930993
A_73_P057936		TEL2, telomere maintenance 2, homolog (S. cerevisiae) [Source:HGNC Symbol; Acc: 29099] [ENSBTAT00000025412]	7.467624	4.456245	7.467624
A_73_P045551	CATHL4	Bos taurus cathelicidin 4 (CATHL4), mRNA [NM_174827]	5.857989	4.318848	5.857989
A_73_P423301	DAB2	Bos taurus disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila) (DAB2), mRNA [NM_001193246]	5.578428	3.898061	5.578428
A_73_P086621	ADAMDEC1	Bos taurus ADAM-like, decysin 1 (ADAMDEC1), mRNA [NM_001206371]	5.4944	10.90215	5.4944
A_73_115081	ZNF205	Bos taurus zinc finger protein 205 (ZNF205), mRNA [NM_001034473]	5.432679	8.364057	5.432679
A_73_P105266	MGC126945	Bos taurus uncharacterized protein MGC126945 (MGC126945), mRNA [NM_001076983]	5.275623	6.182495	5.275623
A_73_109470	CDH10	Bos taurus cadherin 10, type 2 (T2-cadherin) (CDH10), mRNA [NM_001076266]	5.245943	3.038533	5.245943

Table 16. 그룹 A, B, C에서 모두 감소한 유전자

ProbeID	Gene Symbol	Description	Fold-changes		
			A	B	C
A_73_P056106	LOC511106	Bos taurus serpin peptidase inhibitor, clade B like (LOC511106), mRNA [NM_001105619]	-226.313	-34.0565	-22.7724
A_73_P031561	BOLA-D QA5	Bos taurus major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 5 (BOLA-DQA5), mRNA [NM_001012675]	-94.3485	-70.138	-479.842
A_73_P390781	EXOC3L4	Bos taurus exocyst complex component 3-like 4 (EXOC3L4), mRNA [NM_001205930]	-56.2841	-7.73514	-2.58176
A_73_P088096	GRK4	G protein-coupled receptor kinase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:4543] [ENSBTAT00000001970]	-13.4805	-13.0049	-10.2853
A_73_P510983		LB00498.CR_I21 GC_BGC-04 Bos taurus cDNA clone IMAGE:8064959, mRNA sequence [DT851156]	-12.8451	-13.3556	-4.55765
A_73_P251776	LOC100126815	Bos taurus MHC class I-like family A1 (LOC100126815), mRNA [NM_001111069]	-12.1375	-52.3277	-62.9715
A_73_P205782	LOC786770	PREDICTED: Bos taurus uncharacterized LOC786770 (LOC786770), mRNA [XM_001254357]	-8.0722	-5.73135	-2.76859
A_73_P428093		Rep: PAOX protein - Bos taurus (Bovine), partial (12%) [TC474530]	-7.99439	-9.35801	-8.83116
A_73_100039	CCHCR1	Bos taurus coiled-coil alpha-helical rod protein 1 (CCHCR1), mRNA [NM_001024536]	-6.77716	-2.311	-2.79564
A_73_106627	MYO5B	myosin VB [Source:HGNC S y m b o l : A c c : 7 6 0 3 ] [ENSBTAT0000061584]	-6.58618	-2.26708	-2.36795
A_73_P064446	MYO5B	myosin VB [Source:HGNC S y m b o l : A c c : 7 6 0 3 ] [ENSBTAT0000061584]	-5.98474	-2.28461	-2.13143
A_73_P109433		Uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F1MF80] [ENSBTAT00000039039]	-5.97711	-3.83708	-2.48491
A_73_P032616	KANK4	Bos taurus KN motif and ankyrin repeat domains 4 (KANK4), mRNA [NM_001102053]	-5.88675	-3.03557	-5.38771
A_73_P088776		chromosome 7 open reading frame 63 [Source:HGNC Symbol;Acc:26107] [ENSBTAT00000004561]	-5.76386	-2.49974	-3.45824
A_73_P352936	LOC616860	Uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:E1BFZ1] [ENSBTAT00000031940]	-5.53637	-5.11789	-3.44639
A_73_P268066	MAP1A	microtubule-associated protein 1A [Source:HGNC Symbol;Acc:6835] [ENSBTAT00000038632]	-5.36674	-3.0229	-3.50793
A_73_P100521	BMP4	Bos taurus bone morphogenetic protein 4 (BMP4), mRNA [NM_001045877]	-5.18634	-3.67698	-2.35376
A_73_100080	ADRA1B	Bos taurus adrenergic, alpha-1B-, receptor (ADRA1B), mRNA [NM_001191139]	-5.07592	-3.34293	-3.64931
A_73_104846	BMP4	Bos taurus bone morphogenetic protein 4 (BMP4), mRNA [NM_001045877]	-4.98096	-3.2771	-2.16179

Table 17. 그룹 A 증가, 그룹 B, C 감소된 유전자

ProbeID	Gene Symbol	Description	Fold-changes		
			A	B	C
A_73_P036231	KCNIP3	Bos taurus Kv channel interacting protein 3, calsenilin (KCNIP3), mRNA [NM_001075612]	2.813323	-2.86483	-2.12984
A_73_P041866	EMID1	Bos taurus EMI domain containing 1 (EMID1), mRNA [NM_001101867]	2.6557	-2.54635	-2.07366
A_73_P041716	ULBP3	Bos taurus UL16 binding protein 3 (ULBP3), mRNA [NM_001103233]	2.473932	-7.06162	-2.77061
A_73_P073581		Hw_Fat_23_050802_C07 Bos taurus CF-24-HW fat cDNA library Bos taurus cDNA, mRNA sequence [DV776736]	2.42534	-3.07543	-2.33027
A_73_112550	TNFRSF9	Bos taurus tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9 (TNFRSF9), mRNA [NM_001035336]	2.368903	-2.15109	-2.15925
A_73_P069391		Bos taurus cDNA clone IMAGE:8442397. [BC126850]	2.341936	-3.07032	-2.60753
A_73_P054801		Bos taurus clone DV1.1-1 T-cell receptor delta chain mRNA, partial cds. [JX101718]	2.321185	-3.28365	-3.25225
A_73_P040186	PYGM	Bos taurus phosphorylase, glycogen, muscle (PYGM), mRNA [NM_175786]	2.289848	-2.03029	-3.53891
A_73_P054051			2.281366	-3.72614	-3.22384
A_73_P487018			2.240794	-2.88918	-3.04228
A_73_P079201	LOC505306	PREDICTED: Bos taurus uncharacterized LOC505306 (LOC505306), mRNA [XM_002690604]	2.220117	-3.28633	-3.07915
A_73_P079241		Uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F1N512] [ENSBTAT00000052239]	2.196471	-3.29146	-3.19033
A_73_P079251		Bos taurus clone SBC21 T cell receptor delta mRNA, partial cds. [FJ907531]	2.164981	-3.53671	-3.00685
A_73_P056346	ULBP27	Bos taurus UL16-binding protein 27 (ULBP27), mRNA [NM_001168616]	2.096707	-3.86217	-12.4497
A_73_P111866	TRD@	Bos taurus T-cell receptor delta chain, mRNA (cDNA clone MGC:159597 IMAGE:8447047), complete cds. [BC142016]	2.072305	-3.33598	-3.22401
A_73_P132996	BVD1.22	Bos taurus T cell receptor delta chain variable region precursor (BVD1.22) mRNA, partial cds. [U73389]	2.055229	-2.62968	-2.34445
A_73_P053521		Uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F1N512] [ENSBTAT00000052239]	2.054305	-3.60064	-3.23779
A_73_P105036	TRD@	Bos taurus T-cell receptor delta chain, mRNA (cDNA clone MGC:159602 IMAGE:8182494), complete cds. [BC147858]	2.037052	-2.68323	-2.04643
A_73_P053121	TCRA	Bos taurus cDNA clone IMAGE:8446730. [BC149614]	2.034497	-3.52792	

Table 18. 그룹 A는 감소, 그룹 B, C 증가된 유전자

ProbeID	Gene Symbol	Description	Fold-changes		
			A	B	C
A_73_103212		LB0189.CR_L21 GC_BGC-18 Bos taurus cDNA clone IMAGE:8288807, mRNA sequence [EE226588]	-2.50392	2.181707	3.358557
A_73_104245	PGA5	Bos taurus pepsinogen 5, group I (pepsinogen A) (PGA5), mRNA [NM_001001600]	-2.81467	3.389838	2.085341
A_73_104460	DEFB4A	Bos taurus defensin, beta 4A (DEFB4A), mRNA [NM_174775]	-2.89996	2.960187	2.811411
A_73_P031116	DEFB4A	Bos taurus defensin, beta 4A (DEFB4A), mRNA [NM_174775]	-2.85776	2.898905	2.923449
A_73_P034856	ART5	Bos taurus ADP-ribosyltransferase 5 (ART5), mRNA [NM_001076515]	-2.52808	3.162221	2.884312
A_73_P039036	DEFB5	Bos taurus defensin, beta 5 (DEFB5), mRNA [NM_001130761]	-2.48313	3.171196	3.123612
A_73_P100786	DEFB5	Bos taurus defensin, beta 5 (DEFB5), mRNA [NM_001130761]	-2.84246	3.132515	2.924305
A_73_P168292	LOC78292 2	Bos taurus prostaglandin F synthetase II-like (LOC782922), mRNA [NM_001166224]	-2.22069	2.921221	2.58594
A_73_P253171	PDK4	Bos taurus pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4 (PDK4), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_001101883]	-2.53726	2.117981	2.436868
A_73_P267316	LOC40714 8	Bos taurus ADP-ribosyltransferase 5-like (LOC407148), mRNA [NM_001104964]	-2.96525	2.678707	2.571575
A_73_P274436	PGA5	Bos taurus pepsinogen 5, group I (pepsinogen A) (PGA5), mRNA [NM_001001600]	-3.19284	3.603564	2.093377

Table 19. Biomarker 후보 유전자 선발 목록

그룹 A, B, C에서 모두 증가한 유전자	<i>JSP1, LOC616942, BOLA, CATHL4, DAB2, ADAMDEC1, CDH10, LAP</i>
그룹 A, B, C에서 모두 감소한 유전자	<i>LOC511106, BOLA-DQA5, EXOC3L4, GRK4, LOC100126815, CCHCR1, MAP1A, ADRA1B</i>
그룹 A 증가, 그룹 B, C 감소된 유전자	<i>KCNIP3, EMID1, ULBP3, TNFRSF9, PYGM, ULBP27, TRD@, BVD1.22, TCRA</i>
그룹 A 감소, 그룹 B, C 증가된 유전자	<i>PGA5, DEFB4A, ART5, DEFB5, LOC782922, PDK4, LOC407148</i>

Table 20. Nucleotide sequence of primers

Name	Primer sequences (5'-3')	Size (bps)
JSP.1 [NM_001040498]	F: CAGATGTTGCGGAGAGACAGA	141
	R: GACCAGAGATGGGGTGATGG	
LAP [NM_203435]	F: ACAGATTGGCACCTGTCTCG	112
	R: CTCTGTCCAAGGGCACAGTT	
BOLA-DQA5 [NM_001012675]	F: CAGAGCTGACAGAGACTGTGG	109
	R: GAAGGGTCACCTGAACGTAGG	
EXOC3L4 [NM_001205930]	F: CTCATCTCTGAGCGGCAACT	89
	R: AAGGTGCACGAGGCTTCTC	
ULBP3 [NM_001103233]	F: GTGGGCTAGCCGGAAAAGAT	102
	R: GGTCTTGGAGCCACCCATT	
TRD@ [BC142016]	F: TCTTTGGAAAAGGGACCCGC	108
	R: CCTTCACCAAACAAGCGACG	
DEFB4A [NM_174775]	F: TTCCGTTCTTGTGCCGTGTA	121
	R: TTCTGACTCCGCATTGGTCC	
PGA5 [NM_001001600]	F: ACTTGCAGGCCAGGAAGAAT	91
	R: TGACGAGTGGGATCTTGACG	

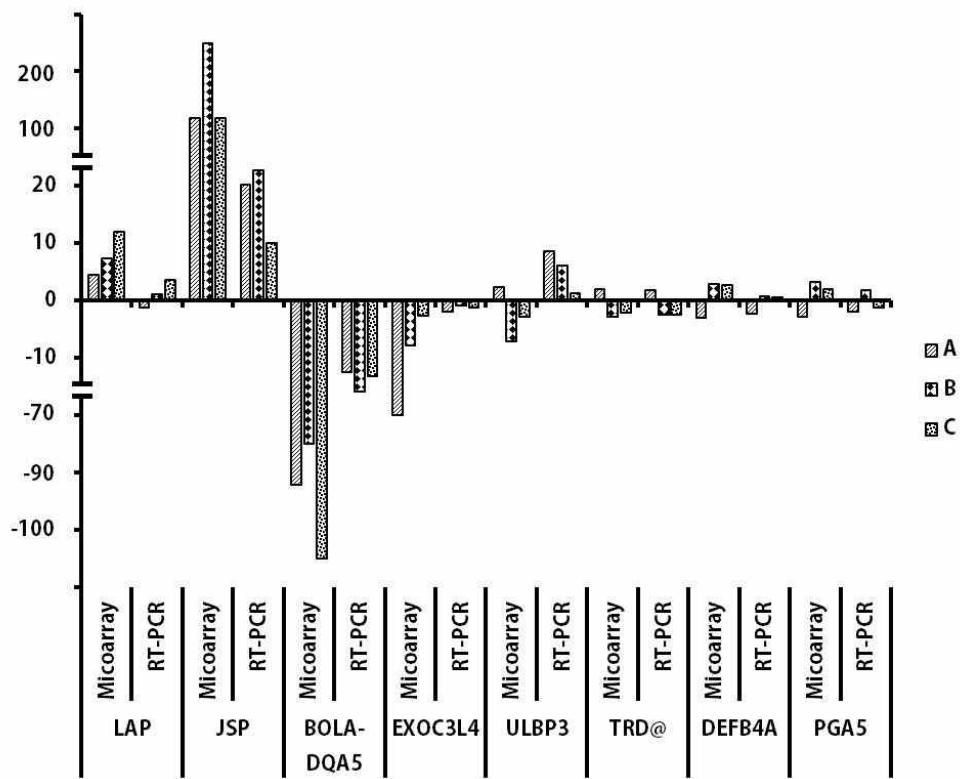


Figure 25. Quantitative real-time PCR을 이용한 후보 biomarker에 대한 microarray 결과 확인

## 다. Biomarker 후보물질 선정

### (1) biomarker 후보물질 선정 전략

본 연구 과제 1, 2년차에 걸쳐 수행한 각 동물 모델에서 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 감염 관련 gene을 검색하고 발굴하였다. 먼저 mouse macrophage cell line raw cell 264.7에서 MAP 자극 후 변화된 유전체들 중 자극 초기 (자극 후 6h)에 증가하고 후기 (자극 후 120h)에 감소하는 유전자를 선정하였다. 또한 마우스 감염모델에서 MAP 감염 초기 단계에 증가한 유전체들 중 Ingeunity Knowledge base를 바탕으로한 Biomarker Discovery program (Ingenuity Systems Inc., Redwood, CA)을 통해 Infectious Disease, Inflammatory response, Immunological disease관련 gene으로 filtering 하여 진단적 가치가 있는 유전자 선발하였다 (Figure 26). 마지막으로 분변 PCR 및 ELISA 결과에 따른 요네병 자연감염 소 그룹에서 감염 단계에 따라 발현 양상이 다른 upstream regulator의 예측을 통해 이의 유의적 변화를 나타내는 target gene 및 down stream gene을 선발하였다 (Figure 27).

Table 21. 유효성 평가를 위한 개체 선정 및 실험군 설정

Group	개체 번호	Fecal PCR*		ELISA		임상증상
		IS900	ISMAP02	S/P ratio	Group**	
Group1	61xx	+	+	267.3	EL200	○
	70xx	+	+	265.1	EL200	○
	110xx	+	+	251.1	EL200	○
	80xx	+	+	168.1	EL100	
	100xx	-	+	117.3	EL100	
	110xx	-	+	61.9	EL45	
	70xx	-	+	47.5	EL45	
	81xx	+	+	33.2	EL45	
Group2	80xx	-	+	3.6	ELneg	
	91xx	-	+	7.5	ELneg	
	100xx	-	+	5.8	ELneg	
	101xx	-	+	4.7	ELneg	
	110xx	-	+	4.5	ELneg	
	120xx	+	+	2.7	ELneg	
	130xx	+	+	7.4	ELneg	
	130xx	+	+	7.7	ELneg	
Group3	90xx	-	-	216.7	EL200	
	70xx	-	-	189.3	EL100	○
	80xx	-	-	105.1	EL100	
	80xx	-	-	139.9	EL100	
	70xx	-	-	66.3	EL45	
	81xx	-	-	48.3	EL45	
	120xx	-	-	75.2	EL45	
	81xx	-	-	39.1	EL45	
Control	90xx	-	-	35.4	EL45	
	110xx	-	-	39.5	EL45	
	110xx	-	-	24.3	EL45	
	70xx	-	-	2.0	Con	
	80xx	-	-	6.8	Con	
	91xx	-	-	8.1	Con	
	110xx	-	-	4.6	Con	
	120xx	-	-	0.4	Con	

\*, 분변 결과의 경우, IS900 PCR 및 ISMAP02 nested PCR에 대한 각각 양성 및 둘 다 양성 개체를 양성으로 판단

\*\*, ELISA 결과의 경우, 결과 양성 유무 및 ELISA SP ratio 수준별 구분설시. - (negative), sp ratio <45; + (EL45), 45≤ sp ratio <100; ++ (EL100), 100≤ sp ratio <200; +++ (EL200), sp ratio ≥200

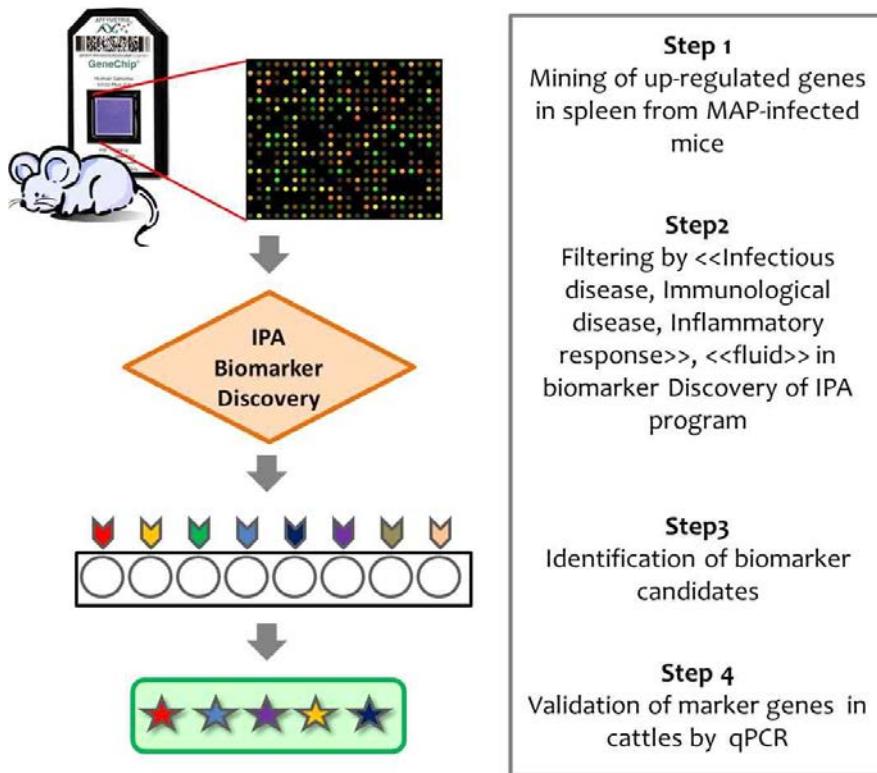
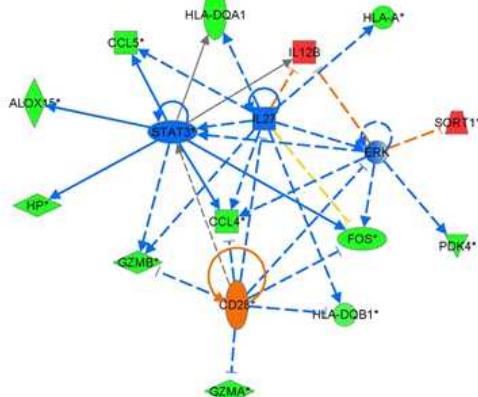
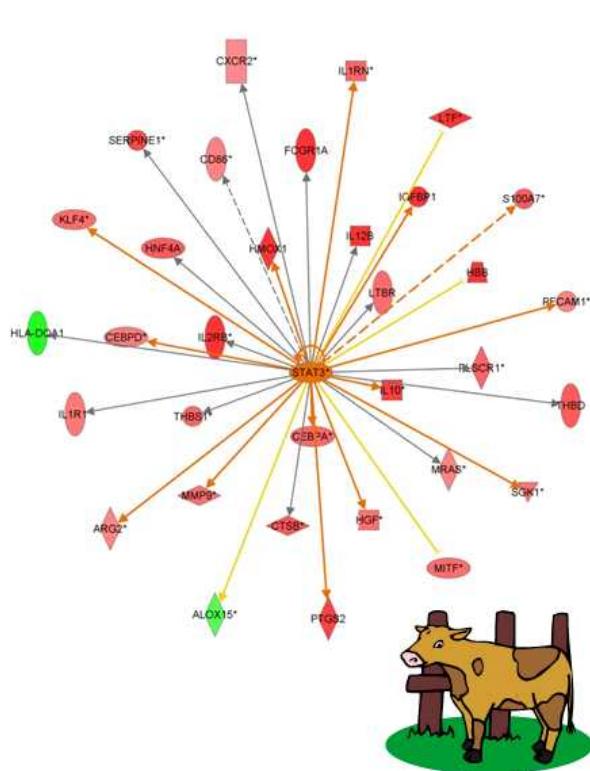


Figure 26. 마우스 모델에서 biomarker 후보 물질 선발 전략

**B****C**A. IPA-derived upstream regulators, by absolute activation  $z$ -score

Upstream regulators	Test1		Test2		Test3	
	Activation $z$ -score	p-value	Activation $z$ -score	p-value	Activation $z$ -score	p-value
STAT3	-2.41	1.24E-03	1.22	1.33E-04	2.64	2.09E-09
ERK	-2.23	7.74E-03	1.10	9.16E-03	2.90	4.13E-07
IL27	-2.20	2.90E-07	0.58	6.17E-04	1.65	8.03E-08
CD28	2.20	2.89E-02	NaN		-1.88	3.78E-02
IL1B	-2.00	4.88E-05	1.88	1.20E-04	3.99	2.62E-11
TNF	-1.76	1.77E-03	0.66	1.85E-03	3.78	1.81E-11
IL1A	-1.99	8.24E-04	1.26	1.76E-05	3.20	1.33E-06
IL13	-1.07	9.72E-06	0.29	1.27E-09	2.62	2.65E-24
TLR3	-0.99	1.18E-06	1.22	1.07E-03	3.07	8.53E-07
TLR9	0	3.58E-02	0.61	1.80E-02	2.68	1.70E-04

Figure 27. 소에서 upstream regulators activation 예측

Table 22. 각 모델에서 선발한 biomarker 후보 물질 목록

References (Bos taurus)*	Gene symbol	Gene Name	Selection model		
			macrophage	mice	cattles
NM_001206577	<i>TFRC</i>	transferrin receptor (p90, CD71)	○	○	
NM_001011673	<i>CXCR3</i>	chemokine (C-C motif) receptor 3	○		
NM_001075147	<i>CCL4</i>	chemokine (C-C motif) ligand 4		○	○
NM_175827	<i>CCL5</i>	chemokine (C-C motif) ligand 5		○	○
NM_001113172	<i>CXCL9</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 9		○	
NM_001046551	<i>CXCL10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10		○	
NM_001113173	<i>CXCL11</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11		○	
NM_174086	<i>IFNG</i>	interferon, gamma		○	
NM_001075995	<i>GBP6</i>	guanylate binding protein family, member 6			○
NM_001206636	<i>KLRB1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1			○
XM_003582266	<i>KLRC1</i>	NKG2-A/NKG2-B type II integral membrane protein			○
NM_174744	<i>MMP9</i>	matrix metallopeptidase 9			○
NM_174137	<i>SERPINE1</i>	serpin peptidase inhibitor			○
NM_174088	<i>IL10</i>	Interleukin 10			○
NM_001040470	<i>HP</i>	haptoglobin		○	○
NM_001031751	<i>HGF</i>	hepatocyte growth factor (hepatopoietin A; scatter factor)		○	○
NM_174143	<i>PIGR</i>	polymeric immunoglobulin receptor			○
NM_001113298	<i>MPO</i>	myeloperoxidase		○	○
NM_174008	<i>CD14</i>	CD14 molecule		○	
NM_001080219	<i>CHI3L1</i>	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)		○	
NM_180998	<i>LTF</i>	lactotransferrin		○	
NM_001105653	<i>ELANE</i>	elastase neutrophil expressed		○	
NM_001113725	<i>S100A8</i>	S100 calcium binding protein A8		○	
NM_001046328	<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein A9		○	

\*, 각 동물 모델에서 선정된 gene은 bos taurus에서의 references를 찾아 선정함.

### 3. 발굴 biomarker 후보물질의 유효성 평가

선발된 biomarker 후보 물질의 유효성 평가를 위해 앞서 구분한 감염단계 그룹별, 혈청내 항체 수준별 biomarker 후보물질의 상관관계를 살펴보았다. 선발된 실험대상 (소)에서 혈액을 Paxgene blood tube (PreAnalytiX)를 이용하여 채취하였다. 또한 채취한 혈액은 Paxgene blood RNA kit (PreAnalytiX)를 이용하여 매뉴얼대로 실행하여 RNA 분리를 수행하였다. 위의 각각 모델에 대해 선발한 유전자들을 바탕으로 소 (*bos taurus*)에서의 유전자를 검색하고 이에 대한 Real-time RT-PCR 용 primer 제작하였다 (Table 23). Real-time RT-PCR 은 2 µl cDNA를 SYBR Green PCR kit (Qiagen) 와Rotor-Gene Q real time PCR cycler (Qiagen) 를 이용하여 실시하였다. PCR 조건은 denaturation: 95°C, 20 sec; annealing: 60°C, 45 sec; 40 cycles 실시하였으며  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법을 이용하여 control group과 비교한 감염군의 fold-change를 도출하였다.

#### 가. Biomarker 후보물질의 요네병 감염 시기에 따른 상관성 분석

##### (1) ELISA 수준에 따른 상관성 분석

ELISA 결과의 경우 32마리 실험대상축의 결과 양성 유무 및 ELISA S/P ratio 수준별 구분을 실시하였다 (ELneg, sp ratio <45; + (EL45),  $45 \leq$  sp ratio <100; ++ (EL100),  $100 \leq$  sp ratio <200; +++ (EL200), sp ratio  $\geq$  200). Control 그룹과 비교하여 MAP 영향을 받은 개체들 간의 ELISA 수준에 따른 biomarker 후보물질 발현의 경향을 살펴본 결과 임상증상 발현이 된 EL200 그룹은 개체간의 값의 편차가 다소 높았다. 또한 ELISA S/P ratio 값이 감소함에 따라 증가하는 genes (*SERPINE1*, *ELANE*, *HGF*, *LTF*, *TFRC*, *CD14*, *HP*, *PIGR*, *MMP9*, *S100A9*, *S100A8*, *CHI3L1*, *IL10*) 이 다수 보였으며, 이중에서 ELneg 그룹에서 증가하는 genes (*SERPINE1*, *HGF*, *LTF*, *TFRC*, *CD14*, *HP*, *MMP9*, *S100A9*, *S100A8*, *CHI3L1*, *IL10*)이 진단적 가치가 유효할 것으로 판단되었다. *CXCL11*은 비록 EL45 그룹과 비슷한 수준의 값을 나타내었지만, 발현 수준이나 통계적 유의성에서 높은 진단적 가치를 나타낸 것으로 판단되었다 (Figure 28).

Table 23. 선발한 biomarker 후보 물질 검출을 위한 primer 목록

Gene symbol	Sequence (5'-3')	size (bps)
<i>KLRB1</i>	CAAATTCCGGTGGATGATCTGC	135
	GGCAGGAGGACCATTACGTT	
<i>KLRC1</i>	ACCCAGGGATTCTGGCATTG	160
	ACTGGTCTCTCTGTTGCTTCC	
<i>CCL4</i>	TCCACTTGCAAACATACAGATAACA	115
	ACCCAACAGCATCCAAACTCA	
<i>CCL5</i>	CCCAGCCAGCTGTGGTATTTC	177
	CTCGGAGCAGCTCAGTTCAA	
<i>CXCL9</i>	CTTCTGCCTCCCCATATGCC	72
	ACTTCTTCTCTGGGTTGGCG	
<i>CXCL10</i>	CTCTGACTGGAGTTCAAGGAGT	141
	TCCCCTGGCTGGTGTGATG	
<i>cxcl11</i>	CCACGTGTCGAGATTATTGCC	73
	TGCCTCTTCCGTGTCGAG	
<i>cxcr3</i>	AAGCATGAGTGTGAAGGGCA	90
	AGGGAAACCTTGAACAAATTGCAG	
<i>IFNG</i>	ACATAGCCAAGTCGGTCACG	157
	CTCGAACATTGACACCCACA	
<i>MMP9</i>	CCCGGATCAAGGATACAGCC	177
	GGGCGAGGACCATAACAGATG	
<i>SERPINE1</i>	CTGCGAAATTCAAGGATGCGG	191
	GGGTGAGAAAACCACGTTGC	
<i>IL10</i>	TCTGCCCTGCGAAAACAAGA	70
	CCTCTCTTGGAGCTCACTGAA	
<i>HP</i>	GGCCCCGAGATTGCTAATA	168
	GGGCAGCTGTCATCTTCTTCA	
<i>HGF</i>	CGACGGGCTCTTTAGGCTC	186
	CTGTCCTTCTGCATAGGGGATG	
<i>PIGR</i>	GAGTTGCCACCACTACCGA	71
	TCCTTGGACGACCTCTTGC	
<i>MPO</i>	GCCCTGGAACTTCAGAGAGATG	132
	GTCAGCACCAACCGAGGTATC	
<i>CD14</i>	TGTCTGACAATCCCAGTCTCG	83
	CGCTAGATATTGGAGGGCCG	
<i>CHI3L1</i>	ATAAGAGAACGCTGGAGGCCA	141
	CCACAAAACCTGTATGAGCCG	
<i>LTF</i>	GGAAGCAGATGCCCTGAACT	141
	AGGTACCCTTCCGTTGGTCT	
<i>ELANE</i>	TTGTCTGAACGGCCTGAACT	92
	CTCTGAACATCTGCCGGGTT	
<i>S100A8</i>	ATTTTGGGGAGACCTGGTGG	124
	ACGGCGTGGTAATTCCCTTT	
<i>S100A9</i>	AGGCTACGGGAAGGGCAG	134
	GCTGGCCTCCTGATTAGTGG	
<i>TFRC</i>	CAAAGTTCTGCCAGCCCAC	188
	AACAGAAAGAGACCGCTGGG	
<i>GBP6</i>	GAGTGAAGGACAAGCAGCCT	179
	CAGACAGAAACCTCTGTATTCCG	

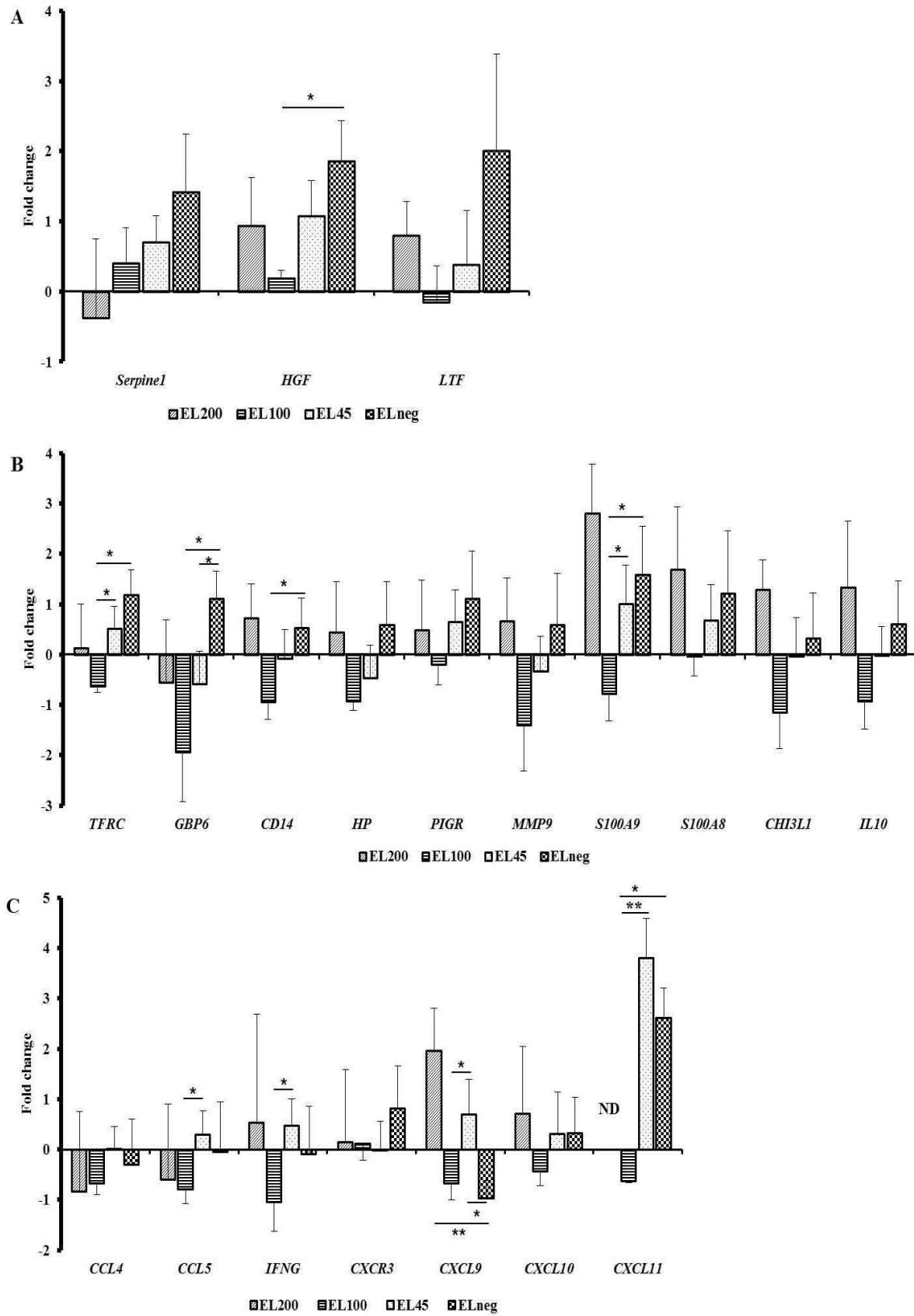


Figure 28. ELISA 수준에 따른 biomarker 후보물질들의 발현 양상 (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; ND, Not Detectable)

## (2) 감염단계에 따른 상관성 분석

실험개체 32마리의 분변 PCR 및 ELISA 양음성 결과에 따라 감염 단계 구분을 실시하였다 (Group 1, PCR 양성, ELISA 양성; Group2, PCR 양성, ELISA 음성; Group3, PCR 음성, ELISA 양성, Control, PCR, ELISA 음성). Control 그룹과 비교하여 각 그룹 개체들 간의 감염 단계에 따른 biomarker 후보물질 발현의 경향을 살펴본 결과 Group 2에서 증가하는 genes (*SERPINE1*, *ELANE*, *HGF*, *LTF*, *KLRB1*, *TFRC*, *GBP6*, *CD14*, *HP*, *MMP9*, *CHI3L1*, *IL10*) 이 다수 보였으며, 이중에서 fold change 1.5 이상 이거나  $p<0.05$  인 증가하는 genes (*SERPINE1*, *HGF*, *LTF*, *TFRC*, *GBP6*)이 진단적 가치가 유효할 것으로 판단되었다. 특히 Th1 type chemokine 관련 genes (*GBP6*, *CCL4*, *CCL5*, *IFNG*, *CXCR3*, *CXCL9*, *CXCL10*)은 Group 1은 감소된 반면 Group 3에서 증가한 비슷한 경향을 나타내었는데, GBP6는 유의적으로 Group 2에서만 증가하였으나 발현 수준이 높지 않아 이와 관련된 genes에 대해서 반응성이 높은 유전자를 선택하거나, 본 유전자에 대해서는 gene set로 real-time PCR을 통한 진단 기법에 적용 가능할 것으로 예상된다 (Figure 29).

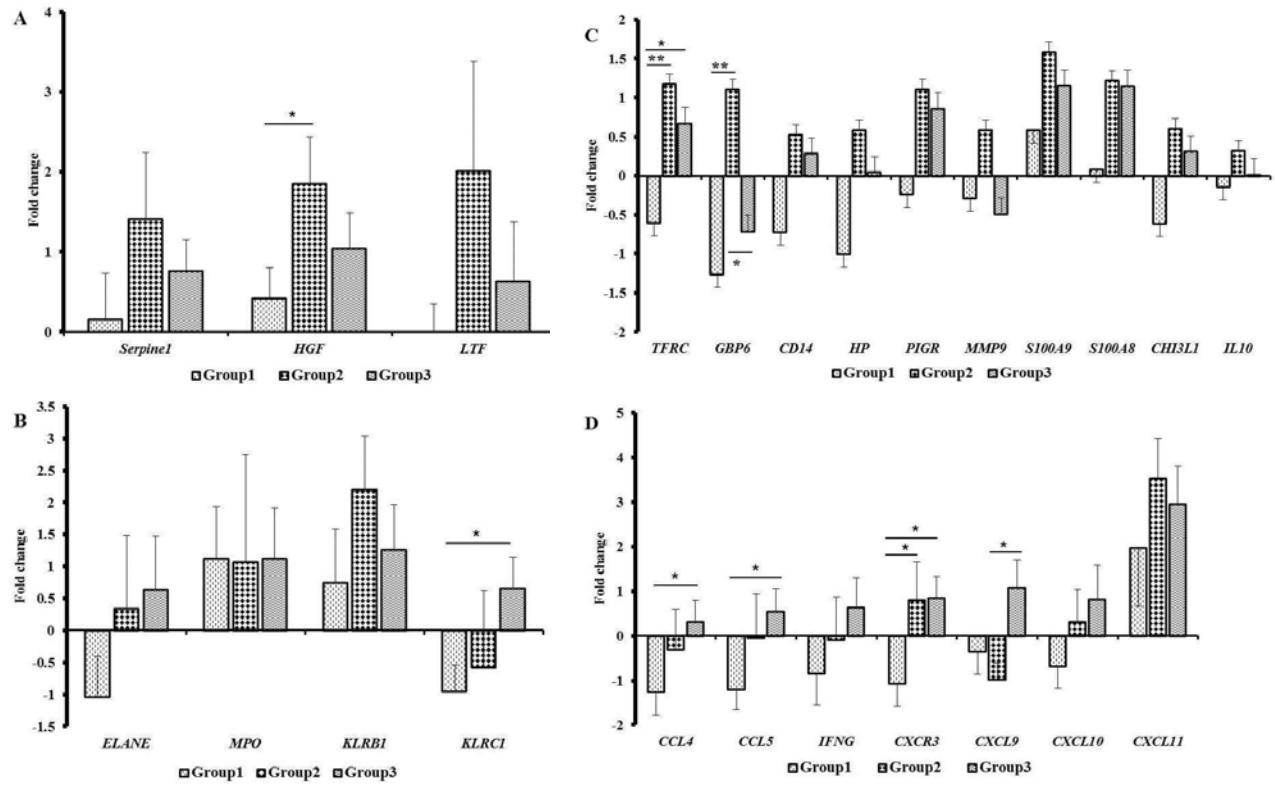


Figure 29. 감염단계 그룹별 biomarker 후보물질들의 발현 양상 (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01)

### (3) *M. paratuberculosis* 감염에 대한 사람세포에서의 biomarker 유효성 평가

마우스 *M. paratuberculosis* 감염 모델에서 20개 유전자 (*IFNG*, *CCL4*, *CCL5*, *CXCL9*, *CXCL10*, *HP*, *S100A8*, *S100A9*, *MPO*, *ELANE*, *CD68*, *CHI3L1*, *HP*, *S100A8*, *S100A9*, *IGF1*, *TCF7L2*, *MPO*, *LTF*, *HMOX1*, *CD68*, *IGF1*, *LTF*, *TFRC*)에 대하여 사람 세포에서 *M. paratuberculosis* 감염 관련 biomarker를 선정하고자 하였다 (Table 24). 사람 macrophage cell line (THP-1)에 *M. paratuberculosis*를 자극한 후 6h, 24h, 48h 후 후보 물질에 대한 발현 양상을 분석한 결과 이들 gene에 대한 사람에서의 reference를 찾아 real-time RT PCR 용 primer 제작하였다 (Table 25). 이를 이용하여 real-time PCR 수행하고 control 그룹과 비교하여  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법을 이용하여 도출하였다. 후보 유전자들은 다음과 같은 기능 및 발현 양상에 따라 4개의 그룹으로 구분되었다 (A, activation of macrophage / phagosome maturation; B, Th1 type chemokines; C, the disease progression; D, no significant changes of expression).

Table 24. *M. paratuberculosis* 자극 human macrophage-like (THP-1) cells에서의 biomarker candidates 발현 분석

Group <sup>2</sup>	Gene Symbol	Gene Name	Location	Family	Mouse spleen <sup>1</sup>	
					3 weeks p.i.	6 weeks p.i.
A	<i>TFRC</i>	transferrin receptor (p90, CD71)	Plasma membrane	transporter	11.13	9.12
	<i>CD14</i>	CD14 molecule	Plasma Membrane	transporter	5.04	2.05
	<i>CD68</i>	CD68 molecule	Plasma Membrane	other	2.3	2.61
	<i>S100A8</i>	S100 calcium binding protein A8	Cytoplasm	other	64.76	5
B	<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein A9	Cytoplasm	other	46.77	4.65
	<i>CCL4</i>	chemokine (C-C motif) ligand 4	Extracellular Space	cytokine	2.03	2.6
	<i>CCL5</i>	chemokine (C-C motif) ligand 5	Extracellular Space	cytokine	2.84	3.02
	<i>CXCL9</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	Extracellular Space	cytokine	4.65	8.4
C	<i>CXCL10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Extracellular Space	cytokine	4.94	4.58
	<i>IFNG</i>	interferon, gamma	Extracellular Space	cytokine	2.62	3.22
	<i>CHI3L1</i>	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein- 39)	Extracellular Space	enzyme	12	7.36
	<i>HP</i>	haptoglobin	Extracellular Space	peptidase	23.85	11.88
D	<i>MPO</i>	myeloperoxidase	Cytoplasm	enzyme	39.33	7.85
	<i>ELANE</i>	elastase, neutrophil expressed	Extracellular Space	peptidase	12.99	5.61
	<i>GPNMB</i>	glycoprotein (transmembrane )nmb	Plasma Membrane	enzyme	5.49	14.22
	<i>HMOX1</i>	heme oxygenase (decycling 1)	Cytoplasm	enzyme	6.9	2.85
D	<i>IGF1</i>	insulin-like growth factor1 (somatomedin C)	Extracellular Space	growth Factor	2.47	2.35
	<i>LTF</i>	lactotransferrin	Extracellular Space	peptidase	64.27	7.68
	<i>NQO1</i>	NAD(P)H dehydrogenase, quinone1	Cytoplasm	enzyme transcripti	2.14	2.21
	<i>TCF7L2</i>	transcription factor 7-like 2 (T cell specific, HMG-box)	Nucleus	on regulator	3.29	2.12

<sup>1</sup> These are gene expression data from microarray after infection of mice with MAP.

<sup>2</sup>The selected genes were divided into four groups, which were related to activation of macrophage/phagosome maturation, A; Th1 type chemokines, B; the disease progression, C; and no significant changes of expression, D.

Table 25. qRT-PCR을 위한 primer 목록

Accession No.*	Gene Symbol		Sequence (5'→3')
NM_002984.2	<i>CCL4</i>	Forward	GCTGTGGTATTCAAACCAAAAGA
		Reverse	AGGAAC TGCGGAGAGGAGTC
NM_002985.2	<i>CCL5</i>	Forward	CTGCTTGCCCTACATTGCC
		Reverse	TCGGGTGACAAAGACGACTG
NM_001174104.1	<i>CD14</i>	Forward	GGGACTTGGATTGGTGGCA
		Reverse	GCCCCCTTCCTTCCTTATATCC
NM_001251.2	<i>CD68</i>	Forward	GCTACTGGCAGCCCAGG
		Reverse	CGTGAAGGATGGCAGCAAAG
NM_001276.2	<i>CHI3L1</i>	Forward	TCCAGTGCTGCTCTGCATAC
		Reverse	CCAGGGTGTGATGTGATCGT
NM_002416.1	<i>CXCL9</i>	Forward	AGTGCAAGGAACCCCAGTAG
		Reverse	AGGGCTTGGGCAAATTGTT
NM_001565.3	<i>CXCL10</i>	Forward	ATATGGCACACTAGCCCCAC
		Reverse	GGTACTCCTTGAATGCCACT
NM_001972.2	<i>ELANE</i>	Forward	CGTGGCGAATGTAAACGTCC
		Reverse	TTTTCGAAGATGCGCTGCAC
NM_002510.2	<i>GPNMB</i>	Forward	CTACAAGTGGAGCTCGGGG
		Reverse	TGTCACCAGCAGGTCTAAAG
NM_002133.2	<i>HMOX1</i>	Forward	TTCAAGCAGCTCTACCGCTC
		Reverse	GGGGCAGAATCTTGCACTT
NM_005143.3	<i>HP</i>	Forward	GCTTTTGCA GTGGACTCAGG
		Reverse	AGCCGT CATCTGCTTCACAT
NM_001111285.1	<i>IGF1</i>	Forward	AGAGCCTGCGCAATGGAATA
		Reverse	TGGTGTGCATCTCACCTCA
NM_000619.2	<i>IFNG</i>	Forward	GGCTTTCAGCTCTGCATCG
		Reverse	TCTGTC ACTCTCCTCTTCCA
NM_002343.3	<i>LTF</i>	Forward	GTTGCTCCACCAACAGGCTA
		Reverse	CTGGGCCATCTTCTCGGTT
NM_000250.1	<i>MPO</i>	Forward	GTCTCACTGCAGAGATGAAGCTG
		Reverse	GCTTGATGCTTCCCGCCG
NM_000903.2	<i>NQO1</i>	Forward	GACCCTTCCGGAGTAAGAAGG
		Reverse	ATTTGAATTGGCGTCTGC
NM_002964.4	<i>S100A8</i>	Forward	GAAGACCTGGTGGGGCAAGT
		Reverse	AGGACACTCGGTCTCTAGCAA
NM_002965.3	<i>S100A9</i>	Forward	TCCTCGGCTTGACAGAGTG
		Reverse	TGCCCCAGCTTCACAGAGTA
NM_001198525	<i>TCF7L2</i>	Forward	GGAAGGAGCGACAGCTTCAT
		Reverse	AGCGCTCAGGTCTGTAATCG
NM_003234.2	<i>TFRC</i>	Forward	TGCTGTCCAGCAGCCATAGG
		Reverse	CCACCAAACAAGTTAGAGAATGCTG
<i>beta-actin**</i>		Forward	GATCATTGCTCCTCCTGAGC
		Reverse	ACTCCTGCTTGATCCAC

\* Primer sequences were obtained from Ding *et al.* (2012) for beta-actin as a reference gene.

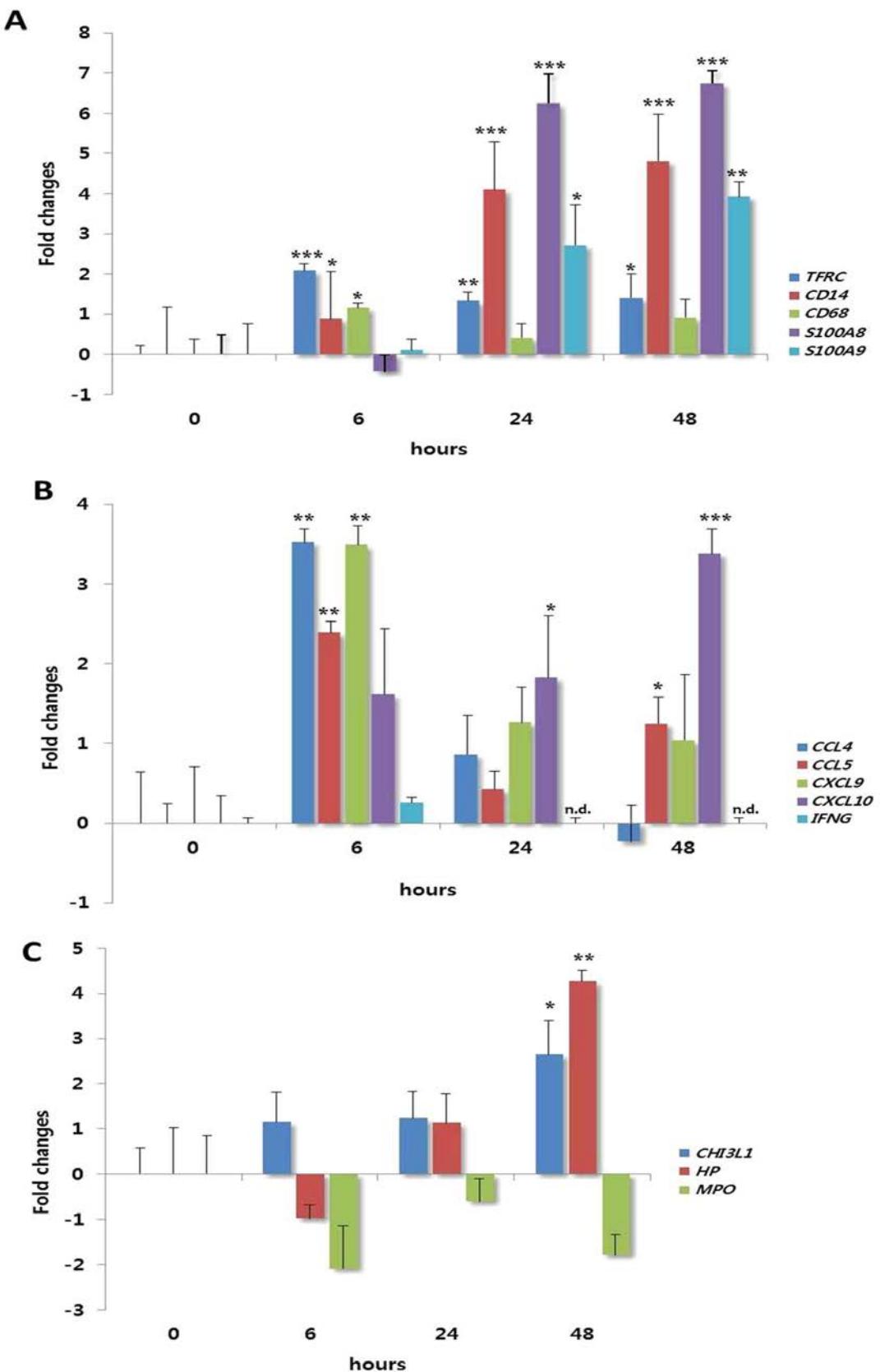


Figure 30. *M. paratuberculosis* 자극 human macrophage-like (THP-1) cells에서의 biomarker candidates 발현 양상

## 나. 야외 요네병 감염우에서의 biomarker 후보물질의 가치 평가

### (1) Biomarker 의 최종 선정을 위한 유효성 평가

#### (가) Biomarker 의 최종 선정을 위한 유효성 평가를 위한 실험군 선정

성축 26두의 소를 대상으로 분변을 채취하여 분변 내의 *M. paratuberculosis*의 존재 유무를 PCR 방법을 통해 확인하였다. 250mg의 분변 샘플을 채취하여 DNA extraction 후 IS900 real-time PCR 및 ISMAP02 nested PCR 수행하여 분변으로부터의 *M. paratuberculosis*의 shedding 여부를 판정하였다. 총 26두를 대상으로 혈액을 채취하여 ELISA 검사를 통해 혈중 항체 양성 개체 검색을 실시하였다. 위의 분변 PCR 및 ELISA 결과에 따라 총 26두의 실험대상을 선정하였고 실험대상을 fecal shedding 여부 및 혈중 항체가 양성 여부에 따라 분류하였다 (Table 26).

#### (나) ELISA 수준별 biomarker 발현 양상 분석

ELISA 결과의 경우, ELISA S/P ratio 수준별 분류를 실시하였다 (ELneg, sp ratio <45; + (EL45),  $45 \leq$  sp ratio <100; ++ (EL100),  $100 \leq$  sp ratio <200; +++ (EL200), sp ratio  $\geq$  200) Control 그룹과 비교하여 MAP 영향을 받은 개체들 간의 ELISA 수준에 따른 biomarker 유전자 발현의 양상을 분석한 결과 임상증상 발현이 된 EL200 그룹은 개체간의 값의 편차가 다소 높았으며, 반대로 ELneg 그룹은 개체간의 편차가 적은 편이었다 (Figure 31). ELISA S/P ratio 값이 가장 낮은 ELneg 그룹에서 가장 높은 발현을 보인 유전자 (*KLRB1*, *CXCR3*, *MMP9*, *SERPINE1*, *IL10*, *HP*, *HGF*, *CD14*, *CHI3L1*, *LTF*, *ELANE*, *S100A8*, *S100A9*, *TFRC*, *GBP6*) 가 다수 보였으며, 이중에서 ELneg 그룹에서 2.0 배 이상으로 증가하는 유전자들 (*KLRB1*, *SERPINE1*, *HGF*, *LTF*, *S100A9*)을 최종 후보로 선정하였다.

#### (다) Fecal shedding 에 따른 biomarker 발현 양상 분석

분변 PCR 결과를 토대로 fecal shedding positive 와 fecal shedding negative 로 구분하여 분석하였다. Control 그룹과 비교하여 MAP 영향을 받은 개체들 간의 fecal shedding 유무에 따른 biomarker 유전자 발현의 양상을 분석한 결과 control 개체에 비교해 보았을 때, fecal shedding 양성 그룹에서는 발현이 감소되고, 음성 그룹에서는 발현이 증가되는 유전자들이 발견되었다 (*CCL4*, *CCL5*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCR3*, *IFN-γ*, *ELANE*, *TFRC*, *KLRC1*, *PIGR*, *CD14*). 반대로 fecal shedding 양성 그룹에서는 발현이 증가하고 상대적으로 음성 그룹에서는 감소하는 유전자 역시 발견됨 (*KLRB1*, *LTF*, *MPO*, *HGF*, *MMP9*, *SERPINE1*, *CHI3L1*, *IL-10*, *S100A8*, *S100A9*, *GBP6*, *HP*) (Figure 32). Fecal shedding 유무에 따라 발현 양상이 달라진 것을 확인하였다. 이 중 유의적인 변화를 보인 *KLRB1*과 *LTF* 가 진단적인 효능이 큰 것으로 생각되며, ELISA 수준에 따른 분석결과와 종합하여 진단기법에 적용해야 할 것으로 생각된다.

#### (라) 발현 양상 분석을 통한 진단용 biomarker 최종 선정

본 연구 과제 3년차에 수행한 요네병 자연 감염 소 그룹에서의 biomarker의 유효성 평가 실험에서 7종의 유전자 (*KLRB1*, *HGF*, *SERPINE1*, *LTF*, *S100A9*, *TIMP-1*, *FGF2*) 를 최종 선정하였다. 또한 기 발표된 논문을 통해 준 임상형 단계의 요네병 자연 감염소에서 유전자 발현의 증가가 확인된 유전자도 추가하여 선정하였다 (*TIMP-1*, *FGF2*).

준 임상형 그룹에서 발현이 증가하는 유전자 (*KLRB1*, *CXCR3*, *MMP9*, *SERPINE1*, *IL10*, *HP*, *HGF*, *PIGR*, *MPO*, *CD14*, *CHI3L1*, *LTF*, *ELANE*, *S100A8*, *S100A9*, *TFRC*, *GBP6*) 가 다수 확인되었으며, 이중에서 준 임상형 그룹의 60% 이상이 발현이 증가하면서 mean fold change 2.0 이상인 유전자(*KLRB1*, *HGF*, *SERPINE1*, *LTF*, *S100A9*)를 현장 적용에 사용할 유전자로 최종 선정하고 (Table 27), 각 유전자들의 발현 정도가 2.0 이상인 것을 양성으로 판정하는 것으로 기준을 설정하였다.

위의 선발한 유전자들을 바탕으로 소 (*Bos taurus*)에서의 유전자를 검색하고 이에 대한 Real-time RT-PCR 용 primer 제작 및 PCR 조건을 확립하였다 (Table 28).

#### (마) 최적의 진단을 위한 biomarker 유전자 조합 선별

준 임상형 그룹을 대상으로 하여 각 유전자들의 발현 정도가 2.0 이상을 양성 판정 기준으로 가정한 후, 가장 높은 판정률을 나타내는 유전자 조합을 선별한 결과 *KLRB1* 유전자가 단독으로 가장 높은 양성개체 판정률을 보였으며 83.3% (5/6) *KLRB1* 유전자와 나머지 *SERPINE1*, *HGF*, *LTF*, *S100A9* 유전자를 조합하여 판정하였을 때 100% (6/6)의 판정률을 보였다 (Table 29). 이 결과는 제한된 그룹 내에서의 판정 결과이기 때문에 차후에 양성개체를 진단하기 위한 현장 적용 시에 오차가 다소 있을 수 있다고 판단된다. 결론적으로 한 가지 유전자만 사용했을 때 보다 여러 유전자의 결과를 조합하여 진단 기법의 정확성을 높일 수 있을 것이다.

Table 26. 개발 진단법의 효능평가를 위한 개체 선정 및 실험군 설정

Group	개체번호	Fecal PCR*			ELISA	
		IS900	ISMAP02	Result	S/P ratio	Group**
Group 1	61XX	+	+	+	267.3	EL200
	70XX	+	+	+	265.1	EL200
	110XX	+	+	+	251.1	EL200
	100XX	-	+	+	117.3	EL100
	80XX	+	+	+	168.1	EL100
	81XX	+	+	+	33.2	EL45
	110XX	-	+	+	61.9	EL45
Group 2	120XX	+	+	-	2.7	ELneg
	100XX	-	+	-	5.8	ELneg
	101XX	-	+	-	4.7	ELneg
	110XX	-	+	-	4.1	ELneg
	80XX	-	+	-	3.6	ELneg
	91XX	-	+	-	7.5	ELneg
Group 3	110XX	-	-	+	24.3	EL45
	80XX	-	-	+	105.1	EL100
	90XX	-	-	+	141.7	EL100
	81XX	-	-	+	39.1	EL45
	90XX	-	-	+	35.4	EL45
	70XX	-	-	+	189.3	EL100
	70XX	-	-	+	66.3	EL45
	81XX	-	-	+	48.2	EL45
	80XX	-	-	+	139.9	EL100
Group 4	110XX	-	-	-1	4.6	Control
	70XX	-	-	-	2.0	Control
	91XX	-	-	-	8.1	Control
	80XX	-	-	-	6.8	Control
	120XX	-	-	-	0.4	Control

\*, 분변 결과의 경우, IS900 PCR 및 ISMAP02 nested PCR에 대한 각각 양성 및 둘 다 양성 개체를 양성으로 판단

\*\*, ELISA 결과의 경우, 결과 양성 유무 및 ELISA SP ratio 수준별 구분설시

- (negative), sp ratio <45; + (EL45), 45≤ sp ratio <100; ++ (EL100), 100≤ sp ratio <200; +++ (EL200), sp ratio ≥200

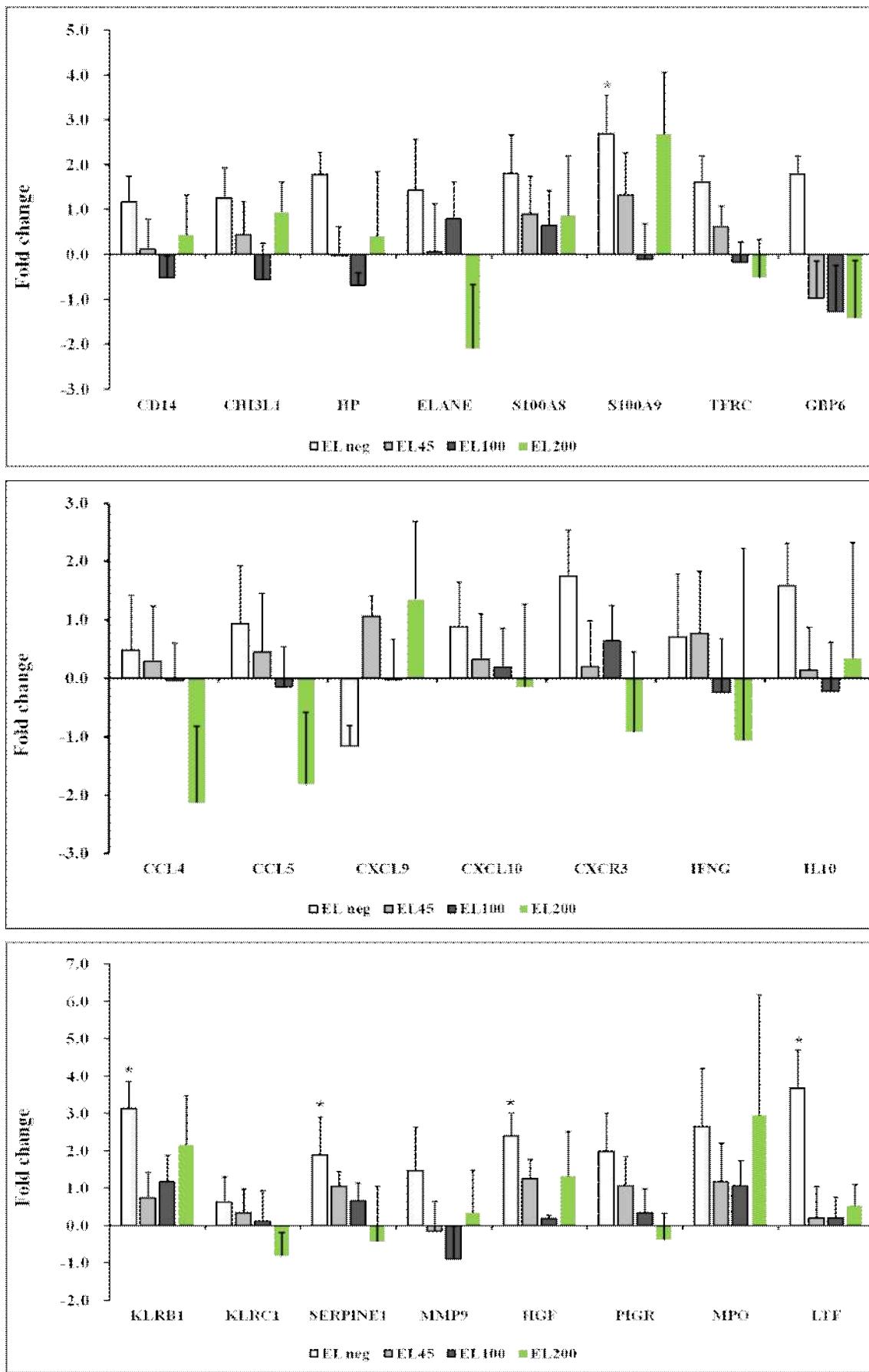


Figure 31. ELISA 수준에 따른 그룹별 biomarker 후보물질들의 발현 양상 (\*, p<0.05;)

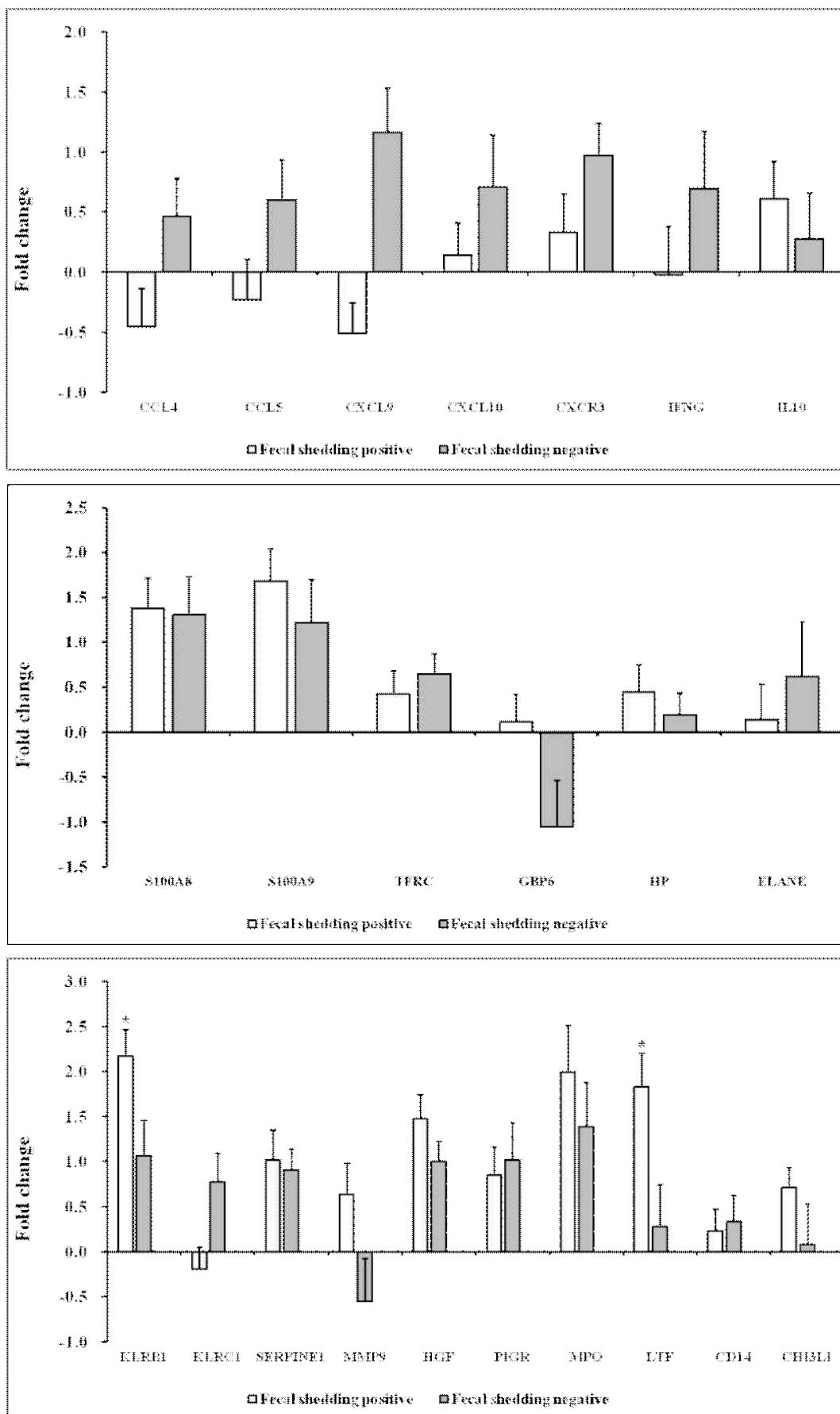


Figure 32. Fecal shedding에 따른 그룹별 biomarker 후보물질들의 발현 양상 (\*, p<0.05);

Table 27. 최종 선정된 biomarker 후보 물질 목록

References ( <i>Bos taurus</i> )*	Gene symbol	Gene Name
NM_001206636	<i>KLRB1</i>	Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1
NM_174137	<i>SERPINE1</i>	Serpin peptidase inhibitor
NM_001031751	<i>HGF</i>	Hepatocyte growth factor
NM_002965.3	<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein A9
NM_002343.3	<i>LTF</i>	Lactotransferrin
NM_174471.3	<i>TIMP-1</i>	Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1
NM_174056.4	<i>FGF2</i>	Fibroblast growth factor 2

\*, 최종 선정된 gene은 *bos taurus*에서의 references를 찾아 선정함.

Table 28. 선발한 biomarker 후보 물질 검출을 위한 primer 목록

Gene symbol	Sequence (5'-3')	size (bps)
<i>KLRB1</i>	AACCAGCATGGATGCTCAAGA	90
	TCTCGGATTCGTTCCAGTGC	
<i>SERPINE1</i>	CTGCGAAATTCAAGGATGCGG	191
	GGGTGAGAAAACCACCGTTGC	
<i>HGF</i>	CGACGGGCTCTTTAGGCTC	186
	CTGTCCTCTGCATAGGGGATG	
<i>S100A9</i>	AGGCTACGGGAAGGGCAG	134
	GCTGGCCTCCTGATTAGTGG	
<i>LTF</i>	GGAAGCAGATGCCCTGAACT	141
	AGGTACCCTCCGTTGGTCT	
<i>TIMP-1</i>	TCTGCAACTCCGATGTCGTC	125
	CCTCAAGGCACACTAACCTT	
<i>FGF2</i>	AGCGACCCACACATCAAAC	79
	AACGGTTGCACACACTCCT	

\* PCR 조건은 denaturation: 95°C, 20 sec; annealing: 60°C, 45 sec; 40 cycles로 사용하였음.

Table 29. 각 biomarker 유전자 조합에 대한 양성개체 판정률

	<i>KLRB1</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>HGF</i>	<i>LTF</i>	<i>S100A9</i>
<i>KLRB1</i>	83.3% (5/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
<i>SERPINE1</i>	100% (6/6)	50% (3/6)	50% (3/6)	66.7% (4/6)	50% (3/6)
<i>HGF</i>	100% (6/6)	50% (3/6)	50% (3/6)	50% (3/6)	50% (3/6)
<i>LTF</i>	100% (6/6)	66.7% (4/6)	50% (3/6)	66.7% (4/6)	66.7% (4/6)
<i>S100A9</i>	100% (6/6)	50% (3/6)	50% (3/6)	66.7% (4/6)	50% (3/6)

## (2) 국내 소 요네병 발생농장에서 현장 적용

### (가) 현장 적용을 위한 실험대상 탐색

기준 진단법으로 요네병 양성의 한우 성축 15두와 그 성축으로부터 태어난 송아지 8두, 총 23두 (Group A) 및 준임상형 단계의 젖소 성축 6두 (Group B)를 대상으로 분변을 채취하여 조직 및 분변 속에 *M. paratuberculosis*의 존재 유무를 PCR 방법을 통해 확인하였다. 250mg의 분변 샘플로부터 DNA extraction 후 IS900 real-time PCR 및 ISMAP02 nested PCR 수행하여 분변으로부터의 *M. paratuberculosis*의 shedding 여부를 판정하였다. 총 29두를 대상으로 혈액을 채취하여 ELISA 검사를 통해 혈중 항체 양성 개체 검색을 실시하였다. 위의 분변 PCR 및 ELISA 결과에 따라 총 29마리의 실험대상을 선정하였다. 실험대상을 연령, Fecal shedding 여부 및 조직 내의 요네균 유무와 혈중 항체가 양성 여부에 따라 분류하였다 (Table 30).

### (나) Biomarker 를 응용한 진단법의 현장 적용

선발된 실험대상의 전혈을 Heparin tube를 이용하여 채취한 후 채취한 혈액은 Favorgen blood RNA kit (Favorgen)를 이용하여 매뉴얼대로 실행하여 RNA 분리하였다. 분리된 RNA는 Quantitect reverse transcription kit (Qiagen)를 이용하여 cDNA를 합성하였고 Real-time RT-PCR 은 1 µl cDNA를 SYBR Green PCR kit (Qiagen) 와 Rotor-Gene Q real time PCR cycler (Qiagen) 를 이용하여 실시하였다. PCR 조건은 denaturation: 95°C, 20 sec; annealing: 60°C, 45 sec; 40 cycles의 조건으로 실시하였으며  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법을 이용하여 control group과 비교한 감염군의 fold-change를 도출하였다.

#### ① Group A (한우 농장)

실험 결과 *KLRB1*, *TIMP-1*, *FGF2* 세 가지 유전자가 요네병 양성을 나타낸 성축과 성축에서 태어난 자축 두 집단에서 모두 평균적으로 2.0 이상의 유전자 발현을 보였다 (Table 31). *KLRB1* 의 경우 성축의 100% (15/15), 자축의 87.5% (7/8)에서 2.0 이상의 발현을 보였다. *TIMP-1* 은 성축의 86.7% (13/15), 자축의 100% (15/15)에서 2.0 이상의 발현을 보였다. *FGF2*는 성축의 73.3% (11/15), 자축의 87.5% (7/8)에서 2.0 이상의 발현을 보였다. 나머지 4종류의 유전자 중 *HGF*는 모축의 13.3% (2/15), 자축의 12.5% (1/8)에서만 2.0 이상의 발현을 보였다. *SERPINE1* 은 모축에서는 모두 down-regulation 되었으며, 자축의 25% (2/8) 에서만 2.0 이상의 발현을 보였다. *S100A9*는 모축의 13.3%, 자축의 13.3% (2/15) 에서만 2.0 이상의 발현을 보였다. *LTF* 는 모축의 73.3% (11/15)가 2.0 이상의 발현을 보였지만 자축에서는 모두 down-regulation 되었다.

본 실험에서 사용된 모든 요네병 양성축 및 양성축에서 태어난 자축은 위의 세 유전자 중 최소한 하나 이상이 2.0배 이상의 발현을 보이는 것으로 확인되었다.

## ② Group B (젖소 농장)

실험 결과 *KLRB1*, *LTF*, *HGF*, *S100A9*, *FGF2* 다섯 가지 유전자가 요네병 양성축에서 평균적으로 2.0 이상의 유전자 발현을 보였다 (Table 31). *KLRB1*과 *FGF2*의 경우 양성축의 83.3% (5/6)에서 2.0 이상의 발현을 보였다. *LTF*는 양성축의 66.7% (4/6)에서 2.0 이상의 발현을 보였다. *HGF*와 *S100A9*는 양성축의 50% (3/6)에서 2.0 이상의 발현을 보였다. 나머지 2종류의 유전자 중 *SERPINE1*는 양성축의 50% (3/6)에서 2.0 이상의 발현을 보였으나, 개체간의 편차가 비교적 크게 나타났다. *TIMP-1*은 양성축의 83.3% (5/6)에서 up-regulation 되었으나 그중 1개체만이 2.0 이상의 발현을 보였다.

개체마다의 편차는 있었으나, 본 실험의 모든 요네병 양성축은 위의 다섯 유전자 중 최소한 하나 이상이 2.0배 이상의 발현을 보이는 것으로 확인되었다.

## ③ 진단법의 현장 적용 시 양성개체 판정률

Group A와 Group B의 결과를 종합하여 분석하였을 때, biomarker에 대한 양성개체 판정률은 *KLRB1*(89.6%), *TIMP1* (75.9%), *FGF2* (75.9%), *LTF* (51.7%), *S100A9* (34.5%), *SERPINE1* (17.2%)로 계산되었다 (Table 32). 단독으로 가장 높은 양성개체 판정률을 보인 것은 *KLRB1*(89.6%) 이었으며, 양성개체 판정률을 높이기 위해 조합을 한 결과 총 5가지의 유전자 조합 [조합1 (*KLRB1*, *TIMP1*, *S100A9*), 조합2 (*KLRB1*, *TIMP1*, *LTF*), 조합3(*KLRB1*, *TIMP1*, *HGF*), 조합4 (*KLRB1*, *TIMP1*, *SERPINE1*), 조합5 (*KLRB1*, *TIMP1*, *FGF2*)] 을 사용한 경우에 양성축을 100% 진단을 할 수 있었다.

Table 30. 진단법의 현장 적용을 위한 개체 선정 및 실험군 설정

Group	개체번호	Tissue PCR*		Fecal PCR*		ELISA	
		IS900	ISMAP02	IS900	ISMAP02	S/P ratio	Group**
<b>Group A</b>							
Calf	152XX	+	-	-	-	7.6	ELneg
	152XX	+	-	-	-	2.3	ELneg
	152XX	+	-	-	-	2.6	ELneg
	150XX	+	-	-	-	3.7	ELneg
	150XX	+	-	-	-	14.6	ELneg
	152XX	+	-	-	-	3.7	ELneg
	150XX	+	-	-	-	9.4	ELneg
	150XX	+	-	-	-	4.9	ELneg
	120XX	ND	ND	-	-	33.1	ELneg
Cattle	120XX	ND	ND	-	-	12.7	ELneg
	121XX	ND	ND	-	-	47.3	EL45
	120XX	ND	ND	-	-	50.5	EL45
	250XX	ND	ND	-	-	90.8	EL45
	290XX	ND	ND	-	-	58.3	EL45
	121XX	ND	ND	-	-	9.4	ELneg
	20100XX	ND	ND	-	+	53.2	EL45
	20100XX	ND	ND	-	-	32.5	ELneg
	110XX	ND	ND	-	-	44.3	ELneg
	130XX	ND	ND	-	-	48.7	EL45
	130XX	ND	ND	-	-	27.3	ELneg
	261XX	ND	ND	-	-	44.5	ELneg
	290XX	ND	ND	-	-	38.7	ELneg
<b>Group B</b>							
Cattle	120XX	ND	ND	+	+	2.7	ELneg
	100XX	ND	ND	-	+	5.8	ELneg
	101XX	ND	ND	-	+	4.7	ELneg
	110XX	ND	ND	-	+	4.1	ELneg
	80XX	ND	ND	-	+	3.6	ELneg
	91XX	ND	ND	-	+	7.5	ELneg

\*, 조직 및 분변 결과의 경우, IS900 PCR 및 ISMAP02 nested PCR에 대한 각각 양성 및 둘 다 양성개체를 양성으로 판단

\*\*, ELISA 결과의 경우, 결과 양성 유무 및 ELISA SP ratio 수준별 구분실시

- (negative), sp ratio <45; + (EL45), 45≤ sp ratio <100

Table 31. 선정된 Biomarker 의 실험군에서의 발현 정도

구분	<i>KLRB1</i>	<i>LTF</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>TIMP-1</i>	<i>FGF2</i>	<i>HGF</i>	<i>SI00A9</i>
Group A							
	1	3.81	31.78	0.08	3.16	4.38	0.04
	2	4.47	1.30	0.13	7.11	2.51	2.03
	3	3.29	14.62	0.09	4.96	21.71	0.37
	4	2.10	1.67	0.03	4.06	14.32	3.14
	5	2.99	1.22	0.04	3.18	11.63	0.80
	6	3.39	8.06	0.14	2.06	0.19	0.09
	7	5.74	23.59	0.05	2.50	3.43	0.12
Cow	8	6.06	11.55	0.03	0.42	0.11	0.12
	9	2.57	2.33	0.10	5.35	18.00	0.67
	10	4.53	5.46	0.05	3.03	1.52	0.02
	11	4.24	6.82	0.01	2.13	0.85	0.02
	12	1.74	0.58	0.06	3.07	0.40	0.95
	13	5.78	4.20	0.05	2.85	2.60	0.00
	14	2.33	3.41	0.04	1.88	7.26	0.04
	15	4.50	3.01	0.04	3.27	13.64	0.11
	1-1	6.45	0.54	0.22	8.69	6.02	0.15
	2-1	2.58	0.98	0.09	5.35	4.06	1.75
	3-1	5.50	0.58	0.17	6.28	12.91	0.35
Calf	4-1	1.62	1.04	0.32	4.38	0.33	1.05
	5-1	3.68	0.53	4.30	5.43	7.62	1.51
	6-1	2.85	1.13	0.25	3.36	4.41	9.37
	7-1	2.60	0.29	2.72	5.70	4.75	0.28
	8-1	3.39	0.40	0.80	6.63	6.19	0.16
Group B							
	1	2.99	1.07	1.90	2.30	4.32	1.62
	2	6.53	4.83	4.88	1.75	5.20	4.28
Cow	3	3.13	0.79	-0.74	0.89	3.41	0.83
	4	2.49	7.16	-1.30	1.41	2.84	0.95
	5	2.18	5.20	2.51	1.66	1.65	2.79
	6	1.47	2.97	4.02	1.51	3.65	3.93
							2.95

Table 32. 진단법의 현장 적용 시 각 biomarker 유전자 조합에 대한 양성개체 판정률

	<i>KLRB1</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>HGF</i>	<i>LTF</i>	<i>S100A9</i>	<i>TIMP1</i>	<i>FGF2</i>
<i>KLRB1</i>	89.6% (26/29)	93.1% (27/29)	93.1% (27/29)	93.1% (27/29)	96.6% (28/29)	96.6% (28/29)	93.1% (27/29)
<i>SERPINE1</i>	93.1% (27/29)	17.2% (5/29)	37.9% (11/29)	58.6% (17/29)	41.4% (12/29)	86.2% (25/29)	79.3% (23/29)
<i>HGF</i>	93.1% (27/29)	37.9% (11/29)	20.7% (6/29)	62.1% (18/29)	37.9% (11/29)	86.2% (25/29)	79.3% (23/29)
<i>LTF</i>	93.1% (27/29)	58.6% (17/29)	62.1% (18/29)	51.7% (15/29)	72.4% (21/29)	96.6% (28/29)	93.1% (27/29)
<i>S100A9</i>	96.6% (28/29)	41.4% (12/29)	37.9% (11/29)	72.4% (21/29)	34.5% (10/29)	86.2% (25/29)	82.8% (24/29)
<i>TIMP1</i>	96.6% (28/29)	86.2% (25/29)	86.2% (25/29)	96.6% (28/29)	86.2% (25/29)	75.9% (22/29)	93.1% (27/29)
<i>FGF2</i>	93.1% (27/29)	79.3% (23/29)	79.3% (23/29)	93.1% (27/29)	82.8% (24/29)	93.1% (27/29)	75.9% (22/29)

#### 4. 발굴 biomarker 등 이용 면역학적 진단기법 개발

##### 가. Real-time PCR 기법을 이용한 진단기법 개발

###### (1) 진단기법의 현장 적용을 위한 샘플 확보

###### (가) 개발 진단기법의 적용 및 효능 평가를 위한 양성·음성 혈청 수집

Biomarker 후보물질의 fecal shedding 수준 및 요네병 감염시기에 따른 상관성 분석을 위하여 지속적으로 국내 사육소에서 양성 및 음성 혈청 확보하였다. 국내 사육소의 혈청은 임상증상, *M. paratuberculosis* 균의 배출정도, 및 ELISA 결과 등 다양한 역학정보에 따라 구분하여 수집하였다. 혈청 수집은 가능한 전국적으로 고른 분포를 가질 수 있도록 하여 총 7개 지역에서 147개의 양성 혈청과 276개의 음성혈청을 수집하였으며, 혈청 수집개체에 대하여는 개체의 일반적인 역학사항도 같이 수집하여 자료를 확보하였다 (Table 33).

Table 33. 요네병 야외 혈청 보유목록

농장명	번호		연령	수집년월	PCR 결과	ELISA 결과	비고
	혈청번호	개체번호					
천안	1	60xx	06년		+	+	
	2	60xx	06년		+	+	
	3	61xx	06년	13. 10. 15.	+	+	
	4	80xx	08년	13. 10. 15.	+	+	
	5	90xx	09년	13. 10. 15.	-	+	
	6	90xx	09년	13. 10. 15.	-	+	
	7	70xx	07년	13. 10. 15.	-	-	
	8	80xx	08년	13. 10. 15.	-	-	
	9	100xx	10년	13. 10. 15.	+	-	
	10	120xx	12년	13. 10. 15.	+	-	
	11	61xx	06년	13. 12. 6.	+	+	
	12	80xx	08년	13. 12. 6.	+	+	
	13	90xx	09년	13. 12. 6.	-	+	
	14	90xx	09년	13. 12. 6.	-	+	
	15	50xx	05년	13. 12. 6.	-	-	
	16	70xx	07년	13. 12. 6.	-	-	
	17	100xx	10년	13. 12. 6.	+	-	
	18	120xx	12년	13. 12. 6.	+	-	
강원 춘천	19	춘천12(26xx)		13. 11. 19.	+	-	
	20	춘천18(89xx)		13. 11. 19.	+	-	
	21	춘천22(10xx)		13. 11. 19.	+	-	
경기 안성	22	2		13. 09.	+	-	
	23	12		13. 09.	-	-	
	24	32		13. 09.	-	-	
	25	35		13. 09.	-	+	
	26	48		13. 09.	-	-	
	27	116		13. 09.	-	-	
	28	124		13. 09.	-	-	
	29	125		13. 09.	-	-	
	30	대원HK122		99. 02. 26.		+	
99년 요네양 성혈청	31	대호HK119		99. 02. 26.		+	
	32	대군HK211		99. 02. 26.		+	
	33	대지HK115		99. 02. 26.		+	
	34	트랜스요네병 (+)		99. 01. 26.		+	
	35	120xx		14. 09. 02	-	+	
Biomarker 실험축	36	61xx		14. 09. 02	+	+	
	37	90xx		14. 09. 02	-	+	
	38	130xx		14. 09. 02	+	-	
	39	110xx		14. 09. 02	+	+	
	40	81xx		14. 09. 02	+	-	
	41	110xx		14. 09. 02	-	-	
	42	81xx		14. 09. 02	-	-	
	43	70xx		14. 09. 02	-	+	
	44	80xx		14. 09. 02	-	+	
	45	110xx		14. 09. 02	-	-	
	46	130xx		14. 09. 02	+	-	
	47	70xx		14. 09. 02	-	+	
	48	91xx		14. 09. 02	-	-	
	49	80xx		14. 09. 02	-	+	
	50	110xx		14. 09. 04	-	-	
	51	100xx		14. 09. 04	+/-	-	
	52	110xx		14. 09. 04	+/-	-	
	53	100xx		14. 09. 04	+	+	

	54	80xx		14. 09. 04	-	-	
	55	70xx		14. 09. 04	-	-	
	56	120xx		14. 09. 04	+	-	
	57	101xx		14. 09. 04	+/-	-	
	58	80xx		14. 09. 04	+	+	
	59	81xx		14. 09. 04	-	doubt	
	60	80xx		14. 09. 04	+/-	-	
	61	91xx		14. 09. 04	+/-	-	
	62	70xx		14. 09. 04	+/-	doubt	
	63	120xx		14. 09. 04	-	-	
	64	110xx		14. 09. 04	+/-	+	
	65	90xx		14. 09. 04	-	-	
전북	남원	66	B0xx	14. 09. 04	+	+	
양성축		67	B0xx	14. 09. 04	+	+	
		68	B0xx	14. 09. 04	+	+	
		69	C0xx	14. 09. 04	+	+	
강원	평창	70	20100xx	15. 07. 20	-	doubt	
도축		71	20100xx	15. 07. 20	-	-	
		72	110xx	15. 07. 20	-	-	
		73	120xx	15. 07. 20	-	-	
		74	120xx	15. 07. 20	-	-	
		75	120xx	15. 07. 20	-	doubt	
		76	121xx	15. 07. 20	-	doubt	
		77	121xx	15. 07. 20	-	-	
		78	121xx	15. 07. 20	-	-	
		79	130xx	15. 07. 20	-	doubt	
		80	130xx	15. 07. 20	-	-	
		81	250xx	15. 07. 20	-	+	
		82	261xx	15. 07. 20	-	-	
		83	290xx	15. 07. 20	-	-	
		84	290xx	15. 07. 20	-	+	
강원	평창	85	150xx	15. 07. 20	+	-	
송아지		86	150xx	15. 07. 20	+	-	
		87	150xx	15. 07. 20	+	-	
		88	150xx	15. 07. 20	+	-	
		89	152xx	15. 07. 20	+	-	
		90	152xx	15. 07. 20	+	-	
		91	152xx	15. 07. 20	+	-	
		92	152xx	15. 07. 20	+	-	
충남	천안	93	80xx	15. 06. 18	+	+	
		94	100xx	15. 05. 08	+	+	
충남	천안	95	61xx	14. 06. 16		+	
양성혈청		96	70xx	13. 12. 26		+	131204 분만
		97		13. 09. 27		+	
		98	70xx	13. 05. 23		+	
		99		14. 10. 20		+	
		100	70xx	14. 12. 10		+	
		101		15. 04. 23		+	
		102	70xx	13. 12. 20		+	
		103		14. 11. 06		+	
		104	70xx	14. 06. 16		+	
		105		15. 04. 23		-	음성
		106	80xx	14. 01. 14		+	
		107		14. 12. 10		+	
		108	80xx	14. 09. 17		+	
		109		14. 12. 12		+	
		110	80xx	14. 12. 10		+	
		111		15. 04. 23		+	

112	80xx		13. 12. 20		+	131014 임신
113			14. 03. 19		+	
114	81xx		14. 12. 11		+	
115	81xx		13. 10. 23		+	
116			14. 11. 06		+	
117	81xx		14. 06. 16		+	
118			14. 11. 06		+	
119	90xx		13. 12. 20		+	
120			14. 03. 19		+	
121	90xx		14. 06. 17		+	
122			15. 04. 23		+	
123	90xx		13. 12. 20		+	
124			15. 04. 23		+	
125	90xx		13. 12. 20		+	
126			14. 12. 10		+	
127	91xx		14. 08. 10		+	
128			14. 12. 10		+	
129	100xx		14. 10. 13		+	
130			15. 04. 23		+	
131	100xx		14. 10. 13		+	
132			15. 04. 23		+	
133	100xx		13. 05. 15		+	130309 임신
134			15. 04. 23		+	
135	100xx		13. 05. 15		+	
136	110xx		14. 12. 11		+	
137	110xx		14. 12. 10		+	
138	110xx		14. 12. 10		+	
139			15. 04. 23		+	
140	110xx		14. 06. 16		+	
141			15. 04. 23		+	
142	110xx		13. 11. 06		+	
143			14. 06. 17		+	
144	120xx		14. 06. 16		+	
145			14. 12. 12		+	
145					+	
충남 홍성 양성혈청	146	44xx	16. 11. 9		+	
	147	73xx	16. 11. 9		+	
충남 천안 음성혈청	1	61xx	13. 05. 23		-	
	2	61xx	13. 05. 23		-	
	3	70xx	13. 05. 23		-	
	4	81xx	13. 05. 24		-	
	5	70xx	14. 10. 23		-	
	6	80xx	14. 10. 23		-	
	7	110xx	14. 10. 23		-	
	8	60xx	14. 10. 23		-	
	9	61xx	14. 10. 23		-	
	10	71xx	14. 10. 23		-	
	11	120xx	14. 10. 23		-	
	12	J130xx	14. 10. 23		-	
	13	81xx	14. 10. 23		-	
	14	81xx	14. 10. 23		-	
	15	90xx	14. 10. 23		-	
	16	90xx	14. 10. 23		-	
	17	90xx	14. 10. 23		-	
	18	90xx	14. 10. 23		-	
	19	90xx	14. 10. 23		-	
	20	90xx	14. 10. 23		-	

21	91xx		14. 10. 23		-	
22	91xx		14. 10. 23		-	
23	91xx		14. 10. 23		-	
24	101xx		14. 10. 23		-	
25	101xx		14. 10. 23		-	
26	110xx		14. 10. 23		-	
27	110xx		14. 10. 23		-	
28	110xx		14. 10. 23		-	
29	110xx		14. 10. 23		-	
30	100xx		14. 10. 23		-	
31	100xx		14. 10. 23		-	
32	100xx		14. 10. 23		-	
33	100xx		14. 10. 23		-	
34	110xx		14. 10. 23		-	
35	50xx		14. 10. 23		-	
36	70xx		14. 10. 23		-	
37	70xx		14. 10. 23		-	
38	80xx		14. 10. 23		-	
39	80xx		14. 10. 23		-	
40	90xx		14. 10. 23		-	
41	90xx		14. 10. 23		-	
42	91xx		14. 10. 23		-	
43	100xx		14. 10. 23		-	
44	120xx		14. 10. 23		-	
45	130xx		14. 10. 23		-	
46	130xx		14. 10. 23		-	
47	130xx		14. 10. 23		-	
48	130xx		14. 10. 23		-	
49	130xx		14. 10. 23		-	
50	130xx		14. 10. 23		-	
51	130xx		14. 10. 23		-	
52	110xx		14. 10. 23		-	
53	110xx		14. 10. 23		-	
54	110xx		14. 10. 23		-	
55	120xx		14. 10. 23		-	
56	120xx		14. 10. 23		-	
57	120xx		14. 10. 23		-	
58	120xx		14. 10. 23		-	
59	120xx		14. 10. 23		-	
60	130xx		14. 10. 23		-	
61	130xx		14. 10. 23		-	
62	130xx		14. 10. 23		-	
63	130xx		14. 10. 23		-	
64	130xx		14. 10. 23		-	
충남 홍성 음성 협청	1	25xx	16. 11. 9		-	
	2	45xx	16. 11. 9		-	
	3	07xx	16. 11. 9		-	
	4	76xx	16. 11. 9		-	
	5	84xx	16. 11. 9		-	
	6	73xx	16. 11. 9		-	
	7	96xx	16. 11. 9		-	
	8	40xx	16. 11. 9		-	
	9	03xx	16. 11. 9		-	
	10	55xx	16. 11. 9		-	
	11	14xx	16. 11. 9		-	
	12	37xx	16. 11. 9		-	
	13	32xx	16. 11. 9		-	
	14	77xx	16. 11. 9		-	

15	14xx		16. 11. 9		-	
16	73xx		16. 11. 9		-	
17	70xx		16. 11. 9		-	
18	86xx		16. 11. 9		-	
19	10xx		16. 11. 9		-	
20	07xx		16. 11. 9		-	
21	92xx		16. 11. 9		-	
22	55xx		16. 11. 9		-	
23	56xx		16. 11. 9		-	
24	82xx		16. 11. 9		-	
25	42xx		16. 11. 9		-	
26	07xx		16. 11. 9		-	
27	81xx		16. 11. 9		-	
28	58xx		16. 11. 9		-	
29	00xx		16. 11. 9		-	
30	60xx		16. 11. 9		-	
31	32xx		16. 11. 9		-	
32	05xx		16. 11. 9		-	
33	71xx		16. 11. 9		-	
34	56xx		16. 11. 9		-	
35	52xx		16. 11. 9		-	
36	09xx		16. 11. 9		-	
37	58xx		16. 11. 9		-	
38	56xx		16. 11. 9		-	
39	49xx		16. 11. 9		-	
40	01xx		16. 11. 9		-	
41	29xx		16. 11. 9		-	
42	99xx		16. 11. 9		-	
43	52xx		16. 11. 9		-	
44	65xx		16. 11. 9		-	
45	93xx		16. 11. 9		-	
46	20xx		16. 11. 9		-	
47	26xx		16. 11. 9		-	
48	63xx		16. 11. 9		-	
49	12xx		16. 11. 9		-	
50	70xx		16. 11. 9		-	
51	61xx		16. 11. 9		-	
52	74xx		16. 11. 9		-	
53	01xx		16. 11. 9		-	
54	18xx		16. 11. 9		-	
55	22xx		16. 11. 9		-	
56	09xx		16. 11. 9		-	
57	01xx		16. 11. 9		-	
58	64xx		16. 11. 9		-	
59	34xx		16. 11. 9		-	
60	73xx		16. 11. 9		-	
61	17xx		16. 11. 9		-	
62	18xx		16. 11. 9		-	
63	41xx		16. 11. 9		-	
64	82xx		16. 11. 9		-	
65	38xx		16. 11. 9		-	
66	39xx		16. 11. 9		-	
67	47xx		16. 11. 9		-	
68	82xx		16. 11. 9		-	
69	08xx		16. 11. 9		-	
70	61xx		16. 11. 9		-	
71	77xx		16. 11. 9		-	
72	20xx		16. 11. 9		-	

73	44xx		16. 11. 9		-	
74	44xx		16. 11. 9		-	
75	17xx		16. 11. 9		-	
76	20xx		16. 11. 9		-	
77	40xx		16. 11. 9		-	
78	49xx		16. 11. 9		-	
79	93xx		16. 11. 9		-	
80	29xx		16. 11. 9		-	
81	27xx		16. 11. 9		-	
82	43xx		16. 11. 9		-	
83	06xx		16. 11. 9		-	
84	48xx		16. 11. 9		-	
85	87xx		16. 11. 9		-	
86	92xx		16. 11. 9		-	
87	99xx		16. 11. 9		-	
88	94xx		16. 11. 9		-	
89	14xx		16. 11. 9		-	
90	77xx		16. 11. 9		-	
91	74xx		16. 11. 9		-	
92	93xx		16. 11. 9		-	
93	54xx		16. 11. 9		-	
94	72xx		16. 11. 9		-	
95	20xx		16. 11. 9		-	
96	74xx		16. 11. 9		-	
97	74xx		16. 11. 9		-	
98	16xx		16. 11. 9		-	
99	23xx		16. 11. 9		-	
100	23xx		16. 11. 9		-	
101	23xx		16. 11. 9		-	
102	45xx		16. 11. 9		-	
103	46xx		16. 11. 9		-	
104	62xx		16. 11. 9		-	
105	14xx		16. 11. 9		-	
106	63xx		16. 11. 9		-	
107	69xx		16. 11. 9		-	
108	77xx		16. 11. 9		-	
109	95xx		16. 11. 9		-	
110	11xx		16. 11. 9		-	
111	11xx		16. 11. 9		-	
112	12xx		16. 11. 9		-	
113	93xx		16. 11. 9		-	
114	41xx		16. 11. 9		-	
115	46xx		16. 11. 9		-	
116	46xx		16. 11. 9		-	
117	92xx		16. 11. 9		-	
118	92xx		16. 11. 9		-	
119	47xx		16. 11. 9		-	
120	13xx		16. 11. 9		-	
121	40xx		16. 11. 9		-	
122	25xx		16. 11. 9		-	
123	50xx		16. 11. 9		-	
124	46xx		16. 11. 9		-	
125	94xx		16. 11. 9		-	
126	82xx		16. 11. 9		-	
127	6xx		16. 11. 9		-	
128	56xx		16. 11. 9		-	
129	52xx		16. 11. 9		-	
130	42xx		16. 11. 9		-	

131	86xx		16. 11. 9		-	
132	69xx		16. 11. 9		-	
133	61xx		16. 11. 9		-	
134	42xx		16. 11. 9		-	
135	84xx		16. 11. 9		-	
136	9xx		16. 11. 9		-	
137	98xx		16. 11. 9		-	
138	81xx		16. 11. 9		-	
139	18xx		16. 11. 9		-	
140	34xx		16. 11. 9		-	
141	47xx		16. 11. 9		-	
142	61xx		16. 11. 9		-	
143	11xx		16. 11. 9		-	
144	67xx		16. 11. 9		-	
145	29xx		16. 11. 9		-	
146	72xx		16. 11. 9		-	
147	60xx		16. 11. 9		-	
148	28xx		16. 11. 9		-	
149	94xx		16. 11. 9		-	
150	6xx		16. 11. 9		-	
151	86xx		16. 11. 9		-	
152	69xx		16. 11. 9		-	
153	30xx		16. 11. 9		-	
154	62xx		16. 11. 9		-	
155	53xx		16. 11. 9		-	
156	62xx		16. 11. 9		-	
157	88xx		16. 11. 9		-	
158	54xx		16. 11. 9		-	
159	32xx		16. 11. 9		-	
160	84xx		16. 11. 9		-	
161	96xx		16. 11. 9		-	
162	03xx		16. 11. 9		-	
163	95xx		16. 11. 9		-	
164	65xx		16. 11. 9		-	
165	54xx		16. 11. 9		-	
166	35xx		16. 11. 9		-	
167	97xx		16. 11. 9		-	
168	13xx		16. 11. 9		-	
169	68xx		16. 11. 9		-	
170	57xx		16. 11. 9		-	
171	30xx		16. 11. 9		-	
172	84xx		16. 11. 9		-	
173	94xx		16. 11. 9		-	
174	15xx		16. 11. 9		-	
175	95xx		16. 11. 9		-	
176	84xx		16. 11. 9		-	
177	27xx		16. 11. 9		-	
178	89xx		16. 11. 9		-	
179	10xx		16. 11. 9		-	
180	00xx		16. 11. 9		-	
181	59xx		16. 11. 9		-	
182	74xx		16. 11. 9		-	
183	89xx		16. 11. 9		-	
184	09xx		16. 11. 9		-	
185	90xx		16. 11. 9		-	
186	53xx		16. 11. 9		-	
187	85xx		16. 11. 9		-	
188	86xx		16. 11. 9		-	

189	5xx		16. 11. 9		-	
190	5xx		16. 11. 9		-	
191	5xx		16. 11. 9		-	
192	36xx		16. 11. 9		-	
193	5xx		16. 11. 9		-	
194	39xx		16. 11. 9		-	
195	55xx		16. 11. 9		-	
196	65xx		16. 11. 9		-	
197	68xx		16. 11. 9		-	
198	6xx		16. 11. 9		-	
199	22xx		16. 11. 9		-	
200	6xx		16. 11. 9		-	
201	44xx		16. 11. 9		-	
202	95xx		16. 11. 9		-	
203	7xx		16. 11. 9		-	
204	24xx		16. 11. 9		-	
205	8xx		16. 11. 9		-	
206	89xx		16. 11. 9		-	
207	42xx		16. 11. 9		-	
208	48xx		16. 11. 9		-	
209	98xx		16. 11. 9		-	
210	98xx		16. 11. 9		-	
211	98xx		16. 11. 9		-	
212	30xx		16. 11. 9		-	

## (2) Biomarker 이용한 진단기법의 야외 적용

Biomarker 기반의 real-time PCR 진단법 적용을 위하여 성축 44두의 소를 대상으로 분변을 채취하여 분변 내의 *M. paratuberculosis*의 존재 유무를 PCR 방법을 통해 확인하였다. 250mg의 분변 샘플을 채취하여 DNA extraction 후 IS900 real-time PCR 및 ISMAP02 real-time PCR을 수행하여 분변으로부터의 *M. paratuberculosis*의 shedding 여부를 판정하였다. 혈중 항체 양성 개체 검색을 위해 총 44두를 대상으로 혈액을 채취하여 ELISA 검사를 실시하였다. 위의 분변 PCR 및 ELISA 결과에 따라 총 44두의 실험대상을 fecal shedding 여부 및 혈중 항체가 양성 여부에 따라 분류하였다 (Table 34).

위의 44두 개체의 전혈을 채취하여 RNA 추출 및 cDNA 합성 후 real-time RT-PCR 진단기법을 이용하여 검사한 결과 biomarker 유전자 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인하여 양성 개체를 진단하였고 (Figure 33), 이를 바탕으로 ROC curve 분석을 통해 높은 진단적 가치를 보이는 유전자를 선정하였다 (Figure 34). 양성 개체 전체의 진단에는 7개의 유전자 (HP, TIMP1, TFRC, SERPINE1, DEFB10, S100A8, MMP9)가 높은 진단적 가치( $AUC \geq 0.8$ )를 보였고 ELISA(-)/PCR(+)인 개체의 진단에는 8개의 유전자 (TIMP1, DEFB1, TFRC, DEFB10, S100A8, SERPINE1, MMP9, HP)가 높은 진단적 가치( $AUC \geq 0.8$ )를 보였다. 또한 ELISA(+)/PCR(-)인 개체의 진단에는 4개의 유전자(HP, TIMP1, TFRC, SERPINE1)가 높은 진단적 가치( $AUC \geq 0.8$ )를 보였으며, ELISA(+)/PCR(+)인 개체의 진단에는 6개의 유전자 (S100A8, HP, SERPINE1, TFRC, MMP9, DEFB10)가 높은 진단적 가치( $AUC \geq 0.8$ )를 보였다 (Figure 34).

ROC curve 분석을 통해 각 biomarker 의 진단적 가치를 평가한 결과 양성개체를 판정하기 위한 cut-off value는 Group 1의 경우 HP 1.82 이상, TIMP1 0.96 이상, SERPINE1 1.07 이상, TFRC 1.09 이상, DEFB1 1.43 이상, DEFB10 1.15 이상, MMP9 0.78 이상, S100A8은 0.92 이상으로 확인되었다. Group 2의 경우는 HP 1.93 이상, TIMP1 0.54 이상, SERPINE1 1.18 이상, TFRC 0.65 이상, DEFB10 0.68 이상, DEFB1 0.28 이상, MMP9 0.28 이상으로 확인되었다. Group 3의 경우는 HP 2.3 이상, SERPINE1 0.83 이상, TFRC 1.19 이상, MMP9 2.27 이상, S100A8 0.83 이상으로 확인되었다. 이러한 유전자 발현 분석을 통해 요네병 감염 개체 중 기존의 진단방법으로는 확인할 수 없었던 준임상형 개체들까지도 탐색할 수 있음을 확인하였다.

Table 34. 진단법의 현장 적용을 위한 개체 선정

Group	개체번호	Fecal PCR*			ELISA	
		IS900	ISMADP02	Result	S/P ratio	
Group 1	130XX	-	+	-	6.1	PCR+/EL-
	110XX	-	+	-	6.2	PCR+/EL-
	91XX	-	+	-	8.1	PCR+/EL-
	130XX	-	+	-	13.0	PCR+/EL-
	110XX	-	+	-	0.7	PCR+/EL-
	91XX	-	+	-	6.2	PCR+/EL-
	80XX	-	+	-	11.3	PCR+/EL-
	110XX	-	+	-	29.7	PCR+/EL-
	120XX	-	+	-	2.6	PCR+/EL-
	110XX	-	+	-	2.5	PCR+/EL-
	91XX	-	+	-	1.3	PCR+/EL-
	130XX	-	+	-	6.1	PCR+/EL-
	90XX	-	-	+	52.2	PCR-/EL+
Group 2	110XX	-	-	+	102.1	PCR-/EL+
	130XX	-	-	+	73.5	PCR-/EL+
	110XX	-	-	+	61.3	PCR-/EL+
	100XX	-	-	+	140	PCR-/EL+
	100XX	-	-	+	110.7	PCR-/EL+
	91XX	-	-	+	72.0	PCR-/EL+
	120XX	-	-	+	59.2	PCR-/EL+
	110XX	-	-	+	106.1	PCR-/EL+
	100XX	-	-	+	103.1	PCR-/EL+
	120XX	-	-	+	111.2	PCR-/EL+
	100XX	-	-	+	199.9	PCR-/EL+
	100XX	-	-	+	140.0	PCR-/EL+
	130XX	-	-	+	84.3	PCR-/EL+
Group 3	120XX	-	+	+	113.1	PCR+/EL+
	91XX	-	+	+	103.5	PCR+/EL+
	100XX	-	+	+	168.0	PCR+/EL+
	120XX	-	+	+	111.2	PCR+/EL+
	110XX	-	+	+	97.3	PCR+/EL+
	91XX	+	+	+	72.0	PCR+/EL+
	120XX	+	+	+	59.2	PCR+/EL+
Group 4	100XX	-	-	-	4.9	PCR-/EL-
	110XX	-	-	-	5.1	PCR-/EL-
	120XX	-	-	-	8.8	PCR-/EL-
	120XX	-	-	-	8.2	PCR-/EL-
	120XX	-	-	-	0.9	PCR-/EL-
	130XX	-	-	-	8.8	PCR-/EL-
	130XX	-	-	-	4.3	PCR-/EL-
	130XX	-	-	-	8.0	PCR-/EL-
	130XX	-	-	-	6.5	PCR-/EL-
	130XX	-	-	-	6.3	PCR-/EL-
	130XX	-	-	-	23.5	PCR-/EL-

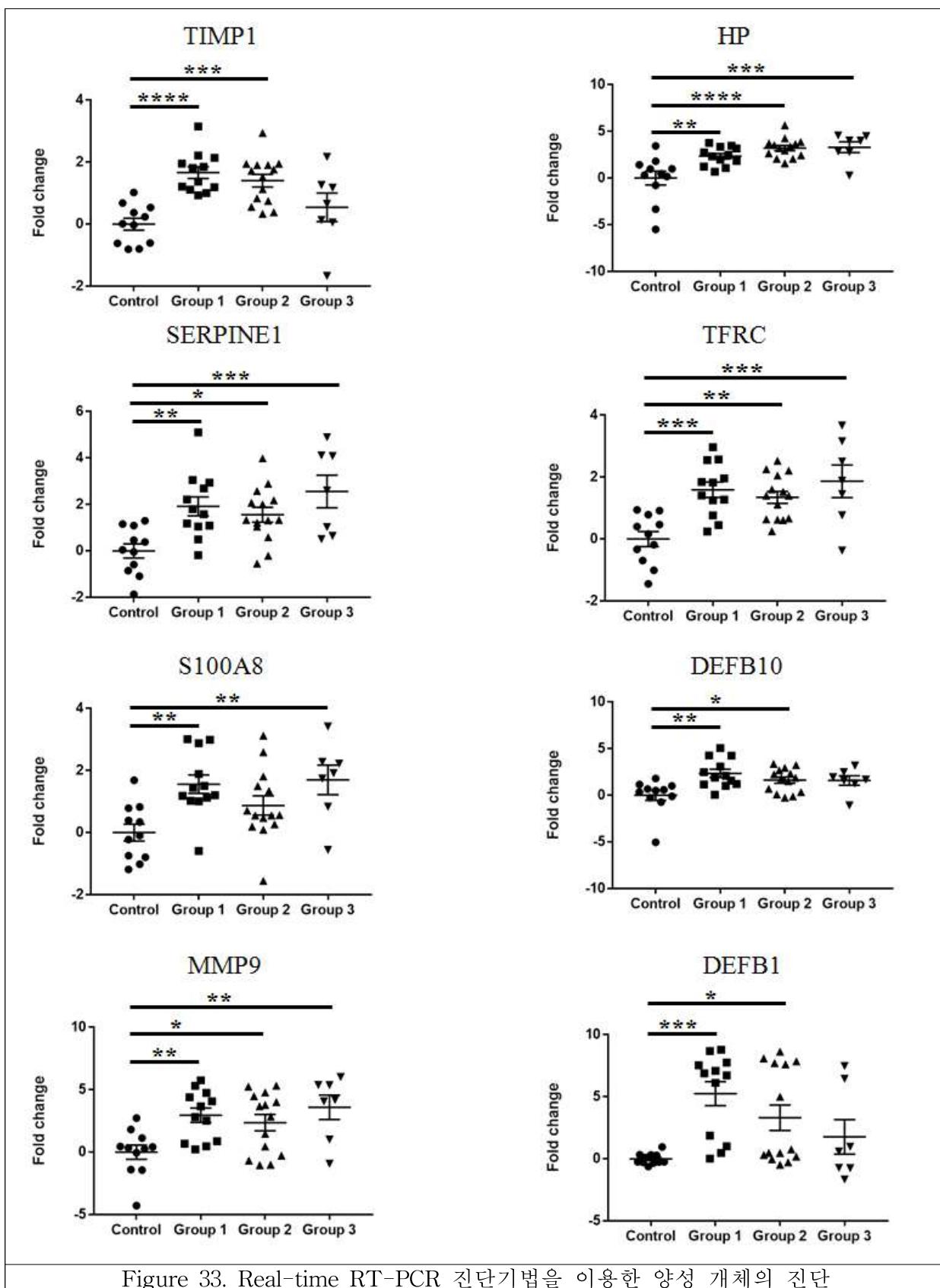


Figure 33. Real-time RT-PCR 진단기법을 이용한 양성 개체의 진단

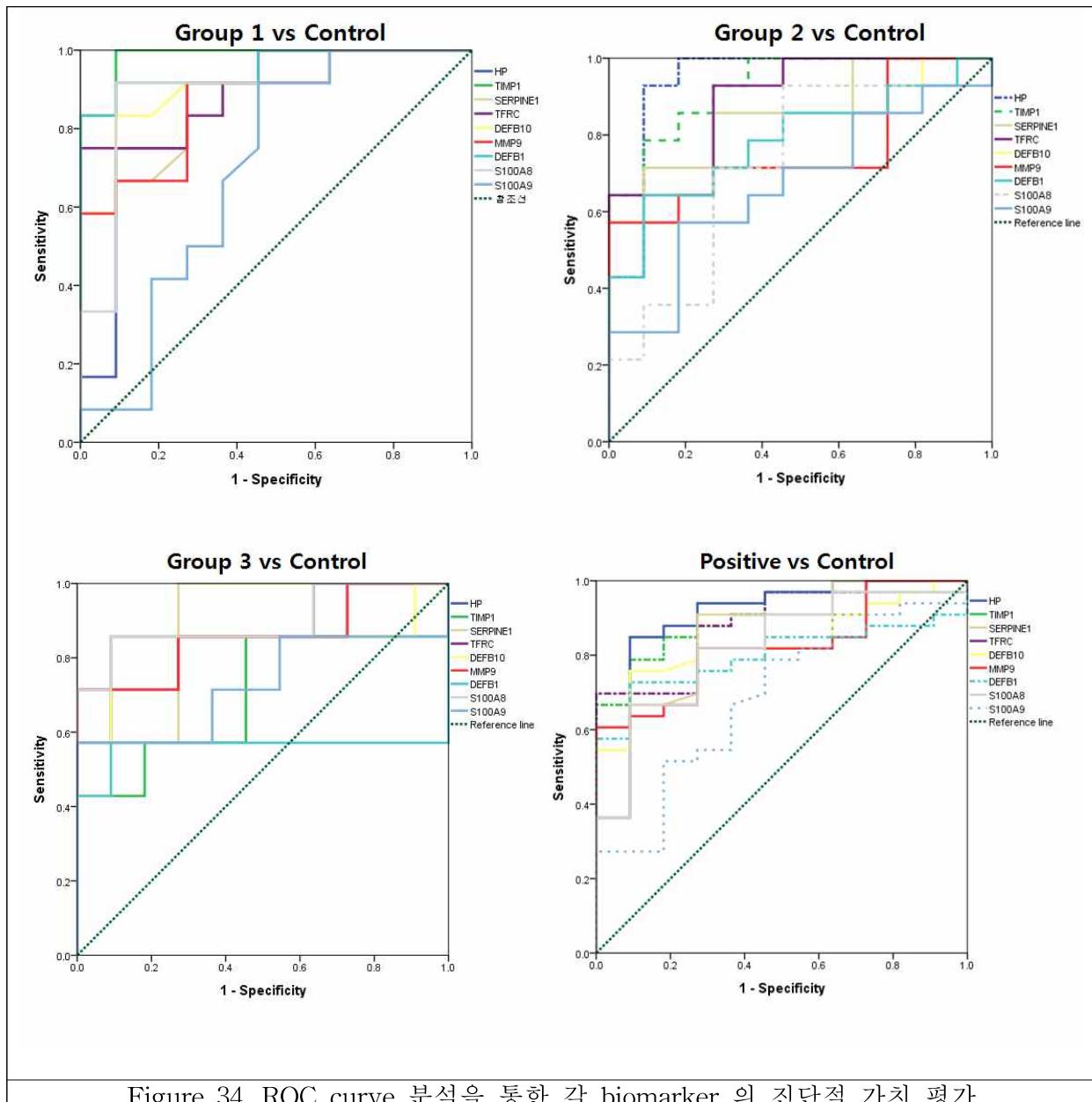


Figure 34. ROC curve 분석을 통한 각 biomarker 의 진단적 가치 평가

#### 나. Biomarker 후보물질의 재조합단백질을 이용한 ELISA 기법 개발

##### (1) 선정된 Biomarker 단백질의 유전자 sequence 확인 및 유전자 증폭

NCBI에서 각각 biomarker 단백질의 유전자 sequence를 검색하고, 각각의 유전자 정보를 이용하여 cloning을 위한 primer 제작하였다 (Table 35). 감염우 혈액에서 total RNA를 분리하고 cDNA합성 kit를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 이를 template로 하여 제작한 primer를 이용해 PCR을 수행하였다. Target gene 을 gel extraction한 후 pColdII vector에 삽입한 후 DH5-alpha cell에 transformation 하여 biomarker에 대한 유전자원을 확보하였다 (Figure 35). 원하는 유전자가 재조합된 DH5-alpha cell에서 mini prep 을 실시하여 분리된 재조합 plasmid를 BL21 expression competent cell에 transformation 함. 다수의 clone을 확보한 후 NCBI BLAST 를 이용하여 재조합된 유전자 염기서열을 확인하여 clone 을 최종적으로 선별하였다 (Figure 36).

Table 35. Nucleotide sequence of primers used in cloning

Primer name		Sequence(5'→ 3')	Size(bp)
SERPINE1	F	GCG AAA CTC GAG ATG CGG ATG TCT CCG GTC	1209
	R	CCT TCC GGA TCC TCA GGG TTC CAT CAC TTG	
TIMP-1	F	AGA TAA CTC GAG ATG GCC CCC TTT GCA CCC	624
	R	TAA TTA GGA TCC TCA GGC CAT CTG GGC CCG	
FGF2	F	TTA ATT CTC GAG ATG GCC GCC GGG AGC ATC	468
	R	TTA AGA CTG CAG TCA GCT CTT AGC AGA CAT TGG	
HP	F	GACACACTCGAGATG AGC GCC CTG CAA GCT GTC	1206
	R	GCC AGC CTG CAG TTA GTT GTT AGC GAT GGT TTT CCG	
HGF	F	CAA ATT GAG CTC ATG TGG GTG ACC AGA CTT CTG	2193
	R	CAG AGA GGT ACC CTA CAA CTG TGG TGC CTT ATA	

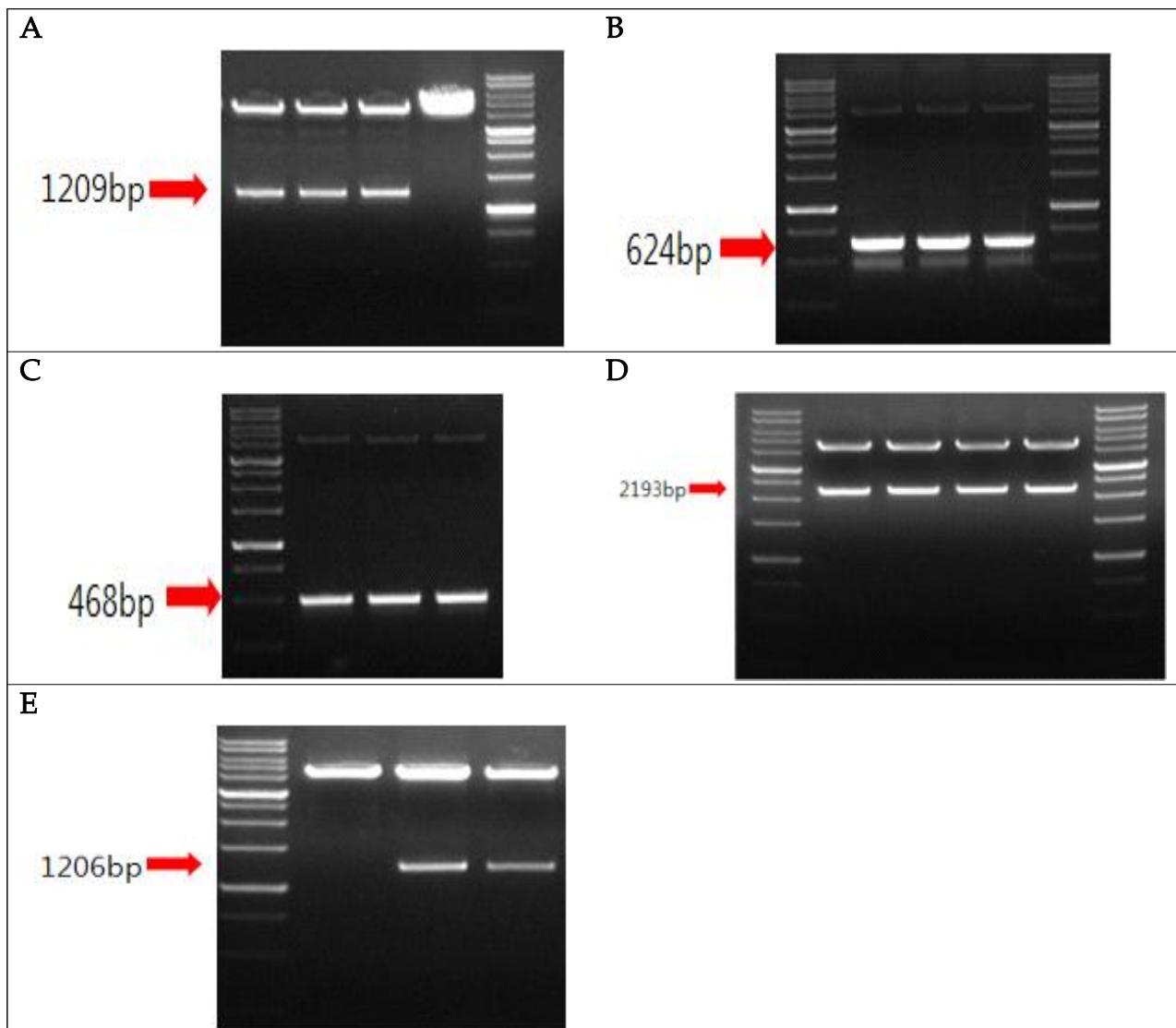


Figure 35. Cloning of genes encoding biomarkers candidates with pcold I vector. A: Serin peptidase inhibitor clade E member 1, B: Tissue inhibitor of metalloproteinase 1, C: Fibroblast growth factor 2, D: Hepatocyte growth factor, E: Haptoglobin.

### ① SERPINE1 유전자의 염기서열 분석

## Alignments

Sequence ID: IclQuery\_116301 Length: 1209 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 1209

② TIMP-1 유전자의 염기서열 분석

## Alignments

Sequence ID: Icl|Query\_235809 Length: 624 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 624

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1153 bits(624)	0.0()	624/624(100%)	0/624(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
Query 1	ATGGCCCCCTTGCAACCATGGCTCTGGCATCCTGTTGCTGCTGTGGCTCACAGCCCC				60
Sbjct 1	ATGGCCCCCTTGCAACCATGGCTCTGGCATCCTGTTGCTGCTGTGGCTCACAGCCCC				60
Query 61	AGCGGAGCCTGTACCTGGTCCCACCCCCACCCACAGACGGGCTCTGCAACTCCGATGTC				120
Sbjct 61	AGCGGAGCCTGTACCTGGTCCCACCCCCACCCACAGACGGGCTCTGCAACTCCGATGTC				120
Query 121	GTCATCAGGGCCAAGTTGCTGGGACCGCAGAAGTCAATGAAACTGCCTTATACCAGCGT				180
Sbjct 121	GTCATCAGGGCCAAGTTGCTGGGACCGCAGAAGTCAATGAAACTGCCTTATACCAGCGT				180
Query 181	TATGAGATCAAGATGACTAAGATGTTCAAAGGGTTCACTGCCTTGAGGATGCCCTGAC				240
Sbjct 181	TATGAGATCAAGATGACTAAGATGTTCAAAGGGTTCACTGCCTTGAGGATGCCCTGAC				240
Query 241	ATCGGTTCATCTACACCCCTGCCATGGAGAGCGTCTGCGATACTCCACAGGTCCAG				300
Sbjct 241	ATCGGTTCATCTACACCCCTGCCATGGAGAGCGTCTGCGATACTCCACAGGTCCAG				300
Query 301	AACCGCAGTGAGGAGTTCTCATAGCTGGACAATTGTCGAATGGCACCTGCACATCACC				360
Sbjct 301	AACCGCAGTGAGGAGTTCTCATAGCTGGACAATTGTCGAATGGCACCTGCACATCACC				360
Query 361	ACCTGCAGTTGTGGCTCCCTGGAACAGCATGAGTTCTGCTCAGCGCCGGGATTCAAC				420
Sbjct 361	ACCTGCAGTTGTGGCTCCCTGGAACAGCATGAGTTCTGCTCAGCGCCGGGATTCAAC				420
Query 421	AAGACCTATGCTGCTGGTTGTGAGGAATGCACAGTGTTCCCTGCTCATCCATCCCTGC				480
Sbjct 421	AAGACCTATGCTGCTGGTTGTGAGGAATGCACAGTGTTCCCTGCTCATCCATCCCTGC				480
Query 481	AAACTGCAGAGCGACACTCACTGCTGTGGACGGACCAGCTGCTCACAGGCTCTGACAAG				540
Sbjct 481	AAACTGCAGAGCGACACTCACTGCTGTGGACGGACCAGCTGCTCACAGGCTCTGACAAG				540
Query 541	GGGTTCAAGAGGCCACCTGGCTGCCCTGCCCGGGAGCCAGGGCTGTGCACCTGGCAG				600
Sbjct 541	GGGTTCAAGAGGCCACCTGGCTGCCCTGCCCGGGAGCCAGGGCTGTGCACCTGGCAG				600
Query 601	TCCCTGGGGCCCCAGATGGCCTGA	624			
Sbjct 601	TCCCTGGGGCCCCAGATGGCCTGA	624			

③ FGF2 유전자의 염기서열 분석

## Alignments

Sequence ID: IclQuery\_100045 Length: 468 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 468

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
865 bits(468)	0.0()	468/468(100%)	0/468(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
Query 1		ATGGGCGCCGGGAGCATCACCAACGCTGCCATCCCTGCCGGAGGAACGGCGGCAGGGCGCT			60
Sbjct 1		ATGGGCGCCGGGAGCATCACCAACGCTGCCATCCCTGCCGGAGGAACGGCGGCAGGGCGCT			60
Query 61		TTCGGCGGGGCCACTTCAAGGACCCAAAGCGGCTGTACTGCAAGAACGGGGCTTCTTC			120
Sbjct 61		TTCGGCGGGGCCACTTCAAGGACCCAAAGCGGCTGTACTGCAAGAACGGGGCTTCTTC			120
Query 121		CTGGCGCATCCACCCCGACGGCGAGTGAGACGGGGTCCGGAGAAGAGCGACCCACACATC			180
Sbjct 121		CTGGCGCATCCACCCCGACGGCGAGTGAGACGGGGTCCGGAGAAGAGCGACCCACACATC			180
Query 181		AAACTACAACCTCAAGCAGAAGAGAGAGGGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCAAAAC			240
Sbjct 181		AAACTACAACCTCAAGCAGAAGAGAGAGGGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCAAAAC			240
Query 241		CGTACCTTGCTATGAAAGAAGATGGAGATTACTAGCTCTAAATGTGTACAGACGAG			300
Sbjct 241		CGTACCTTGCTATGAAAGAAGATGGAGATTACTAGCTCTAAATGTGTACAGACGAG			300
Query 301		TGTCCTGAACGATGGAGTCTAATAACTACAATACCTACCGGTCAAGGAAATAC			360
Sbjct 301		TGTCCTGAACGATGGAGTCTAATAACTACAATACCTACCGGTCAAGGAAATAC			360
Query 361		TCCAGTTGGTATGTGGCACTGAAACGAACTGGCAGTATAAACTGGACCCAAAACAGGA			420
Sbjct 361		TCCAGTTGGTATGTGGCACTGAAACGAACTGGCAGTATAAACTGGACCCAAAACAGGA			420
Query 421		CCTGGGCAGAAAGCTATACTTCTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	468		
Sbjct 421		CCTGGGCAGAAAGCTATACTTCTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	468		

#### ④ HP 유전자와 염기서열 분석

## Alignments

Sequence ID: IclQuery\_242495 Length: 1206 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 1206

## ⑤ HGF 유전자의 염기서열 분석

### Alignments

Sequence ID: scbQuery\_201243 Length: 2193 Number of Matches: 8  
Range: 1 to 2193

Source	Expect	Mismatches	Gaps	Strand	Frame
4050 bits (2193)	0.00	2193/2193(100%)	0/2193(0%)	Plus/Plus	
<b>Features:</b>					
Query 1					80
Subject 1					80
Query 81					120
Subject 81					120
Query 121					180
Subject 121					180
Query 181					240
Subject 181					240
Query 241					300
Subject 241					300
Query 301					360
Subject 301					360
Query 361					420
Subject 361					420
Query 421					480
Subject 421					480
Query 481					540
Subject 481					540
Query 541					600
Subject 541					600
Query 601					660
Subject 601					660
Query 661					720
Subject 661					720
Query 721					780
Subject 721					780
Query 781					840
Subject 781					840
Query 841					900
Subject 841					900
Query 901					960
Subject 901					960
Query 961					1020
Subject 961					1020
Query 1021					1080
Subject 1021					1080
Query 1081					1140
Subject 1081					1140
Query 1141					1200
Subject 1141					1200
Query 1201					1260
Subject 1201					1260
Query 1261					1320
Subject 1261					1320
Query 1321					1380
Subject 1321					1380
Query 1381					1440
Subject 1381					1440
Query 1441					1500
Subject 1441					1500
Query 1501					1560
Subject 1501					1560
Query 1561					1620
Subject 1561					1620
Query 1621					1680
Subject 1621					1680
Query 1681					1740
Subject 1681					1740
Query 1741					1800
Subject 1741					1800
Query 1801					1860
Subject 1801					1860
Query 1861					1920
Subject 1861					1920
Query 1921					1980
Subject 1921					1980
Query 1981					2040
Subject 1981					2040
Query 2041					2100
Subject 2041					2100
Query 2101					2160
Subject 2101					2160
Query 2161					2185
Subject 2161					2185

Figure 36. NCBI-BLAST 를 이용한 Cloning 된 유전자의 염기서열 분석

## (2) 선정된 Biomarker 단백질의 특성 분석

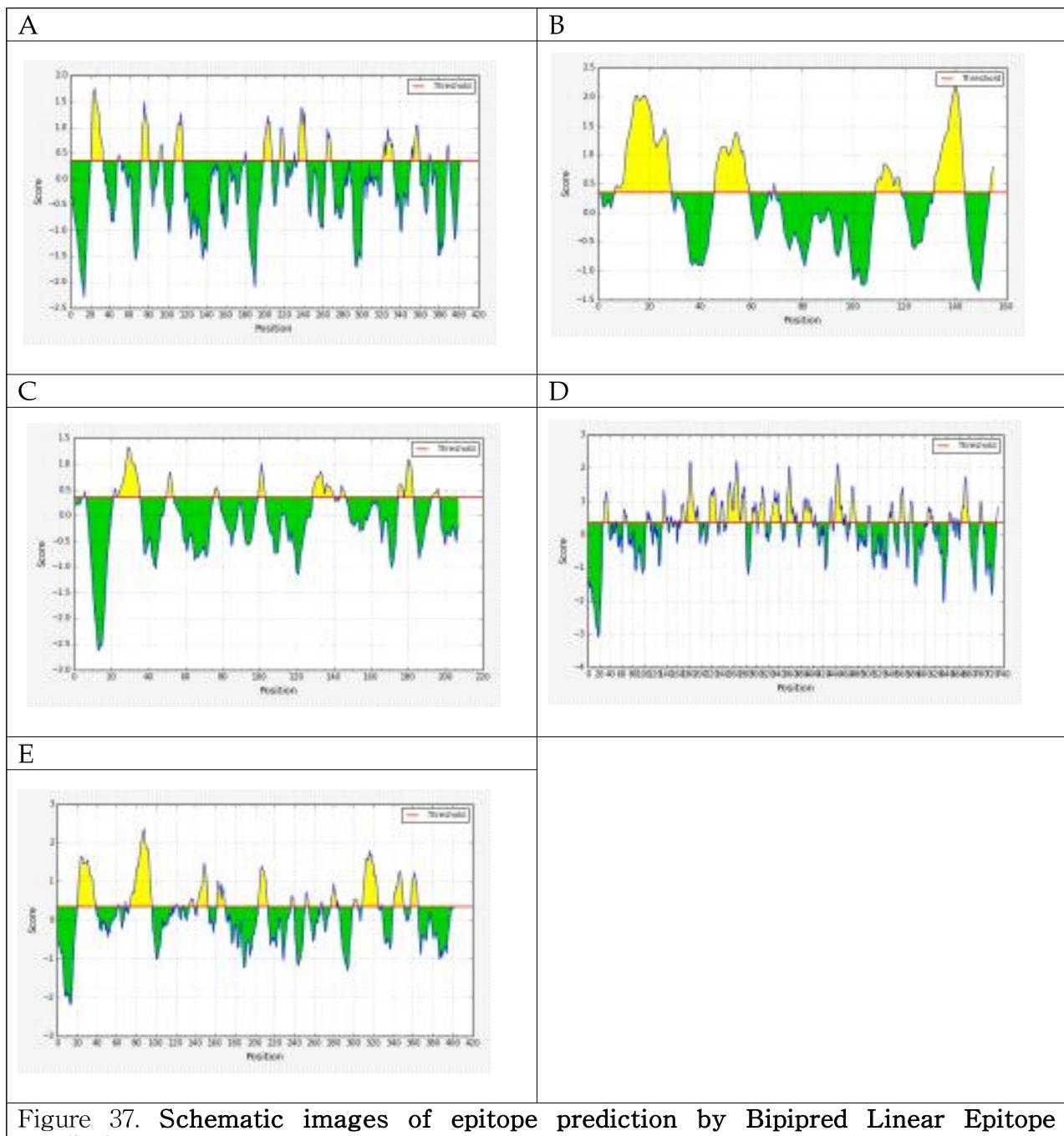
재조합 단백질의 발현, 정제 및 항체 획득을 위해 선정된 biomarker 단백질들의 특성 분석과 epitope prediction 및 단백질 구조분석을 수행하였다. Epitope prediction 은 IEDB analysis resource (<http://tools.immuneepitope.org>)의 Bepipred linear epitope prediction 프로그램을 이용하여 수행하였다. Epitope prediction 결과 각 biomarker protein의 epitope 의 개수 및 위치를 확인할 수 있었다.

Table 36. 선정된 biomarker 단백질의 일반적 특성

	SERPINE1	FGF2	TIMP-1	HGF	HP
Name	serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1	Fibroblast growth factor 2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Hepatocyte growth factor	Haptoglobin
Molecular weight	45.2kDa	17.26kDa	24.37kDa	83.36kDa	44.85kDa
pI	5.96	9.58	7.44	8.50	7.83
Disulfide bond formation	0	0	2	19	7
Glycosylation	3	0	2	3	2
Cellular position	Extracellular	Extracellular	Extracellular	Extracellular	Extracellular
Alpha helix	47.76%	14.03%	27.05%	10%	14.71%
Secondary structure	Extended strand	36%	29.03%	14.98%	29.32%
	Random coil	43.28%	55.94%	57.97%	60.68%
					54.36%

Table 37. Epitope prediction of biomarker proteins by Bipipred Linear Epitope Prediction

Biomarker protein	No. of predicted epitopes	Average score	Minimum score	Maximum score
HGF	38	0.164	-3.1	2.242
HP	21	0.135	-2.196	2.376
SERPINE1	15	-0.161	-2.296	1.753
TIMP-1	10	-0.096	-2.637	1.323
FGF2	6	0.234	-1.357	2.284



- BepiPred predicts the location of linear B-cell epitopes using a combination of a hidden Markov model and a propensity scale method. The residues with scores above the threshold (default 0.35) are predicted to be part of an epitope and colored in yellow on the graph (where Y-axes depicts residue scores and X-axes residue positions in the sequence)

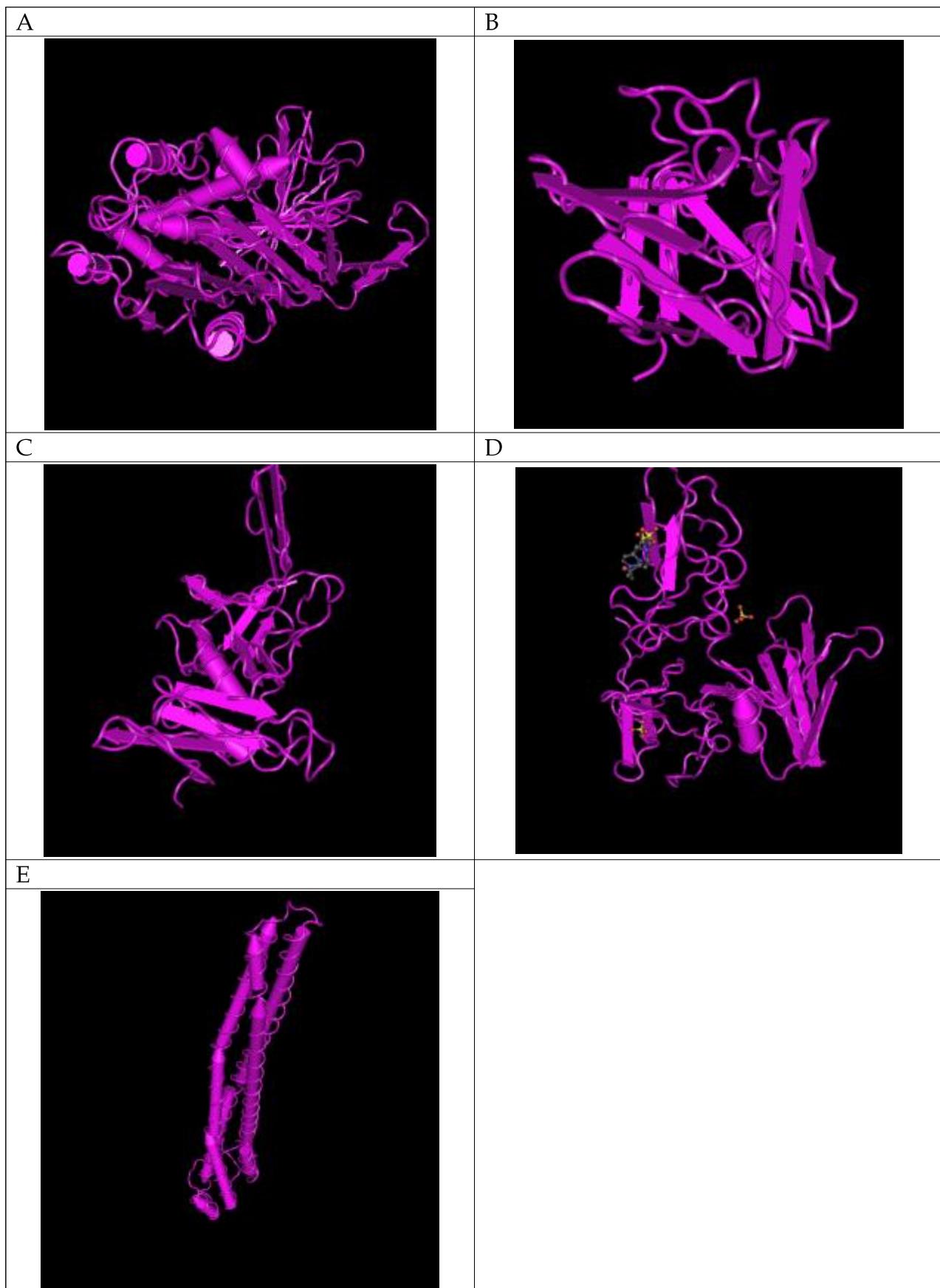


Figure 38. 3D images of biomarker proteins by RCSB PDB. A: SERPINE1, B: FGF2, C: TIMP-1, D: HGF, E: HP.

### (3) Biomarker 단백질 발현 및 정제

재조합된 Biomarker 단백질 발현 정도를 SDS-PAGE 및 Western blotting 을 통하여 확인하였다 (Figure 39). 발현이 확인된 clone 을 배양한 후 affinity chromatography를 이용하여 단백질 정제 최적 조건을 수립하여 생산한 결과 *TIMP-1*, *SERPINE1*, *FGF-2* protein expression 에서 각각 24kDa, 45kDa, 20kDa에서 단백질 발현을 확인하였다. 이후 seed culture 200 $\mu$ l 를 20ml 의 LB broth with ampicillin 100 $\mu$ g/ml 에 넣고 OD600 값이 0.1 이 될 때까지 37°C에서 배양하였다. OD값이 0.1 이 된 이후에 16°C에서 30min 배양 후, IPTG를 최종농도 0.5mM 이 되도록 첨가하고 15°C에서 24시간 동안 Induction 하여 단백질을 발현시켰다. 그 다음 GE health care사의 His-spin trap kit를 이용하여 단백질 정제를 수행 후 단백질 발현 여부를 SDS-PAGE 및 anti 6x-histidine western blot으로 확인하였다 (Figure 39).

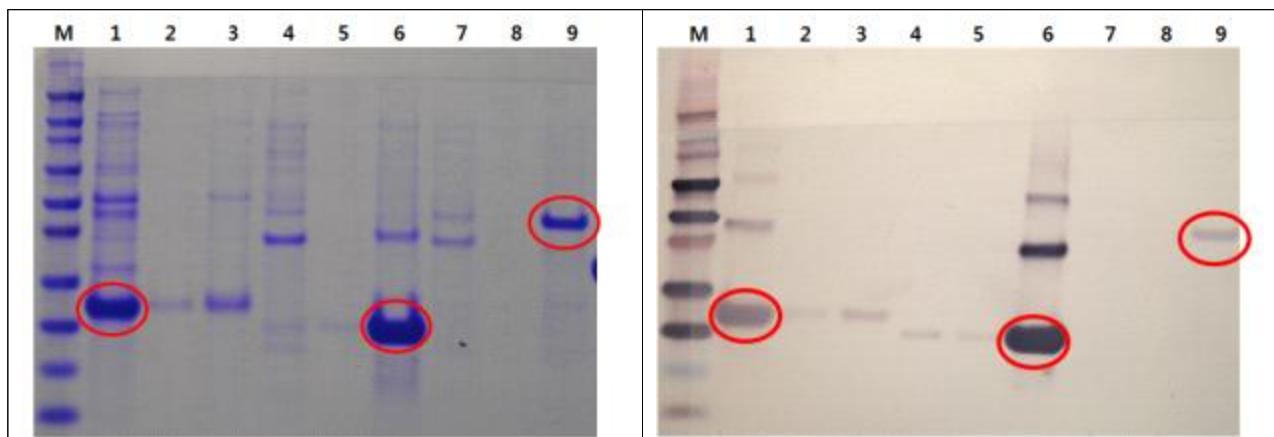


Figure 39. SDS-PAGE and Western blot analysis of biomarkers purified of the expression in *E. coli*. M: protein size marker, 1: TIMP-1(Inclusion body fraction, IB), 2: TIMP-1(Wasing fraction, W), 3: TIMP-1(Soluble fraction, S), 4: FGF2(IB), 5: FGF2(W), 6: FGF2(S), 7: SERPINE1(IB), 8: SERPINE1(W), 9: SERPINE1(S).

#### (4) 재조합 단백질에 대한 항체 생산

##### (가) 기니핀 유래 항체 생산

재조합 단백질에 대한 항체를 생산하기 위해 기니핀을 이용하여 면역접종실험을 수행하였다. 각 재조합 단백질은 유전자 재조합된 대장균에서 발현한 후 정제하여 확보하였다. 동물실험에 필요한 동물실험계획서가 승인되었다 (승인번호 : SNU-150917-6, (2015. 10. 20)). 투여할 샘플 상태는 희석 된 단백질과 adjuvant를 혼합한 상태로 피하 투여하였고 첫 번째 접종 시 Freund's complete adjuvant를 항원과 혼합하여 투여하였고 2, 3차 접종 시에는 Freund's incomplete adjuvant 를 사용하였다. 면역은 2주일 간격으로 3회 피하 투여, 3 차례에 걸쳐서 진행하였다. 항체형성을 확인하기 위하여 면역 중 샘플 채취를 실시하였으며 첫 번째 접종 시와 세 번째 접종 시 채혈하였다. 이 실험은 재조합단백질에 의한 항체 생성을 입증하기 위해 채취한 혈청에서 각 목적 단백질에 대한 항체의 변화를 중점적으로 확인하였다. 재조합 단백질 투여 후 1주일에 최소한 세 번 이상 관찰하여 통증, 부종, 감염, 농양, 궤양 등과 같은 부작용이 일어나지 않는지 면밀히 관찰하였다. 면역반응으로 각 기니핀 개체에서의 특이사항은 나타나지 않았으며, 시간이 지남에 따라 생성되는 항체들의 변화를 ELISA 를 통해 분석하였다. 항체의 획득을 위해 이정맥 및 심장 채혈을 통하여 혈액을 샘플링하여 혈청을 확보하였으며 이를 affinity column을 이용하여 정제하였다 (Table 38).

##### (나) 마우스 유래의 항체 생산

각 재조합 단백질은 유전자 재조합된 대장균에서 발현한 후 정제하여 확보하였다. 동물실험 계획서가 승인되었다 (승인번호 : SNU-160712-9, (2016. 9. 5)). 투여할 샘플 상태는 희석 된 단백질과 adjuvant를 혼합한 상태로 복강 투여하였으며 첫 번째 접종 시 Freund's complete adjuvant, 2, 3차 접종 시에는 Freund's incomplete adjuvant 를 사용하였다. 면역 계획은 2주 일 간격으로 3회 복강 투여, 3 차례에 걸쳐서 진행하였으며 첫 번째 접종 시와 세 번째 접종 시 채혈하여 면역 중 샘플을 채취하였다. 재조합 단백질 투여 후 1주일에 최소한 세 번 이상 관찰하여 통증, 부종, 감염, 농양, 궤양 등과 같은 부작용이 일어나지 않는지 면밀히 관찰한 결과 면역반응으로 각 마우스 개체에서의 특이사항은 나타나지 않았으며 현재 투여 후 혈청을 획득하여 sandwich indirect 방식의 ELISA 기법을 확립하는 작업을 수행 중에 있다.

Table 38. Biomarker 및 균체항원 재조합 단백질 확보 현황

	Protein	생산된 항원량 (μg)
Biomarker	SERPINE1	209.0
	FGF2	1857.0
	TIMP1	298.0
	FGF2	2407.0
균체 항원	TIMP1	4423.0
	MAP0860c	1222.0
	MAP0862	758.7
	MAP1204	2208.6
균체 항원	MAP3155c	1220.3
	MAP2963c	466.5
	MAP3817c	365.0
	MAP3954	658.0

### (5) 기니피 유래 항체를 이용한 ELISA 기법의 확립

양성-음성 샘플에서의 ELISA OD값 비교 결과 음성샘플의 ELISA OD값이 양성샘플과 유사하게 농도에 따라 높게 나오는 것이 확인되었다 (Figure 40). 실험에 사용된 2차항체는 Swine anti-guinea pig IgG-HRP conjugated (희석 배수 1:10000)이 사용되었으며 버퍼는 50mM coating buffer, Ab dilution을 위한 1% BSA in PBST, blocking을 위한 3% BSA in PBST가 사용되었다. 실험 결과 비특이 반응이 높게 나타났는데 한 가지 동물 유래의 항체만을 사용하였기 때문에 비특이 반응이 강하게 일어나는 것으로 판단되어 마우스 유래의 항체를 추가적으로 획득하여 sandwich indirect ELISA 기법에 적용 중에 있다.

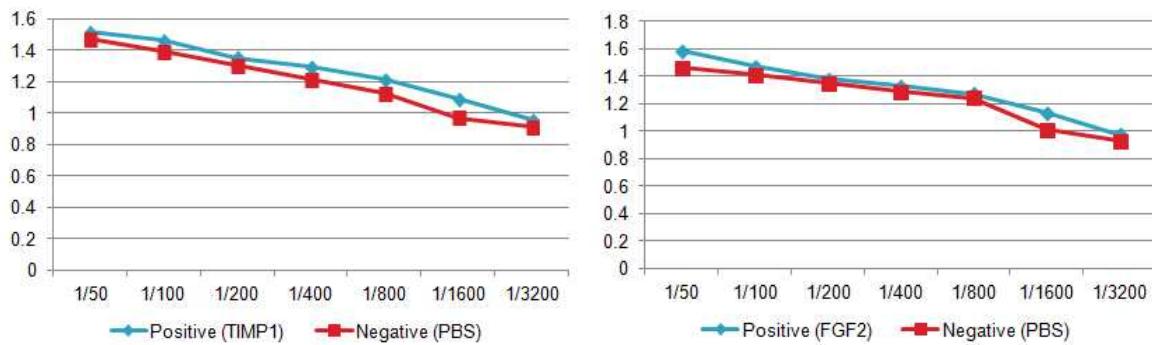


Figure 40. TIMP1, FGF2 의 양성-음성 샘플 별 ELISA OD값 비교

## 다. 재조합 항원단백질을 이용한 ELISA 기법 개발

### (1) 항원의 특성 분석

선정된 항원 후보 단백질에 대한 진단물질로서의 적합성 평가를 위해 transmembrane prediction 및 3D structure prediction 실시하였다. TMHMM server v2.0을 이용하여 단백질에 transmembrane helices의 존재여부를 예측하였다 (Figure 41). 또한 I-TASSER server를 이용하여 입체구조를 예측함으로써 기능이 알려지지 않은 항원 후보 단백질들에 대한 유사구조 검색 및 기능 추측하였다 (Figure 42). Transmembrane prediction 결과 MAP1087, MAP1204, MAP3155c, MAP3954, MAP3817c는 transmembrane helices를 가지는 것으로 보여 요네균의 세포막 또는 세포벽에 존재할 것으로 예측되었다. 3D 구조예측에서 MAP2077c는 MAP0380 유전자가 코딩하고 있는 anti-sigma factor antagonist protein (PDB ID: 4qtp) 와 유사한 것으로 분석되었고 두 번째로 유사한 단백질은 *Bacillus*의 anti sigma F factor protein (PDB ID: 1th8)로 분석되었다. MAP1204의 경우 *Mycobacterium tuberculosis*의 RipB protein (PDB ID: 3pbi)와 유사한 것으로 분석되었고 이 단백질과의 sequence identity는 83.4%로 나타났다 (Table 39).

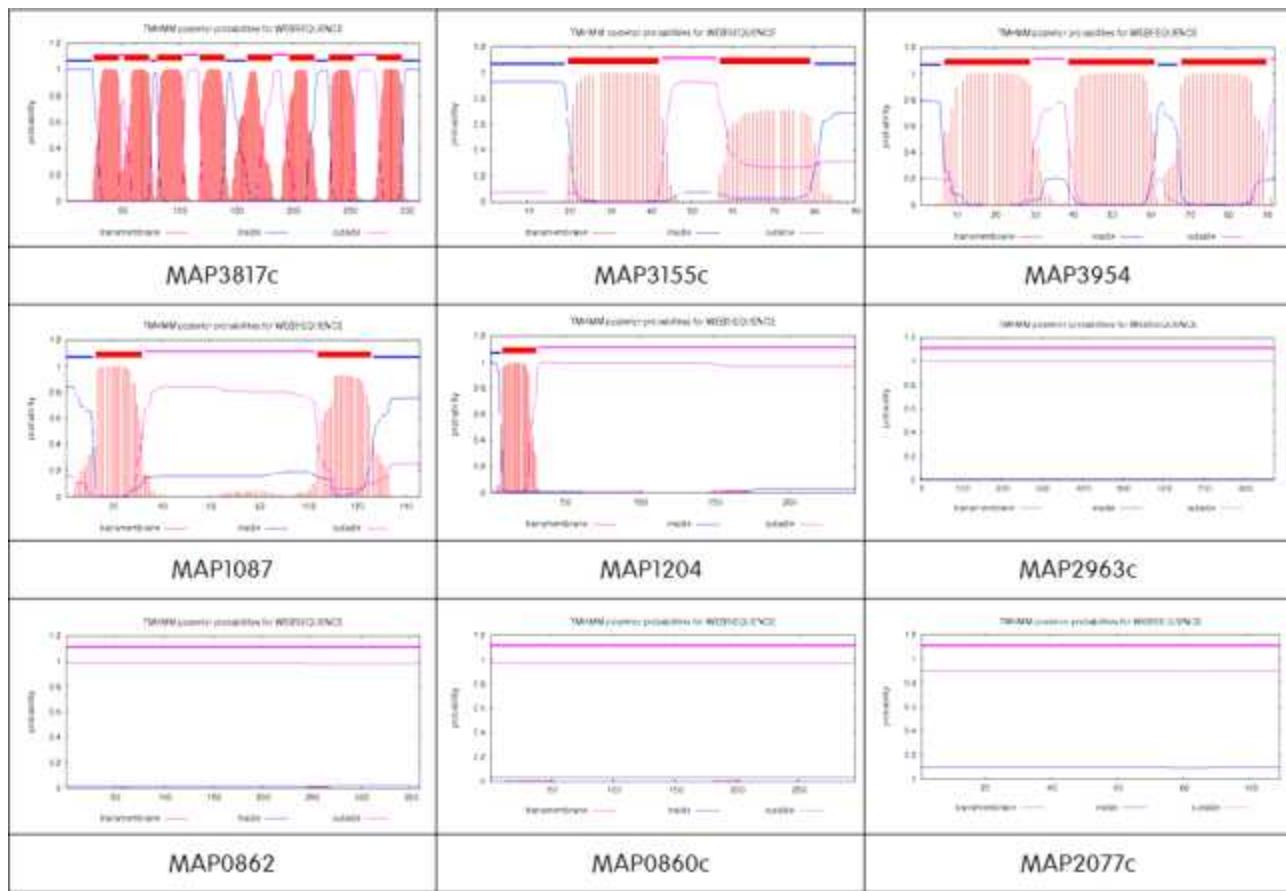


Figure 41. TMHMM server v2.0 transmembrane helices prediction

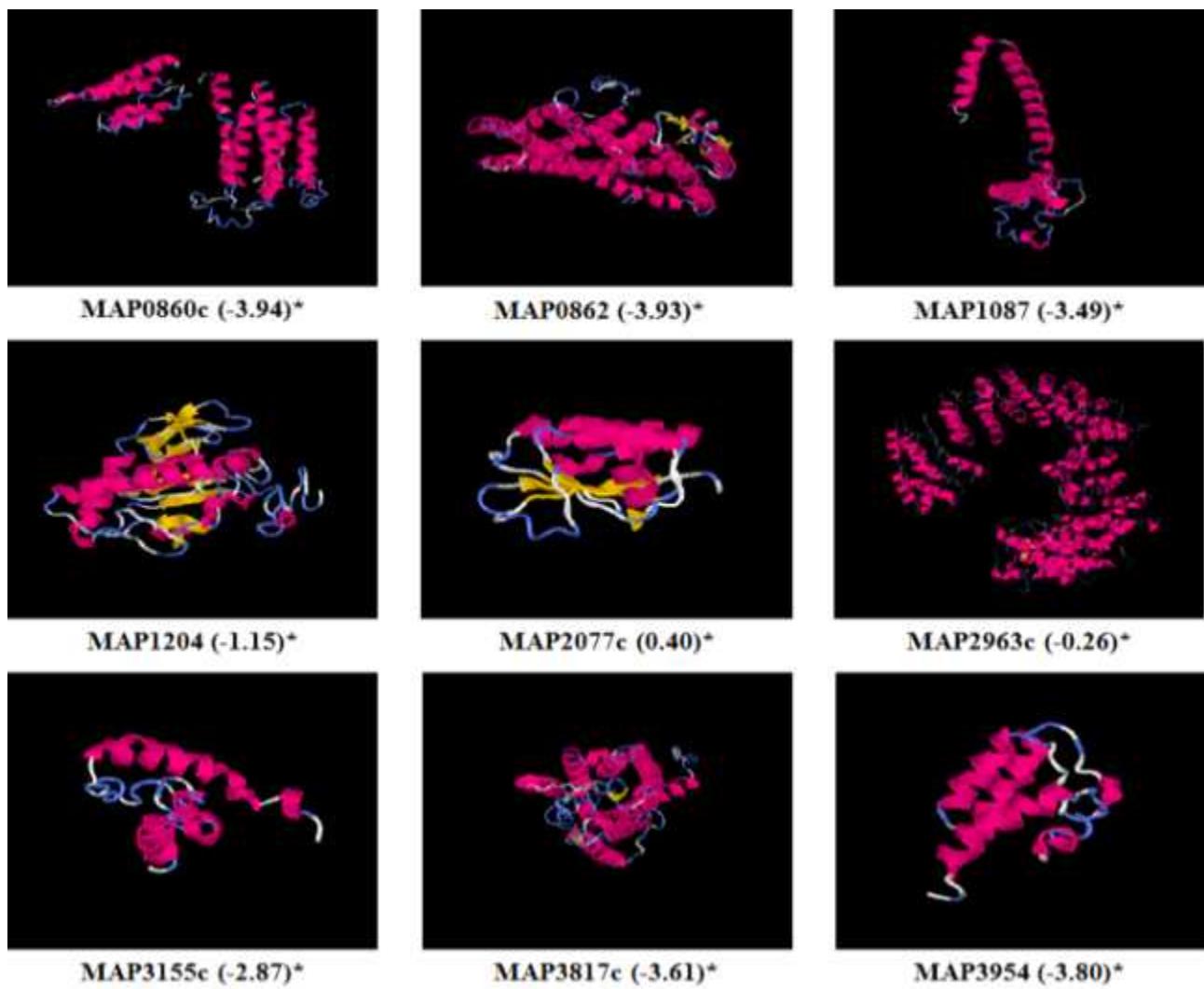


Figure 42. Three-dimensional structure prediction using I-TASSER server. \*C-score.

Table 39. TM-align analysis of antigen candidates

Antigen	PDB hit	TM-score	RMSD	IDEN	Cov.
MAP0860c	3ay5A	0.729	2.64	0.139	0.828
MAP0862	4k1pA	0.871	1.53	0.064	0.903
MAP1087	3puyG	0.648	3.02	0.104	0.843
MAP1204	3pbiA	0.803	0.78	0.834	0.816
MAP2077c	4qtpA	0.911	1.01	0.238	0.963
MAP2963c	4c0oA	0.908	1.01	0.087	0.916
MAP3155c	2gtvX	0.627	3.19	0.094	0.944
MAP3817c	4n4wA	0.775	3.08	0.084	0.894
MAP3954	3s1sA	0.581	2.95	0.086	0.804

RMSD: the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align.

IDEN: the percentage sequence identity in the structurally aligned region.

Cov.: represents the coverage of the alignment by TM-align and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

Table 40. List of selected antigen candidates and the selection criteria

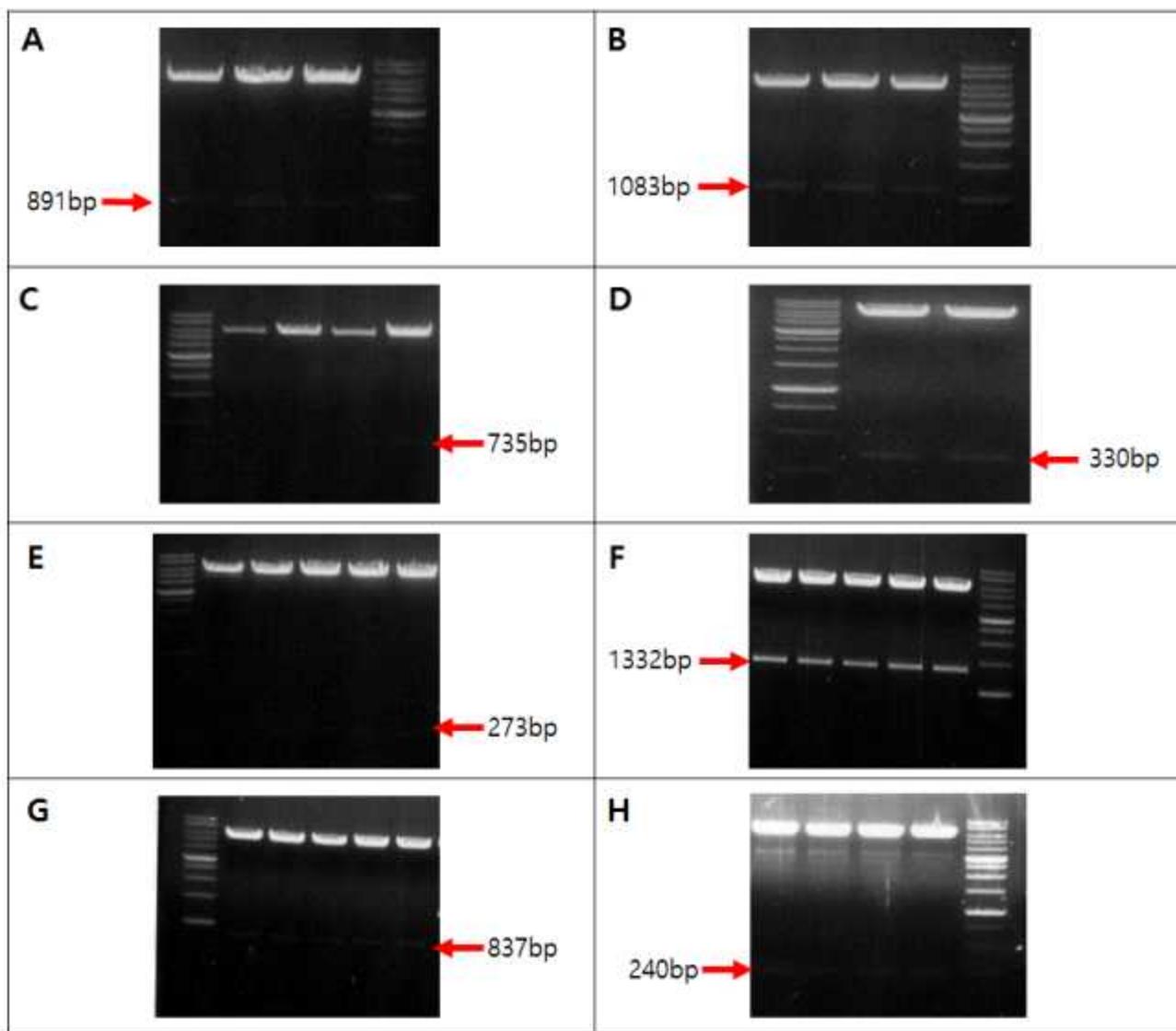
Rank	Selection criteria	Antigens	Gene size	Amino acids	Protein size	pI value	Predicted transmembrane helices
1	MAP specific, high reactivity in early stage of infection	MAP0862	885	296	32.3	9.38	0
2	MAP specific, high reactivity in clinical infection	MAP3817c	939	312	33.5	8.97	8
		MAP0860c	885	296	32.3	9.38	0
3	Specificity not reported, high reactivity in clinical infection	MAP3155c	273	90	9.9	6.81	2
		MAP2077c	330	109	11.1	4.42	0
		MAP3954	279	92	9.3	12.18	3
4	Non-specific, high reactivity in early stage of infection	MAP1087	441	146	15.4	8.89	2
		MAP1204	735	244	25.4	9.62	1
5	MAP specific, low reactivity in clinical infection	MAP2963c	1499	874	97.1	9.12	0

## (2) Cloning 기법을 이용한 재조합 단백질 생산

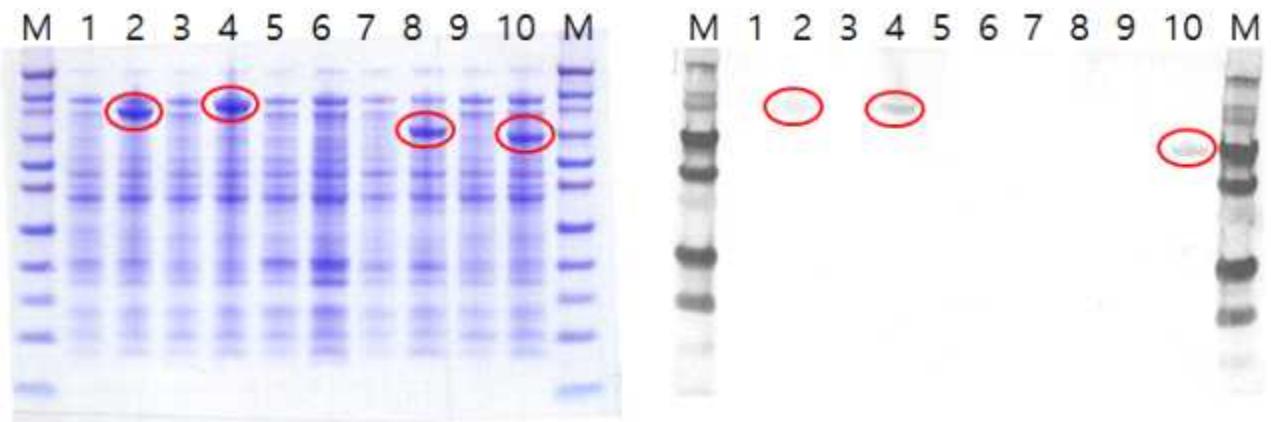
항원 후보 단백질들을 soluble expression 하기 위한 최적의 벡터를 선정하였는데 기존의 pET vector system이나 pCold1 vector에서는 항원 후보 단백질들이 soluble하게 발현되지 않아 발현 시 양과 solubility를 높여줄 수 있는 tag (trigger factor)를 가진 cold-shock expression systme인 pCold-TF vector system 선택하였다. 항원 후보 단백질 중 총 8종에 대한 유전자 cloning을 수행하였다 (Table 41). PCR을 이용하여 각 유전자들을 증폭한 다음 각각의 restriction enzyme 처리하여 벡터와 ligation 시킴으로써 재조합 plasmid를 생산하였다 (Figure 43). 생산된 재조합 plasmid를 DH5 $\alpha$  competent cell 및 Rosetta<sup>TM</sup>-gami2 (DE3) competent cell에 transformation 후 단백질 발현 수행하였다. o/n 배양한 20ml의 seed culture 배양액을 ampicillin이 첨가된 500ml의 LB broth에 접종한 후 약 1~2 시간 후 OD600 값이 0.1 일 때 induction 시작하였으며 induction 시 IPTG의 농도는 0.5mM, 이후 배양은 15°C의 shaking incubator에서 cold-shock 조건 하에서 24시간동안 배양하는 조건을 수립하였다. Induction 후 수확한 세포들은 원심분리하여 펠렛 상태로 보관 및 단백질 정제에 이용하였으며 단백질 정제는 GE health care사의 His-spin trap kit를 이용하여 수행하였다. 단백질 발현 여부는 SDS-PAGE 및 anti 6x-histidine western blot으로 확인하였으며 (Figure 44), 총 8종의 항원 단백질 후보 중 7종에서 단백질 발현 및 정제를 완료하였다. 나머지 1종의 재조합 단백질 (MAP2077c)은 발현확인은 되었으나 Western blot 반응성 관찰되지 않아 후보에서 제외하였다.

Table 41. 각 유전자의 cloning을 위한 primers

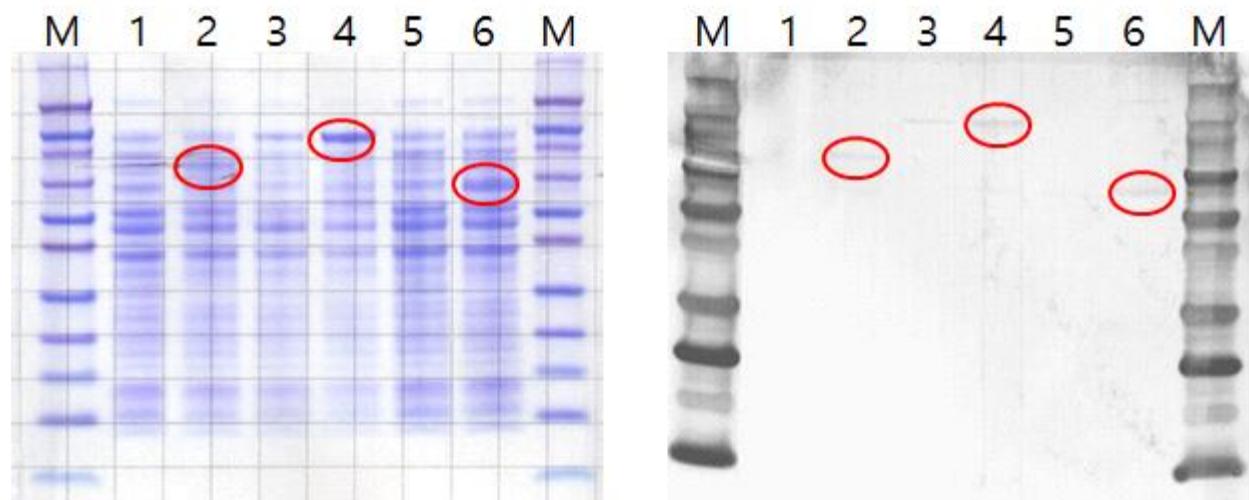
Gene	Primer	Enzyme	Sequence	Size(bp)
MAP0860c	Forward	XhoI	5'-CAC TCT CGA GAT GAC AGA TCA TCT GGA AGT CCG C-3'	891
	Reverse	BamHI	5'-CCG AGG ATC CTC ACG GTG AAT CAC CGC C-3'	
MAP0862	Forward	XhoI	5'-GAG GCT CGA GAT GCG CTT CGT AAA CGG C-3'	1,083
	Reverse	BamHI	5'-TGA CGG ATC CTC AGG CGC GCC ACA GAT T-3'	
MAP1204	Forward	EcoRI	5'-ACG AGA ATT CAT GCG CCG CAA CCG GTT T-3'	735
	Reverse	Sall	5'-CGG CGT CGA CTC AGT ACT CGA TGA TCC-3'	
MAP2077c	Forward	XhoI	5'-GGA TCT CGA GAT GGT CAC CCC GCT GAC G-3'	330
	Reverse	BamHI	5'-GCA AGG ATC CTC AAC GAG GCG CCG GCG-3'	
MAP3155c	Forward	XhoI	5'-GAG TCT CGA GAT GGC GCG GAT CGA CAA T-3'	273
	Reverse	BamHI	5'-CGA AGG ATC CCT ACG GCG TAC GGC ACG C-3'	
MAP2963c	Forward	XhoI	5'-TCG CCT CGA GGT GAT GGT TGG CCG CAA C-3'	1,332
	Reverse	XbaI	5'-TCG TCT CTA GAA CAT CTG AGT CCG GGT T-3'	
MAP3817c	Forward	XhoI	5'-CTG TCT CGA GTT GCT CGT CCT CAC GCT G-3'	837
	Reverse	XbaI	5'-CGC GCT CTA GAA GCC TCG TCT GCA GAG A-3'	
MAP3954	Forward	XhoI	5'-GGC CCT CGA GAT GCT GAT CGG AAG CGC G-3'	240
	Reverse	PstI	5'-GTC CCT GCA GTC AGC CAC CGG CGG TCA-3'	



**Figure 43. Cloning of genes encoding antigen candidates with pCold-TF vector.** A: MAP0860c, B: MAP0862, C: MAP1204, D: MAP2077c, E: MAP3155c, F: MAP2963c, G: MAP3817c, H: MAP3954



**Figure 44-1.** Analysis of cellular proteins expressed in *E. coli* by SDS-PAGE and Western blot with anti-6x histidine antibody. M: protein size marker, 1: MAP0860c(Non induction, NI), 2: MAP0860c(Induction, I), 3: MAP0862(NI), 4: MAP0862(I), 5: MAP1204(NI), 6: MAP1204(I), 7: MAP2077c(NI), 8: MAP2077c(I), 9: MAP3155c(NI), 10: MAP3155c(I).



**Figure 44-2.** Analysis of cellular proteins expressed in *E. coli* by SDS-PAGE and Western blot with anti-6x histidine antibody. M: protein size marker, 1: MAP3817c(Non induction, NI), 2: MAP3817c(Induction, I), 3: MAP2963c(NI), 4: MAP2963c(I), 5: MAP3954(NI), 6: MAP3954(I).

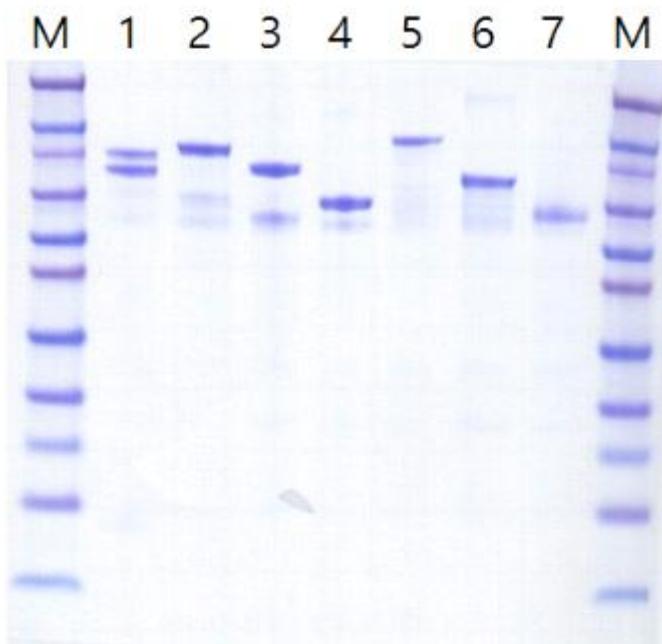


Figure 45. 발현 및 정제 완료한 재조합 항원 단백질 SDS-PAGE 결과. M: protein size marker, 1: MAP0860c, 2: MAP0862, 3: MAP1204, 4: MAP3155c, 5: MAP2963c, 6: MAP3817c, 7: MAP3954.

### (3) Western blot을 이용한 항원 후보 단백질의 반응성 측정

요네병균에 Immunized 된 실험동물 (Rabbit)의 purified IgG를 이용하여 재조합 단백질의 Western blot 반응성 확인 실험을 수행하였다 (Table 42). 또한 요네병의 감염 stage 별 야외 혈청을 이용하여 Western blot을 수행하였다. Western blot을 통한 각 항원 후보단백질과의 반응성 결과가 정리되었다 (Table 43). 실험동물의 혈청을 이용한 western blot 반응성 측정 결과 cellular extract와 culture filtrate 모두에서 MAP1204와 MAP2077c는 반응이 나타나지 않았으며 나머지 항원들은 밴드를 나타내었다. 감염 시기별 소 혈청을 이용한 western blot 실험에서 ELISA와 PCR 모두에서 양성을 나타낸 샘플에서는 MAP2077c를 제외한 모든 항원과 반응성을 나타내었으며 관심있는 ELISA 음성과 PCR 양성 샘플에서는 MAP0860c에서 약한 반응성을 제외하면 나머지 항원들에서는 모두 반응이 나타나지 않았다. 결과적으로 ELISA 실험을 통한 높은 민감도의 면역학적 반응을 통해 항원의 반응성을 측정해 보아야 할 것으로 판단되었다.

Table 42. 재조합 후보 단백질에 대한 실험동물에서의 항체 형성 확인

Sample	MAP0860c	MAP0862	MAP1204	MAP2077c	MAP2963c	MAP3817c	MAP3954
RB44 rabbit anti-MAP IgG	++	+	-	-	+	++	++
Rabbit anti- MAP CF IgG	+	++	+/-	-	+	+	+

RB44: Immunized with MAP cellular extract, CF: Immunized with MAP culture filtrate

Table 43. 항원 후보 재조합 단백질의 그룹별 혈청 Western blot 반응성 비교

Group	Fecal PCR	ELISA*	Sample	MAP0860c	MAP0862	MAP1204	MAP2077c	MAP2963c	MAP3817c	MAP3954
1	+	+	70xx	+	++	++	-	++	++	+++
			110xx	+	+/-	-	-	+	+	+
2	-	+	90xx	++	++	+	-	+	+	+
			110xx	+	+	-	-	-	+/-	+/-
3	+	-	120xx	+	+/-	-	-	-	-	-
			130xx	+	+/-	-	-	-	+/-	+/-
4	-	-	110xx	+	+	-	-	-	+/-	-
			120xx	+	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-

#### (4) 재조합 항원 단백질을 이용한 ELISA 기법 개발을 위한 조건 확립

##### (가) ELISA checkerboard titration

양성 혈청을 이용한 ELISA checkerboard titration을 수행하여 항원 후보 단백질의 반응성 확인 및 ELISA 실험을 위한 최적의 혈청 희석배수 및 항원 희석배수를 결정하였다. ELISA plate는 multibinding plate를 사용하였고 carbonate buffer (pH9.6)으로 4°C o/n 조건으로 항원 코팅을 수행하였다. 5% Horse serum in PBS-T (0.05% Tween-20)으로 2시간 blocking 및 2% horse serum in PBS-T (0.05% Tween-20)으로 diluent를 만들어 혈청 희석 및 conjugate 희석에 사용하였다. 각각 항원-항체 반응은 실온에서 1시간씩 수행하였으며 washing은 PBS-T (0.05% Tween-20)으로 4회-3회-4회-4회 씩 수행하였다.

###### ① MAP2963c & MAP3817c의 항원희석배수 및 혈청희석농도 결정

두 항원 모두 50ng/ml의 항원 농도와 1/160 정도의 혈청 농도에서 가장 반응성이 좋은 결과를 보였다 (Figure 46). 그러나, positive 와 negative의 O.D값 차이는 발견할 수 있었으나 antigen이 코팅되지 않은 well에서 non-specific signal 보였기 때문에 horse serum 이용한 blocking이 충분치 않은 것으로 판단하고 blocking을 위한 최적의 물질 및 농도 조건 결정을 위한 실험을 수행하였다.

###### ② Blocking agent 및 serum diluent 농도에 따른 ELISA 비특이 반응 측정

Blocking agent (horse serum + 1x PBS-T)의 horse serum 농도와 Tween-20 농도를 바꿔가며 가장 효율이 높은 농도를 계산하였다 (Table 44). Diluent (horse serum + 1xPBS-T)도 마찬가지 방법으로 조합을 생성하여 최적의 buffer 농도를 탐색하였다. Blocking은 10% horse serum이 5%에 비해서 훨씬 좋은 결과 (가장 차이가 많이 남)가 나왔고 diluent는 5% horse serum 보다 10%를 썼을 때 효과가 더 좋았다. Tween-20은 0.05%와 0.1% 간에 거의 차이를 보이지 않았다 (Figure 47).

본 실험을 통해 ELISA 수행을 위한 blocking 및 diluent buffer의 조건은 10% horse serum 및 0.05% Tween-20을 포함한 1x PBS-T buffer를 이용하는 것으로 결정하였다.

###### ③ MAP0860c, MAP0862, MAP1204, MAP3155c, MAP3954의 항원희석배수 및 혈청희석농도 결정

Blocking 및 diluent 조건 확립 후 나머지 항원 후보 단백질들에 대한 ELISA checkboard titration을 수행하였다 (Figure 48). MAP0860c는 항원 농도 50ng/well에 혈청 희석배수는 1/80에서 1/160으로 결정하였고 MAP0862는 항원 농도 25ng/well에 혈청 희석배수는 1/80에서 1/160, MAP1204는 항원 농도 50ng/well에 혈청 희석배수 1/80에서 1/160, MAP3155c는 항원 농도 50ng/well에 혈청 희석배수 1/80, MAP3954는 항원 농도 100ng/well에 혈청 희석배수 1/80에서 1/160 정도가 이상적인 반응 농도로 결정하였다.

#### (나) 양성 및 음성 혈청을 이용한 항원 후보 단백질들의 진단 유효성 평가

기존의 진단법 (commercial ELISA kit)에서 양성으로 판정된 혈청 및 음성 혈청을 이용하여 각 항원 후보 단백질들의 반응성 정도를 측정하였다. 감염 단계별 요네병 양성우의 혈청을 이용한 재조합 단백질의 반응성 측정하였는데 혈청 종류별 항원의 반응성 패턴은 모든 항원이 비슷하였으나 MAP3954 항원의 평균 OD 값이 negative group에 비해 높은 결과를 나타내었다. MAP2963c 항원은 분변 PCR 양성 그룹에서 상대적으로 높은 평균 OD 값을 나타내었다 (Figure 49). 그러나 대체적으로 negative 샘플과 positive 샘플 간에 OD값 차이가 크지 않아 몇 가지 조건 변경을 통해 ELISA 최적화를 수행하였다.

#### (다) ELISA 조건 최적화

ELISA plate의 surface coating material에 따른 혈청 비특이반응 측정을 통해 최적의 ELISA plate를 찾는 실험을 수행하였다. Surface coating 상태에 따라 maxisorp (highbinding) 과 polysorp (unibinding)으로 나눌 수 있는데, 각각의 plate에 대해 양성혈청과 음성혈청을 반응시켜 비특이반응의 정도를 살펴보았다. 결과를 보았을 때 maxisorp 보다는 polysorp plate에서 혈청 비특이반응이 잘 억제되는 것을 확인하였다 (Figure 50). 또한 blocking agent로 horse serum이나 bovine serum albumin (BSA) 대신 casein (Sodium Caseinate)을 사용하여 ELISA 조건을 최적화 하였다. Casein은 BSA에 비해 더 작은 크기의 단백질이 존재하므로 blocking 성능이 우수하고 horse serum에 비해 정제된 형태의 물질이므로 이를 blocking agent 및 diluent의 기본 물질로 선택하였다.

Blocking buffer의 조성으로는 PBS에 tween-20의 첨가 유무 및 NaCl의 농도 등 조건을 달리하여 비특이반응의 정도를 측정하였다. 1%의 casein 농도를 기본으로 NaCl이 0.1M 추가된 buffer에서는 비특이반응 뿐만 아니라 양성혈청과의 반응정도도 같이 줄어들었으나 PBS에 tween-20을 첨가한 buffer에서는 효과적으로 억제된 비특이반응과 함께 높은 양성혈청과의 반응성을 보였다. PBS만으로는 중간정도의 결과값을 보였다. 결과적으로 최적의 blocking agent는 1% casein in PBS-T (0.05% Tween-20)으로 결정하였다 (Figure 51).

Diluent의 조성으로는 PBS-T (0.05% Tween-20)의 buffer에 각각 0.1%, 0.5%, 1%의 casein을 첨가하여 각각의 비특이반응 정도 및 양성혈청과의 반응성을 측정하였다. 1%의 casein을 사용하였을 때 비특이반응은 가장 낮았지만 양성혈청과의 반응정도도 줄어들었다. 0.1%의 경우 다른 조건에 비해 주목할만한 높은 값을 나타냈으며 negative 혈청과의 반응 정도 (OD값)도 세 그룹 중 가장 높게 나왔다. 결과적으로 0.2%의 casein in PBS-T (0.05% Tween-20)을 diluent 조성으로 결정하였다 (Figure 51).

재조합 항원단백질에 대한 비특이반응 제거를 위한 vector control pre-absorption 과정을 추가하였다. 재조합 항원단백질의 tag 단백질인 trigger factor (TF) protein 및 정제 과정에 존재 할 수 있는 vector 의 protein에 대한 비특이반응을 제거하기 위하여 vector control lysate를 diluent에 첨가하여 pre-absorption 과정을 추가하였다. Vector control lysate의 첨가 정도를 최적화 하기위하여 western blot을 수행하였다. Vector control lysate를 각각 2mg/ml, 1mg/ml, 0.5mg/ml의 농도로 혈청과 1:1로 반응시킨 후 map0862, map3817c의 항원 및 정제한 TF protein과의 western blot 반응성을 측정하였다. 2mg/ml의 농도에서는 양성혈청과의 반응 자체

가 희미하게 나타났으나 0.5mg/ml의 농도에서는 뚜렷한 밴드와 함께 TF protein에 대한 어떤 반응도 나타나지 않았다. 결과적으로 0.5mg/ml의 농도를 pre-absorption에 사용하는 것으로 결정하였다 (Figure 52).

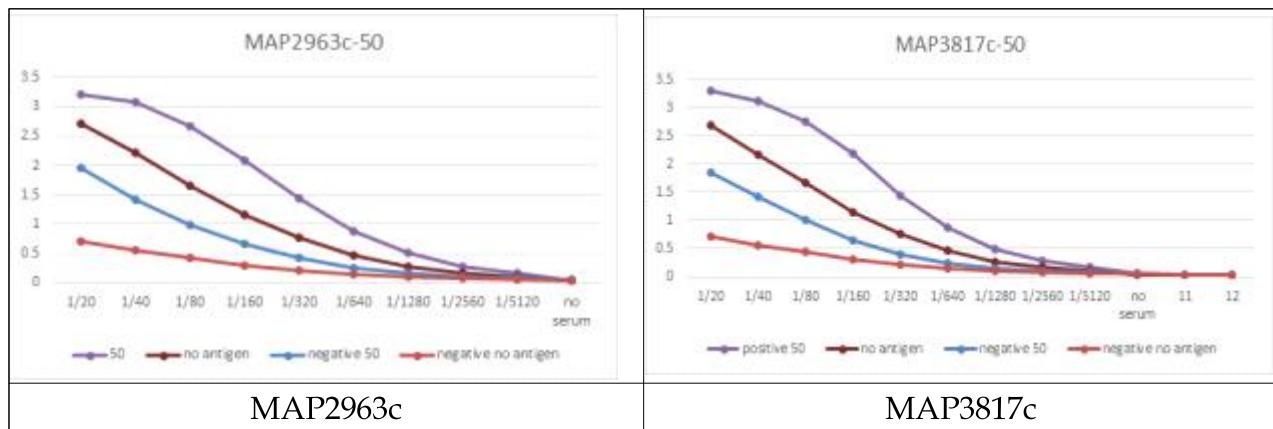


Figure 46. MAP2963c 및 MAP3817c 의 checkerboard titration.

Table 44. Blocking agent 및 diluent의 농도별 조합

	Blocking agent	Diluent
1	5% HS + 0.05% Tween-20	5% HS + 0.05% Tween-20
2	10% HS + 0.05% Tween-20	5% HS + 0.05% Tween-20
3	10% HS + 0.05% Tween-20	10% HS + 0.05% Tween-20
4	5% HS + 0.1% Tween-20	5% HS + 0.1% Tween-20
5	10% HS + 0.1% Tween-20	5% HS + 0.1% Tween-20
6	10% HS + 0.1% Tween-20	10% HS + 0.1% Tween-20

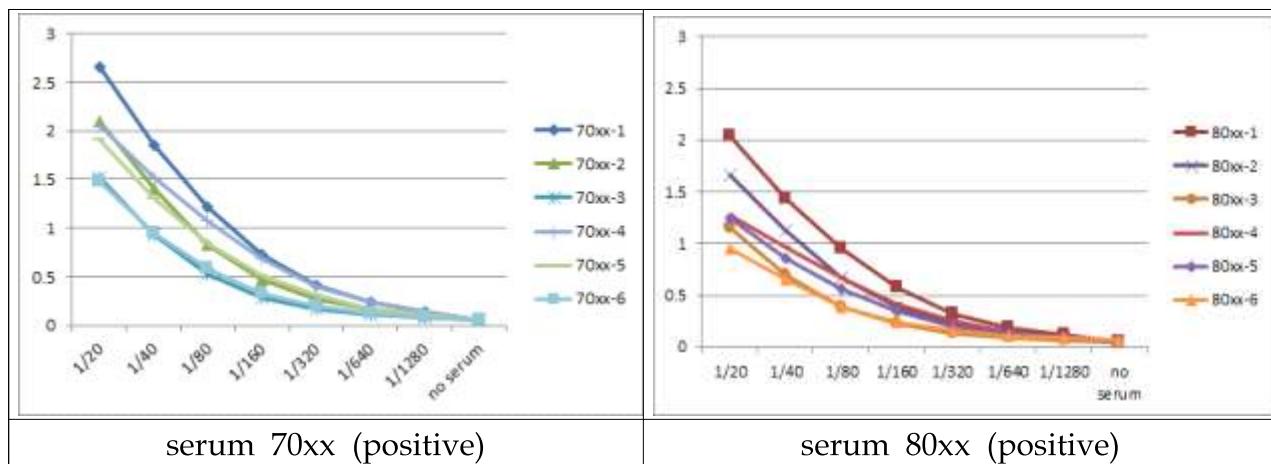


Figure 47. Blocking agent 및 diluent의 농도별 ELISA non-specific binding 측정

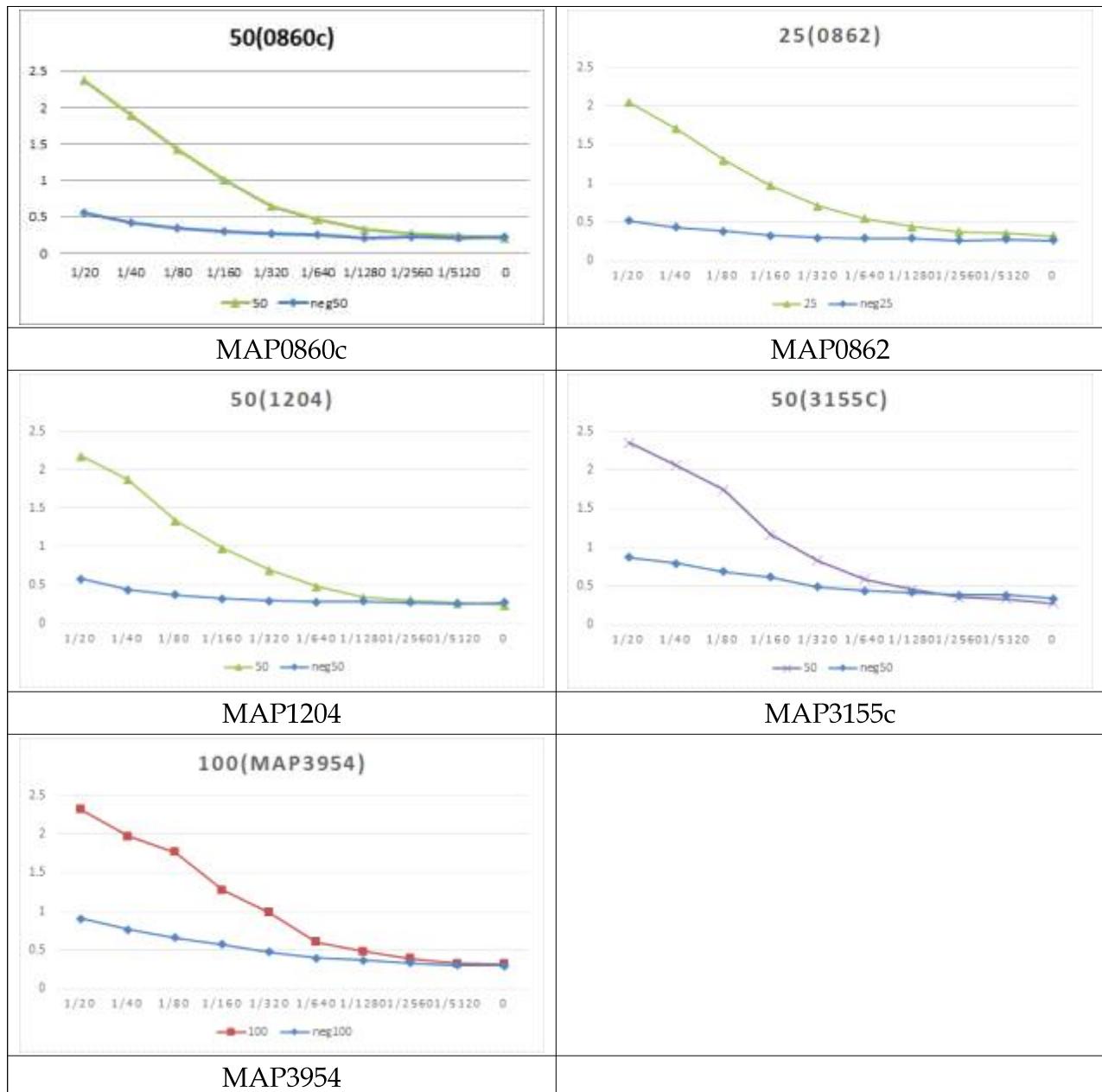


Figure 48. 항원 후보 단백질들의 ELISA checkerboard titration.

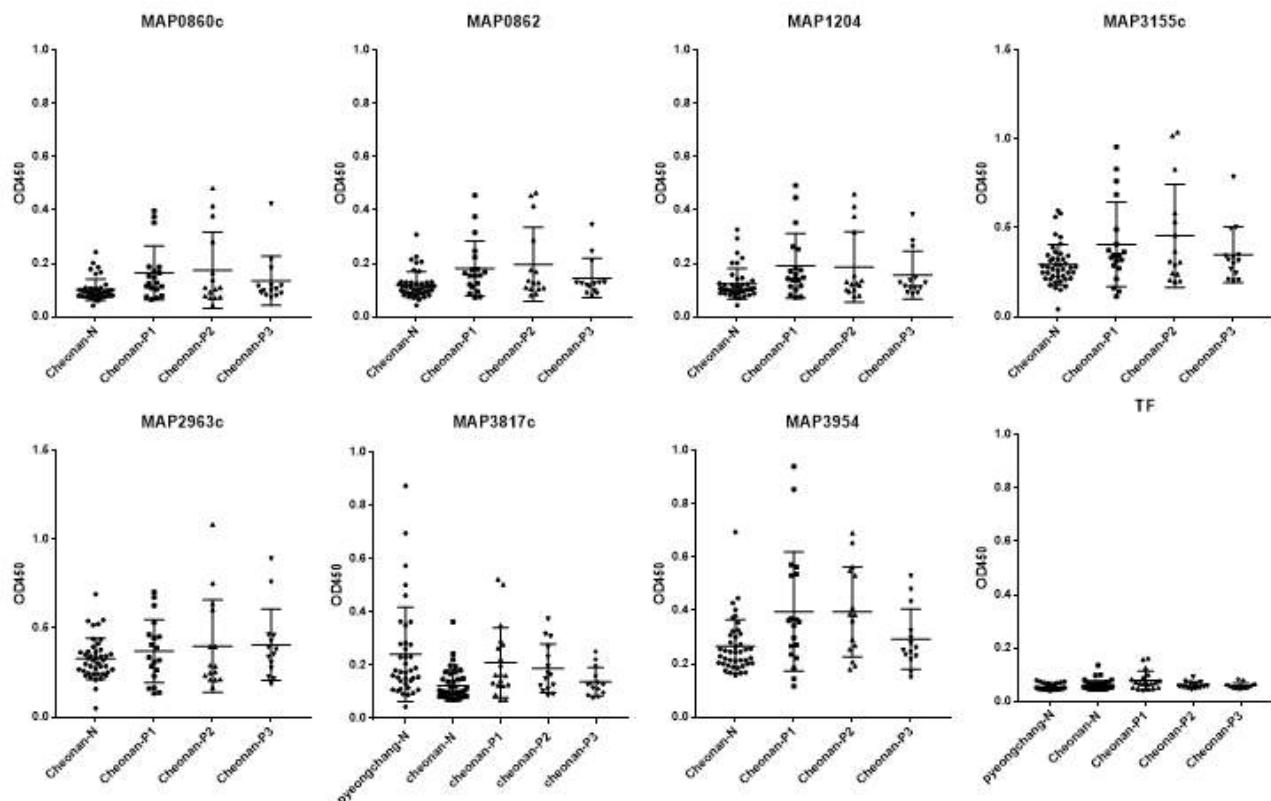


Figure 49. 요네병 감염우의 감염 단계별 그룹에 따른 재조합 항원 단백질의 반응성 측정

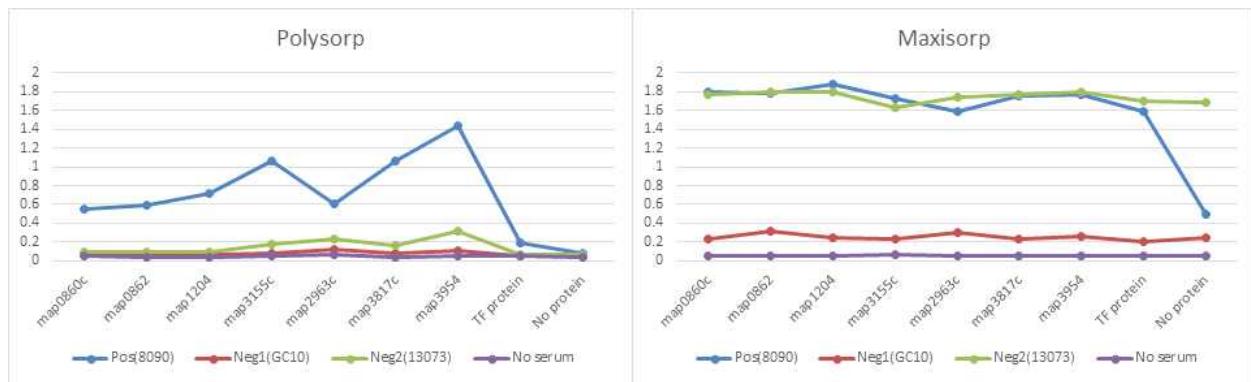


Figure 50. ELISA plate 코팅상태에 따른 혈청 비특이반응 측정.

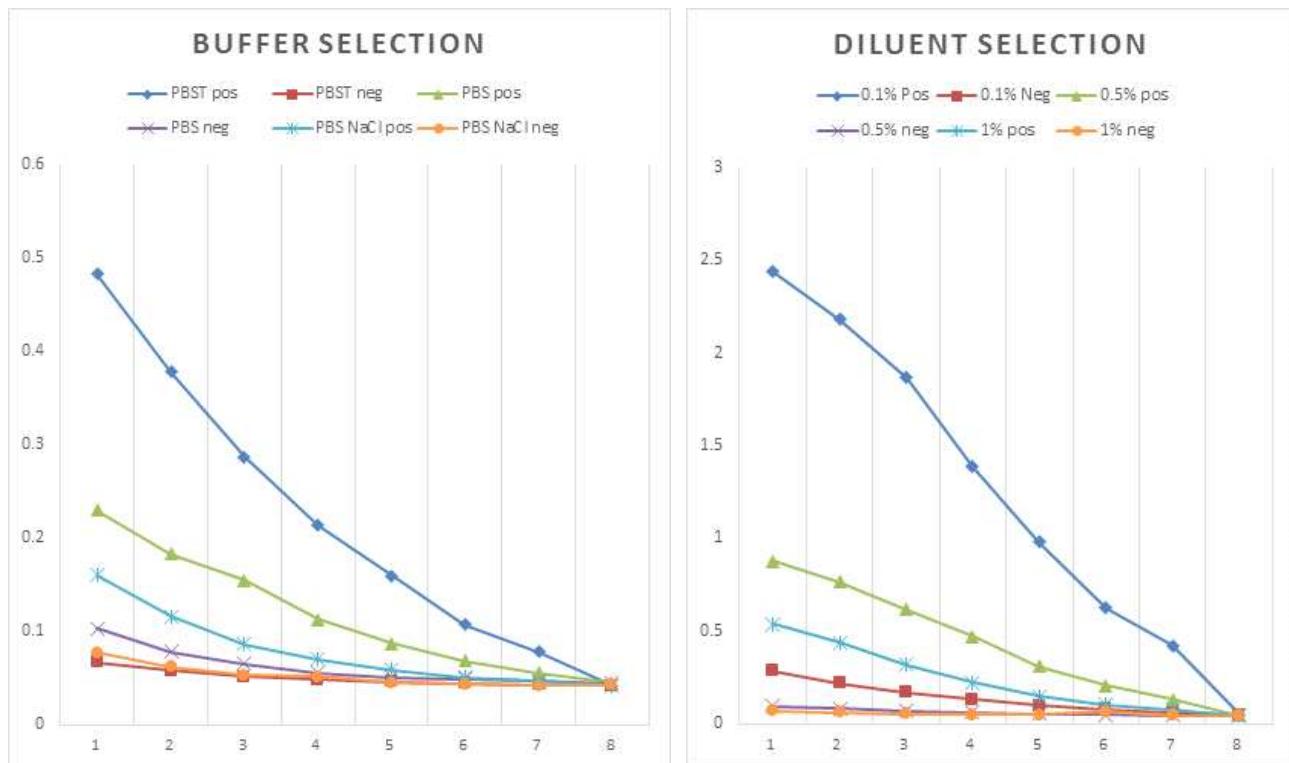


Figure 51. ELISA 조건 최적화를 위한 blocking agent 및 diluent 조성 결정.

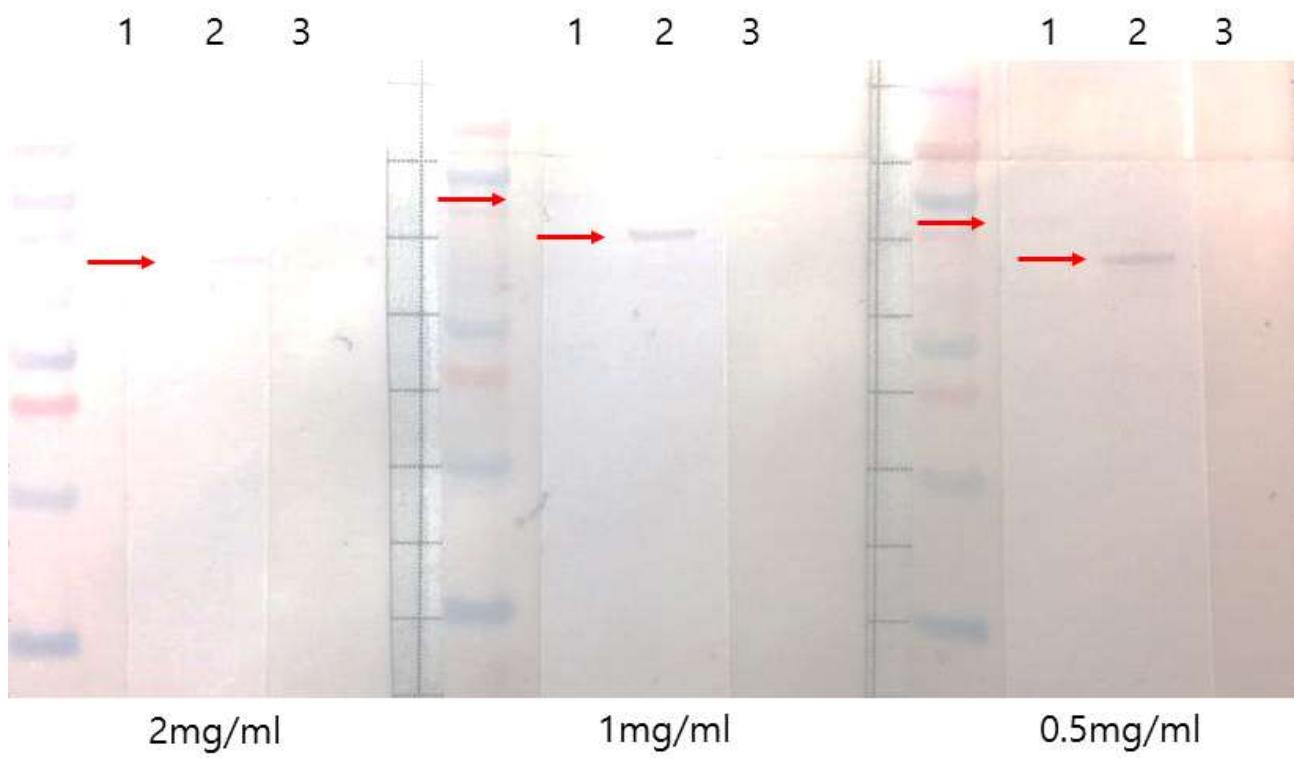


Figure 52. Vector control의 혈청과의 pre-absorption 농도에 따른 재조합 항원단백질의 반응성 측정. 1: map0862, 2: map3817c, 3: trigger factor (TF) protein.

## (5) 재조합 항원 단백질을 이용한 ELISA 기법 개발

앞서 설정한 조건을 이용하여 각 항원후보단백질에 대한 반응성을 측정하였다. 사용된 항원의 개수는 총 7개 (MAP0860c, MAP0862, MAP1204, MAP2963c, MAP3155c, MAP3817c, MAP3954)였으며 혈청은 임상증상을 나타낸 소의 혈청 4개, 분변 PCR 또는 절취에서 양성을 나타낸 소의 혈청 33개, 음성을 나타낸 샘플 30개의 총 67개의 샘플이 이용되었다. ELISA 방법은 앞서 설정한 조건을 그대로 이용하여 수행되었다. Polysorp plate가 사용되었으며 항원의 코팅 농도는 200ng/well로 설정하였다. Blocking agent는 1% casein이 함유된 PBS-T (0.05% Tween-20)을 이용하여 2시간 동안 수행하였으며 0.2%의 casein in PBS-T (0.05% Tween-20)을 diluent 조성으로 결정하였다. 혈청희석배수는 1:20으로 결정하고 vector lysate와 실온에서 1 시간 동안 pre-absorption 한 후 반응에 사용되었다. 2차 항체는 1:5000 농도의 Rabbit anti-bovine IgG를 이용하였다. 각각의 항원-항체 반응은 1시간 동안 수행되었고 마지막 washing 후 TMB에서 10분간 발색한 후 stop solution 반응하였고 450nm에서 OD값이 측정되었다.

각각의 항원과 그룹별 혈청 샘플간의 유의적인 차이가 있는지가 Welch's t-test를 통해서 검정되었고 (Figure 53), 각각의 항원에 대한 반응성 정도를 Receive operating characteristic (ROC) curve 분석을 통해서 확인하였다 (Figure 54). Area under the curve (AUC) 수치는 MAP0862와 MAP3817c에서 각각 0.680과 0.683으로 가장 높게 나왔으며, 각각의 음성샘플 OD값 평균에서 표준편차의 2배를 더한 cut-off value 값을 통해 각각 항원후보단백질의 진단 민감도와 특이도가 분석되었다 (Table 45). 그 결과 각각 항원의 진단 민감도는 IDEXX ELISA kit의 진단 민감도 (54.1%)보다 낮았으나 MAP0860c, MAP0862, MAP3817c에서 각각 나타낸 양성샘플을 합쳐서 계산한 민감도는 kit와 비슷하였다 (Figure 55). 또한 kit에서 음성으로 진단된 양성 샘플 3 개에서 양성으로 나타나는 등 kit가 진단할 수 없는 샘플을 진단할 가능성도 가지고 있는 것으로 생각된다.

결론적으로 위의 세 가지 항원의 조합에서 추가적으로 민감도가 높은 항원을 찾아낸다면 kit보다 높은 민감도를 가지는 ELISA 진단법을 확립할 수 있을 것으로 생각된다.

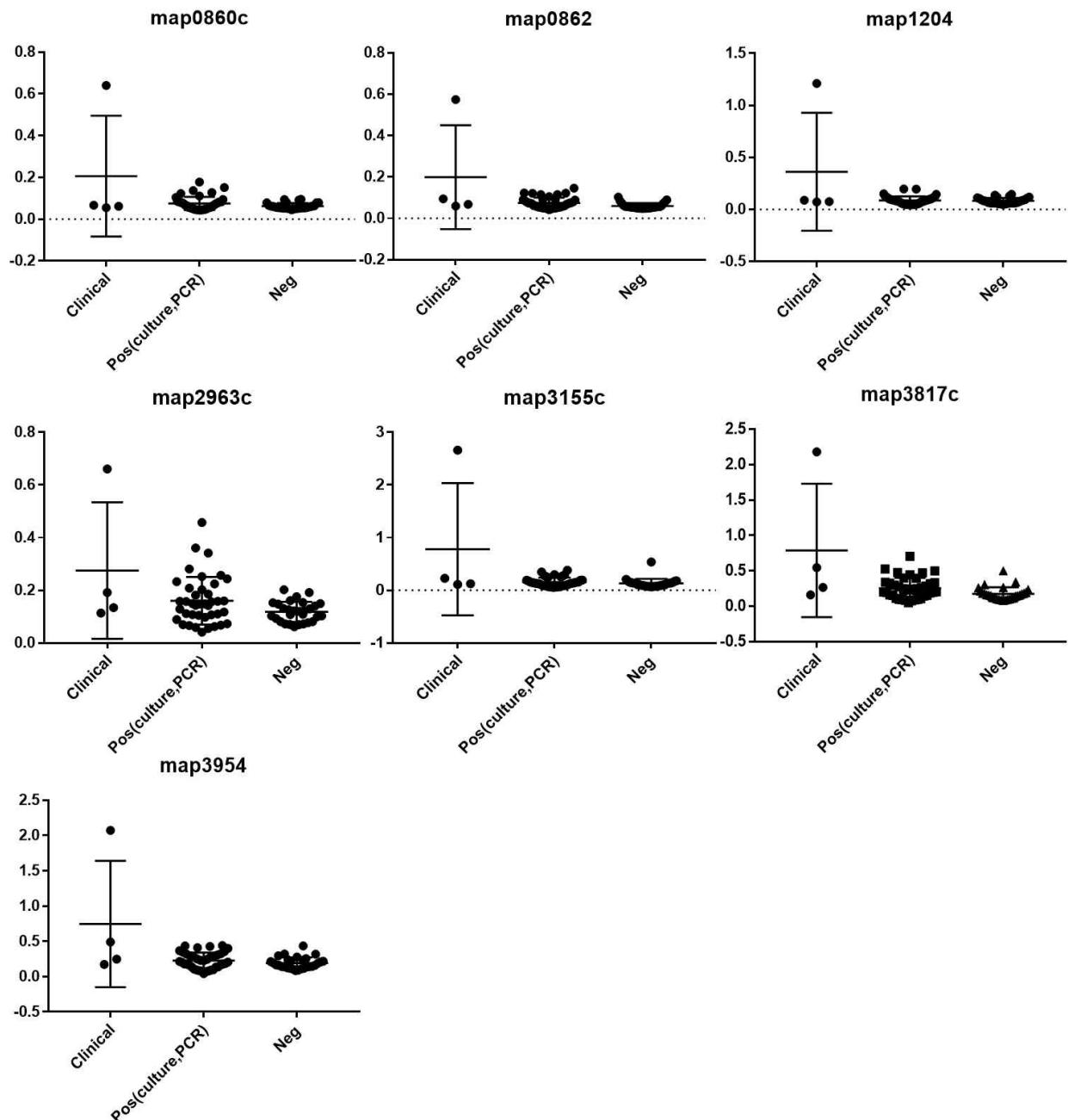


Figure 53. Scatter plot of OD values obtained for recombinant proteins when reacted with sera from clinical, positive and negative cattle. Y-axis is the value of OD<sub>450nm</sub>. \*Mean OD of sera from positive groups are significantly higher than those from the negative groups (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01).

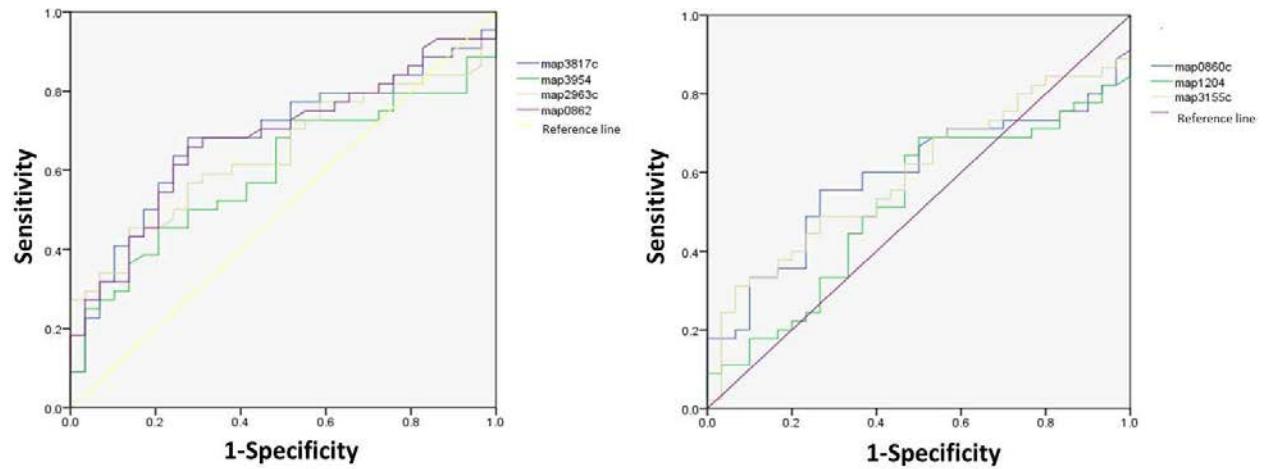
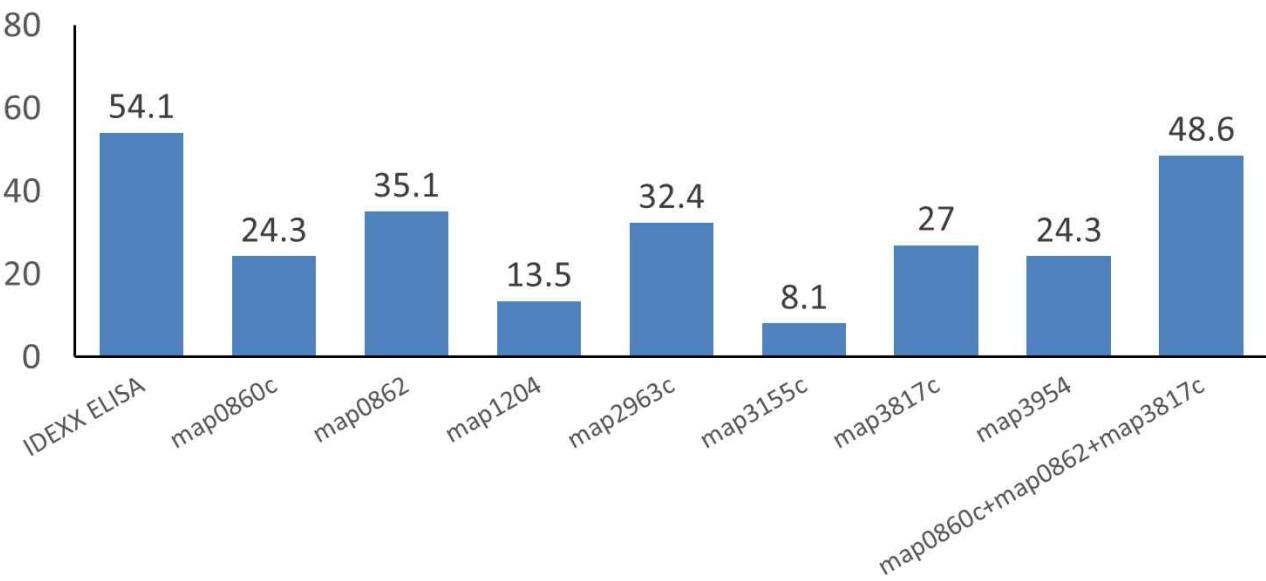


Figure 54. Receiver-operating characteristic (ROC) curves of antigen candidates.



**Figure 55.** Percent-positive results of ELISA given by the sera against each of the antigen candidate. Note that the statistical combination of the three antigen candidates expresses similar extent of percent-positive as the commercial ELISA (IDEXX) kit.

Table 45. Area under the curve (AUC) value of the each antigen candidate and the percentages of sensitivity and specificity using the cut-off values calculated by mean $\pm$ 2SD.

Antigen	Area Under the Curve (AUC)	Cut-off value (mean $\pm$ 2SD)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
MAP0860c	0.589	0.0908	24.3	90.0
MAP0862	0.680	0.0878	35.1	93.3
MAP1204	0.517	0.1381	13.5	96.7
MAP2963c	0.643	0.1946	32.4	100.0
MAP3155c	0.594	0.3029	8.1	100.0
MAP3817c	0.683	0.3594	27.0	96.7
MAP3954	0.597	0.3558	24.3	96.7

## 5. *M. paratuberculosis*의 국내 분리주 확보 및 특성 분석

### 가. 균분리, 동정기법 및 검색기법 개발 및 확립

#### (1) 분변 샘플에서 DNA extraction 기법 확립

분변으로부터 높은 sensitivity로 *M. paratuberculosis*를 검출할 수 있는 DNA extraction 기법인 mGITC/SC 법을 확립하였다. 분변 250mg을 1ml의 L6 lysis buffer(5.25 M GuSCN, 50 mM Tris-HCl (pH 6.4), 20 mM EDTA, 1.3% Triton X-100, distilled water)에 섞고 95°C에서 15분간 incubation. 13,000 × g에서 2분 간 원심분리 후 상층액 300μl를 700μl의 L6 lysis buffer가 담겨있는 새로운 1.5ml tube에 옮기고 70°C에서 5분간 incubation. 250μl의 100% Ethanol을 첨가하여 56°C에서 5분간 incubation 후 DNA Spin column(EPOCH Biolab, Sugarland, TX)에 옮겨 13,000 × g에서 30초간 원심분리. 700μl의 L2 washing buffer(5.25 M GuSCN, 50 mM Tris-HCl, distilled water)와 70% Ethanol로 washing한 후 40μl의 nuclease-free water로 추출하였다.

#### (가) 새로운 DNA extraction 기법(mGITC/SC)의 PCR sensitivity 확인

Specificity와 sensitivity가 높은 새로운 IS900 real-time PCR primer를 선정하여 Ravva and Stanker (2005)에 의해 개발된 probe를 이용한 real-time PCR 기법을 확립하였다 (Table 46). Negative 분변 샘플 250mg에 *M. paratuberculosis* ATCC19698 균주를  $1.5 \times 10^6$  CFU부터 0.15 CFU 까지 10진 희석하여 spiking. mGITC/SC 법으로 DNA extraction 한 후 IS900 real-time PCR에서 검출 가능한 최소 CFU를 측정하였다. IS900 real-time PCR 결과 Ct값이  $18.9 \pm 0.43$ 에서  $38.3 \pm 0.1$ 의 범위로 나타났고 검출 가능한 최소 균 수는 1.5 CFU로 측정되었다 (Figure 56).

Table 46. Nucleotide sequences of IS900 real-time PCR primers

Name	Primer sequences(5'-3')	References
SF214	ATGACGGTTACGGAGGTGGTT	Ravva and Stanker (2005)
SR289	TGCAGTAATGGTCGGCCTTAC	
PR265	FAMCGACCACGCCGCCAGATAMRA	

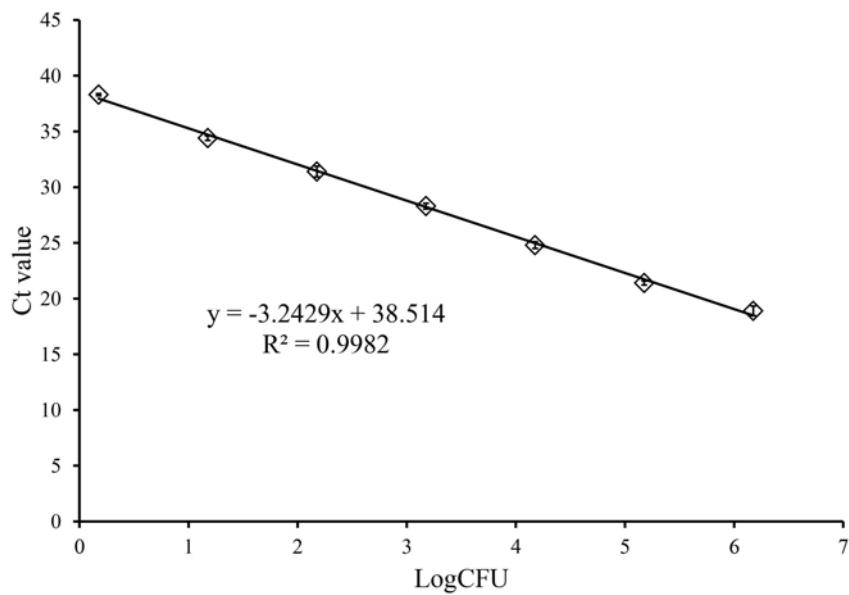


Figure 56. The detection limit and amplification efficiency of mGITC/SC in MAP-spiked fecal samples.  $C_t$  values are the average of 3 independent experiments.  $R^2$  (the coefficient of determination) are indicated on the graph

## (2) 균 분리 및 동정기법 확립

### (가) 요네균 배지 및 배양기법 확립

동물 접종용 표준주의 배양은 7H10 배지에 0.24% glycerol, 0.05% Tween 80, 1.2mg/ml casitone(BD), 1.25mg/l mycobactin J, 5% BACTEC MGIT supplement, 10% Middlebrook OADC Enrichment 와 Egg yolk 250 ml를 추가하여 37°C에서 배양하였다. 동물접종용 균수의 측정은 PBS 을 이용하여 10진 희석한후 mycobactin J, amphotericin, nalidixic acid, vancomycin 이 첨가된 Herrold's Egg Yolk Agar Salnt 에 접종한 후 37°C에서 12 주 동안 배양한 후 접락수를 측정하여 계산하였다. 요네균 배양 및 진단 기법 확립과 동물모델 개발에 이용하기 위해 여러 연구를 통해서 그 특성이 잘 알려진 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain ATCC 19698 확보하였고, 또한 국내 야외 분리균주는 국내 농장에서 소 요네병의 임상 증상을 나타내는 개체, 혈청학적으로 양성인 개체, PCR 진단 기법으로 양성인 개체의 분변에서 분리 및 동정하였다.

### (나) 분변 및 우유 샘플 처리법 확립

요네균 분리를 위한 소 분변 처리방법으로 sedimentation, centrifugation, cornell, 그리고 NADC methods가 알려져 있으며, sensitivity는 NADC method보다 낮지만 오염이 제일 낮은 cornell method를 선택하였다. 소 분변 2 g을 35 ml PBS와 균질하게 혼합한 후 실온에 30분간 정치하고 상층액 5 ml을 취해서 0.9% hexadecylpyridium chloride (HPC)가 들어 있는 BHI broth에 첨가하여 37 °C에서 18~24시간 배양하고, 배양후 3,000×g로 20분간 원심 분리하여 상층액을 버린 후 침전물에 1 ml 의 antibiotic brew 을 첨가한 후 37 °C에서 72시간 배양한 후 150 μl을 취하여 첨가된 HEY 배지에 접종 후 37 °C에서 6~8 주간 배양하였다.

### (다) MAP 분리 및 동정을 위한 분변 전처리 과정 비교 분석

3 가지의 분변 전처리 방법을 선택하여 이를 MAP의 10-fold dilution 희석액들을 spiking한 분변을 이용하여 전처리 실시 후 최종 처리액을 HEYM 배지에 접종하여 각각의 전처리법의 효율을 비교하였다. 각각의 전처리 방법을 이용하여 분변에 spiking한 표준주를 배양한 결과 세 방법 모두 4주차부터 colony가 확인 되었다. 6주차 까지 배양하며 colony 개수 및 오염 유무를 확인함으로써 각각의 분변 전처리방법의 효율성을 비교하였다 (Figure 57). 그 결과 centrifugation과 NADC 방법간 colony 숫자의 차이는 적었으나, NADC 방법에 걸리는 시간이 centrifugation 방법에 비해 하루가 더 소요되었기 때문에 세 가지 분변 전처리과정 비교 결과 centrifugation 방법이 가장 효율이 높은 것으로 판정되었다 (Figure 58).

### (라) Versa-TREK Para-JEM system

요네병균의 분리 및 동정을 위한 새로운 시스템이 도입되었다. Versa-TREK Para-JEM system은 균이 소모하거나 생성하는 모든 종류의 가스 ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2$ ,  $N_2$  등)를 측정함으로써

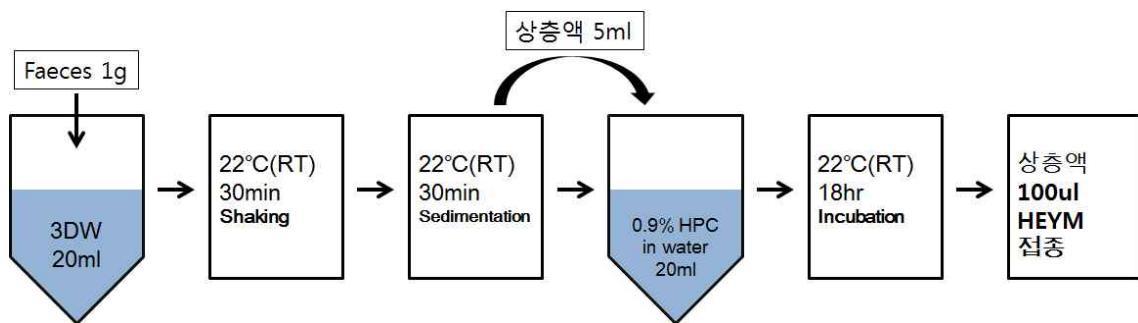
요네병균이 성장하면서 나타내는 특이적인 가스분압을 검출하여 양성여부를 판정하는 시스템으로, 기존의 배양법은 8~16주간의 배양 기간이 필요하였으나 본 system에서는 최소 6주의 배양시간을 통해 균의 동정이 가능하고 컴퓨터를 통한 실시간 모니터링으로 신속한 결과 확인이 가능한 장점이 있다.

VersaTREK Para-JEM system을 이용한 분변의 배양방법은 다음과 같다. Modified cornell method를 이용해 분변시료를 전처리한 후 Para-JEM broth에 준비된 GS, EYE, AS 접종한다. 이후 1ml의 검체를 Para-JEM broth에 접종하고 vortexing한 후 connector에 연결하여 VersaTREK 장비에서 배양한다. 배양을 통해 양성을 나타낸 샘플은 요네균 특이적인 유전자인 IS900 real-time PCR 및 ISMAP02 nested PCR을 이용하여 confirmity test를 거친 후 modified HEYM 배지에 계대배양하여 최종 분리 및 동정하였다.

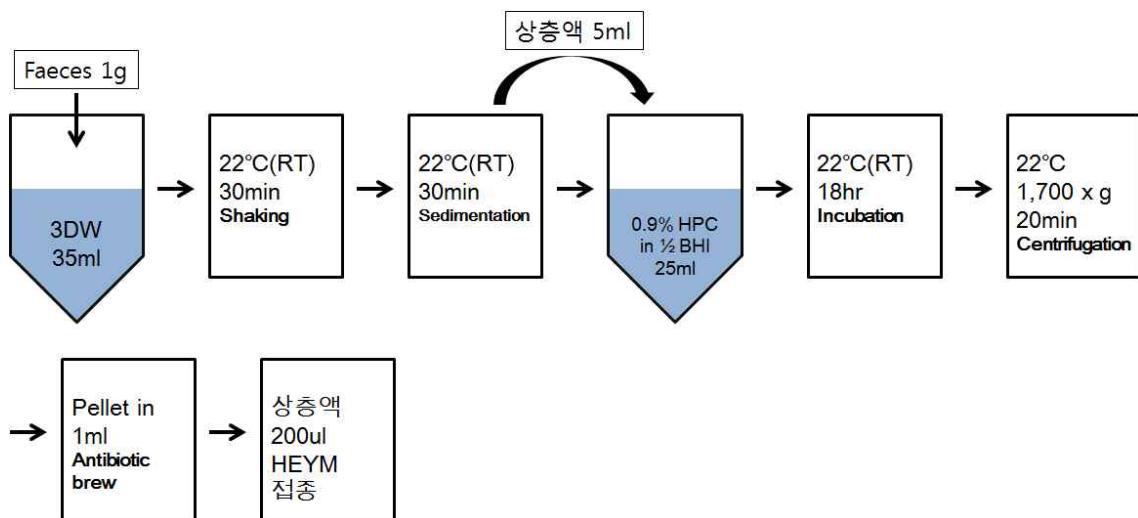
(마) 분변의 요네균 검색법 및 분리 동정기법을 활용한 국내 분리주 확보

분변을 이용한 PCR 검진을 통하여 MAP에 양성인 샘플들을 확립된 균 분리 동정 및 배양법을 이용하여 야외 분리주를 확보하였다 (Table 47). 현재까지 분변 및 조직 샘플로부터 총 19주의 야외 분리주를 확보하였으며 주기적인 분변 PCR 검진 및 균 배양을 통해 지속적으로 야외 분리주 확보 중에 있다.

### <OIE sedimentation>



### <Centrifugation>



### <NADC>

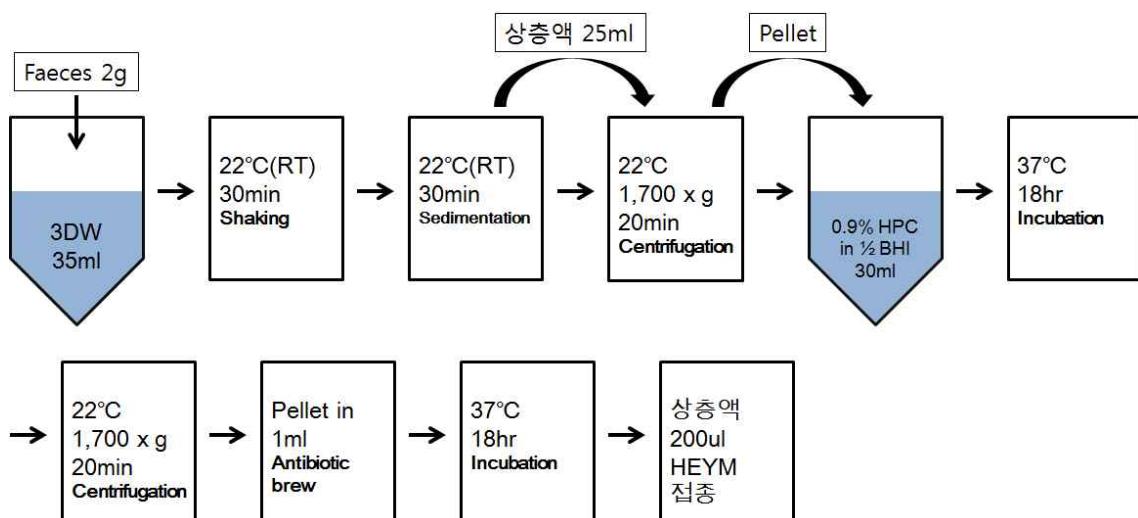


Figure 57. 도식화 한 세 가지 방법의 분변 전처리 과정

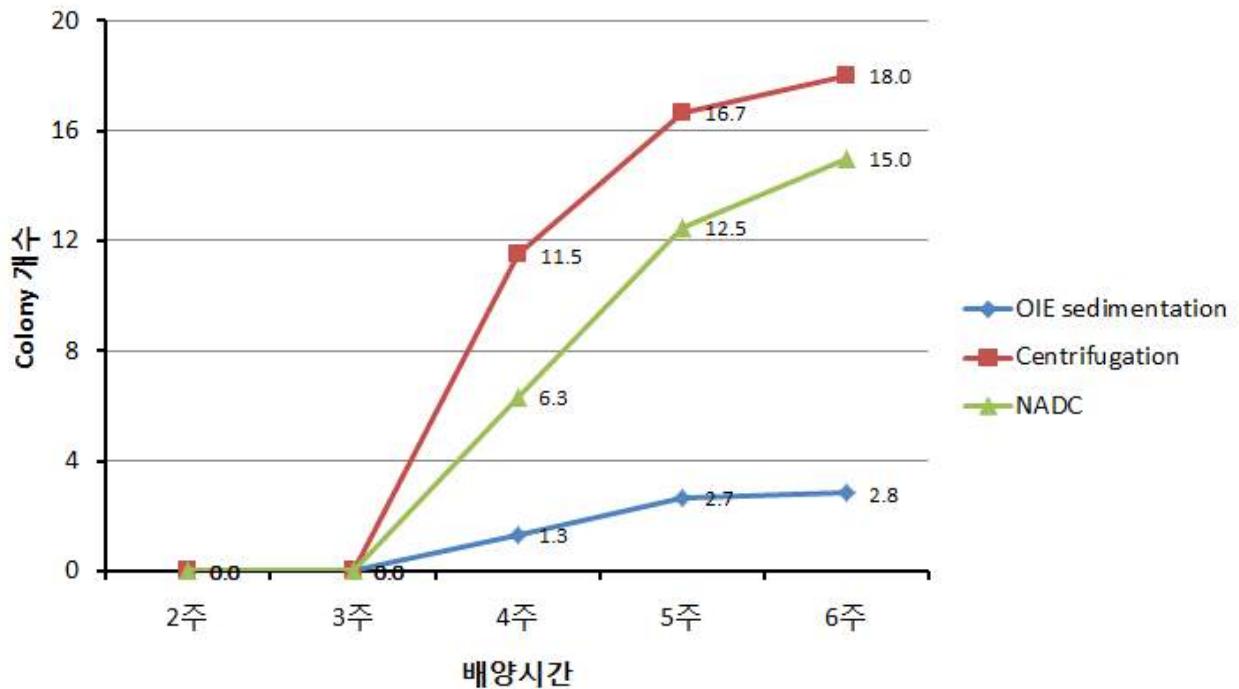


Figure 58. 전처리방법에 따른 배양 시간별 colony 개수 비교



Figure 59. 세 가지 전처리 방법을 이용하여 배양한 MAP 표준주의 colony

<VersaTREK para-JEM system을 이용한 요네균 분리>



Figure 60. VersaTREK Para-JEM system을 이용한 요네균 분리

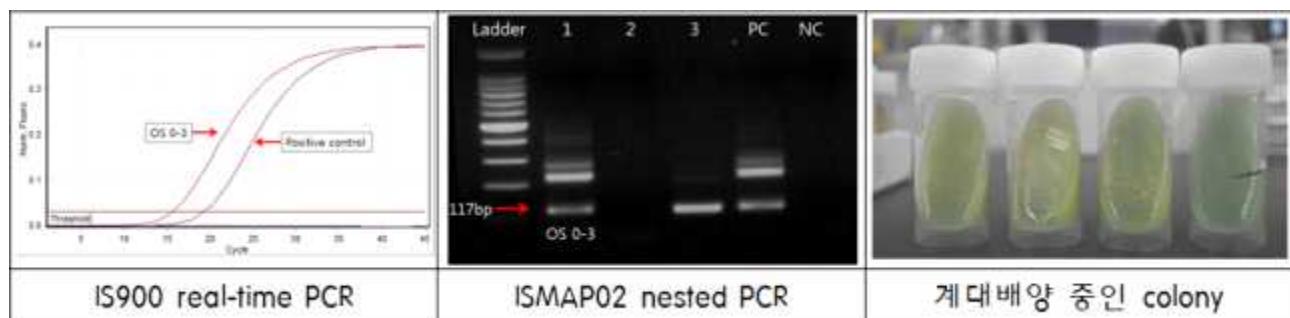


Figure 61. VersaTREK Para-JEM system에서 양성을 보인 샘플의 confirmity test 및 modified HEYM slant에서의 계대배양

Table 47. 국내 야외 분리 MAP 분리주 확보 현황

번호	개체번호	지역	농장명	분리검체	비고
1	02x	제주	A	분변	
2	5	"	B	"	
3	JJ9xx	"	C	"	
4	60xx	충남	S	조직	
5	60xx	"	"	"	
6	61xx	"	"	분변	
7	70xx	"	"	"	
8	80xx	"	"	"	
9	81xx	"	"	"	
10	90xx	"	"	"	
11	100xx	"	"	"	
12	100xx	"	"	"	
13	100xx	"	"	"	
14	110xx	"	"	"	
15	70xx	"	"	"	
16	Gum2-x	"	"	축사환경	
17	B01x	전북	N1	분변	
18	B01x	"	"	"	
19	C00x	"	N2	"	

## 나. 소 사육농장에서 요네병 발생 실태 조사

### (1) 전국단위 소 농장에서 요네병 발생 실태 분석 (2013, 2014)

분변 PCR 기법을 이용하여 전국단위 농장에서의 요네병 발생 실태를 축종 및 농장별, 연령별로 분석하였다 (2013.09~2014.08). 총 1562 샘플을 대상으로 한 PCR 검진 수행 결과 IS900 유전자를 target으로 하는 PCR은 73두 (4.7%)에서 양성을 나타내었고 ISMAP02 PCR에서는 53두 (3.4%)에서 양성을 나타내었으며 두 target 모두에서 양성이 나온 최종 양성 판정 샘플은 35두 (2.2%)였다 (Table 48). 농장단위 결과로는 총 37개 농장 중 12개 농장에서 양성을 나타내어 32.4%의 양성율을 나타내었다 (Table 48). 과거의 연구에서 seroprevalence가 Bayesian approach를 통해 7.1%로 추정되었고 (Pak et al., 2003), 경남지역의 seroprevalence는 3.3%로 추정되었는데 (Lee et al., 2009) 본 실험결과는 이와 유사한 양성율을 나타내었다. 국내에서 농장단위의 양성율은 조사된 바가 없지만 경남지역의 농장 양성율과 비교했을 때 젖소농장의 양성율은 41.7%로 거의 비슷하게 나왔고 한우농장에서의 양성율 (28.0%)은 경남지역 한우농가에 비해 훨씬 높은 수치를 나타내었다. 양성축들의 연령분포를 분석한 결과 4년령 이하의 양성개체가 전체 양성개체의 절반정도로, 요네병균이 아무런 증상 없이 분변으로 균을 배출하는 요네병의 병리기전과 유사한 현상을 나타냄을 확인하였다 (Table 49).

Table 48. Number of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in beef and dairy cattle and its herds

Species	No. of positive/tested (%)					
	Individual			Herds		
	IS900	ISMAP02	Both	IS900	ISMAP02	Both
Beef	60/982(6.1)	36/982(3.7)	<b>24/982(2.4)</b>	12/25(48.0)	9/25(36.0)	<b>7/25(28.0)</b>
Dairy	13/580(2.2)	17/580(2.9)	<b>11/580(1.9)</b>	5/12(41.7)	5/12(41.7)	<b>5/12(41.7)</b>
Total	73/1562(4.7)	53/1562(3.4)	<b>35/1562(2.2)</b>	17/37(45.9)	14/37(37.8)	<b>12/37(32.4)</b>

Table 49. Number of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in beef and dairy cattle divided on their ages

Species	No. of positive samples/tested (%)				
	Age distribution				
	≤2	3~4	5~6	≥7	unknown
Beef	6/326(1.8)	7/269(2.6)	2/113(1.8)	6/187(3.2)	3/87(3.4)
Dairy	2/87(2.3)	2/154(1.3)	2/105(1.9)	1/64(1.6)	4/170(2.4)
Total	8/413(1.9)	9/423(2.1)	4/218(1.8)	7/251(2.8)	7/257(2.7)

## (2) 전국단위 농장에서 분변 PCR 기법을 이용한 요네병 양성 개체 검색 (2015)

2013년 9월부터 2015년 7월 사이에 전국단위 소 사육농가에서 개체별로 채취한 분변을 이용하여 PCR 진단을 수행하였다 (Table 50, 51). 2015년 4월과 6월 강원도 소재의 젖소 사육농장을 대상으로 요네병 PCR 검진 (2개 농장 총 118두) 및 제주지역 요네병 의심 검사의뢰축 검진 수행하였으며 (1두) 검진 결과 전 두수 음성의 결과를 보였다 (Table 52). 현재 전국단위의 소 농장에서 지속적으로 분변 샘플 확보하여 PCR 통한 요네병 검진 및 국내 분리 야외주를 확보 중에 있다.

Table 50. 지역별 양성 농장 수 (2013.09~2015.07)

	경기	강원	충청	경상	제주	합계
농장수	13	6	13	1	10	43
양성농가수	4	2	6	0	2	16
백분율(%)	30.8	50	46.2	0.0	30	37.2

Table 51. 지역별 양성 개체 수 (2013.09~2015.07)

	경기	강원	충청	경상	제주	합계
개체수	271	913	984	46	105	2319
양성개체수	4	17	17	0	6	44
백분율(%)	1.5	1.9	1.7	0.0	5.7	1.9

Table 52. 강원 지역 젖소 농장 요네병 분변 PCR 검진 (2015)

	No. of positive/tested		
	IS900	ISMAP02	Both
Herd A	0/79	0/79	0/79
Herd B	0/39	0/39	0/39
Total	0/118	0/118	0/118

### (3) 대규모 젖소 사육농장에서 요네병 발생 실태 조사

2014년 상반기 및 하반기, 2015년 상반기와 하반기 총 4회에 걸쳐 대규모 젖소 사육농장의 소 전 두수를 대상으로 분변을 채취하여 PCR 검사를 실시하였다. 2014년 상반기 검진에서 총 284두 중 5두 양성(1.76%)으로 나타났고 하반기 검진에서는 총 277두 중 4두 양성(1.44%)으로 나타났다. 2015년 상반기 검진에서 총 308두 중 3두 양성(0.97%)으로 나타났고 하반기 검진에서는 총 210두 중 2두에서 의양성의 결과만 나타났다 (Figure 62). 따라서 본 농장에서 요네병의 발생율이 점차적으로 줄어들고 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

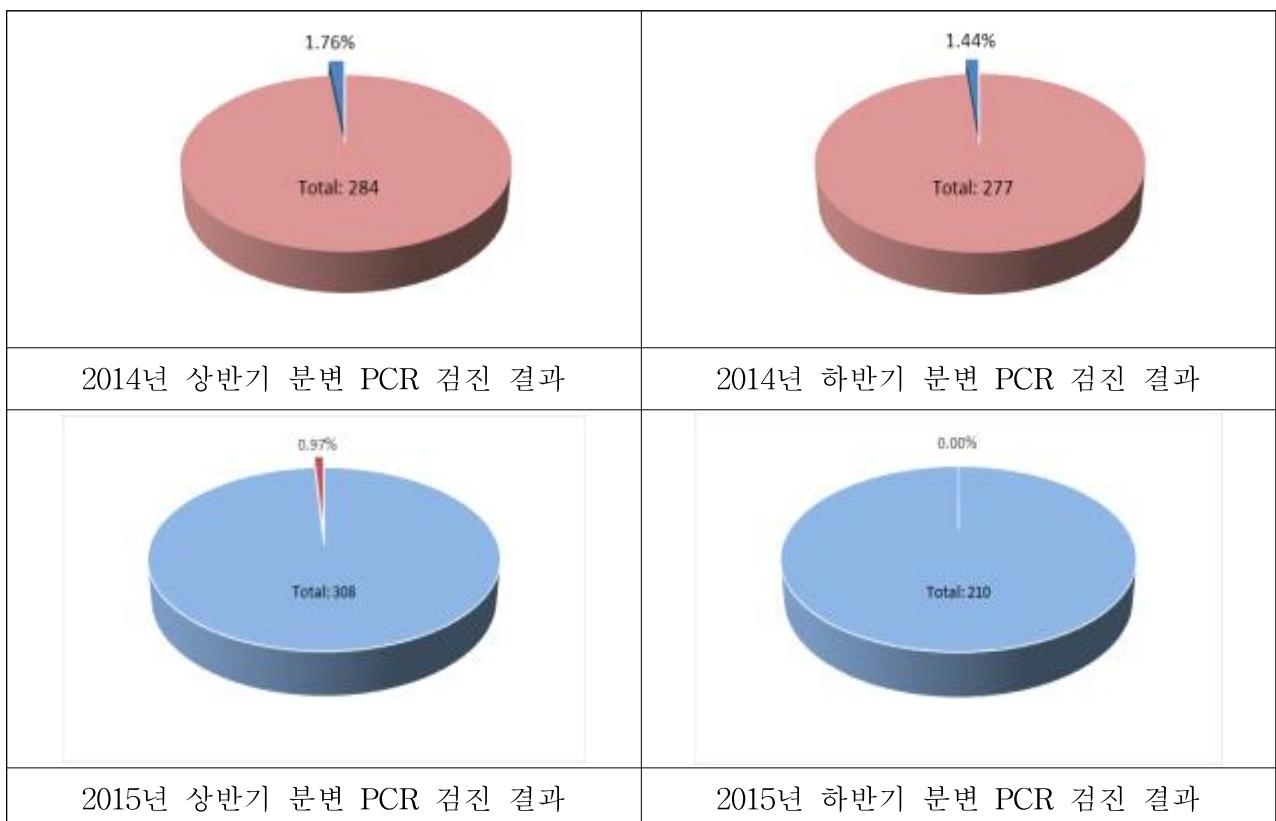


Figure 62. 대규모 젖소 사육농장의 2015년 분변 PCR 검진 결과

## 다. 국내 분리주의 역학적 특성 분석

### (1) IS1311 PCR-REA

소에서 분리된 야외 분리주 19주 및 해외에서 분양받은 야외 분리주 8주를 이용하여 IS1311 PCR-REA 분석을 실시하였다. 모든 분리주에서 IS1311 PCR 양성을 확인하였고 HinfI restriction enzyme 처리하여 밴드 분석 결과 Cattle type 과 Bison type 균주를 확인하였다 (Figure 63).

### (2) MIRU-VNTR

국내 야외 분리주들의 다양성을 조사하기 위하여 mycobacteria의 molecular typing<sup>o</sup>에 사용되는 MIRU-VNTR 방법을 수행하였다. 특히 한 농장 (대규모 젖소사육농장)에서 2 가지 type (Cattle, Bison)의 균주가 분리됨에 따라 농장 내에서의 감염 균주의 다양성 조사 필요성이 존재하였다. 8가지의 MIRU 및 VNTR sequence를 PCR 기법을 이용하여 반복된 sequence의 개수를 살펴봄으로써 각 야외주들의 유전적 다양성을 확인하였다 (Table 53, 54). MIRU-VNTR typing은 <http://mac-inmv.tours.inra.fr/index.php>에서 제공하는 MIRU-VNTR의 표준화 된 실험방법을 이용하여 수행되었으며 해당사이트에서 제공하는 database를 이용하여 각 균주의 type을 확인하였다. 실험 방법은 야외 분리주의 DNA 확보 (colony PCR) 후 각각의 target에 대한 PCR 조건을 설정하고 PCR 수행하여 2%의 agarose gel separation을 수행하였다. PCR size에 따른 특이서열의 반복 횟수를 계산한 후 database와 대조하여 INMV type 결정되었다 (Figure 64).

분리주에 대하여 MIRU-VNTR typing 수행한 결과 국내 분리주는 두 가지 type으로 나타났으며 체코와 호주에서 분양받은 분리주 샘플에서는 세 가지 type<sup>o</sup> 확인되었다 (Table 55). Typing 결과 국내 분리주 중 IS1311 PCR-REA typing에서 Cattle type으로 분류되었던 야외 주는 모두 INMV 2 type으로 나타났고 Bison type으로 분류되었던 야외주는 모두 INMV 68 type으로 나타났다. INMV 2 type은 가장 많은 비율을 차지하는 type으로 K-10 및 MAP ATCC19698 등의 표준주가 이에 속한다. INMV 68 type은 Bison type에서 특이적으로 나타난다는 보고가 있었다 (Sohal et al., 2014).

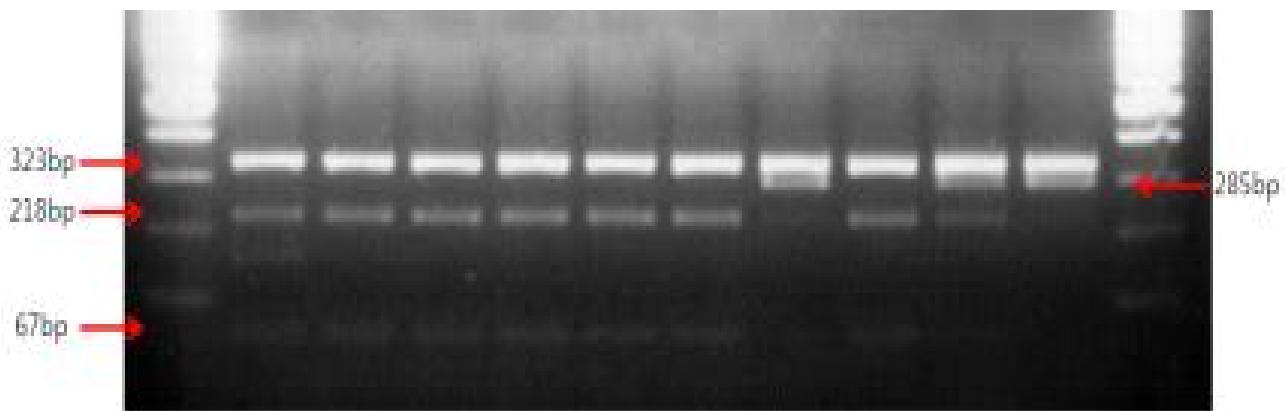


Figure 63. 국내 분리주의 IS1311 PCR-REA를 이용한 type 분석. Cattle type: 67, 218, 285, 323bp; Bison type: 67, 218, 323bp; Sheep type: 285, 323bp.

Table 53. MIRU-VNTR typing을 위한 primer sets.

TR	Forward	Reverse	Tm (°C)	Buffer used	
				DMSO	Betaine
292	CTTGAGCAGCTCGTAAAGCGT	GCTGTATGAGGAAGTCTATTGATG G	58	+	-
X3	AACGAGAGGAAGAACTAAGCC G	TTACGGAGCAGGAAGGCCAGCGGG	58	-	-
25	GTCAAGGGATCGCGAGG	TGGACTTGAGCACGGTCAT	58	+	-
47	CGTTGCGATTCTGCGTAGC	GGTGATGGTCGTGGTCATCC	64	+	-
3	CATATCTGGCATGGCTCCAG	ATCGTGTGACCCCAAAGAAAT	60	+	-
7	GACAACGAAACCTACCTCGTC	GTGAGCTGGCGGCCTAAC	60	+	-
10	GACGAGCAGCTGTCCGAG	GAGAGCGTGGCCATCGAG	60	-	+
32	CCACAGGGTTTTGGTGAAG	GGAAATCCAACAGCAAGGAC	55	+	+

Table 54. Theoretical size of PCR products.

	MIRU-VNTR								
No. Repeat (n)	292	X3	25	47	3	7	10	32	
PCR product (a)	0	141	94	176	112	154	159	193	154
	1	194	147	234	147	181	181	248	172
	2	247	200	292	182	208	203	303	190
	3	300	253	350	217	235	225	358	208
	4	353	306	408	252	262	247	413	226
	5	406	359	466	287	289	269	468	244
	6	459	412	524	322	316	291	523	262
	7	512	465	582	357	343	313	578	280
	8	565	518	640	392	370	335	633	298
	9	618	571	698	427	397	357	688	316
	10	671	624	756	462	424	379	743	334
	11	724	677	814	497	451	401	798	352
	12	777	730	872	532	478	423	853	370
Repeat size (b)	1	53	53	58	35	27	22	55	18
Flanking region* (c)	0	141	94	176	112	154	159	193	154

\* Size determined from genome MAP K-10

PCR product size (a) = n\*b + c

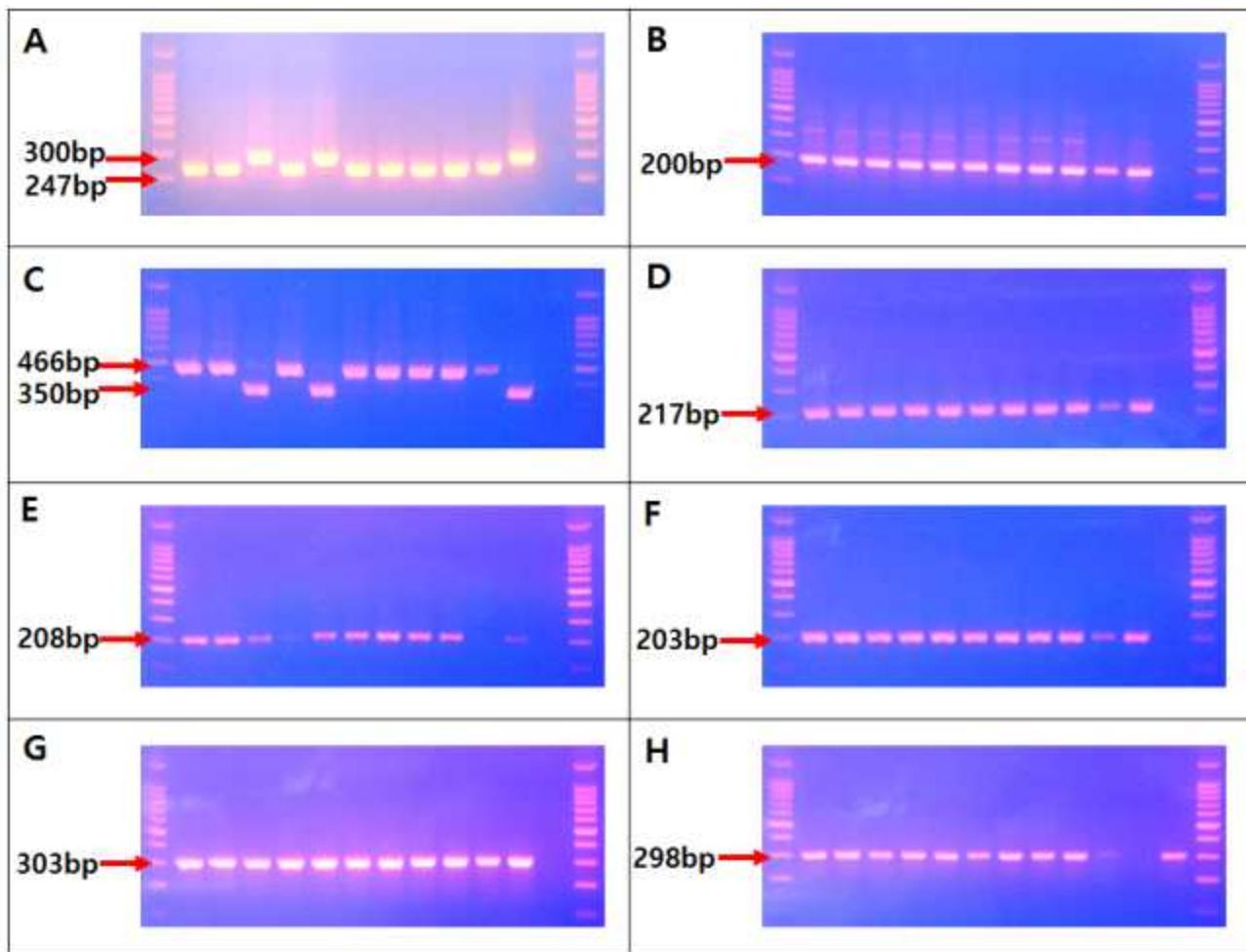


Figure 64. MIRU-VNTR typing을 위한 PCR product의 2% Agarose gel 전기영동. A: MIRU 292, B: MIRU X3, C: VNTR 25, D: VNTR 47, E: VNTR 3. F: VNTR 7, G: VNTR 10, 8: VNTR 32.

Table 55. 국내 분리주 및 해외 분리주의 IS1311 PCR-REA 및 MIRU-VNTR typing.

No.	Region	Farm ID	IS1311 PCR-REA	MIRU-VNTR (repeat number)								INMV type	
				292	X3	25	47	3	7	10	32		
1	Jeju	JJ-A	Bison	2	2	5	3	2	2	2	8	INMV68	
2		JJ-B	"	2	2	5	3	2	2	2	8	"	
3		JJ-C	"	2	2	5	3	2	2	2	8	"	
4			"	2	2	5	3	2	2	2	8	"	
5			"	2	2	5	3	2	2	2	8	"	
6			"	2	2	5	3	2	2	2	8	"	
7			Cattle	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV2	
8			Bison	2	2	5	3	2	2	2	8	INMV68	
9			Cattle	3	2	3	3	2	2	2	8	INMV2	
10		Chung-nam	CN-A	Bison	2	2	5	3	2	2	2	8	INMV68
11				"	2	2	5	3	2	2	2	8	"
12				"	2	2	5	3	2	2	2	8	"
13				"	2	2	5	3	2	2	2	8	"
14				"	2	2	5	3	2	2	2	8	"
15				"	2	2	5	3	2	2	2	8	"
16				"	2	2	5	3	2	2	2	8	"
17		Jeon-buk	JB-A	"	2	2	5	3	2	2	2	8	"
18				"	2	2	5	3	2	2	2	8	"
19				"	2	2	5	3	2	2	2	8	"
20				CZ-A	Cattle	4	2	3	3	2	2	2	8
21	Czech	CZ-B	CZ-C	"	4	2	3	3	2	2	2	8	"
22				"	4	2	3	3	2	2	2	8	"
23				"	4	2	3	3	2	2	2	8	"
24		Slovakia	SL-A	"	4	2	3	3	2	2	1	8	INMV5

### (3) MLSSR typing

Multilocus short sequence repeat typing (MLSSR)은 Amosin et al. 2004 논문에서 제시한 typing 방법으로 11개의 SSR(short sequence repeat)의 반복서열 개수를 sequencing 방법으로 확인하여 그 차이를 구분하는 방법이다. MIRU-VNTR typing 보다 Discriminatory Index가 더 높게 나타는 것으로 알려져 있다 (Douarre et al. 2011, Ricchi et al. 2009(ICP proceeding)). 국내에서 분리된 19주의 야외 분리주와 체코의 야외 분리주 5주, 호주의 야외 분리주 3주를 이용하여 MLSSR typing 수행하였다 (Figure 65). 27주의 분리주가 총 7가지의 type으로 구분되었고 한국과 호주, 체코의 분리주는 각각 다른 type으로 나타났다. 국내 분리주는 3가지 type, 호주는 1가지 type, 체코는 3가지 type으로 나타났다 (Table 57).

IS1311 PCR-REA, MIRU-VNTR, MLSSR 결과를 모두 종합한 결과 국내 분리주는 총 3가지 type으로 구분되었으며 그 중 Bison type, INMV68, Type3에 해당하는 분리주가 14주로 가장 많았다 (Table 57). 이를 통해, 해외의 소 유래 MAP의 주된 strain type이 아닌 비교적 분리된 사례가 적은 type의 strain이 국내에 특징적으로 분포함을 알 수 있었다. 향후 해당 strain의 세균학적 특성 분석을 통해 세포 구성 단백질 차이나 면역원성, 배양 특성, 생화학적 특성을 분석하여 국내 발생 요네병의 발생상황에 대한 보다 정확한 이해 및 효율적인 방역 대책 수립의 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

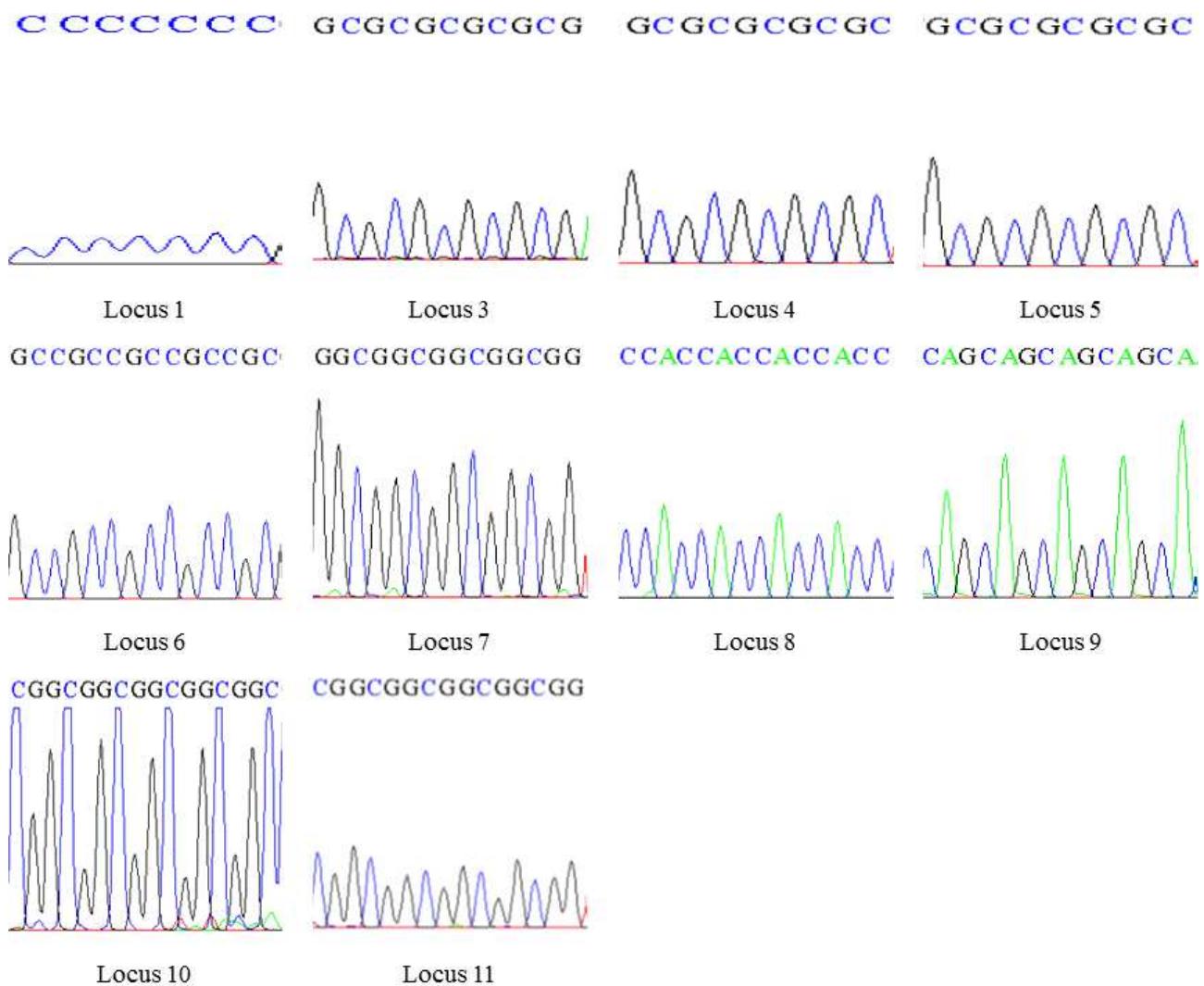


Figure 65. PCR 증폭산물의 sequencing을 통한 MLSSR 반복서열 확인. 각 locus 별 특이적인 반복서열의 개수를 확인하여 molecular type 구분.

Table 56. 국내 분리주 및 해외 분리주의 각 locus별 MLSSR 반복서열 개수 구분.

No.	MLSSR locus										
	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
2	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
3	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
4	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
5	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
6	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
7	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
8	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
9	14	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
10	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
11	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
12	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
13	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
14	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
15	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
16	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
17	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
18	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
19	7	5	5	5	4	4	4	4	5	5	
20	7	5	5	5	5	5	5	4	5	5	
21	7	5	5	5	5	5	5	4	5	5	
22	7	5	5	5	5	5	5	4	5	5	
23	7	5	5	5	4	6	4	5	5	5	
24	7	5	5	5	4	6	4	5	5	5	
25	7	5	5	5	4	5	4	4	5	5	
26	7	5	5	5	4	5	4	4	5	5	
27	7	5	5	5	4	6	4	4	5	5	

Table 57. 세 가지 molecular typing 방법을 이용하여 구분된 분리주들의 지역적인 분포

Country	Location	Herd ID	MLSSR	MIRU-VNTR	IS1311 PCR-REA	No. of isolates
Korea	Region 1	A	Type 1	INMV2	Cattle	1
			Type 2	INMV2	Cattle	1
			Type 3	INMV68	Bison	11
	Region 2	B	Type 3	INMV68	Bison	1
		C	Type 3	INMV68	Bison	1
		D	Type 3	INMV68	Bison	1
	Region 3	E	Type 3	INMV68	Bison	3
Australia	Region 4	F	Type 4	INMV2or36	Cattle	2
	Region 5	G	Type 4	INMV2or36	Cattle	1
Czech	Region 6	Unknown	Type 5	INMV1	Cattle	2
			Type 6	INMV1	Cattle	1
	Region 7	Unknown	Type 7	INMV1or2	Cattle	1
			Type 7	INMV5	Cattle	1

## 6. 현장 적용을 통한 소 요네병 박멸 프로그램 개발

### 국내 요네병 발생 상황 및 외국 방역사례를 통한 국내 방역에 대한 제언

#### 1. Introduction

요네병 (Johne's Disease)은 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)에 의한 반추류의 만성, 소모성 질병으로 감염 되면 긴 잠복기 후 만성의 설사로 쇠약, 급격한 체중감소 및 산유량 감소 등의 임상증상 발현 후 폐사하는 질병이다. 우리나라 뿐만 아니라 미국, 유럽 등 여러 나라에서 발생하고 있으며 생후 4개월 이내의 어린 송아지 시절에 주로 감염되어 긴 잠복기 (2~3년)를 거쳐 초기에 특별한 임상증상의 발현 없이 분변을 통해 다량의 균을 배출하여 주변 환경을 오염시켜 주요 오염원으로 작용한다. 분변으로 배출된 요네병균은 목장 내의 물, 사료, 우유 및 주위 환경을 오염시켜 목장 내에 지속적으로 감염이 발생되며 한번 질병이 발생된 목장에서 질병을 근절하기는 매우 어렵다. 특히 요네병균은 외부환경에서 높은 저항성을 가지고 있어서 오랫동안 생존할 수 있는 특성을 가지고 있어 한번 환경이 오염되면 근절이 매우 어렵다. 질병의 전파는 주로 분변에 오염된 음수, 사료 등의 섭취에 의한 경구 감염이나, 그 외에도 임신우를 통한 태반감염, 감염된 숏소와의 교미 또는 감염된 정액에 의한 감염 등 다양한 방법으로 이루어진다. 요네균의 감염은 크게 4단계로 나누어 볼 수 있는데, 1단계는 “잠복감염” 상태로 이 시기의 동물은 임상 증상을 전혀 보이지 않으며, 분변을 통해 균을 배출하지도 않는다. 2단계는 “준임상형” 상태로 1단계와 마찬가지로 임상 증상을 전혀 보이지 않지만 분변을 통해 균을 환경으로 배출하여 질병의 전파에 중요한 매개체로 작용한다. 특히 이 단계에서 대부분의 개체들은 혈청학적으로도 양성을 나타내지 않는다. 3단계와 4단계는 “임상형”, “진행된 임상형” 상태로 분변을 통한 다량의 균배출과 함께 만성적인 설사, 쇠약을 비롯한 전형적인 임상증상을 보이면서 죽음에 이르게 된다. 이러한 임상증상의 발현으로 요네병은 젖소와 육우에 있어서 산유량 감소, 성장률 저하 및 감염동물의 도태 등에 의한 많은 경제적인 손실을 유발하고 있다. 미국의 National Animal Health Monitoring System의 조사에 의하면 감염된 목장에서의 손실액은 감염된 개체 1두 당 연간 40\$로 추정되며 이에 따른 전체적인 피해액은 연간 200\$에서 250\$로 추정된다. 국내에서의 경제적 피해에 대해서는 아직까지 조사된 적은 없으나 외국의 사례와 비교할 때 막대한 경제적인 피해를 줄 것으로 생각된다. 주요 축산 선진국들에서는 요네병의 근절을 위한 정책적 대책과 질병 피해의 최소화 방안에 관한 연구가 오래 전부터 진행되어 왔다. 그러나 요네병 근절의 가장 문제로 제기된 준임상형 개체에 대한 검색이 현재의 진단법으로는 불가능하기 때문에 스웨덴을 제외한 세계 대부분의 나라에서 근절에 성공하지 못하고 있다. 그러나 지속적인 근절 프로그램 적용으로 감염율을 감소 등 매우 긍정적인 효과를 거둔 나라들도 상당수 있다. 본고에서는 국내 상황의 파악 및 일본, 미국, 호주, 네덜란드, 스웨덴의 요네병 근절 프로그램을 분석하여 한국형 요네병 근절을 위한 방역 프로그램을 제안 하고자 한다.

#### 2. 국내 요네병 발생 상황

국내에서 요네병의 발생은 1967년에 첫 발생이 보고된 이후 지속적인 감염율의 증가를 보여

왔다. 1968년 최초 혈청학적 검사에서 0.96%의 양성율을 나타내었고, 그 이후 검사 결과 1994년에 6.7%, 2003년에 7.1%로 증가 추세를 나타내었다. 또한 경남 지역의 목장을 대상으로 혈청학적 검사를 실시한 결과 전 개체의 3.3%, 목장의 13.8%가 요네병에 대한 혈청학적 양성율을 나타내었다. 최근 국내에서 KAHIS에 보고된 양성개체와 발생건수가 지속적으로 증가되는 것을 볼 수 있다 (Figure 66). 현재 국내에서 요네병에 대한 대책은 혈청학적 양성개체의 검색 및 도태유도 정부이며 분변을 통해 균을 배출하는 주요 오염원으로 작용하는 준 임상형에 대한 조사 및 방역대책은 전무하다. 국내의 축산 상황은 다른 나라들과 다른 점이 많아 우리나라의 현실에 적합한 한국형 요네병 방역 정책의 개발 및 적용이 시급한 실정이다.

### 3. 외국의 현황

#### (1) 일본

1959년에 미국에서 수입된 젖소에서 요네병의 발병이 처음 확진 되었으며 이후 1980년대 이전까지는 수입된 소와 송아지에 발병이 국한되었으나, 1980년대 이후에는 히카이도, 도호쿠, 간토 지역의 일본 육우로의 확산 이후 일본 전역으로 확산되었다. 본격적인 확산이 시작된 1980년대부터 지속적인 증가를 확인할 수 있으며, 1997년 이후부터 2000년대 중반까지 급격하게 증가하여 2006년에는 1179두가 감염되었다 (Figure 67). 이에 일본에서는 요네병을 근절하기 위해 1998년 이후부터 5년을 주기로 모든 목장을 대상으로 요네병 검사를 시행하고 있으며 검사에서 양성으로 판정된 개체는 의무적으로 도태시켰다. 이러한 근절 정책을 시행한 결과 2007년 이후로는 감소하는 추세를 보여 2013년에는 573두가 감염된 것으로 확인되었다.

일본은 요네병의 예방 및 통제를 위해 정기적인 검사를 통해 목장의 등급을 분류하여 관리하고 있다. 즉, 정기적인 검사 결과에 따라 청정 목장인 Category I 과 발생은 하였지만 통제되고 있는 Category II로 분류하여 관리하고 있다. Category I 목장은 정기적인 혈청 ELISA 검사와 세균 배양 검사 결과 양성인 개체가 없는 목장이며, Category II는 정기적인 검사에서 요네병 양성 개체가 발견된 곳으로 혈청학적 검사 (ELISA) 및 분변검사 (세균배양 및 PCR)를 통해 검사를 3개월 마다 수행한다. 만약 모든 검사에서 음성이 나오게 된다면 다시 Category I으로 분류 된다. 그러나 한번이라도 감염이 확인된 목장은 각 지역에서 운영하는 가축위생시험소 (LHSCs)에 의해 지속적으로 위생 상태를 검사 받게 된다.

가축위생시험소는 각 지역마다 있으며, 충분한 숫자의 수의사들이 있어 목장주들을 대상으로 철저한 목장 위생 관리에 대한 교육을 실시한다. 이러한 위생관리교육은 축사와 목장 환경의 청결을 위한 목장 입구 및 장화 소독, 분변에 의한 시설이나 환경의 오염 방지, 진료 수의사와의 협조를 통한 목장 내 가축들에 대한 지속적인 관찰 및 기록, 분만실의 청결 유지, 도태 시 요네병 음성 목장에서 대체우 도입, 새로 태어난 송아지와 어미의 신속한 격리 등과 같은 내용을 포함하여 요네병을 근절하고자 한다.

목장 내의 전파 외에도 감염된 개체의 이동에 따른 목장 간의 전파를 예방하려는 노력도 함께 이루어지고 있다. 즉, 요네병 근절을 위해 목장주가 외부농장에서 소를 구입시 지침을 설정하여 감염된 개체의 이동을 방지하고 있다. 즉, 소 구입은 가능하면 category I 목장에서 하고, 도입 시 ELISA 를 통해 혈청학적 음성을 확인한다. 만약 부득이하게 category II 목장에서 가

축 구입시는 3달 간격의 ELISA 및 분변 배양을 시행하여 음성인 개체를 확인 후 구입한다. 또한 9개월령 이하의 개체를 도입시는 2회 이상의 균배양 검사 후 도입을 권고하고 있다. 목장 내의 전파의 방지를 위해 도입된 개체는 두 번의 ELISA 검사결과에서 음성 판정이 내려질 때까지 격리시킨다. 판매 시에도 Category I 목장은 판매되는 개체가 ELISA 검사를 통해 음성이, Category II 의 목장에서는 3달 간격으로 2번 이상의 ELISA 검사에서 음성 및 배양 검사 결과에서 음성이 확인되어야 한다.

요네병이 발생했을 때 시험소에서는 감염된 개체의 격리, 양성개체의 도태, 역학조사 및 목장의 소독과 같은 핵심적인 역할을 수행한다. 요네병의 진단은 다양한 검사법을 통해 이루어진다. 즉, 최소 2주 이상의 간격을 두고 ELISA를 통한 혈청학적 검사 및 분변에서 요네병균의 분리도 함께 이루어진다. 임상증상을 보이는 경우 항산성 염색을 통해 분변 내의 균의 존재를 확인하여 진단한다. 6개월령 이하에서 감염이 의심되는 개체들은 피내 요닌 테스트를 통해 확인한다. 검사결과에서 감염이 확인된 양성개체들은 가축가격의 80%를 보상하고 모두 도태시킨다. 또한 질병의 발생 후 2차적인 전파를 방지하기 위해 처음 질병이 발생한 목장에서는 같은 축사에서 남아있는 동물을 대상으로 2년 동안 정기적인 검진을 시행하여 추가적인 감염 여부를 확인하고 있다. 그러나 기존의 진단법으로는 모든 감염된 동물을 진단할 수 없는 측면이 있기 때문에 자발적인 도태를 권고하고 있으며, 특히 분변을 통해 많은 양의 균을 배출하는 'High shedder'의 경우 우선적으로 도태를 권고하여 목장 내의 추가적인 오염을 방지하고 있다.

## (2) 미국

미국에서 전국적인 수준의 요네병 검사는 1996년에 National Animal Health Monitoring System (NAHMS)에 의해 처음 이루어졌으며, 전국적으로 21.6%의 젖소 목장이 양성으로 판정되었다. 2007년에는 환경내의 분변 시료를 대상으로 하여 검사한 결과 한 개 이상의 샘플에서 양성을 보인 젖소 목장이 68.1% 이었다. 또한 500두 이상을 키우는 젖소 목장의 경우에는 95%가 양성으로 판정되었다. 육우목장의 경우에도 1997년에 NAHMS에 의해 전국적인 조사가 이루어졌다. 총 21개 주에서 380개 목장의 10,372두의 육우가 조사 대상으로 선정되었으며, ELISA 검사 결과 0.4%의 육우와 7.9%의 목장만이 양성으로 판정되었다. 2003년에서 2010년 사이에 3,100,000두 이상의 젖소와 692,000두 이상의 육우가 혈청 ELISA에 의한 요네병 검사를 받았으며 젖소의 경우에는 해마다 5~6.6%, 육우의 경우에는 해마다 2.1~3.6%의 양성률을 보였다. 젖소 목장에서 우유를 대상으로 ELISA 검사를 한 결과 검사 숫자 및 양성률이 증가하고 있는 경향을 보였다. 2003년에 672두에서 2두(0.3%)의 양성개체를 확인한 이후 2010년에는 약 131,334두에서 5,267두(4%)가 양성으로 확인되었다. 또한 2003년에서 2010년 사이에 대략 514,000두의 젖소와 67,000두의 육우를 대상으로 분변 PCR과 배양 검사를 한 결과, 젖소는 7.2~14.1%, 육우는 2.8~16.9%의 양성률을 보였다.

미농무성 (USDA)의 조사에 따르면 미국에서 요네병 발생에 따른 피해는 소 한 두당 약 100달러 정도의 추가적인 경제적 손실이 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 이러한 경제적인 피해를 막기 위한 요네병 근절 정책들이 지속적으로 개발되어 왔다. 1993년에는 U.S. Animal Health Association (USAHA)에 의해 목장에 대한 요네병 청정 검증 프로그램이 개발되었으나 비용적인 측면 때문에 축산업계에 널리 도입되지는 못하였다. 이후 1998년에는 자발적 요네병 목장

인증 프로그램 (VJDHSP; U.S Voluntary Johne's Disease Herd Status Program)이 개발되어 시행되고 있다. 이 정책은 Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program (VBJDPC) 의 탄생에 기반이 되었다. 2002년에 VBJDCP는 미국 농림부 및 Plant Health Inspection Service (APHIS) 의 주도 하에 탄생하게 되며, 크게 생산자 교육, 목장의 위해도 평가 및 관리, 목장의 분류를 중요 관리 요소로 시행하고 있다.

VBJDCP 에서 이루어지는 교육은 생산자들에게 요네병의 위험성 (생산성 감소 및 질병 관리)을 이해시키고, 요네병의 예방, 통제 및 제거를 위한 정보를 제공하는 것을 주 목표로 하고 있다. 교육을 통해 요네병의 기본적인 지식, 목장 관리 방법, 진단 방법 및 결과의 활용법 등에 대한 지식을 목장주에게 전달하여 요네병 전파의 위협요인을 감소시킬 수 있게 하고 있다. 이러한 노력에 힘입어 목장주들의 요네병에 대한 인식도가 7.8% (1997년) 에서 31.3% (2007년) 으로 크게 증가하였다. 그러나 같은 기간 동안 요네병 검사를 한 생산자들의 비율은 0.7% 에서 3.2% 로 증가도가 낮았고, 프로그램에 대한 참여도 역시 1.4% 밖에 되지 않는 한계를 나타내었다. 젖소목장의 경우 매우 차이가 있어서 목장주의 인식도가 54.8% (1996년) 에서 94% (2007년) 로 증가도가 매우 높았다. 또한 참여 목장도 1% (1996년) 에서 31% (2007년) 로 크게 증가하였다. 이처럼 생산자에 대한 적절한 교육은 프로그램에 대한 참여도를 높일 수 있는 중요한 요소 중 하나라고 생각된다.

목장의 위해도 평가 및 관리는 목장에서 요네병의 전파를 촉진시킬 수 있는 요인을 확인하여 목장을 평가하는 것을 주 목표로 하고 있다. 평가 대상은 목장의 모든 구역이며, 분만사 및 송아지 축사, 성체 축사 및 목장의 차단방역과 같은 부분들을 평가한다. 평가 항목으로는 분변에 사료나 음수의 노출 여부, 여러 동물의 분만사 사용, 다양한 연령대의 합사 등 과 같은 요소 들이 포함된다. 이러한 위해도 평가 및 목장 관리를 통해 실제로 요네병의 전파 위험을 감소시키고 있는 것으로 확인되었다. 미네소타 대학의 연구결과에 따르면 1998년부터 2006년 12 월까지 Minnesota Johne's Disease Control Program (MJDPC) 에 자발적으로 참여하는 목장이 꾸준히 증가하였으며, 그 결과 젖소와 육우 농가 모두에서 위해도 정도를 감소시켜 요네병의 전파 위험을 낮추는데 성공하였다. 프로그램에 참여한 농가들은 평균적으로 처음 2년 동안 위해도 평가 점수를 18.1 포인트 감소시켰으며 이러한 경향은 프로그램을 진행하는 동안 계속 유지되었다.

뉴욕 주에서는 New York State Cattle Health Assurance Program (NYSSCHAP) 가 시행되고 있으며 NYSCCHAP 에서는 목장을 세가지 등급으로 분류하여 관리하고 있다. 참여목장은 요네병 감염 유무를 모르는 목장이며, 대책수립 목장은 요네병의 감염 유무를 이미 알고 있는 농장, 인증 프로그램 목장은 요네병이 없으며 다른 목장에서 질병이 유입되는 위험도를 최소화하는 관리정책을 실행하고 있는 목장이다. 2005년에 시행된 설문조사에서는 등록된 목장 중 92개의 목장에서 응답을 하였으며, 그 중 76%의 목장이 축군의 건강이 향상되었다고 응답하였다. 또한 30%의 목장에서는 우유 생산량이 증가하였으며 35%의 목장에서 NYSSCHAP 프로그램이 목장에 이익을 가져다 주었다고 응답하였다.

VBJDCP 에서는 최소한으로 요구되는 방역 조치를 규정하여 목장 내의 개체들이 요네병균에 노출될 위험을 감소시키고 있으며 방역 조치들은 다음과 같은 항목을 포함하고 있다. 분만사는 항상 청결하게 유지되어야 하며 각 개체가 분리된 분만실을 사용하는 것을 권고한다. 또한 송아지는 태어나는 즉시 모체로부터 격리하며, 요네병에 걸리지 않은 것이 확인된 동물의 초유만을 급여한다. 출생 이후에 송아지들은 연령에 따라 분리 사육되며, 성축과의 접촉은 엄

격하게 금지된다. 외부로부터의 요네병의 전파를 막기 위해 동물은 반드시 요네병이 없는 목장에서 도입하며 도입 전 일정기간 격리하여 검사 후 도입한다. 만약 임상 증상을 보이는 개체가 나타난다면 즉시 격리하고 양성 확인시는 즉시 도태시켜야 한다.

VBJDCP의 목장 분류 시스템은 VJDHSP 와 “Minimum Recommendations for Administering and Instituting State Voluntary Johne’s Disease Programs for Cattle”에 근거하여 수행되며, 수년간의 검사를 통해 MAP에 의한 위험도를 평가하여 이루어진다. 2010년에 APHIS에 의해 분류 기준이 좀더 유연성 있게 변경되었는데, 목장을 기준의 음성-양성이 아닌 1~6 단계로 분류하였고, 요네병 전파에 대한 위해 요소가 적을수록 분류 단계가 높아진다.

젖소 목장의 경우 우유와 혈청을 시료로 한 ELISA 와 개체 별 분변 배양 및 PCR, 환경 샘플 검사 및 혼합한 분변 샘플 검사를 통해 목장을 분류하며, 육우 목장의 경우에는 우유를 시료로 한 ELISA와 개체 별 분변 배양 및 PCR, 혼합한 분변 샘플 검사를 통하여 분류하게 된다. 모든 검사용 시료는 주 정부나 중앙정부의 동물 위생 공무원의 감독 하에서, 아니면 이들이 직접 채취하여야 한다. 또한 진단 검사는 NADC가 인증하는 실험실들에 의해 수행되기를 권고하며 주 정부산하의 수의 관련기관에 결과를 보고하도록 한다.

### (3) 호주

호주에서 요네병은 수입한 소의 검역과정에서 1911년에 처음 발견되었으며, 1925년에는 빅토리아주에서 발병이 확인되었다. 요네병에 감염된 개체들은 1950년대부터 급격하게 증가하였고 대부분 젖소 목장에서 발병하였으며, 염소(Capra aegagrus), 알파카(Vicugna pacos)에서도 발병이 확인되었다. 호주의 소 요네병은 대부분 9500개 이상의 젖소 목장이 위치하고 있는 빅토리아 지역에서 발생하며, 호주의 서부 및 퀸즐랜드 지역의 소규모 젖소 목장에서는 거의 발병이 일어나지 않는다. 또한 육우목장에서는 비교적 적게 발생하는 것으로 알려져 있다. 호주에서 요네병에 의한 직접적인 경제적 피해는 3,820,000 호주달러로 예측되며 호주 내의 15.5%의 목장이 요네병에 양성인 개체를 가지고 있는 것으로 추정되어 낙농업에 미치는 영향이 매우 큰 것으로 판단되었다.

호주에서 국가 단위의 목장 인증 프로그램인 “Australian Johne’s Disease Market Assurance Program for Cattle (CattleMAP)”는 1996년에 시작되었으나, 요네병이 상재하는 지역인 호주 남동부 지역의 젖소 목장에서는 참여율이 저조하였는데 감염이 의심 또는 확인된 목장에게 불이익을 주었기 때문인 것으로 생각된다. 이로서 감염된 많은 목장들이 통제되지 않는 상태로 방치되었고, 이에 새로운 국가 단위의 요네병 근절 프로그램의 필요성이 대두되었다.

1997년에 Animal Health Australia는 표준 진단법, 질병 예방 수칙, 역학조사와 같은 항목을 확립하여 새로운 국가 단위의 요네병의 근절 프로그램인 검사와 근절 프로그램 (Test and Control Program)을 개발하였다. 검사와 근절 프로그램은 목장과 유제품을 요네병균의 오염으로부터 차단하고, 감염되지 않은 청정목장의 상태를 유지하며, 요네병의 지역 및 국가 수준에서의 경제적 영향을 감소시키는 것을 목표로 하였다.

또한 낙농업계와 정부는 모든 젖소 목장의 요네병 감염상황에 관한 평가 시스템을 개발하였는데 (National Dairy BJD Score), 이 시스템을 통해 각 목장들은 0~10의 등급으로 분류하였다. 이 등급은 목장의 요네병 유무에 따라 분류되었으며 요네병에 대해 안전할수록 높은 점수

를 받게 된다. 많은 젖소 목장들이 요네병 검진에 대한 공식적인 기록을 가지고 있지 않았으며, 요네병 음성을 검사로 확인 받지 못하였다. 이런 상태의 목장들은 ‘평가 받지 않은 목장’으로 분류되며 이러한 목장들은 요네병의 전파에 큰 역할을 하고 있기 때문에 평가 시스템 상에서 ‘중간 정도로 감염된 목장’ (Score 3) 과 같은 수준으로 여겨진다. 또한 평가 받지 않은 목장들이 만약 계속 평가를 받지 않거나 3단계의 송아지 양육 계획을 따르지 않는다면 0단계로 강등되는 불이익을 받게 된다. 또한 이 정책에서는 12개월령 이하의 송아지에서 요네병 전파의 위험을 감소시키기 위한 지침을 시행하고 있으며 요네병에 노출된 개체와의 접촉을 차단시키는 것을 핵심으로 하고 있다. 즉, 송아지들은 출생 후 12시간 내에 어미로부터 격리되어야 하며, 송아지를 키우는 공간은 성체로부터 차단되어야 한다. 또한 송아지들은 12개월이 지나기 전까지는 목초지에서 방목하지 않아야 한다.

호주에서의 요네병 근절 정책 중 주 단위에서의 정책은 빅토리아 지역에서 가장 먼저 시작되었다. 빅토리아 주의 요네병 예방 프로그램 (Test and Control Program) 은 1996년에 시작되었는데, TCP는 프로그램에 참여한 목장의 2세 이상의 모든 개체들을 대상으로 정기적인 ELISA 검사를 통한 양성축 도태, 송아지 사육 환경의 관리를 시행하였다. 그 결과 등록된 600여 개의 목장에서 임상증상을 보이는 개체들을 감소시켰으나 완전히 청정화는 이루지 못했다. 2003년에 TCP는 송아지 시기의 감염을 차단하기 위한 Johne's Disease Calf Accreditation Program (JDCAP) 이라는 송아지 관리 정책을 포함하여 TCP2로 새롭게 시작되었다. JDCAP의 내용을 살펴보면 목장 내에서의 전파와 목장 간의 전파를 차단할 수 있는 요소들을 모두 갖추고 있다. 청결한 공간에서 분만에서 이유까지 송아지가 사육되도록 하였고 분만 후 최대 12시간 이내에 모축과 송아지를 분리하여 사육하였으며 성축의 분변에 의해 송아지를 사육할 장소가 오염되지 않도록 통제하였고, 성축은 송아지와 같은 장소에 방목되지 않도록 관리하였다. 음수공급은 깨끗한 탱크를 통해서만 이루어 지도록 관리하였고 송아지 사육장을 들어갈 때에는 반드시 분변이 묻지 않은 장화, 작업복 등을 착용하여 병원체의 유입을 차단하였다. 또한, 목장에서 송아지의 분만 또는 구입에 대한 정확한 정보를 기록하도록 하였다.

#### (4) 스웨덴

스웨덴에서는 1952년에 요네병이 Swedish Epizootic Act 프로그램에 의해 법정전염병으로 지정된 이후 요네병 근절을 위한 많은 노력을 기울여 왔다. 1993년에는 1,576개의 목장에서 나온 4,000 마리의 소를 ELISA 를 통해 검사하였고, 48마리의 양성개체를 확인하였으며, 1996년에는 130개 목장에서 나온 Limousin breed 를 대상으로 분변 배양 및 ELISA 로 검사한 결과 2마리의 양성개체가 발견되었다.

2009년에서 2014년까지 분변 PCR 및 배양을 통한 검사 결과 육우 및 젖소에서 요네병 양성 개체가 전혀 나오지 않은 것으로 알려져 있다. 이처럼 스웨덴 내의 요네병 양성률은 매우 낮으며 발병은 대부분 수입된 소에 국한된 경우가 많았다. 스웨덴의 요네병 예방 프로그램은 Swedish Animal Health Service 에 의해 운영되며, 해마다 모든 목장의 24개월 이상의 개체들을 대상으로 분변 샘플을 채취하여 배양 및 PCR을 통하여 요네병균 검사를 하였다. 또한 다른 목장에서 도입된 개체의 경우 12개월령 이상의 개체들 역시 검사대상에 포함하고 있다.

검사 후 목장들은 음성 결과 횟수에 따라 A(음성 결과 5번), B(음성 결과 3~4번), C(음성 결과 1~2번) 등급 세 가지로 분류되며 검사 결과를 확정하기 위해 검사 기간 중 다른 목장의 동

물과 접촉하지 않았다는 사실도 또한 확인 받아야 한다. 프로그램에 참여하고 있는 목장들은 같은 등급의 통제되고 있는 목장에서만 동물을 도입할 수 있으며, 방목 시에도 같은 등급 내의 동물들만 허용된다. 프로그램에 참여하지 않고 있는 동물과의 접촉이나, 운송 등을 금지되어 있다. 이와 같은 정책을 통해 스웨덴에서는 요네병을 잘 통제하고 있어 젖소의 경우 전혀 발생하고 있지 않으며 육우의 경우 산발적으로 발생하는 경우가 있었지만 마지막 발생이 있었던 2005년 이후로는 발생이 없다.

#### (5) 네덜란드

네덜란드에는 대략 4백만 마리의 소가 있는 것으로 알려져 있으며, 그 중 54%의 목장이 요네병 양성으로 여겨진다. 네덜란드에서 요네병은 1919년에 처음 공식적으로 확인되었으며, 1992년부터는 피내 검사를 이용하여 감염 초기에 감염동물을 탐색하기 위한 요네병 근절 프로그램이 운영되었다. 1942년부터는 138개의 젖소 목장이 참여하는 근절 프로그램이 시작되었으며 참여 목장의 동물들은 해마다 요닌 피내반응법과 분변 배양을 통해 요네병 감염 유무를 확인 받았다. 또한 1952년부터는 임상 증상을 보여 도태된 동물에 대한 경제적인 보상이 이루어졌으며, 검사에서 양성을 보인 동물들은 다른 농장에 판매하는 것이 법적으로 금지되었다. 1954년부터는 임상 증상을 보이는 동물과 요닌 피내반응법에서 양성을 보인 동물을 대상으로 보체결합반응법을 적용하였으며 1958년부터는 18개월 이상의 모든 동물이 보체결합반응법으로 검사를 받았다. 그 후 1979년에는 4~18개월의 소를 대상으로 요닌 피내반응법을 적용하여 조기에 감염 개체를 확인하여 요네병을 근절하려고 하였다. 또한 18개월 이상의 동물은 요닌 피내반응법 양성 개체에 한정하여 보체결합반응법을 적용하여 검사하였다. 그러나 이러한 지속적인 노력에도 불구하고 근절이 실패(115개 목장 중 단 2곳만 근절에 성공)하자 송아지를 대상으로 사균백신접종을 1983년에 시도하였고 그 결과 요네병 임상증상을 보이는 개체를 감소시키는 데 성공하였으나 목장 내에 지속감염이 발생하는 한계점을 보였다.

네덜란드는 2006년에 요네병의 청정화 프로그램을 새롭게 개발하였고, 이 프로그램은 우유에서의 요네병 오염을 감소시키는 것을 주 목표로 하고 있다. 모든 착유우에서 나오는 우유를 대상으로 ELISA 검사를 시행하면서 동시에 3년령 이상의 모든 소를 대상으로 1년 간격으로 혈청 ELISA 검사를 수행하고 있다. 양성 판정을 받은 개체는 축주의 요청에 따라 분변 배양을 통해 양성 여부를 다시 확인하여 최종적으로 판정된다. 농장의 분류는 세가지로 이루어 지는데, ELISA 검사 상에서 음성 판정을 받은 목장은 "Status A"로 분류하였고, 양성 판정을 받은 후 양성 개체를 제거한 목장은 "Status B"로, 양성 개체가 목장 내에 남아 있는 목장은 "Status C"로 분류하였다. (34). 현재 네덜란드 젖소 목장에게 의무적인 참가가 요구되고 있으며 "Status C"로 판정 받은 목장은 우유 판매의 제한과 같은 불이익을 받게 된다.

### 4. 외국으로부터의 시사점

일본의 경우 정기적인 검사와 목장의 등급을 설정하여 요네병 근절을 추진하였으며, 요네병이 한번이라도 감염되었던 목장에 대해 지속적으로 모니터링하여 관리하는 점이 질병의 감소에 많은 영향을 주는 것으로 판단된다. 또한 감염된 개체와 접촉하였던 개체들의 지속적인 검사 및 도태 권고 또한 목장 내에서의 2차적인 전파를 예방하는 것으로 생각된다.

호주의 경우 비교적 성공적으로 요네병을 통제하고 있다고 할 수 있으며, 요네병의 전파를 방지하는 가장 중요한 부분은 실제로 목장 내에서 시행되고 있는 방역조치라고 생각된다. 즉 송아지와 감염된 개체의 접촉을 원천적으로 차단시키는 것이 요네병의 전파를 방지하는 중요한 방법으로 제시되고 있다.

미국의 경우 중앙정부 차원에서의 기본적인 프로그램과 함께 주 단위의 VJDHSP에 의해 자발적인 참여목장의 수는 증가되고 있으며 아직까지는 미흡하지만 이 프로그램을 운영하는 주 정부는 물론 참여하는 목장의 수가 점차 증가하고 있는 실정이다.

스웨덴의 경우 가장 성공적으로 요네병을 근절하였다. 첫소의 경우 발생한 경우가 전혀 없으며, 육우의 경우도 2005년에 마지막으로 발병하였다. 감염된 개체가 나온 목장의 모든 개체들을 도태시키며, 이후에도 지속적으로 모니터링 하여 재발 여부를 확인하는 정책이 요네병 근절에 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

네덜란드의 경우 비교적 감염된 목장이 많은 실정이지만 체계적인 농장 분류 시스템을 갖추고 있다. 특히 요네병 개체가 목장 내에 남아 있는 목장의 경우 경제적인 제한을 통해 양성개체의 도태를 유도하여 근절을 시도하는 점과 모든 착유우를 대상으로 검진을 실시하는 점은 요네병의 전파의 감소에 효과적인 부분으로 생각된다.

## 5. 한국형 요네 근절 프로그램 제안

### 가. 해외의 근절책의 공통점

해외의 사례들을 통해 각국의 요네병 예방 및 관리 프로그램의 공통점은 나라마다 차이는 있지만 ①정기적인 요네병 검진을 수행하고 있었으며, ②송아지가 태어난 후 즉시 성축과 분리 사육하여 송아지의 감염 가능성을 차단하였다. 또한 ③수직 감염의 위험성에 따라 요네병 음성으로 확인된 개체로부터 얻은 안전한 초유를 공급하여 송아지로의 수직감염의 위험성을 차단하였다. ④목장 내의 환경을 청결하게 유지하는 것도 중요 정책 중 하나로 특히 분만사나 송아지를 기르는 공간은 청결하게 유지 되도록 하였고, 최적의 위생적인 관리를 하도록 하였다. 특히 목장 내부에서 성축의 분변과 접촉된 기구 등은 송아지와 다시 접촉되지 않도록 하여 질병의 전파를 방지하였다. 즉, 사육환경의 전반적인 개선 및 송아지로의 감염 전파를 막기 위한 정책을 시행하고 있는 것으로 생각된다. 따라서 국내 역시 해외의 사례들과 마찬가지로 사육환경의 전반적인 개선 및 송아지로의 감염 전파를 막기 위한 적극적인 정책이 필요하다고 할 수 있다.

### 나. 요네병 근절을 위한 중점 관리 기준 설정

해외의 사례를 종합하여 요네병 근절을 위한 중점 관리 기준을 요네병 양성개체, 송아지, 목장을 관리대상으로 하였으며 세부 사항은 Table 58과 같다.

요네병 양성개체의 경우 정기적인 검사를 통해 양성으로 판정된 이후 즉각적인 격리하며 이후 설사 등의 임상증상이 나타나게 되면 도태한다. 또한 임상증상을 보이지 않는 준임상형의 검색을 위한 진단법이 확립되어야 하며, 이들 개체는 다른 개체와 격리하여 사육하면서 다른 개체로의 전파를 차단해야 한다. 또한 외부로부터 새로운 개체를 도입시는 목장 내의 별도의 공간

에 일정 기간 격리하면서 혈청 ELISA 및 분변 PCR을 통하여 요네병이 없음을 확인 후 입식하도록 한다. 수직감염을 차단하기 위해 감염된 개체는 번식을 금지하고 도태시키도록 유도한다. 송아지는 청결한 장소에서 분만하도록 하며, 특히 다른 성체의 분변 및 체액으로 오염되지 않도록 항상 신경써야 한다. 분만 직후 송아지는 모축으로부터 격리되어야 하고 성우로부터 분리된 사육시설에서 사육한다. 송아지의 사육시설의 청결 유지 역시 중요한 부분으로 분변에 오염된 의복이나 장비를 사용하지 않도록 주의하여야 한다. 또한 송아지에 급여하는 초유나 우유는 여러 개체의 것을 혼합하여 쓰지 않고 요네병 음성 개체에서만 확보하여 급여하여야 한다. 목장에서는 입식 하는 가축의 수와 목장 내 가축의 요네병 유무 및 검사결과를 상세하게 기록하고 관리하여야 한다. 목장 내 요네병 양성축이 존재한다면 임상증상의 발생 여부 등을 관찰하여 기록하여야 한다. 또한 목장 내의 분변에 의한 사료, 음수, 장비 및 차량의 오염을 방지하여 질병 전파의 위험성을 낮추어야 한다.

#### 다. 목장의 등급 분류 및 사후 관리

요네병 검사결과에 따른 목장의 등급 분류 및 인증을 위해 12개월에 한번씩 검사를 시행하여 등급을 분류하도록 하며 등급 분류 후 한번 이상 검사를 받지 않은 목장은 4등급으로 설정하도록 한다. 각 목장에 대한 등급은 1등급에서 4등급으로 분류하며 다음과 같이 정의한다.

- 1등급: 요네병이 발생한 적이 없거나 발생 후 2년 이상 청정 상태를 유지하고 있는 목장
- 2등급: 요네병이 발생한 적이 있으며 현재 양성축을 도태한 후 청정 상태가 2년 미만인 농장
- 3등급: 요네병이 발생한 적이 있으며 현재 양성축이 존재하는 목장
- 4등급: 등급 판정을 받지 않거나 받은 후 한번 이상 검사를 받지 않은 목장

검사 대상은 18개월령 이상의 모든 개체를 대상으로 하며 송아지의 경우에는 18개월령 이상이 되었을 때 검사 대상에 추가하도록 한다. 검사 방법은 개체의 혈청을 대상으로 ELISA법을 사용하며, 또한 분변을 채취하여 IS900 유전자를 대상으로 PCR을 시행한 후 ELISA 와 PCR의 두 가지 결과 중 하나 이상에서 양성이 나온 개체를 최종적으로 양성으로 판정한다. 등급 판정 이후에 양성 개체가 발견되게 되면 등급이 1단계씩 하향 판정을 받게 되며, 양성 개체는 즉각적인 격리 조치 후 빠른 시일 내에 도태시키도록 한다. 1등급 농장의 경우 양성 개체가 발생하여 2등급으로 하향 된 후 양성 개체를 도태 처리하고 3개월 간격으로 8회 동안 검사를 하게 하며 만약 8회 동안 연속하여 음성 판정을 받게 된다면 원래의 등급을 회복하도록 한다. 2등급 농장은 양성 개체가 발생하였을 때 3등급으로 하향되며, 양성 개체를 도태 처리하면 다시 2등급으로 조정되게 된다. 또한 4등급의 목장에 대해서는 지속적으로 검사를 받도록 유도하여 참여하는 목장의 수가 증가하도록 유도한다.

#### 6. 맷는말

본 연구에서는 국내 요네병 발생 상황의 파악 및 일본, 미국, 호주, 네덜란드, 스웨덴의 요네병 근절 프로그램을 분석하여 한국형 요네병 근절을 위한 방역 프로그램을 제안하였다. 국내의 상황을 살펴보면 요네병 발생 건수와 감염 두수가 최근까지도 지속적으로 증가하였으며 이에 따라 경제적 피해도 증가할 것으로 예상된다. 이에 따라 요네병 근절을 위한 방역 프로그램의 개발이 시급한 실정이다. 외국의 사례들을 종합해 보면 정기적인 요네병 검진, 송아지로의 수

직 전파 차단 및 목장 내의 사육 환경 개선이 공통적으로 확인되었고, 이런 요소들이 요네병 근절에 핵심적인 역할을 하는 것으로 여겨진다. 따라서 이것을 기반으로 요네병 양성개체, 송아지, 목장을 관리 대상으로 중점 관리 요소를 설정하여 요네병 근절 프로그램을 제안하였다. 이 프로그램은 목장을 4등급으로 분류하며 정기적인 검진을 통한 양성개체의 조기 탐색 및 제거, 목장내의 위생관리를 통한 체계적인 관리정책을 제시하고 있다. 따라서 이 프로그램의 적용을 통해 요네병에 의한 경제적 피해를 최소화시키며 나아가 요네병을 완전히 근절할 수 있을 것으로 기대된다.



Figure 66. 국내의 소 요네병 발생 건수 및 감염 두수: 2003-2015

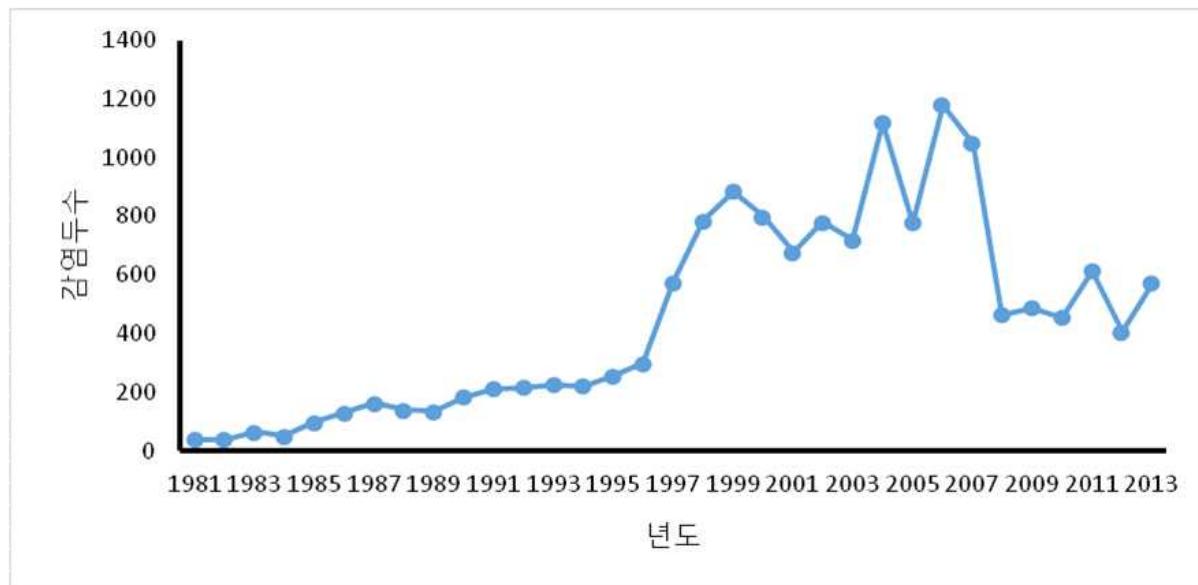


Figure 67. 일본 내의 소 요네병 감염 두수: 1981-2013

Table 58. 요네병 근절을 위한 관리 대상 별 중점 관리 기준

관리 대상 별 구 분	중점 관리 기준
요네병 양성개체	정기적인 검사를 통해 양성으로 판정된 개체의 즉각적인 격리 및 도태 준임상형 감염우의 다른 우군과의 분리 사육 외부로부터 개체 도입 시 일정 기간 격리하여 질병 유무 검사 감염된 개체의 번식 금지
송아지	송아지 분만 장소의 청결 유지 분만 후 송아지는 즉시 모축으로부터 분리 성우로부터 분리된 사육시설에서 사육 송아지의 방목은 1년령 이후에 실시 송아지 사육시설 청결 유지 (분변에 오염된 기구 사용금지) 우유나 초유는 혼합하지 않은 것을 급여 (요네병 음성 개체에서만 확보)
목장	입식하는 가축의 수와 목장의 정보 기록 및 관리 가축의 변동내역, 임상증상 발생 여부 등 기록 목장 내의 분변에 의한 사료, 음수, 장비 및 차량의 오염을 방지

## <제 2 세부: 소 사육농장의 요네병 근절모델 개발 연구>

### 제1절 대규모 소 사육농장에서의 요네병 발생실태

#### 1. 요네병 진단 대상축

대규모로 젖소를 사육하는 농가에서 요네병 항체 양성율을 정기적인 ELISA 검사를 통하여 조사하였다. 젖소는 축산자원개발부 보유 젖소, 한우는 한우연구소에서 사육하는 소를 대상으로 검사하였으며 젖소, 한우 년 간 사육두수는 각각 350두, 800두 수준이었다. 항체 양성축들을 관리하여 전체 우군의 유병율을 안정적으로 유지하고, 동시에 항원(분변)검진을 통한 전염원을 차단하여 우군 내 전파를 방지하였다.

#### 2. 요네병 ELISA 진단방법

*Mycobacterium paratuberculosis* Antibody Test Kit(IDEXX)를 이용하여 요네병 ELISA 검사를 실시하였다. 처리방법은 실험시작 전 conjugate 제외하고 kit내 내용물은 21°C( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ )에 도달하도록 실온에 최소 1시간 이상 방치하고 Wash solution은 DW로 20배 희석하고 conjugate 와 dilution buffer를 1:100으로 100배 희석하여 준비한다. Control 혈청과 Sample 혈청을 Dilution buffer 12에 20배 희석하고 최고 15분간 배양한 후 coated microplate에 100ml 씩 분주후 실온에 45분간 배양한다. Wash solution 300ml으로 3회 세척한다. 100배 희석한 Conjugate를 100ml 분주하고 실온에서 30분 반응시킨후 다시 Wash solution 300ml으로 3회 세척한다. TMB 100ml 분주후 10분간 반응후 Stop solution 100ml를 분주한다. ELISA reader를 이용하여 450nm에서 측정한다. positive 혈청 대비 OD값이 55%이상일 때 양성, 45이하일 때 음성이며 그 사이는 의양성으로 진단한다.

#### 3. 요네병 관리 프로그램 적용

우군에 지속적인 요네관리프로그램을 적용하였다. 혈청검사는 분만전·후에 실시하였고 전두수에 대하여 년 2회 실시하였다. 분변 내 항원검사를 실시하였으며 양성축 분만시 자우는 분만후 신속히 격리하였고 음성축으로부터 확보된 초유를 공급한 결과 우군의 낮은 요네병 유병율을 유지하였다.

#### 4. 대규모 젖소사육 농가 요네병 항체 양성율 분석 결과

젖소 요네병 항체 양성율은 2008년도에는 9.5%, 2009년 6월에는 4.39% 크게 감소하였고, 2009년 11월에는 3.72%, 2010년 3월에는 3.21%, 2010년 10월에는 2.94% 점진적으로 줄어들었다. 2011년 4월 상반기 검진에서는 4.02%로 지난 3년간 발생율과 비교해 양성율이 늘어났지만, 2012년 10월 검진에서는 2.47%로 다시 감소, 2013년 이후 비교적 안정적인 상태를 유지하였다 (Figure 68).

## 5. 대규모 한우사육 농가 요네병 항체 양성을 분석 결과

대규모로 한우를 번식 및 비육하는 농장에서의 1년 이상 성우를 대상으로 소 요네병 ELISA 항체 양성을 조사하였다. 2010년도 검진에서는 전체 검진 대상우 660두의 1년 이상 한우에서 1.97%(13두)가 소 요네병 ELISA 항체 양성을 보였고, 2012년도 검사대상우 695두에서 3.74%(26두)가 항체 양성을 나타내었으며 약간의 항체 양성을 증가하였다. 2013년 검진 대상우 871두의 1년이상 한우에서 0.57% 양성을 보였고, 2015년도 검사대상우 934두에서 2%의 양성을 보였다 (Figure 69). 한우 우군에서의 정기적인 질병 진단으로 양성축 지속적인 모니터링 및 조기 도태우군관리로 낮은 요네병 유병율을 보였다.

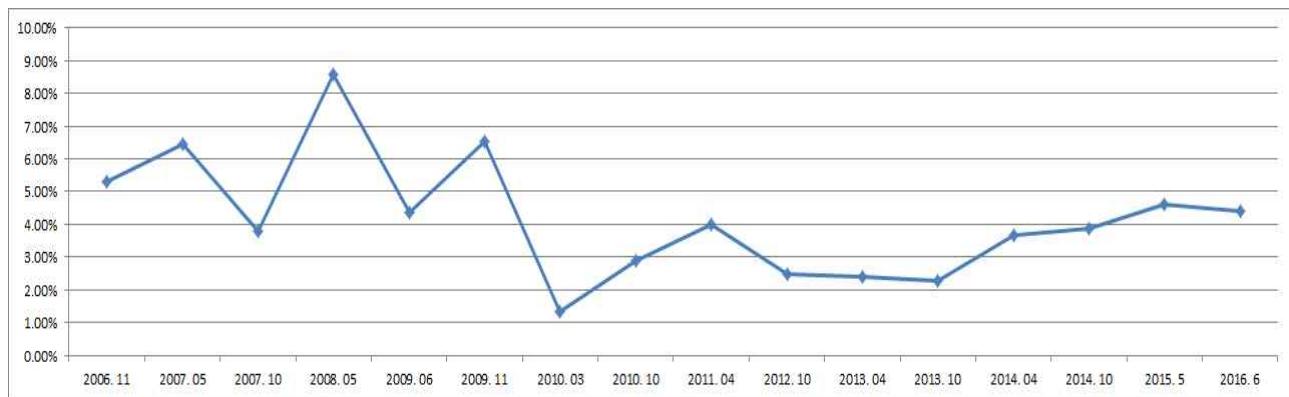


Figure 68. 대규모 젖소 사육농가에서의 요네병 ELISA 항체 양성을

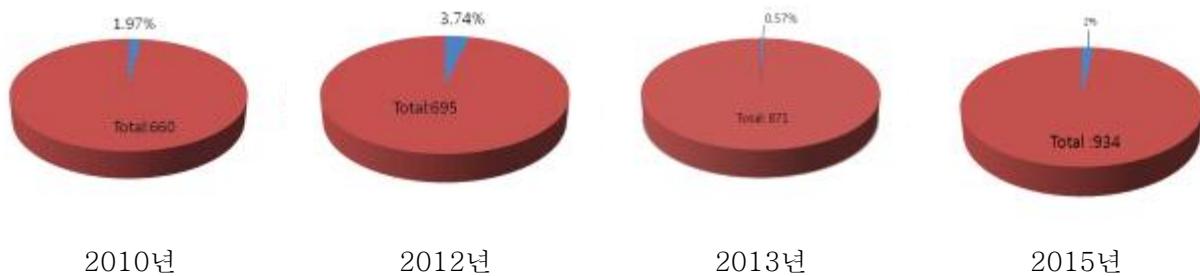


Figure 69. 대규모 한우 사육농가에서의 소 요네병 ELISA 항체 양성을

## 제2절 한국형 요네병 근절 프로그램 개발 및 적용

### 1. 국내 대규모 소 사육농가 대상 요네병 관리 방법

요네병은 주로 6개월령 이전에 감염되며 세균이 포함된 초유, 우유 및 분변을 통해서 감염된다. 분변에 오염된 젖꼭지나 유방은 중요한 매개체이며 태반내 감염도 발생하는 것으로 알려져 있다. 요네병에 이미 감염되어 있는 분만우는 임상증상이 없어도 초유와 우유로 요네균을 배출하나 우유보다는 초유로 더 많이 배출하며 분만우도 분만 후 증상이 더 악화되는 경우가 많다. 요네병의 주요 감염 경로는 경구감염이므로 감염의 연결고리를 차단하는 것이 매우 중요하다. 따라서 양성축군에서 분만한 자우에 대해 요네병 음성 분만우로부터 확보된 초유를 공급할 수 있는 냉동보관 시스템 필요하다. 이를 위하여 다음과 같은 조치가 수반된다.

가. 정기적인 소 요네병 검진으로 양성 개체 및 항체가 변화 추적

- 가검물 채취: 혈청에서 소 요네병 항체 ELISA 검사

나. 분만 1개월 전 요네 검진을 통한 분만축 관리로 자우로의 수직전파 차단

- 가검물 채취: 혈청 및 우유에서 소 요네병 항체 ELISA 검사 (Figure 70)

다. 분만 시 요네병 양성 모축과 자축의 신속한 격리로 요네전파 차단

- 양성축과 자우간 수직 전파 차단 (Figure 71)

라. 분만 전 초유 및 우유에서 요네병 검진으로 양성 초유 스크린

- 음성축군 초유 확보 및 요네병 음성 초유 확인 (Figure 72)

마. 초유 및 우유의 저온 살균처리로 위생적인 포유 실시

- 초유 및 우유 급여시 저온살균(63°C, 30분) 처리후 송아지에 급여하여 요네병 뿐만 아니라 우유로부터 전파가 가능한 병원체 감염 방지 (Figure 73)

#### (1) 초유 저온살균 방법

- 모체로부터 착유한 초유 및 우유를 저온살균기 투여

- 저온 살균기 설정 : 63°C, 30분

※ 저온 살균처리로 초유 및 우유내 영양소 · 면역물질 손실 방지

- 초유가 잘 혼합되도록 있도록 교반기 회전시킴

- 30분이 지나면 살균 완료

- 상온에서 서서히 식힌후 송아지에 급여

- 남은 초유는 - 20°C 냉동 보관

※ 저온 살균기가 없을 경우 농가에서는 가온 water bath[항온수조]를 이용하여 간이 살균처리 가능

바. 초유의 냉동보관 시스템 운영

음성축균 및 저온살균 처리한 초유는  $-20^{\circ}\text{C}$  저온 냉동고에 동결 보관한다. 1~2리터 용기에 개체별로 보관하며 다른 젖소의 초유가 혼합되지 않도록 한다. 생산된 초유는 생산 젖소, 생산 일, 생산량, 초유수급 송아지 일자, 수급일자, 수급량을 기록하여 관리한다 (Figure 74).



분만 1개월 전 채혈



소 요네병 ELISA 항체 검진

Figure 70. 혈청 및 우유에서 소 요네병 항체 ELISA 검사



분만 전 요네 양성축 판정 어미소에서 분만 후 신속히 자우를 격리(수직감염 차단)



Figure 71. 양성축과 자우간 수직 전파 차단 실시



송아지에 초유 및 우유를 급여하기 전에 요네병 검진으로 청정한 우유를 송아지에 공급

Figure 72. 음성축군 초유 확보 및 요네병 음성 초유 확인



초유 저온살균 처리 ( 63°C, 30분)



위해 미생물이 없는 초유를 송아지에 급여

Figure 73. 초유 및 우유의 저온 살균처리



초유보관 냉장고 및 초유 관리양식

초유 관리 양식							
No.	생산일자	제조업체	제조 품종	제조 기관	제조 일정	제조 내용	기록

Figure 74. 초유의 냉동보관 시스템 운영

## 제3절 요네병 근절 프로그램 적용 질병발생 모니터링

### 1. 요네병 양성우의 pedigree 작성 및 생체지표 변화 모니터링

지속적인 요네병 검진 및 우군에서의 가계도(pedigree)분석을 통해 부모, 형제, 자손의 가계도를 작성하여 양성축군의 요네균의 수직 전파를 모니터링 진행하였다. 명호 10\*\*\*의 경우, 어미 70\*\*이 요네 양성축으로 확인되었다. 명호 90\*\*의 경우, 자손 11\*\*\*에서 의양성이 확인되었다. 명호 110\*\*\*의 경우, 어미 60\*\*이 요네 양성축으로 확인되었으며 명호 81\*\*의 경우, 자손 11\*\*\*에서 의양성이 확인되었다 (Figure 75). 우군 요네병균의 수직 전파를 확인하기 위하여 분만우 228두를 대상으로 어미의 요네병 진단결과가 자축에 이행되는 여부를 추적 분석하였다. 분만 송아지의 요네병 검진시기는 자축의 비특이반응을 배제하기 위하여 생후 1년 경과후 실시하였다. 양성축 32두로부터 분만한 송아지의 요네병 양성비율은 6.3%였으며 음성축 196두로부터 분만한 송아지의 양성 감염 비율은 15.3%로 조사되어 양성축의 자손보다 음성축군의 자손의 양성비율이 더 높게 조사되었다 (Table 59). 요네병의 전파경로는 초유로부터 전파될 뿐만 아니라 감염 우유의 섭취 및 환경 오염에 의해 경구감염에 의한 것 등 다양한 경로로 경구 감염되는 것으로 생각되어 진다.

정기적인 요네병 항체검진으로 양성축군의 형매 및 형매의 자손에 대하여 질병전파를 모니터링하였다. 2013년 양성축의 형제 27두와 자손 12두에 대한 가계도 분석, 전두수 요네 ELISA 항체음성 확인하였다. 2014년 양성축의 형매 18두중 4두에서 양성반응 나타내었으며 형매의 자손은 모두 음성반응을 보였다(Figure 76). 기존의 요네예방프로그램, 즉 양성축 신속한 격리, 음성초유공급 등을 적용하여 수직전파의 위험도가 감소하여 비교적 전파가 예방된 것으로 생각된다.

### 2. 농장단위 요네병 진단시료 오염도 측정

젖소 목장내의 사육 구역별 분류하여, 오염도를 측정하였다. 각 우사 펜스별 랜덤하게 전 지역의 분변, 흙, 깔짚 등의 환경시료를 채취하여 PCR 검사를 통한 요네균 항원 검출을 실시하였다 (Figure 77). IS900과 ISMAP02는 모두 요네병균에만 특이적으로 존재한다고 알려진 유전자로 본 검사의 경우 분변 내의 DNA를 추출한 후 Taqman-probe 방식을 이용하여 두 유전자를 대상으로 real-time PCR을 실시하였으며 IS900과 ISMAP02 PCR의 결과가 모두 양성인 경우 양성으로 판정하였다.

이유자우에서 초임수정단계까지 사육되는 육성우사와 송아지 사육공간의 환경시료에서 IS900, ISMAP02 유전자는 모두 검출되지 않았다. 착유우, 임신우 및 저수태우 등 성우가 사육되는 검정우사와 시험우사의 내부공간, 운동장, 분만우 공간 등에서는 IS900, ISMAP02 유전자의 발현을 보였다 (Table 60). 따라서 요네병 항원은 지우 및 육성우가 사육되는 우사 오염도는 성우가 사육되는 공간에 비하여 발현이 현저히 낮게 조사되었다. 이는 우사내부 및 운동장 분변에서 IS900, ISMAP02 유전자가 검출된 것으로 보아 양성축 성우 분변으로부터 요네균이 배출된 것으로 생각되어 진다.

MAP ELISA positive animal pedigree (2013. 11.01)																				
Farm	ID	Result	Birth	Dam	Sibling	Offspring	성별	출산여정	비고	Farm	ID	Result	Birth	Dam	Sibling	Offspring	성별	출산여정	비고	
1	60**	P	2038		9088(f), 11018(f), 12035(m)					60**	11018(f)	MAP ELISA positive animal pedigree (2014. 11.01)	2038		9088(f), 11018(f), 12035(m)					
2	60**	P	4078	7057(f)	90212(m), 11020(m), 12035(f)					60**	11018(f)		4078	7057(f)	90212(m), 11020(m), 12035(f)					
3	71**	P	08-08-12	2252	5038(m), 8090(f), 9076(f)	8099(m), 9087(f), 10359(f), 11039(m), 1300 3(f)	5			A	61** (L-E)	P	08-08-12	2212	3088(f), 11018(f), 9076(m)	9088(f), 11018(f), 12035(m)	5			제사
4	71**	P	07-02-09	5014		abortion(lungs,2009), 10***(f), 12030(f)	3			A	7070** (L-E)	P	07-02-09	3014	abortion(lungs,2009), 10***(f), 12030(f)	9088(f), 11018(f), 12035(m)	3			제사
5	71**	P	07-05-22	1103	9017(f)	9103(m), 사선(13.8.13)	2	13-06-26		A	7070** (L-E)	P	07-05-22	1103	9017(f)	9103(m), 사선(13.8.13)	2	13-06-26		제사
6	71**	sus	07-06-20	2038	5081(m), 6329(f), 6110(f)	10344(f), 11036(f), 12012(m)	3			B	7070**	aus	07-08-20	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친
7	71**	P	08-01-03	5115	9028(f), 11111(m)	10238(f), 11034(m), 12037(f)	3			B	7070**	aus	07-08-20	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친
8	71**	P	08-08-16	6030	9118(f), 10394(f)	abortion(Nov,2011), 12038(m)	3			B	7070**	aus	07-08-20	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친
9	71**	P	08-09-09	6104	9024(f), 10295(m), 11073(f)	110239(f), abortion twin(Nov,2011)	2			B	7070**	aus	08-08-16	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친
10	71**	P	09-02-19	7012	10034(f), 11059(f)	11***(f), 12049(f)	2	-		B	7070**	aus	08-08-16	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친
11	71**	P	09-03-12	6146	10025(m), 11040(m)	12020(m)	1	13-11-23		B	7070**	aus	08-08-16	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친
12	71**	P	09-09-28	7025	10049(f), 12021(f)	12027(m)	1	-	폐사	B	7070**	aus	08-08-16	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친
13	71**	sus	09-01-19	7040		0			B	7070**	aus	08-08-16	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친	
14	71**	P	10-09-28	7070**	12067(m)	12079(f)	1			B	7070**	aus	08-08-16	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친
15	71**	P	10-10-31	6040	9077(m)	12039(m)	1			B	7070**	aus	08-08-16	3012	9081(m), 61029(f), 61202(m)	10044(f), 11038(f), 13012(m)	3			2013 바인기 걸친
16	71**	sus	11-05-08	6130	10019(f), 11034(f)				C	110**	aus	11-09-08	6110	10019(f), 11034(f), 11035(f)	12026(m)					
17	71**	P	11-10-22	8095	10069(f)				C	110**	aus	11-09-08	6110	10019(f), 11034(f), 11035(f)	12026(m)					
18	71**	P	11-11-26	8057	12066(m)				C	110**	aus	11-09-08	6110	10019(f), 11034(f), 11035(f)	12026(m)					

2013

2014

Figure 75. 양성축군 가계도 작성

Table 59. 요네병 양성 및 음성의 어미에서 자축 요네병 양성이 나오는 비율

구분	두수	자손(양성)	비율
어미 (양성)	32	2	6.25%
어미 (음성)	196	30	15.3%

Animal pedigree: offspring of sibling (2013..2017)						
Farm	ID	Birth	Dam	Sibling	Offspring of sibling	
1	60**	2038				
2	65**	4078	7057(f)	11088(f)		
3	61**	08-08-12	2052	5088(m) 8090(f) 9076(f)	abortion ST(june+2010), 120514(f) abortion Feb(2012)	
4	7**	07-03-09	5014			
5	70**	07-05-13	1103	5017(f)	8128(f), 10327(m), 11104(m)	
6	78**	07-08-20	2052	5081(m) 6109(f) 6110(f) 6129(m)	6109(f) 6110(f) 6129(m)	
7	80**	08-01-09	5115	9058(f)	11080(f)	
8	80**	08-08-16	8038	9119(f) 10347(f) 10347(m)	10347(f) 12071(m)	
9	81**	08-09-29	6124	8045(m) 10395(m)	11072(f)	
10	90**	09-03-19	7012	10304(f), death [an_2010], 11055(f)		
11	90**	09-03-12	6146	10025(m) 11040(m)		
12	90**	09-03-28	7025	10346(f)		
13	90**	09-01-19	7053	12001(f), death [an_2012]		
14	105**	10-03-19	7011	12062(m)		
15	105**	10-03-21	6040	9077(m)		
16	110**	11-05-08	6130	10193(f)		
17	110**	11-10-22	8095	10063(f)		
18	110**	11-11-26	8057	12068(m)		

2013

2014

Figure 76. 양성축군 형매에서의 가계도 작성



Figure 77. 우사별 각 pens, 사조 및 급수조 등 MAP 오염도분석

Table 60. 축사환경검사 결과(2014년, 2015년)

구분	2014			2015		
	PCR결과		판정	PCR결과		판정
	IS900	ISMADP02		IS900	ISMADP02	
육성 1	-	-	-	-	-	-
육성 2	-	-	-	-	-	-
육성 3	-	-	-	-	-	-
육성 4	-	-	-	-	-	-
육성 5	-	-	-	-	-	-
육성 6	-	-	-	-	-	-
육성사일리지	미검	미검		-	-	-
송 1	-	-	-	-	-	-
송 2	-	-	-	-	-	-
송 3	-	-	-	-	-	-
검정 1-1	-	-	-	-	-	-
검정 1-2 운		+	±	-	-	-
검정 2-1	-	-	-	33.2	+	+
검정 2-2 운	-	-	-	34.48	+	+
검정 3-1	-	-	-	-	-	-
검정 3-2	37.63(+)	+	+	-	-	-
검정 3-3	-	-	-	-	-	-
검정 분만	41.13(+)		±	-	-	-
검정 4 산	-	+	±	-	-	-
검정 5 착유,대기장	-	-	-	-	-	-
검정 송,방	-	-	-	-	-	-
시험 1-1	35.51(+)		±	-	+	±
시험 1-2 운동	33.68(+)		±	40.53	+	+
시험 2-1	37.16(+)	+	+	-	-	-
시험 2-2 운동	31.87(+)	+	+	37.44	-	±
시험 3	-	+	±	-	+	±
시험 4	-	+	±	미검	미검	
시험 5	27.71(+)		±	37.92		±
시험 6-1	-	+	±	미검	미검	
시험 6-2	43.64	-	±	-	-	-
육성 음수	미검	미검		-	-	-
검정 음수	미검	미검		-	-	-
시험 음수	미검	미검		-	-	-

## 제4절 요네병 양성우 생체지표 및 면역학적 모니터링

### 1. 요네병 양성축 생체지표 변화

요네병 양성축으로 진단된 개체에 대해 지속적인 혈청생화학 분석하여 통한 생체지표 변화를 분석하였다. 알부민 등 18개 항목을 분석하였으며 대부분 정상축군의 참고범위에 포함됨을 확인하였다 (Table 61).

### 2. 소 생체에서의 가검물 샘플링에 따른 요네 검진율의 특징

대규모로 젖소를 사육하는 농가에서 성우 75두를 무작위로 선택하여 서로 다른 두 종류의 검체(혈청과 우유)를 채취 및 두 검체에 대해 소 요네병 ELISA 항체 검사결과를 비교하였다 (Table 62). 75건 중 2건에서 혈청과 우유에서 동시에 소 요네병 항체가 검진되었고 양성으로 진단되었으며 1건에서 혈청 샘플에서는 소 요네병 항체 음성을 보였지만, 우유 샘플에서 소 요네병 항체 양성을 보였다. 또한 1건에서 우유샘플에서만 소 요네병 항체 의양성을 나타낸 것으로 분석되었다. 또한 항체 S/P ratio는 혈청 샘플이 우유 샘플에 비교해 높게 나타내었다.

### 3. 소 요네병 양성 개체에서 가검물에 따른 주기별 항체가 변화

소 요네병 항체 ELISA 양성 개체에서 혈청 및 우유에서의 항체가의 변화를 조사하였다. 개체 A 젖소 혈청 샘플의 경우 초기에 S/P ratio가 100에서 62로 낮아졌고, 시간이 경과함에 따라 60대를 유지한 후 72, 81로 증가하는 양상을 보였다. 우유 샘플의 경우 초기에 S/P ratio가 192, 184로 점진적으로 낮아지다가 시간이 경과함에 따라 145, 95로 급격히 줄어드는 것으로 분석되었다. 우유 샘플에서 S/P ratio 가 90.9로 최저치를 기록했지만, 다시 137, 118로 증가하였다(Figure 78). 서로 다른 두 개의 검체에서의 소 요네병 ELISA 항체가 변화에서 혈청 샘플보다 우유 샘플에서 높은 항체가를 나타내었다. 개체 B 혈청 샘플의 경우 초기에 S/P ratio 가 113에서 28로 급격히 낮아졌으나, 시간이 경과함에 따라 100대를 유지한 후 점차적으로 166까지 증가하였고, 다시 100으로 떨어졌다. 10월 검사에서 201로 최고수치를 나타내었고, 11월 검사에서는 130으로 떨어졌다. 우유 샘플의 경우 초기에 S/P ratio가 2.2를 보였다가, 67.7로 높게 나타났다. 전체적으로 30-50 사이를 기록하였고 10월에 207의 높은 수치를 나타냈다. 11월에는 55.2의 수치를 기록하였다 (Figure 79).

결과적으로, 서로 다른 두 개의 검체에서의 소 요네병 ELISA 항체가 변화에서 혈청 샘플에서 높은 항체가를 나타내었으며 시간이 변화함에 따른 가검물에서의 다양한 항체가 변화를 관찰하였다.

### 4. 분변 내 요네병 항원검사

젖소 분변 308건에 대한 요네병 항원 검사를 위해 PCR 검사를 실시하였다. IS900, ISMAP02 유전자 모두 발현한 것을 양성으로 진단하였으며 3건이 양성으로 진단되어 0.97%의

분변에서 요네병 항원이 배출되는 것으로 조사되었다.(Table 64)

## 5. 요네병 진단 Biomarker 탐색

대규모로 젖소를 사육하는 농가에서 200여두의 젖소에서 분변샘플을 수거하여 요네항원에 대한 PCR을 수행하여 혈청 ELISA 결과와 비교하였다. IS900 primer에서 29샘플에서 항원이 검출되었지만, 대체로 높은 ct값을 보였다. ISMAP02 primer를 이용한 검사에서는 15샘플에서 항원이 검출되었다. 또한 혈청 ELISA 검사와의 비교시, 2개체에서 중복 검출됨을 확인하였다.

대규모로 젖소를 사육하는 1년 이상 성우 280여두의 분변샘플을 수거하여 요네항원에 검출에 대한 특이도(specificity)를 높이기 위해 IS900 과 ISMAP 두 개의 목적유전자를 PCR 수행하였다. IS900 과 ISMAP 가 동시에 4두에서 검출되었다 (Figure 80).

## 6. 요네병 임상증상 전후 생리학적 변화

소 요네병 양성 개체에서의 샘플(혈청 및 우유)에서의 항체가 변화 코호트 분석을 실시하였다 (Figure 81). Case A는 임상형 증상을 나타내어 격리 관리되었던 개체로서, 폐사되기까지 높은 항체가 150~200(s/p ratio)를 유지하였다. Case B는 분만후 임상형 증상을 보인 개체로, 우유에서도 높은 항체가가 지속적으로 유지되었으며 혈청항체가의 85%에 근접하였다. 분만 후 첫 1주 동안 우유에서 혈청샘플보다 높은 항체가를 나타냈으며 전반적으로 혈청과 우유에서 200(s/p ratio) 이상의 높은 항체가를 유지하였다. Case C는 준임상형 상태를 유지한 개체로 분변에서도 항원이 검출되었다. 분만 1주 동안 우유에서 혈청보다 높은 항체가를 유지했지만, 분만후 5개월까지 우유항체 수치가 50(s/p ratio) 이하의 낮은 상태를 유지하다가 서서히 증가하는 패턴을 보였으며, 이러한 변화는 혈중 항체가의 변화와 유사함을 보였다. Case D는 분만 1개월전 검진에서 의양성으로 판정되었고, 3주전 항체가가 상승하여 양성으로 판정되었다. 전체적으로 혈청에서의 항체가가 우유보다 높게 유지되었으며, 우유의 항체가 패턴의 변화도 혈청에서의 항체가 변화와 유사하게 유지되었다. 분만 후 4개월이 지난면서 혈청 항체가가 100 (s/p ratio)이상의 수치를 나타내었다. Case E는 분만 전부터 분만 후 첫 1주 동안 우유에서 혈청보다 높은 항체가가 유지되었다. 비유개시 1개월이 지나면서 혈청내 항체가가 우유보다 높은 수치로 유지되었고, 전체적인 두샘플의 항체가 변화가 유사하게 나타났다. Case F는 임신 4개 월째 쌍태임신으로 유산한 개체로, 본 연구의 주기적인 혈청의 항체가 검사에서 양성과 음성의 경계에서 변화되는 게 관찰되었다. 1회 요네병 검진에서 음성을 보이는 개체라도 차후 우군에서 주기적인 검진을 통해 양성개체를 판별해야 하는 것으로 사료된다. Case G는 혈청에서의 항체가가 우유보다 높게 나타나는 전형적인 모습을 보여주고 있으며 우유에서의 항체가 변화가 혈청에서와의 변화가 매우 유사하게 변화하는 게 관찰되었다. 좀더 자세히 살펴보면, 혈청에서 100(s/p ratio) 일 때 우유에서는 상대적으로 낮은 25-49의 항체가를 유지하는 것으로 조사되어 우유샘플을 통한 요네병 검진시 이러한 점을 고려하여 판단된다. Case H는 Case G에서처럼 혈청과 우유샘플에서의 항체가 변화가 유사하게 나타나는 것이 관찰되었고, 분만전후에 항체가가 높아지는 것이 나타내었다. Case I는 분만전후 우유에서의 항체가가 일시적으로 높게 나타나는 것을 제외하고 전체적으로 혈청과 우유에서 유사한 항체 변화가 관찰됨. 몇몇 앞 Case에서 분만전후 우유에서 혈청보다 높은 항체가가 유지되는 것이 관찰되었다.

## 7. 요네병 양성축 조직 및 장내용물 PCR 결과

ELISA 검사에서 요네병으로 진단된 젖소 2두에 대해 요네병 항원을 검출하기 위해 폐사후 조직을 채취하여 PCR 검사를 실시하였다. 100\*\*의 경우 2015년 1월 검사에서 음성이었지만 2월 이후 항체가 급격히 상승하였으며 지속적인 항체가 양성을 보였으며 2015년 5월 9일 폐사하였으며 80\*\*의 경우 2015년 1월 검사이후 지속적인 항체가 양성을 보였으며 2015년 6월 18일 폐사하였다(Table 63). 양성축 2두 모두 신장, 간, 폐, 비장, 자궁 등 복강실질 장기에서의 요네균 항원은 관찰되지 않았다. 십이지장 일부, 공장, 회장, 맹장 및 직장 일부 조직에서 요네균 항원이 확인되었으며 맹장 장내용물 일부에서 요네균 항원이 확인되었고, 일부 장내 림프절에서 항원이 확인되었다 (Table 64).

Table 61 . 요네병 양성축 혈청생화학 분석으로 통한 생체지표 변화 모니터링

개체	채혈일	ALB	CA	CK	CRE	G-GTP	GLU	AST	ALT	LDH	MG	PHO	T-BIL	T-CHO	T-PRO	TG	BUN	NEFA	3-HB
	Unit	g/dl	mg/dl	IU/L	mg/dl	IU/L	mg/dl	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	g/dl	IU/L	mg/dl	uEq/L	Umol/L
A	2012-12-11	3	9.5	444	0.8	32	91	134	33	1405	2.5	8.1	0	125	8.2	16	9.1	33	255
	2013-01-04	2.9	9.5	398	0.7	30	98	116	25	1306	3	9.9	0	132	7.7	23	12.1	21	263
	2013-01-18	2.8	9.3	271	0.8	32	91	111	26	1162	2.7	7.1	0.05	129	7.9	16	9.3	34	242
	2013-01-29	3	9.4	356	0.9	25	92	129	27	1369	2.7	8.1	-0.04	126	8	14	11.8	27	313
	2013-01-31	3.1	9.3	445	0.9	25	85	133	27	1401	2.7	8.6	0.02	129	8.2	22	13.9	33	248
	2013-02-27	2.4	9.8	292	0.8	18	28	107	18	877	2.7	11.3	-0.01	109	6.3	22	21.1	98	562
B	average	2.9	9.5	367.7	0.8	27.0	80.8	121.7	26.0	1253.3	2.7	8.9	0.0	125.0	7.7	18.8	12.9	41.0	313.8
	2012-12-06	3.8	10.1	191	1.4	24	79	90	23	1210	2.7	9.1	0.05	136	7.9	15	11.7	83	250
	2012-12-27	3.6	4.8	352	1.2	29	98	128	21	1257	2.7	1.3	0.35	85	6.9	1	14.1	398	595
	2013-01-03	3.7	8.4	454	1.1	29	43	193	25	1526	2.1	10.9	0.36	107	7.1	3	21.6	441	1685
	2013-01-07	4.1	7.9	588	1.2	31	80	251	29	1869	2.9	7.1	0.99	107	8.5	3	25.3	1039	2217
	2013-01-10	3.3	8.6	785	1	22	45	285	32	2045	2.4	5.3	0.49	77	8	2	15.1	750	1663
	2013-01-14	3.1	9.4	413	1	27	75	239	29	1823	2.6	7.4	0.18	75	7.2	2	14.2	299	485
	2013-01-18	2.8	9	375	0.9	22	59	207	26	1818	2.4	6.7	0.45	100	6.9	6	17.9	341	358
	2013-01-29	3.1	9	192	1	26	168	154	21	1905	2.9	9.5	1.03	123	8.6	5	28.9	560	479
	2012-01-31	2.4	8.7	643	0.8	22	70	188	20	1801	2	7.7	0.23	88	6.9	7	19.3	283	339
C	average	3.3	8.4	443.7	1.1	25.8	79.7	192.8	25.1	1694.9	2.5	7.2	0.5	99.8	7.6	4.9	18.7	466.0	896.8
	2013-01-18	5.2	12.5	143	1.2	22	101	93	25	1490	2.9	6.8	0.26	118	11.4	14	10.1	333	353
	2013-01-31	4.9	12.1	136	1.6	17	82	83	26	1376	3.1	7.9	0.09	120	9.9	29	11.5	61	343
	2013-02-19	5.1	12.3	1707	1.5	17	92	99	30	1445	3.7	7.3	0.13	107	10.1	28	8.4	208	359
	2013-02-27	5.3	12.4	141	1.5	20	80	87	29	1249	3.6	6.9	0.18	118	11	20	10.3	329	349
D	average	5.1	12.3	531.8	1.5	19.0	88.8	90.5	27.5	1390.0	3.3	7.2	0.2	115.8	10.6	22.8	10.1	232.8	351.0
	2012-12-06	5	11.4	288	1	44	76	132	49	1192	2.5	5.5	0.03	188	10	15	25.2	38	239
	2013-01-03	4.9	11.3	393	0.9	41	73	144	55	1312	3	4.9	0.03	247	9.6	8	29.4	55	248
	2013-01-18	5	11.4	454	1	41	36	177	70	1354	3.7	7.4	0.03	266	9.7	13	31.9	80	371
	2013-01-31	5.1	11.6	483	0.9	42	74	166	65	1509	3.3	6.1	0.04	316	9.5	30	27.5	66	381
	2013-02-19	5.4	11.3	357	0.9	45	84	132	63	1486	4.1	5.2	0.05	343	9.9	12	34.9	67	563
D	2013-02-27	5.8	11.8	455	0.9	39	38	157	69	1436	3.8	5.9	0.03	382	10.9	8	38.8	157	382
	average	5.2	11.5	405.0	0.9	42.0	63.5	151.3	61.8	1381.5	3.4	5.8	0.0	290.3	9.9	14.3	31.3	77.2	364.0

Table 62. 혈청 및 우유 가검물에 따른 소 요네병 항체 ELISA 비교

구분 시료	판정	샘플수	S/P ratio
혈청	음성	71	5.3(평균)
우유	음성		0.99(평균)
혈청	음성	1	42.6
우유	의양성		21.6
혈청	음성	1	33.0
우유	양성		164.1
혈청	양성	2	A 96.2 B 235.1
우유	양성		A 41.8 B 172.3
합계		75	

\* 참고 : 요네 검진 ELISA 항체가 판정기준(s/p 비율)

구분	양성	의양성	음성
혈청	55 이상	45~55	45 이하
우유	30 이상	20~30	20 이하

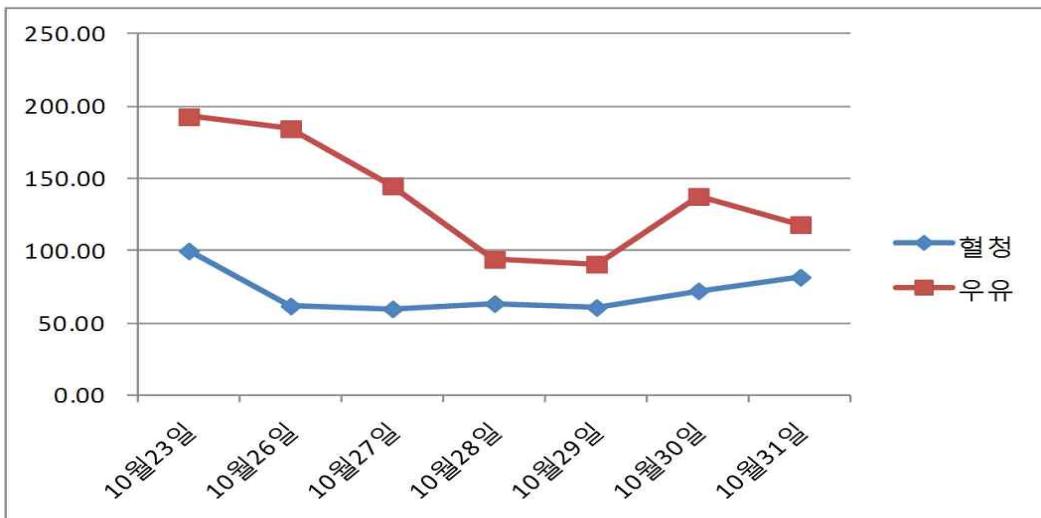


Figure 78. 요네 양성축(개체 A)의 혈청 및 우유 내 ELISA 항체가 변화

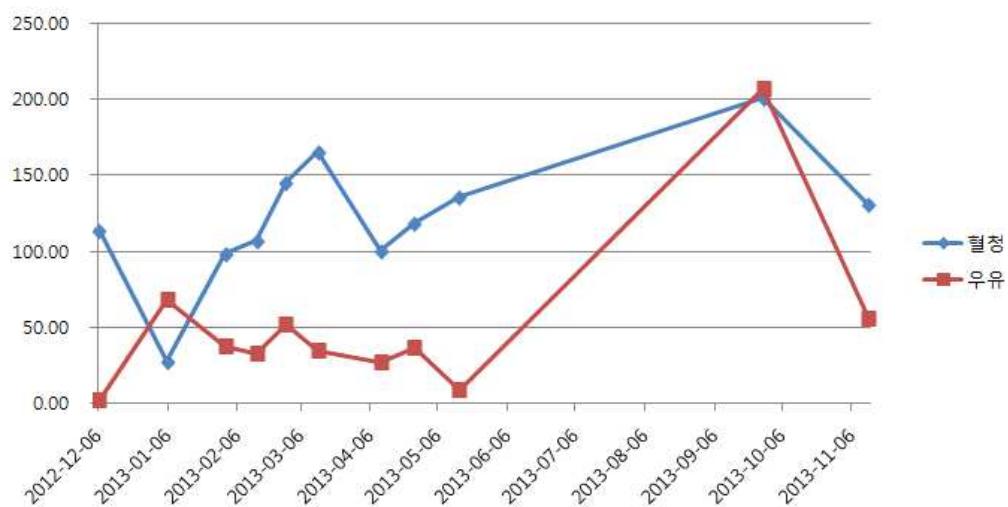


Figure 79. 요네 양성축(개체B)의 혈청 및 우유 내 ELISA 항체가 변화

No.	%적발률	IS900_Ct24	ISMAPQ2_PCR	비고
1	80**	29.9	-	
2	30**	35.31	-	
3	10***	34.67	-	
4	70**	34.20	-	ELISA 양성
5	61**	35.83	-	
6	70**	32.28	-	
7	10***	34.19	-	
8	61**	35.22	-	ELISA 양성
9	100**	35.92	-	ELISA 양성
10	100**	35.72	-	
11	81**	35.17	-	ELISA 양성
12	90**	34.33	-	
13	80**	33.69	-	ELISA 양성
14	10***	35.51	-	
15	10**	35.18	-	ELISA 양성
16	80**	26.6	-	
17	40**	35.74	-	
18	11***	35.51	-	
19	12***	35.32	-	
20	10***	36.44	-	
21	12***	36.53	-	
22	12***	35.33	-	
23	12***	35.03	-	
24	12***	35.08	-	
25	20**	35.13	-	
26	11***	35.09	-	
27	11***	35.67	-	
28	71**	35.51	-	
29	81**	34.76	-	
30	90**			ELISA 양성
31	90**			ELISA 양성
32	70**			ELISA 의양성
33	90**			ELISA 의양성

2013

2014

총장영	번호 기록번호	연령	PCR결과		판정	폐양	비고
			IS900	ISMAPQ2			
	1	81**	-	+			
	2	40**+	-	-			
	8	60**	-	+			
	9	80**	-	-			
	10	90**	-	+			
	11	80**	-	-			
	25	90**	-	+			
	26	60**	-	+			
	27	120**	-	-			
	67	101**	-	-			
	68	100**	-	+			
	69	120**	-	+	+	+	
	163	120**	-	-			
	164	100**	-	-			
	165	100**	-	-			
	166	80**	-	+	+	+	
	167	130**	-	-			
	194	110**	-	-			
	195	81**	-	+	+	+	
	196	110**	-	-			
	208	100**	-	-			
	209	80**	-	-			
	210	81**	-	+	+	+	
	211	80**	-	-			
	283	70**	-	-			
	284	110**	-	-			

Figure 80. 요네병 진단을 목적으로 한 분변 내 요네병 항원검사

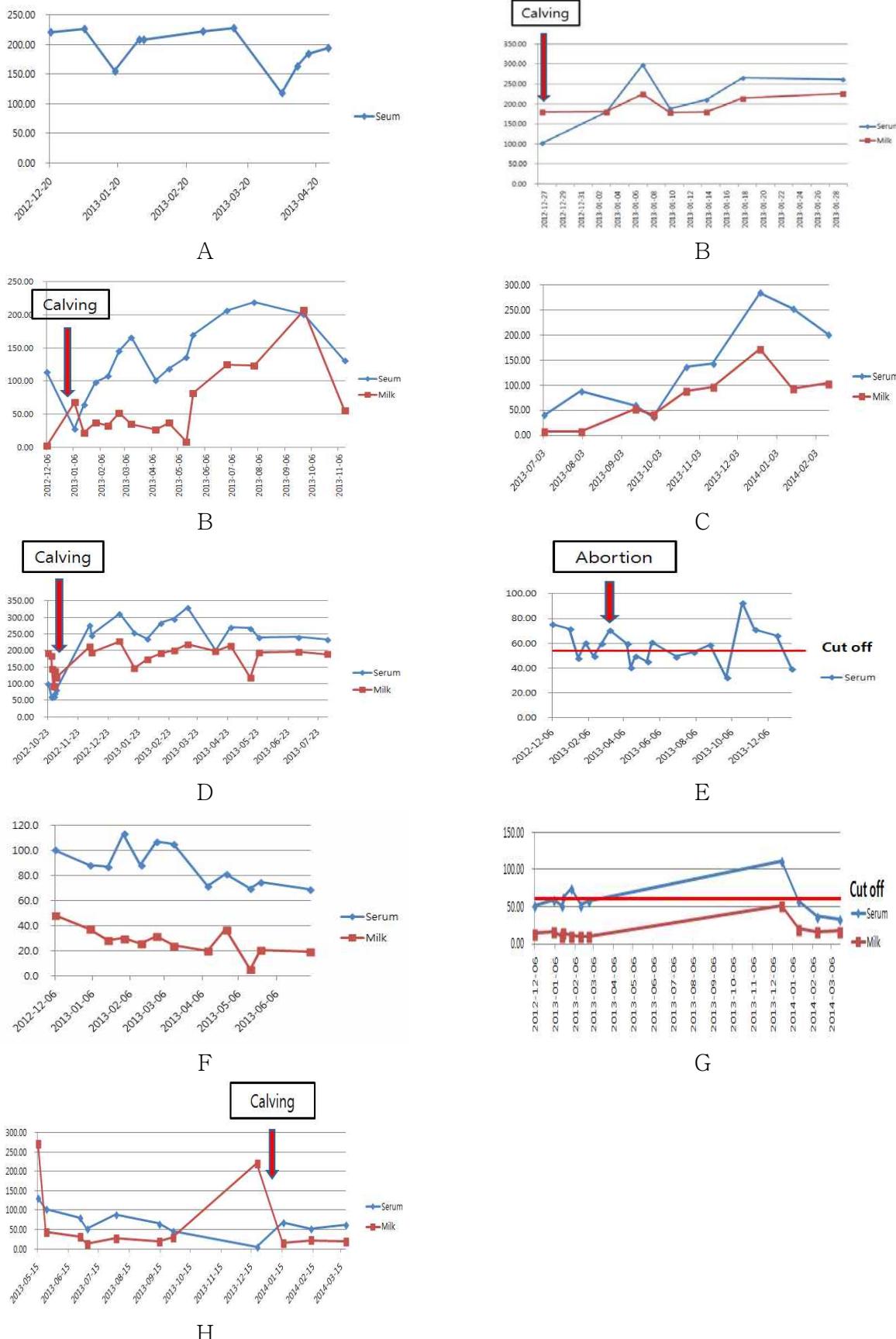


Figure 81. 소 요네병 양성축의 혈청 및 우유내 ELISA 항체가 변화

Table 63. 요네병 양성축 ELISA S/P ratio 변화 및 폐사일

구분	ELISA S/P ratio					폐사일
	2015년 1월	2015년 2월	2015년 3월	2015년 4월	2015년 5월	
100**	22.1	158.2	207	223.8	210.9	2015년 5월 9일
80**	106.3	-	197.3	224	235.6	2015년 6월 18일

Table 64. 요네병 양성축 조직 및 장내용물 PCR결과

구분	100**			80**		
	PCR결과		판정	PCR결과		판정
	IS900	ISMAP02		IS900	ISMAP02	
4위	-	-	-	-	-	-
십이지장	-	-	-	36.31	-	±
공장	34.95	+	+	미검	미검	
회장	27.72	+	+	미검	미검	
회맹연접부	27.54	+	+	미검	미검	
맹장	32.67	+	+	37.83	+	+
결장	미검	미검		33.64	+	+
직장	-	+	±	미검	미검	
장간막립프절	23.76	+	+	미검	미검	
1위립프절	-	-	-	미검	미검	
간쪽립프절	41.72	-	±	미검	미검	
신장	-	-	-	-	-	-
간	-	-	-	-	-	-
폐	-	-	-	-	-	-
비장	-	-	-	-	-	-
자궁				-	-	-
1위 내용물	-	-	-	미검	미검	
2위 내용물	-	-	-	미검	미검	
3위 내용물	-	-	-	미검	미검	
4위 내용물	-	-	-	-	-	-
십이지장 내용물	-	-	-	미검	미검	
공장 내용물	-	-	-	미검	미검	
맹장 내용물	37.01	-	±	29	-	±
분변	34.68	-	±	미검	미검	

## 제5절 요네병 균절 프로그램 적용 평가 및 경제성 분석

### 1. 대규모 소 농장 요네병 관리 방법

정기적 전 두수 검진을 통한 질병 모니터링하고 양성축군은 격리 및 도태를 추진한다. 월별 젖소에서 혈청 내 요네 항체가의 변화가 다양하기 때문에 요네병이 다발하는 대규모 소 농장의 경우 ELISA를 이용한 요네병 검진 시 1회/년 검진보다는, 2-3회/년 주기적인 검진을 통해 양성개체의 지속적으로 검출하는 것이 중요하다. 혈청에서의 요네병 ELISA 항체 검사는 시기별로 다양하게 나타낸다. 양성축으로 진단되더라도 다음 검진 시 음성 수준의 항체가를 보이지만 시간이 경과함에 따라 양성축 수준의 항체가로 증가하는 다양한 변화를 보였다(Figure 82).

젖소 개체에 따라 항체가의 변화의 폭이 크게 나타내어 양성축에도 불구하고 음성으로 진단되는 경우가 있다. 좀 더 정확한 판단으로 위하여 주기적인 검진을 통해 가음성(false negative)을 낮추는 것이 중요하다. 또한 요네병 ELISA 검진 후 양성축 격리 또는 도태 시 항체가 수준에 따른 우선순위를 두어 우군에 요네병 전파(감염) 위험도를 낮추는 것이 중요할 것으로 사료된다 (Table 65).

양성축임에도 불구하고 임신축이거나 기타 사정으로 인해 도태가 어려운 개체는 별도 표시를 하여야 한다(Figure 83). 요네병 양성우 임신우가 분만할 때 자우가 어미소의 분변이나 초유에 의한 수직감염을 차단하기 위하여 우사 관리자 모두가 인식할 수 있는 표시를 하여 분만 전후 별도 관리를 준비하여야 한다. 분만 시에는 어미의 분변이 자우에 경구감염되지 않도록 주의하여야 하고 양성축의 초유 및 우유는 송아지에 급여되지 않도록 관리하여야 한다. 그러기 위해서는 미리 음성인 개체로부터 초유 확보 및 냉동 보관하여야 한다. 양성으로 진단된 개체로부터 태어나는 송아지는 어미의 분변오염이 되지 않도록 분만 후 바로 분리하고 별도의 공간에 사육하여야 하며 요네병 음성 초유를 분만후 신속하고 충분히 급여하는 것이 중요하며 보통 6시간이내 4L를 급여한다. 양성개체 초유를 급여할 경우 63°C, 30분간 저온살균 후 급여하며 만약 저온살균기가 없을 경우 항온수조(water bath)를 이용하여 처리한 우유를 급여한다. 이유 시까지 음성개체의 우유를 급여하고 원유살균기 등이 구비되어 살균이 가능할 경우 살균 원유 급여하여야 한다. 요네병 전파에 감수성이 있는 시기인 6개월령까지는 분변이 오염되지 않은 사료와 물을 급여하고 송아지는 성축과의 접촉을 차단하는 것이 중요하다.

### 2. 요네병 균절 프로그램 적용 평가 및 경제성 분석

대규모 젖소 사육농가 젖소의 요네병 항체 양성율은 최고 9.5%이었으며 지속적인 요네병 검진, 양성우 도태, 송아지 위생관리를 통해 최저 2.5%의 양성율을 보였다. 한우농장의 경우 최고 3.7%의 한우가 요네병 항체 양성을 나타내었고 이후 최저 0.6%의 양성율을 보여 안정적인 결과를 도출되었다. 젖소 100두 사육농가에서의 요네 유병율 10%시 유생산량, 육성율, 중체량, 도태율, 치료비용 등 포함 연간 26,730천원의 경제적 손실이 유발되는 것으로 미국 USDA-APHIS에서 보고되었다. 국내 젖소 100두 사육농가에서 주기적인 요네병 검진으로 양성축의 검진율 향상 및 유병율 10%에서 5%로 감소시 약 9,115천원/년의 소득 향상이 기대된다.

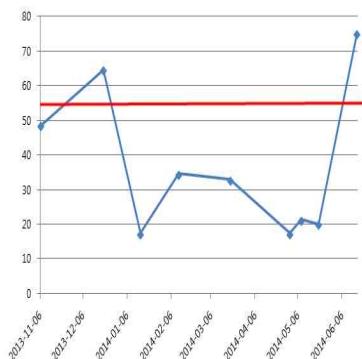
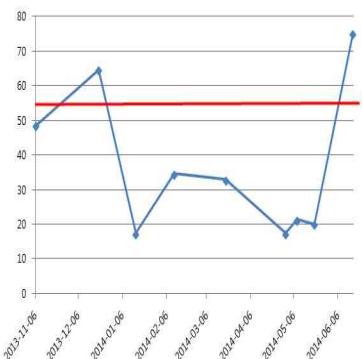
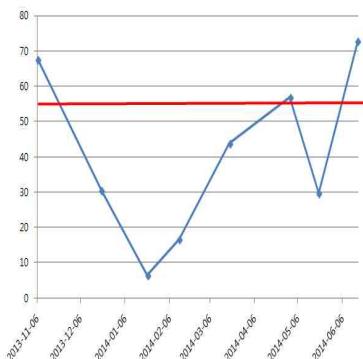


Figure 82. 시간대별 가축개체에서의 항체가 변화



Figure 83. 요네병 양성축 별도 표시 예시(이표에 끈, 발목 색깔띠 등)

Table 65. 요네병 ELISA S/P ratio 수준에 따른 우선순위

ELISA (S/P) ratio (%)	판정	예측가능 가축상태	도태 및 격리 순위
100 이상	강한 양성	임상형 전환가능	1
65-100	양성	감염 및 균배출	2
55-65	약한 양성	감염초기,	3
45-55	의양성	재검진	-

Table 66. 요네병 검진시 경제성 분석

손실적 요소(A)	이익적 요소(B)
○ 검진비용 - ELISA 검사 비용: (천원) 100두 × 3회/년 검사	○ 증가되는 이익 - 젖소 100두 사육농가에서 유병율 5%이하 유지시 13,365(천원)/년 이익
○ 계: 1,300 (천원)	- 계: 13,365 (천원)
○ 추정수익액(B-A) = 13,365,000 - 1,300,000 = 12,065,000원	

젖소 100두 사육농가에서의 요네 유병율 10%시, 26,730(천원)/년 경제적 손실유발 (미국):  
유생산량, 육성율, 증체량, 도태율, 치료비용 등 포함

## 제6절 분변 시료에서 요네병균 검출을 위한 다중 RT-PCR 개발

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)는 가축 및 야생동물에서 장 내 육아 종성 감염증을 유발한다. 이 연구의 목적은 MAP 특이유전자 3개(IS900, F57 및 ISMAP02)의 빠른 검사를 위한 다중 실시간 중합효소연쇄반응기법을 개발하고 평가하는데 있다 (Table 67). American Type Culture Collection(ATCC19698)에서 확보한 MAP의 유형 균주 및 10 마리의 우군에서 수집 한 152 개의 분변 샘플을 분석 민감도를 평가하고 분석의 진단 성능을 평가하기 위해 사용 하였다. 모든 분변 시료는 설사를 유발하는 소에서 채취 하였다. 배설물 152개 중 24개가 MAP에서 양성이었으며 MAP 특이적 겔 기반 PCR은 ISMAP02 유전자를 표적으로 하였고 128개는 음성이었다. 128개 시료 중 6 개 시료는 MAP 항체 표적화 ELISA 검사에서 양성 이었으나 PCR에서는 음성이었다. mqPCR 분석의 분석 감도 (즉, 검출 한계)는 1 ml 당 공지 된 CFU를 갖는 연속 희석 된 박테리아 혼탁액을 사용하여 추정하였다. 각 표적 유전자에 대한 분석의 추정 검출 한계 (세포 / ml)는 : IS900의 경우 150; 50 ISMAP02; F57의 경우 1500이었다. 각 표적 유전자의 10 배 단계 희석을 사용하여 분석에 의해 생성 된 표준 곡선은 0.992에서 0.999 사이의 상관 계수 ( $R^2$ )와 3.246-4.362의 기울기를 보였으며(그림 1), PCR 반응의 선형성이 우수함을 나타내었다. 다른 시험과 비교하여 분석의 진단 성능 mqPCR 분석과 다른 실험실 테스트 간의 152 개의 대변 샘플에 대한 테스트 결과의 비교는 Table 68과 같다.

전반적으로 mqPCR 분석은 33개의 샘플을 검출했으며 이는 9개 이상의 양성 각 약제에 대한 기존의 실험실 테스트로 확인 된 샘플. 특히, MAP 항체에 양성 이었지만 배양 또는 겔 기반 PCR에서 양성인 6 샘플 모두는 mqPCR 분석에서 양성이었으며, 특히 ISMAP02 유전자 서열을 표적으로 하는 분석에서 양성이었다. mqPCR 분석과 기존 검사 간의 전체적인 검사 일치도는 94%( $\kappa = 0.807$ )이었다.

평가 결과 분석 민감도는 IS900이 150 cells/ml, F57이 1500 cells/ml, ISMAP02가 50 cells/ml로 확인되었다. 152개 소 분변시료를 대상으로 실시한 검사 결과 개발한 기법이 기존 검사방법보다 빠르고 적은 비용으로 동시검사가 가능한 것으로 확인되었다. 검사결과의 일치도 외의 불일치 결과는 개발한 기법이 양성으로 확인하였으나, 기존 검사에서는 음성으로 나타난 것 때문으로 확인되어, 개발한 기법이 더 높은 민감도를 갖는 것으로 나타났다. 개발한 다중 실시간 중합효소연쇄반응기법은 가축 및 야생동물에서 파라결핵 또는 요네병의 조사를 위한 빠르고 정확한 검사기법이 될 것으로 생각된다 (Figure 84).

Table 67. 다중 RT-PCR에 사용된 프라이머와 프로브 시퀀스

Target gene	Primer/probe	Sequences (5' to 3')	Annealing temperature (oC)	Product size (bp)
IS900	IS900(Q)-F	GATGGCCGAAGGAGATTG		
	IS900(Q)-R	CACAACCACCTCCGTAACC	60	145
	IS900(Q)-probe	FAM-ATTGGATCGCTGTGTAAGGACACGT- BHQ1		
	F57(Q)-F	GCCCATTTCATCGATACCC		
F57	F57(Q)-R	GTACCGAATGTTGTTGTCAC	60	147
	F57(Q)-probe	Joe-CAATTCTCAGCTGCAACTCGAACACAC-BHQ1		
	ISMAP02-for	CGCCAGGAACGCAAACAT		
ISMAP02	ISMAP02-rev	GTGCAGGGTCGCTCTGATG	60	96
	ISMAP02-probe	Cy5- ACTCCGCATCCAACAACTCACGCTG -BHQ2		

Table 68. 기준의 검사법과 비교한 다중 RT-PCR의 검사 결과 일치도

		Multiplex	real-time PCR	Overall	% agreement
		Positive	Negative	( $\kappa$ value)	
Routine tests (culture or gel-based PCR)	Positive	24	0	94%	(0.807)
	Negative	9	119		

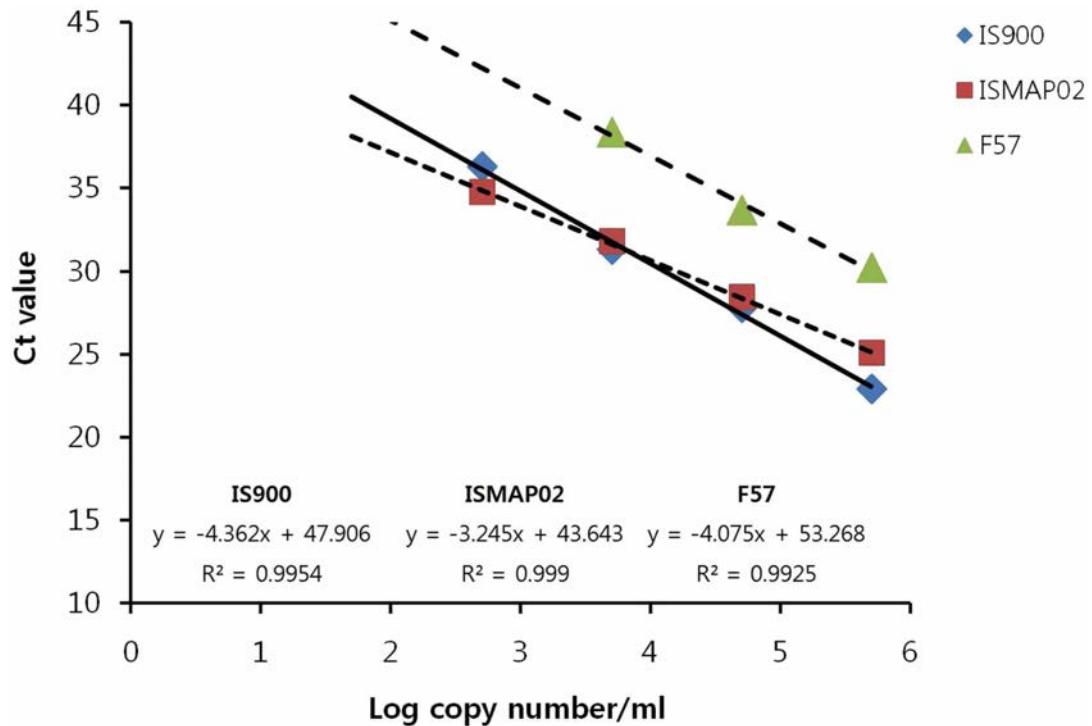


Figure 84. MAP 특이 유전자 시퀀스에 대한 검사 결과. 배양된 각 MAP 균주의 10진 희석액이  $5 \times 10^1$ 에서  $10^5$  까지 template으로 사용되었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 제1절 : 목표대비 달성도

#### <제 1 세부: 유전체 정보를 활용한 요네병 발현 양상 기전 연구>

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
1)유전체 분석을 위한 요네병의 실험동물 모델 확립	20	<p>1) 실험동물에서 pathogenesis 연구를 위한 면역학적 및 병리학적 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험동물에서 요네병 감염의 병리학적 평가 : H&amp;E 염색을 통하여 조직병리학적 변화 granulomatous inflammatory reaction을 관찰함. 또한 Acid-fast 염색을 통해 조직에서 요네균의 분포를 관찰</li> <li>- 실험동물에서 요네병 감염의 면역학적 (cytokine) 평가 : 마우스에서 생성되는 cytokine의 양은 Quantitative Real-time PCR 기법을 이용하여 cytokine gene expression 정도를 측정함.</li> </ul> <p>2) 요네병균 감염에 따른 유전체(transcriptomes)발현 양상 분석 및 주요 지표 물질 (biomarker)발굴</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 마우스에 요네균 감염 시킨 후 감염 시기별로 채취한 spleen의 total RNA를 추출하여 microarray를 시행.</li> <li>- 감염군과 대조군 간의 유전자 발현 차이에 유의적인 변화를 보이는 유전자 군에 대하여 Quantitative Real-time PCR 기법을 이용하여 유효성을 확인.</li> <li>- 유전체 분석을 통해 요네병감염과 상관성이 높다고 판단되는 유전자들을 발굴하고, 지표물질로서의 가치가 높은 물질을 후보물질로 선택. 소에서 요네균 감염에 대한 biomarker 발굴에 기초자료가 될 수 있도록 정리함.</li> </ul>	100
2)소에서 유전체 정보를 활용한 biomarker 탐색	20	<p>1) 요네병 감염 수준별에 따른 숙주동물 (소) 실험대상 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 요네병 감염 수준 평가</li> <li>- Fecal shedding 개체 검색: 총 275두의 소를 대상으로 분변을 채취하여 분변 속에 <i>M. paratuberculosis</i>의 존재 유무를 PCR 방법을 통해 확인.</li> <li>- 혈중 항체 양성 개체 검색: 총 275두의 소를 대상으로 혈액을 채취하여 ELISA 검사를 실시하여 혈청학적 양성개체 확인.</li> <li>- 연령, Fecal shedding 여부와 혈중 항체가 양성 여부에 따라 요네병 감염 단계를 구분.</li> </ul> <p>2) 요네병 감염 수준별에 따른 혈중 면역세포에서 유전체 (transcriptomes) 발현 양상 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 요네병 감염수준 평가를 통해서 선발된 실험대상 (소)에서 혈액을 채취하고 total RNA를 추출하여 microarray를 시행.</li> <li>- 감염단계별 그룹 간의 유전자 발현 차이에 유의적인 변화를 보이는 유전자 군에 대하여 Quantitative Real-time PCR 기법을 이용하여 유효성을 확인.</li> <li>- MAP 감염시 감염단계별로 나타나는 혈중 면역세포에서의 유전자 변화를 살펴보았으며, 이를 바탕으로 감염시 biomarker로 사용할 수</li> </ul>	100

		있는 후보 유전자를 선발함.	
		<p>3) biomarker 후보물질 선정</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- biomarker 후보물질 선정 전략 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ mouse macrophage cell line raw cell 264.7에서 MAP 자극 후 변화된 유전체들 중 자극 초기 (자극 후 6h)에 증가하고 후기 (자극 후 120h)에 감소하는 유전자를 선정함.</li> <li>▪ 마우스 감염모델에서 MAP 감염 초기 단계에 증가한 유전체들 중 Ingenuity Knowledge base를 바탕으로한 Biomarker Discovery program (Ingenuity Systems Inc., Redwood, CA)을 통해 filtering하여 진단적 가치가 있는 유전자 선발함.</li> <li>▪ 분변 PCR 및 ELISA 결과에 따른 요네병 자연감염 소 그룹에서 감염 단계에 따라 발현 양상이 다른 upstream regulator의 예측을 통해 이의 유의적 변화를 나타내는 target gene 및 down stream gene을 선발함.</li> </ul> </li> </ul>	
3) 3) 3)	발굴 biomarker 후보 물질의 유효성 평가	<p>1) biomarker 후보물질의 유효성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발된 biomarker 후보 물질의 유효성 평가를 위해 앞서 구분한 감염단계 그룹별, 혈청내 항체 수준별 biomarker 후보물질의 상관관계를 살펴봄.</li> <li>○ ELISA 수준에 따른 상관성 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- ELISA의 양성 유무 및 S/P ratio 수준별 구분된 그룹간 biomarker 후보물질 발현 경향을 확인하여 진단적 가치가 높은 biomarker 발굴 (<i>KLRB1, CXCR3, MMP9, SERPINE1, IL10, HP, HGF, CD14, CHI3L1, LTF, ELANE, S100A8, S100A9, TFRC, GBP6</i>).</li> <li>- 이 중 ELneg 그룹에서 2.0 배 이상으로 증가하는 유전자들 (<i>KLRB1, SERPINE1, HGF, LTF, S100A9</i>)을 최종 후보로 선정.</li> </ul> </li> <li>○ 감염단계에 따른 상관성 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- ELISA 결과 및 분변 shedding 여부, 연령 등을 고려하여 감염단계를 구분하고 이들간의 biomarker 후보물질 발현 경향을 확인하여 진단적 가치가 높은 biomarker 발굴(<i>KLRB1, SERPINE1, HGF, LTF, TFRC, GBP6</i>).</li> </ul> </li> <li>○ <i>M. paratuberculosis</i> 감염에 대한 사람 면역세포에서의 biomarker 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 마우스 감염 모델에서 선정한 20개 유전자에 대하여 사람의 macrophage cell line (THP-1)에서 <i>M. paratuberculosis</i> 감염 관련 biomarker의 발현 양상을 분석함.</li> <li>- 후보 유전자들은 다음과 같은 기능 및 발현 양상에 따라 4개의 그룹으로 구분되었음. A, activation of macrophage / phagosome maturation; B, Th1 type chemokines; C, the disease progression; D, no significant changes of expression.</li> </ul> </li> </ul> <p>3) 발현 양상 분석을 통한 진단용 biomarker 최종 선정</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 본 연구 과제 3년차에 수행한 요네병 자연 감염 소 그룹에서의 biomarker의 유효성 평가 실험에서 7종의 유전자 (<i>KLRB1, HGF, SERPINE1, LTF, S100A9, TIMP-1, FGF2</i>)를 최종 선정.</li> <li>- 또한 기 발표된 논문을 통해 준 임상형 단계의 요네병 자연 감염 소에서 유전자 발현의 증가가 확인된 유전자도 추가하여 선정함 (<i>TIMP-1, FGF2</i>)</li> <li>- 준 임상형 그룹에서 발현이 증가하는 유전자 (<i>KLRB1, CXCR3, MMP9, SERPINE1, IL10, HP, HGF, PIGR, MPO, CD14, CHI3L1, LTF, ELANE, S100A8, S100A9, TFRC, GBP6</i>) 가 다수 확인되었으며, 이중에서 준 임상형 그룹의 60% 이상이 발현이</li> </ul>	100

		<p>증가하면서 mean fold change 2.0 이상인 유전자(<i>KLRB1</i>, <i>HGF</i>, <i>SERPINE1</i>, <i>LTF</i>, <i>S100A9</i>)를 현장 적용에 사용할 유전자로 최종 선정하고 각 유전자들의 발현 정도가 2.0 이상인 것을 양성으로 판정.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 위의 선별한 유전자들을 바탕으로 소 (<i>Bos taurus</i>)에서의 유전자를 검색하고 이에 대한 Real-time RT-PCR 용 primer 제작 및 PCR 조건 확립.</li> </ul> <p>4) 최적의 진단을 위한 biomarker 유전자 조합 선별</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 준 임상형 그룹을 대상으로 하여 각 유전자들의 발현 정도가 2.0 이상을 양성 판정 기준으로 가정한 후, 가장 높은 판정률을 나타내는 유전자 조합을 선별한 결과 <i>KLRB1</i> 유전자가 단독으로 가장 높은 양성 개체 판정률을 보였으며 83.3% (5/6) <i>KLRB1</i> 유전자와 나머지 <i>SERPINE1</i>, <i>HGF</i>, <i>LTF</i>, <i>S100A9</i> 유전자를 조합하여 판정하였을 때 100% (6/6)의 판정률을 보였음.</li> </ul>	
4)발굴 biomarker 등 이용 면역학적 진단 기법 개발	20	<p>1) 진단기법의 현장 적용을 위한 샘플 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발 진단기법의 적용 및 효능 평가를 위한 양성·음성 혈청 수집</li> <li>- Biomarker 후보물질의 fecal shedding 수준 및 요네병 감염시기에 따른 상관성 분석을 위하여 지속적으로 국내 사육소에서 양성 및 음성 혈청 확보함.</li> <li>- 국내 사육소의 혈청은 임상증상, <i>M. paratuberculosis</i> 균의 배출정도, 및 ELISA 결과 등 다양한 역학정보에 따라 구분하여 수집함. 혈청 수집은 가능한 전국적으로 고른 분포를 가질 수 있도록 함. 총 7개 지역에서 147개의 양성 혈청과 276개의 음성혈청을 수집하였으며, 혈청 수집개체에 대하여는 개체의 일반적인 역학사항도 같이 수집하여 자료를 확보함.</li> </ul> <p>2) Real-time PCR 기법을 이용한 진단법 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ELISA 및 분변 shedding 정도에 따른 요네병 감염우 44두 개체의 전혈을 채취하여 RNA 추출 및 cDNA 합성 후 real-time RT-PCR 진단기법을 이용하여 검사한 결과 biomarker 유전자 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인하여 양성 개체를 진단하였고, 이를 바탕으로 ROC curve 분석을 통해 높은 진단적 가치를 보이는 유전자를 선정함.</li> <li>- 양성 개체 전체의 진단에는 7개의 유전자(HP, TIMP1, TFRC, SERPINE1, DEFB10, S100A8, MMP9)가 높은 진단적 가치(AUC≥0.8)를 보임. ELISA(-)/PCR(+)인 개체의 진단에는 8개의 유전자(TIMP1, DEFB1, TFRC, DEFB10, S100A8, SERPINE1, MMP9, HP)가 높은 진단적 가치(AUC≥0.8)를 보임. 또한 ELISA(+)/PCR(-)인 개체의 진단에는 4개의 유전자(HP, TIMP1, TFRC, SERPINE1)가 높은 진단적 가치(AUC≥0.8)를 보였으며, ELISA(+)/PCR(+)인 개체의 진단에는 6개의 유전자(S100A8, HP, SERPINE1, TFRC, MMP9, DEFB10)가 높은 진단적 가치(AUC≥0.8)를 보임.</li> <li>- ROC curve 분석을 통해 각 biomarker 의 진단적 가치를 평가한 결과 요네병 감염 개체 중 기존의 진단방법으로는 확인할 수 없었던 준임상형 개체들까지도 탐색할 수 있음을 확인하였음.</li> </ul> <p>3) Biomarker 이용 ELISA 진단법 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 재조합 단백질의 발현, 정제 및 항체 획득을 위해 선정된 biomarker 단백질들의 특성 분석과 epitope prediction 및 단백질 구조분석을 수행함.</li> <li>○ Biomarker 단백질 발현 및 정제</li> <li>- 재조합된 Biomarker 단백질 발현 정도를 SDS-PAGE 및 Western blotting 을 통하여 확인함.</li> <li>- 발현이 확인된 clone 을 배양한 후 affinity chromatography를 이용하여 단백질 정제 최적 조건을 수립하여 생산함.</li> <li>- <i>TIMP-1</i>, <i>SERPINE1</i>, <i>FGF-2</i> protein expression 결과 각각 24kDa,</li> </ul>	100

		<p>45kDa, 20kDa에서 단백질 발현을 확인 함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- GE health care사의 His-spin trap kit를 이용하여 단백질 정제를 수행 후 단백질 발현 여부를 SDS-PAGE 및 anti 6x-histidine western blot으로 확인.</li> <li>○ 재조합 단백질에 대한 항체 생산</li> <li>- 기니픽에서 생산된 항체를 이용하여 ELISA법을 확립하여 야외 가검 혈청에 적용</li> <li>○ 기니픽 유래 항체를 이용한 ELISA 기법의 확립 마우스 유래 antibody 확보. sandwich indirect 방식의 ELISA 기법을 확립하는 작업을 수행 중.</li> </ul> <p>4) 균체항원을 이용한 요네병의 혈청학적 진단기법 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항원의 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선정된 항원 후보 단백질에 대한 진단물질로서의 적합성 평가를 위해 transmembrane prediction 및 3D structure prediction 실시.</li> </ul> </li> <li>○ Cloning 기법을 이용한 재조합 단백질 생산 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항원 후보 단백질 중 총 8종에 대한 유전자 cloning 수행.</li> <li>- 총 7종에서 단백질 발현 및 정제.</li> </ul> </li> <li>○ Western blot을 이용한 항원 후보 단백질의 반응성 측정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 요네병균에 Immunized 된 실험동물 (Rabbit)의 purified IgG를 이용하여 재조합 단백질의 Western blot 반응성 확인.</li> <li>- 요네병의 감염 stage 별 야외 혈청을 이용하여 Western blot 수행.</li> </ul> </li> <li>○ ELISA 법을 이용한 항원 후보 단백질의 진단 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- ELISA 진단법 개발을 위해 발현 및 정제 완료된 재조합 항원 후보 단백질들에 대한 진단 유효성 평가 수행.</li> <li>- ELISA 조건 최적화 및 field sample과의 반응성 측정.</li> </ul> </li> </ul>	
5) <i>M. paratuberculosis</i> 의 국내 분리주의 특성 분석 및 면 역특이성분석	20	<p>1) 균 분리 동정 및 검색기법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 분변에서 요네병균 검색을 위한 DNA extraction 법 확립</li> <li>○ IS900 real-time PCR 및 ISMAP02 nested PCR 법을 통한 분변의 균 검색기법 확립</li> <li>○ 균 분리 및 동정기법 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 요네균 배양기법 확립 및 분변 및 우유샘플에서의 전처리법 확립</li> <li>- Versa-TREK Para-JEM system</li> <li>- 요네병균의 분리 및 동정을 위한 새로운 시스템 도입.</li> <li>- VersaTREK Para-JEM system을 이용하여 현재까지 19주의 야외 분리주를 확보.</li> <li>- 지속적인 샘플 확보로 균 분리 및 동정 수행중.</li> </ul> </li> <li>2) 소 사육농장에서 요네병 발생 실태 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 전국단위 농장에서 분변 PCR 기법을 이용한 요네병 양성 개체 검색 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전국단위 소 사육농가에서 개체별로 채취한 분변을 이용하여 PCR 진단 수행.</li> </ul> </li> <li>○ 전국단위 소 농장에서 요네병 발생 실태 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분변 PCR 기법을 이용하여 전국단위 농장에서의 요네병 발생 실태를 축종 및 농장별, 연령별 분석 (2013.09~2014.08)</li> </ul> </li> <li>○ 대규모 젖소 사육농장에서 요네병 발생 실태 조사 (2014-2015) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대규모 사육농장의 소 전 두수를 대상으로 분변을 채취하여 PCR 검사 실시.</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>3) 소에서 요네병 감염에 따른 국내 분리주의 역학적 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ IS1311 PCR-REA <ul style="list-style-type: none"> <li>- 야외 분리주 19주 및 호주와 체코 분리주를 이용하여 IS1311 PCR-REA 분석 실시.</li> <li>- 분석 결과 Cattle type 2주와 Bison type 7주 확인.</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	100

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Mycobacterial interspersed repetitive units - Variable number of tandem repeats (MIRU-VNTR) typing           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Typing 결과 IS1311 PCR-REA typing에서 Cattle type으로 분류되었던 야외주는 모두 INMV 2 type으로 나타났고 Bison type으로 분류되었던 야외주는 모두 INMV 68 type으로 나타났음.</li> </ul> </li> <li>○ MLSSR typing           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 분리주는 총 3가지 type으로 나타났고 체코 분리주는 3가지 type 호주 분리주는 1가지 type으로 나타남.</li> <li>- 문자역학적 typing 결과와 지역적 분포를 정리함. 국내 분리주는 bison type으로 대표되는 특정 type의 strain이 고르게 분포하는 것으로 확인.</li> </ul> </li> </ul>	
	100%	100

## <제 2 세부: 소 사육농장의 요네병 근절모델 개발 연구>

연구개발 목표	연구개발내용	달성도
대규모 일관 소사육농장 요네병 발생 실태 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대규모 젖소 사육농장에서의 요네병 발생실태 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 정기적인 젖소사육 농가에서 (2006년부터 2016년까지) 요네병 항체 검사 (ELISA)를 통한 질병 관리</li> <li>- 항체 양성축들을 관리하여 전체 우군의 유병율을 안정적으로 유지하고, 동시에 항원(분변)검진을 통한 전염원을 차단하여 우군내 전파를 방지</li> </ul> </li> <li>○ 대규모 한우 사육농가에서의 요네병 발생실태 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대규모로 한우를 번식 및 비육하는 농장에서의 1년이상 성우를 대상으로 요네 항체검진, 매우 낮은 유병율 유지</li> <li>- 환경시료와 우군의 분변검사를 통해 감염균을 배출하는 개체를 검사</li> </ul> </li> </ul>	100
한국형 요네병 근절 프로그램 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 요네병 근절 프로그램 개발 및 현장 적용 <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 정기적인 소 요네병 검진으로 양성 개체 및 항체가 변화 추적</li> <li>나. 분만 1개월 전 요네 검진을 통한 분만축 관리로 자우로의 수직전파 차단</li> <li>다. 분만 시 요네병 양성 모축과 자축의 신속한 격리로 요네 전파 차단</li> <li>라. 분만 전 초유 및 우유에서 요네병 검진으로 양성 초유 스크린</li> <li>마. 초유 및 우유의 저온 살균처리로 위생적인 포유 실시</li> <li>바. 초유의 냉동보관 시스템 운영</li> </ul> </li> </ul>	100
한국형 요네병 근절 프로그램 적용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 요네병 양성우의 pedigree 작성 및 생체지표 변화 모니터링 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 우군의 가계도 분석을 통해 MAP 전파형태 분석(수평전파 위험도)</li> <li>- 지속적인 혈청모니터링을 실시하여 젖소우군에서 수직전파의 상관관계분석</li> <li>- 한우집단에서는 어미와의 동거기가 길기 때문에 모체로 부터의 감염을 예방하기 위해서는 음성모축을 유지가 중요하게 판단됨. 번식전 또는 분만 1-2개월전 검진을 통한 질병관리 필요 (우군 상황에 따라, 항체가 수치를 구분 사양관리)</li> </ul> </li> </ul>	100
요네병 양성우의 생체지표 변화 모니터링	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 음성초유 냉동보관 시스템을 이용한 양성모우에서 태어난 자우에 공급</li> <li>○ 우유와 분변내 요네균 배출 모니터링</li> <li>○ 각 우사별 요네균 오염도 측정을 통한 요네균 전파예방</li> </ul>	100
한국형 요네병 근절 프로그램 적용 평가 및 경제성분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 분변내 요네 항원 배출검사 및 가축사육 공간 오염도 측정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 가축 사육공간, 구획별, 사조 및 음수조 등의 시료분석 (MAP 분포지역 예측)</li> <li>- 요네항원은 환경에서 장기간 생존 가능함, 우군의 항체형성도와 환경에서의 항원 유무에 따른 우군내 유병률 분석 실시</li> <li>- 항원분포에 따른 우군 재조정, 분변제거(우사바닥청소) 횟수 조정.</li> </ul> </li> </ul>	100

## 제2절 : 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

성과지표명	연도	당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	9	10	111.1	100
	비SCI	7	6	85.7	60
산업재산권	출원	5	5	100	40
	등록	1	1	100	10
학술발표	국제	11	13	118.2	90
	국내	14	18	128.6	50
기술이전		1	1	100	5
정책자료 기관제출		5	0	0	15
영농기술·정보 기관제출		10	8	80	25
생물자원 등록 · 기탁		4	4	100	40
홍보		5	36.5	730	20
DB 구축실적		1	3	300	5
인력양성지원		10	20	200	40
계		83	125.5		500

\* ATIS 승인 기준

\* 달성도(%) = (실적소계/당초목표전체) × 100

## 제 5 장 연구 결과의 활용 계획

- 요네균배양에 수개월이 소요되기 때문에 소 분변에서 확립된 IS900 real-time PCR 및 ISMAP02 real-time PCR 기법을 이용하여 감염초기 또는 준임상형 상태의 동물인 주 전파원을 빨리 진단하여 차단.
- 소 요네병 감염모델동물 (실험동물 및 소) 의 유전체 분석을 통해서 진단의 지표로 발굴될 biomarker 을 이용한 진단기법 (real-time PCR 진단 kit, ELISA kit 등)을 개발하고, 현장 적용시험등을 통해 그 효능이 인정된 것들에 대하여는 국내에서 동물질병의 진단 kit 개발의 실적이 많고, know-how 을 축적하고 있는 기업에 기술전수하여 산업화 추진.
- 감염모델을 동물의 유전체 분석을 통해 소 요네병 발생기전 및 발현 양상을 규명하는 과정에 습득하게 되는 요네병의 질병학적 특성 및 국내 분리균주들의 역학적 특성을 분석하여 소 요네병 발생의 위험요소 (Risk factors) 를 규명하고, 이들 위험요소의 발생을 최소화 및 위험요소가 발생시 즉시 적극적으로 대처할 수 있는 수동적 (passive) 및 능동적 (active) surveillance program 개발하여 정책건의.
- 개발된 진단 kit 을 이용하여 야외 농장에서 검사들을 통해 준임상형 fecal shedder 로 의심되는 개체들을 조기검출하여 격리 수용 또는 도태등 즉각적인 대처를 통해 타개체에 전파를 차단하고, 이러한 대처방식의 국내 소 요네병 청정화 및 예방을 위한 방역 프로그램을 개발하여 정책건의하고, 또한 현장 대응용 행동요령 (SOP) 을 작성.
- 요네병 발생실태 및 생체지표변화를 통해 성전된 질병근절 프로그램을 대규모 소사육 농가에 적용함으로서 발생억제, 생산성 향상 및 안전축산물 생산에 기여하고 국가 정책자료 및 현안대책 기초자료로 활용할 될 예정.
- 또한 향후 요네병 발생이 번식관리, 사양관리 및 대사성질환과의 세부 상관관계를 구명하여 경제수명 연장 및 생산 효율성 증대 연구에 적극 활용되어질 예정.

## 제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

### <제 1 세부: 유전체 정보를 활용한 요네병 발현 양상 기전 연구>

#### 1. 요네병의 발병 기전에 관한 연구

- Machugh 등은 monocyte-derived macrophage 를 MAP에 감염시킨 후 시간의 경과에 따른 유전자 발현의 변화를 microarray 기법을 사용하여 분석하였다. 감염 후 2시간이 지났을 때 1050개 유전자의 발현이 변화한 것을 확인 하였고, 6시간 후에는 974개, 24시간 후에는 78 개의 유전자 발현이 변화한 것을 확인하였다. 또한 발현이 변화한 유전자들은 주로 inflammatory response, cell signalling pathways 및 apoptosis 에 관련된 것으로 분석되었다.
- 또 다른 연구에서는 MAP에 감염된 소에서 대식세포를 분리하여 RNA-Seq 을 통해 유전자 발현을 분석하였고, 발현이 변화된 유전자들을 대상으로 기능적 분석을 실행하였다. 감염 후 2시간에는 245개, 6시간 후에는 574개의 유전자의 발현이 변화하였으며, IL-10 signaling pathway 및 CD40 signaling pathway 가 활성화 된 것을 확인하였다 (Casey 등, 2015).
- MAP이 숙주에 최초로 침입하는 부위인 회장-맹장 연접부에서의 유전자 발현에 대한 연구 역시 이루어졌다. 요네병에 자연 감염된 소의 회장-맹장 연접부의 조직을 채취하여 RNA를 추출 후 RNA-Seq 을 통해 유전자 발현의 변화를 확인하였다. 임상형 개체에서는 T-and B-cell receptor signaling, apoptosis, NOD-like receptor signaling, 및 leukocyte transendothelial migration pathways 가 활성화되었으며, 준임상형 개체에서는 metabolism 에 관련된 pathway 가 활성화되었다 (Hempel 등, 2016). 이러한 연구들을 통해 요네병이 자연 감염 되었을 때 나타나는 숙주의 초기 반응을 해석할 수 있다.

#### 2. MicroRNA를 이용한 요네병의 진단 바이오마커 발굴

- Farrell 등은 실험적으로 MAP에 감염된 송아지의 혈청 내의 miRNA를 분석하여 감염 후 6 달이 지났을 때 miR-205가 증가되고 miR-432는 감소된 것을 확인하였다 (Farrel 등, 2015). 또한 Shaughnessy 등은 실험적으로 감염된 송아지의 혈청에서 83종류의 micro RNA를 확인하였고 그 중 miR-29a 와 miR-92b가 감염 전에 비해서 증가한 것을 확인하였다 (Shaughnessy 등, 2015).

## <제 2 세부: 소 사육농장의 요네병 근절모델 개발 연구>

### 제1절 12th ICP (국제요네학회) 국제학술대회 참석(이탈리아)

#### 1. 최근 국제 연구동향 파악과 국외 연구자와의 교류 및 네트워크 수립

##### 가. 요네의 진단과 분변내 배출패턴에 관한 연구

요네검진을 위해 분변배양은 현재 표준진단방법으로 사용되고 있다. 하지만, 긴 세균배양기간, 비용, 분변으로의 간헐적인 요네균의 배출은 요네진단에 어려움을 주고 있다. 따라서, 요네균의 비유시기별 및 계절별 배출 패턴에 대한 연구가 시작되었다. 분변에서의 요네균 검출을 위해 Solid culture, Broth culture, direct realtime PCR(qPCR) 방법을 적용하였다. Solid culture에서는 46%(95% CI:40 to 51%; n=313), Broth culture에서는 55%(50to60%; n=345), qPCR에서는 78%(73to82%; n=344) 의 요네균이 검출되었다. 건유기와 분만 14일 이내에 qPCR로 실시한 요네검진에서 높은 sensitivity를 나타내었다. 또한, 분변배양을 통한 요네균 배출을 qPCR의 Ct(cycle threshold) value 와 비교하였을 때, Ct value 가 35이하에서는 moderate shedding 29이하에서는 heavy shedding 으로 분류 되었다. qPCR 을 이용한 요네검진에서 계절별 검출 패턴을 분석하였을 때 여름과 가을에 요네검출율이 겨울과 봄에 비해 낮게 나타났다. 하지만 분변내 요네균 배출은 moderate에서 heavy shedding 의 형태를 보였다. 직접적인 qPCR 방법은 다른 검출방법보다 효율적으로 나타났다. 향후, 요네검진 ELISA와 더불어 qPCR의 진단법을 병행하여 보는것도 좋을 것으로 사료된다.

##### 나. 젖소에서의 요네질병과 관련된 유전자 마커에 관한 연구

반추로에서 많은 유전적 변이들이 요네균에 대한 감수성에 관련된 것으로 보고되고 있다. 지금까지 요네 감염개체들의 조직학적 다양성과 유전적 요소들과 관련된 연구가 미흡한 실정이어서, latent (국소적병변) 와 patent(다발성 및 확산성 병변)에 대한 유전적 다양성에 관하여 연구를 하였다. 실험은 Taq-Man®OpenArray®를 이용하여, 면역과 관련된 6개 유전자들(Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2, Solute carrier family 11 member A1, Nuclear body protein SP110, Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, CD209) 에서의 24개의 SNP geno-typing을 실시하였다. Logistic regression 분석을 통해 CD209 와 latent 요네증과 관련된 것으로 파악 되었다. minor alle 인 rs208222804 SNP 는 latent 요네증 발생을 낮추는 효과와 연관관계가 보였다. 향후 CD209 유전자의 소 요네증에서의 병인론의 세부적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

다. Peptide-mediated magnetic separation (PMS)-Phage assay를 이용한 우유에서의 살아있는 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) 정확한 검출을 위한 우유샘플 검진 프로토콜의 최적화 연구

본 연구는 PMS-phage assay를 이용하여 살아있는 MAP 검진을 위한 우유샘플 처리 프로토콜에 관한 내용으로, 4가지 실험을 통해 평가를 하였다. 첫째, 수집된 50ml 우유에서의 원심분리후 어느 분획에서의 검진이 적절한지? 둘째, 샘플 처리과정에서 군집된 MAP cell들의 어떻게 균일화 할 것인지? 셋째, 우유샘플 검진시 적정 보관 방법은 (냉장, 냉동, 우유 보존제 사용 등)? 넷째, PMS-phage assay에서 qPCR 사용을 위해 늦게 사용된 plaque 가 결과에 미치는 효과? 등이다. Ultra-heat 처리된 우유와 생유에 50ml MAP를 spike 한후 PMS를 이용하여 살아있는 MAP를 조사하였다. 결과는, 2,500 rpm, 15분간 원심분리에서 생유의 pellet 분획에서 다량의 MAP cell 이 관찰되었다. 군집된 MAP을 효과적으로 분리하는데, sonicator bath에서 37kHz, 4분간 처리에서 가장 좋게 나타났다. 실험을 위해서는 우유샘플은 4°C에 보관한 후 18-24시간 이내에 검사를 해야 살아있는 MAP를 손실 없이 검진 할 수 있다. 이것이 불가능할 경우 우유샘플을 -70°C에서 한달간 보관할 수 있다. 우유보존제 (e.g., Bronopol)의 사용이나 오랫동안 냉동보관은 살아있는 MAP의 손실을 크게하기 때문에 권장되지 않는다. DNA 추출을 위한 phage assay plate에서 plaque 의 수학이 1일 지연될시, IS900 Plaque-PCR에서의 PMS-phage assay의 false-negative 가 증가 하였다.

#### 라. 소에서의 MAP 검진을 위한 lymphatic fluid 사용

본 연구는 MAP가 소 분방(udder)의 림프액(lymphatic fluid)에서의 검출된 결과를 토대로, 소 MAP 진단에 활용하는데 있다. 본 실험에서는, 소 122두의 분방에서 채취된 림프액에서의 MAP를 검사하였다. MAP 검진에는 primer 을 사용한 IS900 nested PCR ([P90, P91], [J1, J2] primer 이용)을 실시하였다. 림프액 PCR 결과는 혈액과 우유의 ELISA 검사결과와 비교하였다. 또한, Herrlad's egg yolk medium에서 분변을 배양한 결과와도 비교하였다. MAP는 림프액에서 27.1% 가 양성을 나타내었다. 하지만, 이결과는 다른 진단test와의 일치도가 상당히 낮았다. 림프액에서의 양성의 6.7%는 다른 test (i.e., ELISA and culture) 결과와 같은 결과를 나타내었고, 림프액 양성의 69.0% 는 다른 test에서 음성의 결과를 나타내었다. 8-12개월 후 25두의 소에서 재검진 하였는데, 첫 번째 검사에서 20%가, 두 번째 검사에서는 5.5%, 세 번째 검사에서는 27.8% 가 MAP양성을 나타내었다. 실험에 사용된 herd의 기록 분석에서, 검진 8-12개월 후 MAP 림프액 양성 개체의 도태율이 음성개체에 비교해 7.2배 높게 나타났다. 결과적으로 림프액을 이용한 MAP 검진은 조기 예 MAP 감염개체를 진단하는데 효율적인 것으로 나타났다.

#### 마. 캐나다 소 요네컨트롤 프로그램의 분변내 MAP 배출하는 젖소를 도태시 소용비용 산정연구

2010년부터 캐나다 온타리오주에서 자발적 요네 컨트롤 프로그램 (voluntary Johne's disease [JD] control program, [www.johne's.ca](http://www.johne's.ca)) 이 시작되었다. 이 프로그램은 농장수준의 위험도를 평가하고 (farm risk assessment), 우군에서 우유와 혈청샘플에서의 검진을 지원하고, 정기적으로 높은 수준의 양성개체의 도태를 실시하고 있다. 우유에서의 MAP 검진은 Prionics Paracheck antibody 검진 ELISA로 사용하였다. S/P value 가 >0.1 이면 요네 양성으로, >1.0 (high risk of fecal shedding of MAP)이면 높은 수치의 양성개체로 분류하였다. 높은 수치의

양성개체는 다른 herd로 이동하지 않고 도태하도록 하였다. 검사후 90일내 높은 수치의 양성개체를 도태하였을 경우 주정부는 두당 \$500 (CDN)를 지불하였다. 171개 herd에서 243두가 높은 수치의 양성개체로 진단되었고, 이 가운데 163두(67%)가 도태 되었다. 도태 시키지 (나머지 33%의 가축) 않은 농장주들에게 이유를 확인한 결과, 높은 수치의 양성을 보인 개체가 보상비로 준 \$500보다는 높은 가치가 있다고 생각했기 때문이었다. 따라서, Cow Value of Dairy COMP 305 (CWVAL)를 이용하여 각각의 가축 개체에 대한 가치를 비교 분석하였다. 즉 CWVAL 이 \$500 이하이면, 이프로그램에서 제공하는 보상비는 replacing cow를 구입한 충분한 보상을 해준것이고, CWVAL 이 \$500 이상이면 가축의 가치는 실제 보상비를 넘게 되는 것이다. CWVAL 은 80개 herd에서 86두의 높은 양성개체, 232두의 양성개체, 11,957의 음성개체에 대한 가치를 평가하였다. 결과는 CWVAL 의 가치는 양성개체들은 \$830, 음성개체들은 \$1200 이었고, 도태대상인 높은 양성개체들의 평균 CWVAL 은 \$700으로 평가 되었다. 높은 수치의 양성을 보인 개체들 1/3의 CWVAL 는 \$500보다 낮게 평가되었다. 높은 수치의 양성을 보인 개체들을 도태한 농장주들은 \$200를 손해보는 것으로 나타났지만, 도태를 통해 금전적으로 평가되지 않는 가치를 얻게 될 것으로 결론을 내렸다.

바. 육우생산농가에서 세균학적, 혈청학적 검사를 통한 도태는 경제적으로 어떤 영향을 미치는지?

육우에서의 요네 양성축들의 도태는 우군에서의 유병율을 감소시키고, 생산성을 증가시킨다. 그런데 비용적인 문제는 어떻게 될까? 이번 연구에서는 요네 검진 없음, 혈청학적 검사, 세균 배양검사, 혈청과 배양 검진 등의 장점에 대한 비교 연구를 하였다. 요네의 검진과 도태의 프로그램은 후보축은 요네 위험도가 낮은 우군에서 도입한다는 가정하에 이루어졌다. 이 프로그램의 시나리오는 0에서 100% 유병율의 구간에서 1%씩 증가하는 방법으로 평가하였다. 또한 검진과 도태 프로그램 도입한 후의 연간 유병율 변화를 추정하였다. 각각의 검진을 적용후 소요되는 누적비용을 우군의 유병율이 0.5%로 떨어질 때까지 계산하였다. 검진과 도태프로그램을 적용하여 컨트롤하려는 우군에서 손실회복은 세균배양검진에서는 23% 유병율에서, 혈청검진에서는 40% 유병율에서, 세균배양과 혈청검사 병행은 70%의 유병율에서 높게 나타났다. 연간 검진선택에서는 세균배양이 빠른 유병율 감소를 보였다. 세균배양검진은 도입된 연간 검진과 도태프로그램의 누적소용비용에서 낮은 비용선택으로 나타났다. 검진은 빠른 진전을 나타냈지만, 이유된 송아지들의 매매를 통한 우군내 전파를 제한하고, 요네위험도가 낮은 후보군을 도입하여 유병율을 낮추게 되며, 농가에 높은 경제적 이득을 돌려준다.

## 2. 방문지

가. 파르마산 햄 가공 및 치즈생산 공장

- (1) 방문 일시 : 6. 24
- (2) 주관 : ICP (요네학회) 주관
- (3) 프로슈토 파르마 (Prosciutto di parma); [파르마 지방산 햄] 생산 공장:

파르마 지역의 유명한 특산물로서 프로슈또는 이탈리아어로 햄이란 뜻을 지니며, 도재의 널적다리살 부분을 천일염으로 염장후 자연건조하여 만드는 햄이다. 보통 1년이상 건조 숙성을

하여 판매된다. 스페인에서는 하몽(Jamon) 이라고 부른다.

		
자동화 이동시스템	염장	건조
		
재염장	슬라이싱 기계	얇게 슬라이싱된 햄

(4) 파르미지아노 레지아노 (Parmigiano reggiano) [파르마산 치즈]생산 공장:

파르마지역의 또 하나의 특산물로 파르마산 치즈가 있다. 파르마산 치즈 생산자 조합은 이 지역에서 자생하는 알팔라를 급여하여 원유의 등급을 유지하고, 생산지, 생산방법, 등급을 꼼꼼히 제정하여 판매한다. 제조된 치즈는 염장처리과정을 거친후, 습도와 온도가 일정하게 유지된 창고에서 보통 치즈는 18~36 개월 숙성과장을 거친 후 제품화한다.

		
치즈제조기	치즈보형틀	보형틀 치즈
		
염장과정	숙성 및 위치이동	1년 이상 숙성된 치즈

## 제2절 The 6th Congress of European Microbiologists 국제학술대회 참석(네덜란드 마스트리히트)

### 1. 국제 연구동향 화학과 국외 연구자와의 교류 및 네트워크 수립

#### 가. 도심의 water cycle 에서의 항생제 저항성: origins, fate and risks

도심에서의 물의 순환은 사람의 음수로 사용하기 위해 채수, 소독, 정수 등의 여정을 거친다. 이런 순환과정에서 여러 다양한 환경 즉 극한환경, 사람 또는 동물유래, 오염된 환경 등에서 유래한 세균집단 (bacterial population)이 물속에 포함된다. 임상과 관련된 항생제저항성 유전자를 지니고 있는 복합약제내성(multi drug) 세균들은 이러한 수중환경에서 흔하게 발견된다. 유럽과 미국에서의 항생제저항성 세균에 의한 사망자는 년 2만 건 이상으로 추정되고 있다. 비록 이러한 수치는 임상적 측정치에서 유래되었지만, 환경 특히 물을 통한 항생제 저항성의 사람에서 또는 사람으로 확산에 주요한 역할을 하고 있다. 정화되었거나 또는 정화되지 않았던 환경으로 배출되는 도심의 물은 항생제 저항성을 포함하고 있어, 환경에서의 이러한 오염의 축적되는 결과를 나타낸다. 게다가, 임상적으로 문제가 되는 항생제 저항성 유전자가 이러한 생활하수에서 검출되는 것을 보아 물을 통한 빠른 확산을 알 수 있다. 상대적으로 병원균이 제거된 음수는 환경의 다양한 세균들이 존재하며, 이들 중 일부에서는 복합약제 내성 표현성을 지닌 세균도 있다. 비록, 항생제저항성 전파에 긴급한 문제는 지나고 있지만, 본질적으로 항생제 저항성 세균은 인간의 건강에 부(adverse)의 효과를 나타낸다. 현재로서는, 항생제 저항성 세균의 환경에서 사람으로의 직접적 또는 간접적 전파의 위험도를 측정하기는 어렵다.

#### 나. 도심의 생활하수 (wastewater)의 새로운 방법에 의한 소독: 항생제 내성에 효과적인

UWWTPs (Urban wastewater treatment plants: 도심생활하수 처리공장)에서 나오는 유출물은 지표수에 항생제 저항성 오염원을 발산하는 주요 원천이다. 많은 국가에서는 소독(살균) 과정은 항생제 저항성 세균 및 유전자의 방출을 최소화하기 위해 UWWTPs에서의 마지막 step에 해당된다. 하지만 일부 국가에서는 UWWTPs 유출물은 아무런 소독(살균)과정을 거치지 않고 처리되고 있다. 대체로 염소처리 및 UV(자외선)으로 처리하지만, 오존같은 다른 산화제 또는 이산화염소(chlorine dioxide), 과산화수소(hydrogen peroxide) 같은 소독제들이 사용되고 있다. 하지만 우려스럽게도, UWWTPs 처리된 유출물에서의 항생제내성 세균 또는 유전자들이 검출되고 있어, 기존의 소독과정 (특히, 염소 또는 UV 처리)가 항생제 내성 물질이 환경으로 확산을 방지하는데 효과적이지 않게 생각되었다. 그래서, 최근에는 최신산화과정 (Advanced Oxidation Processes: AOPs)을 기반으로 하는 기술이 개발되어 항생제저항 물질의 확산을 방지하는 새로운 접근방법으로 대두되었다. 본 실험에서는 염소처리, UV처리, AOP 처리에 따른 실험을 하였다. 실험에서는 항생제 저항성이 있는 대장균 (E.coli : UWWTPs 처리된 유출물 유래)을 사용하여 비활성화, 세균의 재성장, 항생제 저항성에 관하여 평가를 실시하였다. 또한, 항생제 저항성 전이에 대한 AOP의 효과를 조사하였다. AOP는 항생제 저항성 세균을 비활성화하는데 기존의 방법보다 더 효과적이었다. 하지만, AOP의 항생제 저항 전이에 대

한 효과는 좀더 연구가 필요하다.

다. 수중 세균 공동체에서의 항생물질의 최소선택농도(Minimal Selective Concentration : MSC)의 결정

살균제, 금속과 같은 항생제의 복합제물은 오수의 유출과 함께 환경에 존재하게 된다. 하지만, 수중생태계에 저항성 있는 항생제와 복합제의 양이 어느 정도 인지는 알지 못한다. 본 실험의 목적은 복합수중 세균공동체에서 항생제 (tetracycline) 의 MSC 와 CTAC (Cetyl trimethyl ammonium chloride) 최소동반선택농도 (Minimal Co-selective Concentrations: MCCs)을 결정하는데 있다. 처리된 유출되는 하수는 희석되었으며, 다른 농도의 항생제가 들어 있는 flow-through systems 에서 바이오플름을 형성하기 위한 접종물(세균)으로 사용하였다. 바이오플름은 선택된 플레이트, 개체의 특성, metagenomics 분석 그리고 공해유발성 공동체 저항 (pollution induced community tolerance: PICT) 각자의 저항성 내성에 따라 검색되었다. 결론적으로, 테트리사이클린의 농도-반응 커브는 선택 plating, tet-genes 와 PICT을 위해 얻게 되었다. Selective plating의 테트라사이클린 MSC 농도는 10ng/ml ( $p=0.009$ ) 이고, 이는 증가된 MIC50 (concentration inhibiting 50% of the isolates) 와 일치하였다. ISCR2 와 intI1 같은 다른 저항성 유전자의 증가가 높아지는 테트라사이클린 농도와 함께 관찰되었다. 테트라싸이클린의 분류학상 구성 (taxonomic composition) 대한 효과는 덜 평가 되었다. CTAC 는 클로람페니콜, 테트라싸이클린 및 에리스로마이신에 대한 자기-내성(self-tolerance) 및 공동내성 (co-tolerance)을 선택하였다. CTAC 의 MCCs와 저항성 유전자에 빈도에 대한 효과와 분류학은 더 평가돼야 할 것이다. 테트라싸이클린과 CTAC의 선택 (select) 과 공동선택 (co-select)에 대한 지식은 안전한 방출한도를 설정을 촉발시킬 수 있다. 또한, 환경에서의 저항성 선택의 위험도를 낮추는 안내 자료가 될 것이다.

라. 광범위 약제 내성에 대한 *Pseudomonas aeruginosa* 와 *Acinetobacter baumannii* 의 평행 (parallel) 및 특별 (distinct) 진화

20세기 중반부터 의도하지 않았던 의학의 진보의 결과물로 *Pseudomnas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) 와 *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*)는 주요 병원내 감염 병원체로 주목받기 시작했다. 이런 호기성 간균들은 숙주의 환경에 살아가기 위해 높은 다양한 대사능력을 나누고 있다. 이들 세균은 연약한 환자를 감염시키기 위해 다양한 병원성 요인을 나타낼 뿐만 아니라, 이용 가능한 항생제들에 대한 높은 저항성을 나타내었다. 이들 *P. aeruginosa* 와 *A. baumannii* 세균은 이러한 뚜렷한 유사성도 불구하고, 높은 항생제 저항성을 나타내는 메커니즘은 서로 다르다. *P. aeruginosa* 의  $\beta$ -lactams (치료에 주로 사용하는 항생제 계통) 전체적인 저항은 대부분 돌연변이( 내재적  $\beta$ -lactamase AmpC 의 과잉생산, porin OprD 결핍, efflux system의 활성화) 에 기반하며, 환경에 존재하는 세균으로부터 수평적으로 전이된 넓은 범위의  $\beta$ -lactamases 성질을 지닌 유전자와 상승적으로 작용한다. *A. baumannii* 세균의 평행적 진화(parallel evolution)에 의한 광범위한  $\beta$ -lactam 계통 항생제에 대한 내성은 밀접히 연관된 유사한 종의 세균으로부터 획득한 제한된 양의 OXA-type  $\beta$ -lactamases 와 결합된 OXA-type  $\beta$ -lactamases 의 IS 의존성 상승 (dependent up-regulation) 과 관련이 있다. 이들 두 세균은

각 세균의 저항성 메카니즘을 강화하기 위해 각 세균의 특징적인 저항성 유전자를 활용한다. 이런 것들은 각각의 뚜렷한 생태적 지위(입장)에 따른 것이다.

마. 항생제 저항성: 인의(human medicine)와 수의(veterinary medicine)에서의 touchy interface

사람과 수의에서의 높아지는 항생제 내성 병원성 세균에 대한 높아지는 관심은 동물에서의 예방적 치료적으로 사용되는 약제로 인한 항생제들이 점차 무용지물이 되가는 현상에 대한 공포심을 높여주고 있다. Genomic flexibility, clonal spreading에 대한 새로운 지식은 사람과 동물에서의 항생제내성에 관해 다시 정립하기 위해 본 연구를 했다. 주요 항생제에 (제3세대 세팔로스포린, 프로로퀴놀론, 아미노글라이코사이드) 대한 내성의 진화에서, 식품을 매개로 한 살모넬라, 캠필로박터와 같은 병원체는 항생제 저항성인자를 동물에서 사람으로 전이를 통해 전달하는 것으로 보였다. 장내병원체와는 달리 비장관염 유발하는 MRSA, 반코마이신-저항성 Enterococcus faecium 다내성 Psedomonas aeruginos 와 같은 저항성세균의 dominat clone 은 사람에는 동물과는 다른 형태를 보인다. 세균의 Distinct clone 의 다양한 동물의 종(species) 또는 사람에 대한 적응은 관찰된 clonal diversity 에 의한 것으로 보인다. 플로로퀴놀론 계통의 항생제 사용은 MRSA 또는 다른 다약제 내성세균의 major international clone 의 enhancer로 나타날 수 있다. 따라서, 항생제내성 장내세균의 진화와 확산은 종종 사람의 임상현장에서 유래하거나 전파된 주요 clone으로 인해 나타난다. 반면 동물 또는 식품의 항생제내성 clone은 부분적으로 사람과 중첩되는 부분도 있지만 더 다양하게 나타난다. 그러므로 다른 역학적 구획(epidemiological compartment)에 있는 사람과 동물에서의 확산되는 항생제 저항성 차이점은 좀 더 분석적으로 고려해야한다.

## 제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

해당사항 없음

## 제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

## 제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

- 서울대학교에서 수행하는 실험실안전검사를 정기적으로 수행 및 안전조치 이행 준수
- 국립축산과학원 규정에 의거하여 기술적 위험요소 분석 및 안전관리대책 이행 준수

## 제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역 할	논문 게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문 게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Recent research on bovine paratuberculosis in South Korea	서울대	주저자	Veterinary Immunology and Immunopathology	1.664	2012.07.	단독사사	SCI
2	논문	Analysis of transcriptional profiles to discover biomarker candidates in <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> -infected macrophages, RAW 264.7	서울대	주저자	Journal of Microbiology and Biotechnology	1.685	2013.08.	단독사사	SCI
3	논문	Effective DNA extraction method to improve detection of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> in bovine feces	서울대	주저자	Korean Journal of Veterinary Research		2014.03.	단독사사	비SCI
4	논문	An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention	축산원	주저자	Journal of Veterinary Science	1.076	2014.03.	단독사사	SCI
5	논문	Antimicrobial resistance, virulence genes and PFGE-profiling of <i>Escherichia coli</i> isolates from South Korean cattle farms	서울대	주저자	Journal of Microbiology	1.621	2014.10	중복사사	SCI
6	논문	Whole-blood gene expression of cows infected with <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> reveal changes in immune response and lipid metabolism	서울대	주저자	Journal of Microbiology and Biotechnology	1.685	2015.02.	단독사사	SCI
7	논문	Host gene expression for <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> infection in human THP-1 macrophages	서울대	주저자	Pathogens and Disease	2.483	2015.04.	단독사사	SCI
8	논문	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 개체 검출을 위한 항원 탐색 및 특성 분석	서울대	주저자	Korean Journal of Veterinary Research		2015.06.	단독사사	비SCI
9	논문	분변 시료에서 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 의 빠른 검출을 위한 다중 실시간 종합효소연쇄반응기법의 개발	축산원	주저자	한국임상수의학회지		2015.06.	단독사사	비SCI
10	논문	Suggested guidelines for vaccination of cattle in Korea	축산원	주저자	Clinical and Experimental Vaccine Research		2015.07.	단독사사	비SCI
11	논문	Prevalence of	서울대	주저자	Applied and	3.823	2015.08	단독사사	SCI

		Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in Escherichia coli Isolates from Beef Cattle.			Environmental Microbiology				
12	논문	Host transcriptional profiles and immunopathologic response following <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> infection in mice	서울대	주저자	Plos One	3.057	2015.10.	단독사사	SCI
13	논문	Virulence factors, antimicrobial resistance patterns, and genetic characteristics of hydrogen sulfide-producing <i>Escherichia coli</i> isolated from swine	서울대	주저자	Korean Journal of Veterinary Research		2015.10	단독사사	비SCI
14	논문	Gene expression profiles of putative biomarker candidates in <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> -infected cattle	서울대	주저자	Pathogens and Disease	2.483	2016.03.	단독사사	SCI
15	논문	PCR-based detection of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> infection in cattle in South Korea using fecal samples	서울대	주저자	Journal of Veterinary Medical Science	0.782	2016.09.	단독사사	SCI
16	논문	Development of vaccines to <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> infection	서울대	주저자	Clinical and Experimental Vaccine Research		2016.07.	단독사사	비SCI
17	특허 출원	마이코박테리움 감염 진단용 조성물	서울대	주발명자	대한민국		2014.11.17		
18	특허 출원	요네병 특이적 마커를 포함하는 요네병 진단용 조성물 및 방법	서울대	주발명자	대한민국		2014.04.09		
19	특허 등록	요네병 특이적 마커를 포함하는 요네병 진단용 조성물 및 방법	서울대	주발명자	대한민국		2015.10.15		
20	특허 출원	요네병 진단방법	서울대	주발명자	대한민국		2015.06.12		
21	특허 출원	잠복기 요네병 진단방법	서울대	주발명자	대한민국		2016.10.28		
22	특허 출원	호흡기 질환 원인체 검출용 조성물	축산원	주발명자	대한민국				

## 제 11 장 기타사항

해당사항 없음

## 제 12 장 참고문헌

1. Abubaker I et al. 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systemic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 14:401–410.
2. Bannantine JP, Talaat AM. 2010. Genomic and transcriptomic studies in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138, 303–311.
3. Biet F et al. 2012. Inter-and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis strains. *BMC Microbiol.* 12:264.
4. Bryant JM et al. 2016. Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *BMC Genomics.* 17:79.
5. Casey ME et al., 2015. Analysis of the Bovine Monocyte-Derived Macrophage Response to *Mycobacterium avium* Subspecies Paratuberculosis Infection Using RNA-seq. *Front Immunol.* 6:23
6. Cho D et al. 2010. B-cell epitope specificity of carboxy terminus of *Mycobacterium paratuberculosis* ModD. *J Immuno Immunochem.* 31:181–192.
7. Cho D et al. 2007. Cloning, expression, purification and serodiagnostic evaluation of fourteen *Mycobacterium paratuberculosis* proteins. *Protein Exp Purif* 53:411–420.
8. Choi CS et al. 1968b. Studies on Johne's disease. II. Studies on the comparison of intradermal test with complement fixation test for diagnosis of Johne's disease. *Res Rept RDA.* 11(5):35–45.
9. Collins MT et. al. 1994. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am Vet Med Assoc.* 229:1912–1919.
10. Collins MT. 2011. Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice, Johne's Disease, 27(3).
11. Douarre PE et al., 2011. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using multi-locus short sequence repeat (MLSSR) and mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) typing methods. *Vet Microbiol.* 149(3–4):482–487
12. Fernández B et al. 2012. Detection of Bovine IgG Isotypes in a PPA-ELISA for Johne's Disease Diagnosis in Infected Herds. *Vet Med Int.* 145318.
13. Fernández M et al. 2017. Macrophage Subsets Within Granulomatous Intestinal Lesions in Bovine Paratuberculosis. *Vet Pathol.* 54(1):82–93.
14. Gilmour NJL et al. 1965. Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. *J Comp Pathol* 75:281–286.

15. Gioffré A et al. 2015. Molecular typing of Argentinian *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates by multiple-locus variable number-tandem repeat analysis. *Braz J Microbiol.* 46(2):557–564.
16. Gurung RB et al. 2015. Development of 316v antibody enzyme-linked immunosorbent assay for detection of paratuberculosis in sheep. *Rev Sci Tech.* 34(3):869–79.
17. Hempel RJ et al. 2016. Transcriptional profiling of ileocecal valve of Holstein dairy cows infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Plos One.* 11(4):e0153932.
18. Huntley JF et al. 2005. Immunoreactivity of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 19-kDa lipoprotein. *BMC Microbiol.* 5:3.
19. Irene LM et al. 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet Microbiol.* 136:166–172.
20. Janagama HK et al. 2010. Primary transcriptomes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* reveal proprietary pathways in tissue and macrophages. *BMC Genomics.* 11:561.
21. Jeon YS et al. 1984. Isolation and identification of Mycobactin dependent acid-fast bacteria (*M. paratuberculosis*) from bovine fecal material. *Korean J Vet Res.* 24(1):58–63.
22. Khare S et al. 2009. Early phase morphological lesions and transcriptional responses of bovine ileum infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.* 46:717–28.
23. Kim D et al. 2002. Prevalence of paratuberculosis of dairy cattle on Kangwon area. *Korean J Vet Res* 42(1):81–88.
24. Kim JM et al. 1994. A survey of paratuberculosis by immunological methods in dairy and Korean native cattle. *Korean J Vet Res* 34(1):93–97.
25. Kim TJ et al. 1997. Studies on molecular biological and immunological diagnosis of Johne's disease. *Korean J Vet Res.* 37(2):349–358.
26. Koets AP et al. 2015. The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Vet Res.* 46:61.
27. Koets AP et al. 1999. Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunop.* 70:105–115.
28. Lee KW and Jung BY. 2009. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle in Korea. *Vet Rec* 165:661–662.
29. Mita A et al. 2016. Comparison of fecal pooling methods and DNA extraction kits for

- the detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Microbiologyopen*. 5(1):134–42.
30. Nielsen SS and Toft N. 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Pre Vet Med* 88:1–14.
31. Pak SI et. al. 2003. Estimation of paratuberculosis prevalence in dairy cattle in a province of Korea using an enzyme-linked immunosorbent assay: application of Bayesian approach, *J Vet Sci* 4(1):51–56.
32. Oakey J et al. 2014. Variable-number tandem repeats genotyping used to aid and inform management strategies for a bovine Johne's disease incursion in tropical and subtropical Australia. *J Vet Diagn Invest*. 26(5):651–7.
33. Park HT et al. 2014. Effective DNA extraction method to improve detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine feces. 54(1):55–57.
34. Park KT et al. 2006. Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field samples testing in Korea. *J Vet Sci*. 7(4):349–354.
35. Park KT et al. 2011. Evaluation of two mutants of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as candidates for a live attenuated vaccine for Johne's disease. *Vaccine*. 29(29–30):4709–4719.
36. Park KT et al. 2008. Demonstration of allelic exchange in the slow-growing bacterium *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, and generation of mutants with deletions at the pknG, relA, and lsr2 loci. *Appl Environ Microbiol*. 2008 74(6):1687–1695.
37. Ricchi M et al. 2009. Typing of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) strains isolated from different Italian regions by four Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) methods alone or in association. 10th ICP proceeding. pp.60–63.
38. Rónai Z et al. 2014. Molecular analysis and MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains from various sources. *J Appl Microbiol*. 118(2):275–83.
39. Shin MK et al. 2015a. Whole-blood gene-expression profiles of cows infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis reveal changes in immune response and lipid metabolism. *J Microbiol Biotechnol*. 25(2):255–67.
40. Shin MK et al. 2015b. Host Transcriptional Profiles and Immunopathologic Response following *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Infection in Mice. *PLoS One*. 6;10(10):e0138770.
41. Shin SJ et al. 2005. In vitro cellular immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Infect Immun*. 73(8):5074–85.
42. Shin SJ et al. 2008. Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked

- immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 15(8):1277–1281.
43. Sohal JS et al. 2014. Genetic structure of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* population in cattle herds in Quebec as revealed by using a combination of multilocus genomic analyses. *J Clin Microbiol*. 52(8):2764–75
44. Speer CA et al. 2006. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's Disease) in cattle. *Clin Vaccine Immunol*. 13(5):535–40.
45. Stabel JR and Robbe-Austerman S. 2011. Early immune markers associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a neonatal calf model. *Clin Vaccine Immunol*. 18:393–405.
46. Sweeney RW et al. 2006. Tissue prediction sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Res Vet Sci*. 80:253–259.
47. Thoen CO and Baum KH. 1988. Current knowledge on paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*. 192:1609–1611.
48. Timms VJ et al. 2015. Optimisation of DNA extraction and validation of PCR assays to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 112:99–103.
49. Wu CW et al. 2007. Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in vitro and in naturally infected cows. *J Bacteriol*. 189:7877–7886.
50. Yokomizo Y et al. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*. 44(11):2205–2207.
51. Zhu X et al. 2008. Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes Infect*. 10:1274–1282.

## 주         의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「친환경안전농축산물생산 기술개발」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「친환경안전농축산물생산기술개발」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

\* 예산사업명은 과제 종료년도에 지원한 세부사업을 기재함