잘사는 충북
행복한 도민

2007년

시험연구보고서

The Report of Chungbuk Livestock &
Veterinary Research Institute

충청북도축산위생연구소

발 간 사

충청북도 민선 4기 원년을 보내고, “비상하는 경제특별도 충북 건설”이란 정우택 지사님의 2년차 비전을 갖고 전 도민이 화합과 참여정신을 실현하고 있습니다.

그동안 잘사는 충북 행복한 도민이라는 도정목표 달성을 위해 혼신을 불사르는 우리 축산위생연구소 직원들을 보며 그들의 열정을 부러워하지 않을 수 없었고 함께 호흡하고자 혼자서 내심 도전장을 던지곤 하였습니다.

한미자유무역협정(KORUS FTA) 타결이 향후 국가 전체적으로 이익이 될 것이라는 긍정적인 평가에도 불구하고 우리 농축분야는 경쟁력이 취약하기 때문에 우리는 선진국과의 전쟁을 준비하여야 할 것입니다. 그간 조류인플루엔자 및 구제역 등 해외악성질병 방역을 위해 모든 노력을 쏟아 부은 축산분야 관계자들은 몸을 추스를 겨를도 없이 축산물 시장의 거인 ‘골리앗’에 맞서 싸울 준비를 해야 합니다.

최근 선진국을 비롯한 지구촌 곳곳에서 ‘Food War(음식과의 전쟁)’가 한창입니다. 허술한 식품 안전관리와 잘못된 식생활이 식품의 안전성을 떨어뜨리는 원인이라 생각합니다. 음식을 ‘문화의 초석이자 민족 정체성의 상징이다’라고 규정한 어느 일간지의 문구가 있었지만 우리가 살아가는 지금은 교통과 기술의 발달에 따른 음식의 세계화로 ‘음식과의 전쟁엔 국경도, 민족도 없다’는 말이 더 설득력이 있는 듯 합니다.

안전축산물의 생산과 공급을 위해 불철주야 노고를 아끼지 않는 직원들께 감사드리며 어려운 환경 속에서도 귀하고 값진 논문과 사례연구에 힘써준 분들께 다시 한번 깊은 감사를 드립니다. 이 연구의 결과가 현장에 적용되어 농가의 소득증대 및 축산물에 대한 소비자의 신뢰도 제고에 일익을 감당하여 승리를 위한 전략적 메시지가 되기를 기원합니다.

2007. 08. .

충청북도축산위생연구소장 최 해 연

목 차

식육중 항생제 잔류물질 조사

윤호규, 이진성, 이보영, 곽학구, 최해연

충청북도축산위생연구소

Survey on the residual materials of antibiotics in muscle

Ho-Gyu Yoon, Jin-Seong Lee, Bo-Young Lee, Hak-Koo Kwak, Hae-Yeun Choi

Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute

Abstract

It was carried out to compare the residual materials by EEC 4-plate and HPLC method in the muscles of cattle, pigs and chicken from slaughter-houses in Chung buk from 2005 to 2006.

The result of this survey were summarized as follows,

1. Residual materials were detected from 1.1%(143/13,283) samples by EEC 4-plate method and 0.17%(23/13,283) samples by HPLC method.
2. Residual materials were detected from 0.3%(11/4,301) in 2005, 0.1%(12/8,982) in 2006 by HPLC method.
3. Residual drugs of antibiotics positive were classified as 30.4% Enrofloxacin, 21.7% Chlortetracycline, 17.4% Oxytetracycline, 8.7% Sulfamethazine by HPLC method.
4. Residual causes for production farms with antibiotic positive investigated in whole 23 case, Antibiotic treatments 14(60.9%) Feed additives 4(17.4%), unknown 5(21.7%).

Key words : Residual drugs of antibiotics, EEC 4-plate, HPLC

서 론

최근 경제성장 및 국민소득 향상으로 인한 식생활 개선 특히, 육류 등의 동물성 식품 소비가 급증하여 전체 식품 중에 축산물이 차지하는 비중이 높아짐에 따라 축산업은 영세농에서 대규모 사육으로의 전환이 급속도로 진행됨에 따라 가축 질병 치료 및 사료 효율 향상을 목적으로 동물 약품이 널리 사용됨으로써 국내외 소비자들의 축산식품 안전성에 관한 관심이 날로 증대되고 있으며 축산물의 교역도 활발해짐에 따라 항생물질 등의 잔류물질은 국제적으로도 중대함 관심사항이 되고 있다.

잔류물질(Residues)이라 함은 가축의 질병치료, 예방 또는 진단목적으로 투여되는 동물용

의약품이나 농약, 유해중금속, 다이옥신, 곰팡이 독소 등 환경유래 오염 물질이 사료, 음수, 토양, 대기 등을 통해 가축체내에 유입되어 식육, 우유, 계란 등의 축산물에 잔류되는 모든 화학물질의 원 물질과 그 대사물질을 말한다. 이러한 동물약품의 남용으로 인한 식육 중 잔류 유해성이 문제로 제기됨에 따라 국내에서도 WTO 체제 출범과 국제 경제 시대를 맞아 수입 축산물뿐만 아니라 국내산 축산물 위생 관리의 WTO SPS협정의 의한 FAO/WHO의 Codex 국제 기준을 적용받게 되어 1989년부터 항생물질 등의 잔류허용 한계치를 고시하여 잔류물질 검사를 시작하였다.

국립수의과학검역원 자료(2004년)에 의하면 동물용 항생물질 용도별 사용량은 도매상 판매 50.2%로 가장 높은 비율을 보였으며 사료 첨가용으로 42.1%, 동물병원 7.7%순으로 나타나 치료용으로 사용되기 보다는 질병예방 사료 효율 향상 목적으로 항생물질이 사용됨을 알 수 있으며 축종별 항생물질 사용량은 돼지 54.7%, 닭이 21.5%, 수산용이 16.3%, 소가 7.6% 순으로 많이 사용되었는바 그중 소와 돼지는 tetracyclines계가 가장 많이 사용되었고, penicillin계, aminoglycoside계, sulfonamide계, nitrofuran계 순으로 나타났고, 닭의 경우는 tetracyclines계, nitrofuran계, fluoroquinolone계, sulfonamide계, penicillin계, aminoglycoside계 순으로 많이 사용되었다.

축산산업에서의 항생물질 과다사용의 문제점으로는 식육 중에 항생물질이 잔류됨에 따라 내성이 발현된 세균이 식품을 통해 인체에 감염될 수 있으며 인체용으로 사용되어 왔던 항생물질에 대해서도 교차내성을 일으켜 결국 항생제 치료를 어렵게 만드는 심각한 피해를 초래할 수 있다는 점이다. 이러한 항생물질의 내성균과 잔류문제가 사회적 이슈로 지속될 경우 축산식품을 소비하는 소비자가 축산물 안전성을 불신함으로써 축산물 소비를 위축 시켜 축산업 전반에 위기를 초래할 것이다.

이에 본 조사연구는 축산농가에서 안전한 축산물을 생산하기 위한 동물약품의 올바른 사용과 유해 잔류물질에 대한 홍보 및 국내산 식육의 안전성 확보를 위한 기초 자료로 활용코자 2005년부터 2006까지 충북 관내 도축장에 도축된 쇠고기, 돼지고기, 닭고기의 항생물질 잔류검사를 EEC 4-plate실시하여 억제대가 양성(2mm이상)으로 형성된 시료에 대하여 HPLC을 이용하여 정밀검사를 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

2005년 1월부터 2006년 12월까지 충북 관내 도축장에서 도축된 소, 돼지, 닭의 도체를 무작위 채취 및 항생물질 잔류 의심축의 시료를 채취하여 냉동보관(-20℃)하면서 시험에 공하였다.

시험방법

가. EEC 4-plate method

본 시험은 식육 중 잔류물질 검사요령(농림부 고시 제2005-17호, 2005. 3. 2)을 적용하여 시험을 실시하였다.

1) 시험용 균액의 조제

가) *Bacillus subtilis*(B.s) 포자액

나) *Micrococcus lutea*(M.l) 균액

2) 시험용 평판배지의 조제

시험용 배지는 Testagar(MERCK사)를 각각 pH6.0, 7.2, 8.0(B. subtilis용) 및 8.0(M. lutea용)이 되도록 조절하여 멸균한 후 pH7.2 배지에는 Tri- methoprim 용액을 0.05㎕/㎖ 되게 첨가하였다.

각 배지에 준비된 균액을 B.s균은 $2X10^4$ cfu/㎖, M.l균은 $2X10^5$ cfu/㎖은 농도가 되게 혼합하여 멸균 페트리디쉬에 두께가 1mm 되도록 분주하고 표준 항균물질용액을 이용하여 감도를 측정한 후 시험에 사용하였다.

3) 시료의 검사 및 판정

냉동된 시료는 해동후 지육검사용 디스크(Advantec, Toya, Japan, ϕ10mm)를 넣어 육즙을 충분히 적신 후 각 배지에 부착시켰으며 B. subtilis 배지 및 M. lutea 배지는 32℃에서 18-24시간 배양하였다.

시험결과 하나 또는 그 이상의 평판에서 디스크 주변 억제대가 2mm(직경 14mm) 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

나. High performance liquid chromatography (HPLC)법

주 분석 장비로는 Waters 2690 separations module이고 detector는 Quinilone계 경우 fluorscence detector 사용하였고 그 밖의 항생물질은 uv detector를 사용하였다.

1) Tetracycline계

가) 분석조건

이동상 : Oxalic acid 1.26g + DW 1000mℓ /700 : ACN 200 : MeOH 100

칼 럼 : μ-Bondapak C18

검출기 : UV 360 nm / FL 1.0ml

표준액 : 표준품 10mg을 메탄올 10mℓ로 용해 후 100mℓ(표준원액 100ppm)로 만들고 최종 10μg/mℓ로 희석 후 사용

나) 시료추출

① C18 2g + 검체 0.5g + Oxalic acid 0.05g + EDTA 0.05g으로 균질화 후 10mℓ 주사기 컬럼에서 4.5mℓ로 압축

② Hexane 8mℓ로 탈지

③ Methylene chloride 8mℓ로 세척 -완전 건조

④ Methanolic Oxalic acid 8mℓ 용출

⑤ 40℃ 수욕조에서 감압 건고 후 이동상 1mℓ로 용해, 여과 후 주입

2) Sulfonamide계

가) 분석조건

이동상 조제 : KH_2PO_4 1g + DW 1000mℓ /840 : ACN 160

칼 럼 : Nova-pak C18

검출기 : UV 270 nm / FL 1.0ml

주입량 : 10μℓ

표준액 : 표준품 각10mg을 메탄올 10mℓ로 용해후 100mℓ(표준원액 100ppm) 10μg/ml로 희석 후 사용

나)시료추출

① C18 2g + 검체 0.5g 으로 균질화후 10mℓ 주사기 컬럼에서 4.5mℓ로 압축

② Hexane 8mℓ로 탈지

③ Methylene chloride 8ml 용출

④ 40℃ 질소가스로 감압 건조 후 이동상 0.5ml로 용해, 여과 후 주입

3) Penicillin계

가) 분석조건

이동상 : Na_2HPO_4 4.969g + NaH_2PO_4 H_2O 8.969g + $Na_2S_2O_3$ 2.482g → DW 1000mℓ (pH 6.5)/750 : ACN 250

* 유도체화 시약 제조

I 시약 benzoic anhydride 2.26g → DW 50mℓ

II 시약 1,2,4-triazole 6.905g을 DW 30mℓ로 용해 → $HgCl_2$ 5mℓ(26 mM) 가해 5M NaOH로 pH 9.0으로 조정

칼 럼 : Novapak C18

검출기 : UV 325 nm / FL 0.8ml

표준액 : 표준품 10mg을 DW 20mℓ로 용해후 100mℓ(표준원액 100ppm) -20℃에서 보관 1μg/mℓ로 희석 후 사용

나) 시료추출

① 검체 5g + 0.01M sodium phosphate buffer(pH 4.5) 15mℓ로 믹서

② 0.17M 황산 5mℓ, 5% sodium tungstate 5mℓ를 넣고 혼합 후 원심분리 (2500rpm/10분)

③ 상층을 5M NaOH 로 pH 8.1 조정 수용성 필터로 여과 (GF/B)

④ 여액을 20% NaCl 10mℓ로 혼화

⑤ 전 조작된 tC_{18} 카트리지(메탄올 20mℓ → DW 20mℓ → 2% NaCl 10mℓ) 로 용출

⑥ 2% NaCl 10mℓ →DW 10mℓ로 세척후 5분 건조

⑦ ACN 2mℓ로 용출

⑧ 40℃ 수욕조에서 감압건조 후 phosphate buffer(pH 9.0) 1mℓ로 용해

⑨ 유도체시약 I 75μℓ를 넣고 밀봉하여 30초간

혼합 실온에 10분 정치

⑩ 유도체 시약 II 450$\mu\ell$를 넣고 밀봉하여 60초간 혼합 65℃에서 30분 가열 하여 반응 후 즉시 찬물로 실온 처리하여 여과 후 주입

4) Quinilone계

가) 분석조건

이동상 : 증류수(0.4% triethylamine, phosphoric acid 포함)/MeOH/ACN = 85:7:8(v/v/v)

컬 럼 : Water XTerra C_{18} (4.6×250mm, 5μm) 또는 동등품

검출기 : 형광 (Ex. 278nm / Em. 455nm) / FL 1.0ml

주입량 : 50$\mu\ell$

표준액 : 표준품 10mg을 methanol 10mℓ로 용해 후 이동상으로100mℓ(표준원액100ppm) methanol로 10μg/mℓ 희석 후 사용

나) 시료추출

① 시료 1g에 2.5% trichloroacetic을 가하여 균질화 acetonitrile로 추출

② 농축건조후 50% acetonitrile과 이동상 혼합액으로 용해

역학조사

HPLC 항생물질 정밀검사 결과 양성시료로 확인된 출하농가에 대한 잔류 원인을 규명하기 위하여 질병치료를 위한 동물약품의 사용 여부, 사료급여 방법, 휴약 기간 준수여부를 조사하였다.

결 과

충북 관내 도축장에서 2005년부터 2006년까지 도축된 쇠고기, 돼지고기, 닭고기의 식육 중 항생물질 잔류검사 스크리닝 검사로 EEC 4-plate법으로 검사결과 양성으로 판정된 시료에 대한 정밀검사는 High performance liquid chromatography(HPLC)법으로 검사한 결과 Table. 1과 같이 나타내었다.

EEC 4-plate법으로 식육 중 잔류물질 검사결과를 살펴보면(Table. 1), 전체 검사건수 13,283건 중 143건(1.1%)가 양성으로 검출되었으며, 연도별 검사결과는 2005년도 전체 4,301건 중 54건(1.3%)이 양성으로 검출되었고, 2006년도는 전체 8,982건 중 89건(1.0%)이 양성으로 나타나 2005년 보다 낮은 검출율을 보였다.

EEC 4-plate법으로 양성으로 검출된 축종별 검사결과는 쇠고기의 경우 전체 1,248건 중 27건(2.2%)이 양성으로 검출되었고, 돼지고기는 전체 8,757건 중 103건(1.2%)이 양성으로 검출되었고, 닭고기는 전체 3,268건 중 13건(0.4%)이 양성으로 나타나 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 순으로 높은 검출율을 나타내었다.

EEC 4-plate법으로 식육 중 항생물질 잔류검사에서 양성으로 검출된 시료를 HPLC법으로 정밀검사 결과를 살펴보면(Table. 1), 전체 검사건수 143건 중 23건(16.12%)가 잔류허용기준을 초과하였으며, 축종별 검사결과는 쇠고기의 경우 전체 27건 중 14건(51.9%)이 기준을 초과하였고, 돼지고기는 전체 103건 중 6건(5.8%)이 기준을 초과하였고, 닭고기는 전체 13건 중 3건(23.1%)이 기준을 초과하여 쇠고기가 가장 높게 잔류 허용치를 초과하였다.

HPLC법으로 전체 시료 중 정밀검사결과를 살펴보면, 전체 검사건수 13,283건 중 23건(0.2%)가 기준을 초과하였으며, 연도별 검사결과는 2005년도 전체 4,301건 중 11건(0.3%)이 기준을 초과하였고, 2006년도는 전체 8,982건 중 12건(0.1%)이 기준을 초과하여 2005년이 비교적 높게 나타내었다.

Table 1. The survey of antibiotic positive by EEC 4-plate and HPLC method from beef, pork and chicken in Chung-buk

Meat	No. of sample		EEC 4-plate		HPLC	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006
Beef	494	754	11(2.2)	16(2.1)	9(1.8)	5(0.7)
Pork	2,950	5,807	39(1.3)	64(1.1)	2(0.07)	4(0.07)
Chicken	847	2,421	4(0.5)	9(0.4)	-	3(0.1)
Total	4,301	8,982	54(1.3)	89(1.0)	11(0.3)	12(0.1)

HPLC법으로 축종별 항생물질 정밀검사 결과는 쇠고기의 경우 1,248건 중 14건(1.1%), 돼지고기는 8,757건 중 6건(0.07%), 닭고기는 3,268건 중 3건(0.1%)이 잔류허용 기준을 초과하여, 쇠고기, 닭고기, 돼지고기 순으로 조사되었다.

HPLC법으로 최종 항생물질 잔류허용치를 초과한 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 시료에 대한 항생물질 종류에 따른 검사결과를 살펴보면 (Table. 2), 쇠고기의 경우는 Enrofloxacin이 기준초과 14건 중 7건(50.0%)으로 가장 높고, Oxytetracycline 4건(28.6%), Sulfamethazine 2건(14.3%), Sulfamethoxazole과 Penicillin은 각각 1건(7.1%) 순으로 조사되었으며, 돼지고기는 기준초과 6건중 Chlortetracycline이 5건(83.3%), Enrofloxacin은 1건(16.7%)이 잔류허용치를 초과하였으며, 닭고기는 기준초과 3건(100%) 모두 합성항균제인 Enrofloxacin 제재가 허용기준을 초과하였다.

HPLC법으로 정밀검사결과 잔류허용기준을 초과한 항생물질은 Quinilone계 11건(47.8%), Tetracycline계 9건(39.1%), Sulfonamide계 3건(13.0%), Penicillin계열이 1건(4.3%) 순으로 나타내었다.

Table 2. Distribution of antibiotic positive by HPLC method from beef, pork and chicken

Antibiotics	Beef	Pork	chicken
Oxytetracycline	3,(1)	-	-
Chlortetracycline	-	5	-
Sulfamethoxazole	(1)	-	-
Sulfamethazine	2	-	-
Penicillin	1	-	-
Enrofloxacin	7	1	3
Total	13(1)	6	3

* ( ) : positive of two antibiotic

HPLC법으로 정밀정량 검사결과 항생물질 잔류 허용치를 위반한 출하 농가에 대한 원인 규명을 위한 역학 조사 결과를 살펴보면 (Table. 3) 전체 항생물질 잔류위반 23개 농가 중 질병치료 목적으로 항생제 약물투여 후 휴약 기간 미준수가 14건(60.9%)으로 가장 높은 원인으로 나타났으며, 사양관리 중, 후기 사료 미급여가 4건(17.4%) 이었고, 원인불명이 5건(21.7%)으로 조사되었다.

Table 3. The survey of residual causes for production farms with antibiotic positive

Causes	Cattle	Pigs	Fowl
Antibiotic treatments	9	2	3
Feed additives	-	4	-
Unknown	5	-	-
Total	14	6	3

축종별 잔류물질 위반농가 원인규명의 역학조사는 소 경우 전체 14건 중 9건(64.3%)이 휴약 기간 미준수로 나타났으며, 나머지 5건(35.7%)은 원인불명으로 조사되었으며, 돼지 경우는 전체 6건 중 4건(66.7%)이 후기사료 미급여로 나타났으며, 나머지 2건(33.3%)은 휴약 기간 미준수로 조사되었으며, 닭 위반 농가는 3건(100%) 모두 휴약 기간 미준수로 조사되어 대부분의 가축사육농가의 항생물질 잔류원인이 약물투여 후 휴약 기간 미준수가 가장 높은 원인으로 나타내었으며, 다음으로 돼지의 경우는 후기사료 미급여로 사양관리 소홀이 가장 큰 원인으로 조사되었다.

고 찰

우리나라는 축산용 항생제의 사용이 다른 선진국에 비해 사용량이 많을 뿐 아니라 질병에 대한 직접적인 치료용 보다는 성장촉진 용도로서 사료 첨가용 항생제가 많이 사용되고 있다고 보고되고 있다.

우리나라와 같은 목적으로 사용하는 일본의

경우는 가축에 사용하는 항생제중 테트라싸이클린계가 전체의 60%를 차지하는 등 전세계적으로 사용하여, 오스트레일리아에서는 설파제와 함께 축산에 가장 널리 이용되는 항생제 등을 수입 및 자국산 축산식품에 대해 잔류여부와 약물의 사용에 관한 조사를 실시하였다고 보고하였다.

우리나라도 1989년부터 일본 수출돈육에 대한 설파제 검사를 계기로 잔류검사를 시작하였으며, 1990년대에 들어와 본격적으로 국내산 축산물의 잔류 조사사업을 추진하여, 현재의 잔류검사체제를 확립하였다.

축산물내 동물용의약품의 잔류는 선진국이나 우리나라의 경우를 보더라도 약품 사용설명서에 제시된 휴약 기간을 지키지 않거나 출하전 후기사료를 급여하지 않은 경우가 대부분이라 할 수 있다. 따라서 축산물내 동물용의약품의 잔류를 예방하기 위해서는 축산 현장에서 축주의 역할이 가장 중요하다 할 수 있겠다.

또한 동물용 의약품 또는 사료 첨가물의 안전성이 세계적으로 재평가 되어 현재 다시 그 사용상의 주의나 규제가 엄격하게 실시되고 있는 추세에도 불구하고 약물의 부적절한 오용이나 남용에 의해서 축산물의 안전성을 저해하게 된다.

가축질병을 예방하거나 치료를 목적으로 사용하는 동물용의약품은 투여 후 가축체내 에 흡수되어 일정기간 작용한 후 오줌·분변 등을 통해 서서히 배설된다. 특히 항생제는 제조회사가 권장하는 용법·용량이나 휴약 기간을 준수하지 않을 경우 가축의 체내에 잔류하게 되고 그 생산물에도 잔류되어 축산식품의 안전성을 저해하는 주요원인이 된다.

가축사육농가의 항생제 사용을 최소화 할 수 있는 방법으로 첫째, 철저한 차단방역으로 질병예방관리가 가장 기본적으로 노력하여야 하며 다음으로 질병발생시 수의사 등 전문가와 상담하여 약제선정 및 약품투여에 따른 휴약 기간 준수사항 등을 지도 받아야하며 효과적인 백신접종프로그램을 실시하여 질병에 대한 면역력을 높여 항생제 사용을 최소화하고, 질병 발생 시 축사의 온도, 습도, 환기 불량 등의 환경요인을 조절하고, 비타민과 전해질 공급 등의 항생제 대체요법을 적절히 병행하여 실시하면 항생제 사용 최소화가 가능하리라 생각된다.

질병 치료목적 및 사료효율 극대화를 위한 항생제 사용은 앞으로도 가축사육 농가에서 계속하여 실시될 것으로 사료되며, 항생제 잔류 원인 규명인 역학조사에서와 같이 약물 투여 후 휴약 기간을 준수하지 않은 원인 가장 크므로 "동물용의약품의 안전사용기준"(국립수의과학검역원 고시 제2000-12호, 2000. 3. 25)에 제시된 축종별 휴약기간을 잘 지키면 축산물내 약물 잔류을 사전에 예방이 가능하며, 약품 휴약 기간을 잘 지키기 위해서는 약품투여 기록을 정확히 작성하는 것이 중요하다. 그리고 허가되지 않은 약품의 사용을 금지하여야 하며, 항생제등 약제가 첨가 한 배합사료를 반드시 사육시기에 맞춰 급여토록 하여 출하시 후기사료를 반드시 급여하는 등 동물용 의약품 안전사용을 위한 10대 수칙을 준수한다면 항생제 잔류방지가 가능하리라 생각된다. 이를 위하여 축주의 항생제에 대한 의식이 확고해 질 수 있도록 관련단체의 홍보 및 교육 노력이 절실히 요구된다.

현재 우리나라는 축종별·항생물질별·투여 방법 등에 따라 동물용 의약품의 사용 및 휴약 기간을 정하였고, 또한 배합사료내 사료첨가제의 사용도 축종별, 년령별로 기준을 제정하여 그 사용을 규제하는 등 축산물의 안전성 확보를 위해 노력하고 있으나 아직까지 식육 중 항생물질 잔류가 근절되지 않는 결과로 미루어 볼 때 휴약 기간 준수, 동물약품의 오·남용 등의 잔류물질에 대한 홍보 및 교육의 지속적인 필요성과 축산농가에서의 공중보건학적인 관심이 부족하였던 것으로 사료된다.

결 론

충북 관내 도축장에서 2005년부터 2006년까지 도축된 쇠고기, 돼지고기, 닭고기의 항생물질 잔류검사를 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 조사 기간동안 항생물질 잔류 검사결과는 전체 13,283건 중 EEC 4-plate법으로 143건(1.1%)이 양성으로 검출되었고, HPLC법 23건(0.17%)이 항생물질 잔류허용치를 초과하였다.

2. 식육중 항생제 잔류정밀 검사결과는 2005년 4,301건 중 11건(0.3%), 2006년 8,982건 중 12건(0.1%)이 항생물질 잔류허용 기준을 초과하였다.

3. 식육중 잔류허용기준을 초과한 항생제는 Enrofloxacin 30.4%, Chlortetracycline 21.7 %, Oxytetracycline 17.4%, Sulfamethazine 8.7% 순으로 나타내었다.

4. 항생물질 잔류위반 출하농가에 대한 원인 규명 역학조사는 전체 23건 중 휴약 기간 미준수 14건(60.9%), 후기사료 미급여 4건(17.4%), 원인불명 5건(21.7%)으로 조사 되었다.

참고문헌

1. American Society of Hospital Pharmacists. 1994. Drug information. Am Hospital Formul Serv 324-340.
2. Messersmith RE, Sass B, Berger H, et al. 1967. safety and tissue residue evaluations in swine fed rations containing chlortetracycline, sulfamethazine, and penicillin. *JAVAMA*151(6) : 719-724.
3. Salisbury CDC, Chan W, Patterson JR, et al. 1990. Case report : An investigation of chlortetracycline and oxytetracycline residues in suspect swine slaughtered in Manitoba, Canada, October 1987 to March 1988. *Food Addit* Contam7(3) : 369-373.
4. Huber WG. 1988 Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6 ed. 813-821, 1172-1173.
5. Oka H, Ikai Y, Kawamura Nawamura N, et al. 1991. Limited Survey of residual tetracycline on tissue collected from diseased animals in Aichi prefecture Japan *JAOAC* 74 : 897-896.
6. Tsai CE, Kondo F. 1994. Simple continuous and Simultaneous determination of tetra-cycline residues. Research Vet Sci 6 : 277-283.
7. Walsh JR, Walken LV, Webber JJ. 1992. Determination of tetracycliines in bovine and porcine muscle by HPLC using solidphase extraction. *J* Chromato 596 : 211-216
8. 농림부. 2005. 식육 중 잔류물질 검사요령. 농림부고시 제2000-17호
9. 보건복지부. 1996. 식품위생법. 식품 등의 기준 및 규격 고시. 보건사회부고시 제 96-10호.
10. 이재진. 1984. 동물용 항생물질제제의 현황과 개선방안. 대한수의학회지. 24(1): 9-20.
11. Barker SA, Walker CC. 1992. Chromato-graphic method for tetracycline analysis in foods. J Chromato 624 : 195-209.
12. CODEX Alimentarius Commission, 1993. Residues of veterinary drugs in foods. Co-dex alimentarius 3 : 8
13. 조태행, 이광직, 박종명 등, 1993. 1963-1992년도 동물용 항생물질 제제의 국가검정 성적, 한국수의공중보건학회지 17(1) : 111-121
14. 조대행, 이광직, 진남섭 등. 1993. 테트라싸이클린계 항생물질의 분석기법 개발 및 잔류조사에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 17(3): 321-328

15. Bogaerts R, Wolf F. 1980. Astandardized method for the detection of residues of antibacterial substances in freshmeat Fleischwirtschaft 60 : 672-673
16. Moats WA, Anderson KL, Rushing JA, et al. 1995. Comparison of a radioimmuno -assay(Charm II) test with HPLC for detection of oxytetracycline residues in milk samples from lactating cattle. Am J. Vet Res 56(6) : 795-800
17. Anderson KL, Moats WA, Rushing JA, et al. 1995. Potential for oxytetracycline administraration by three routes to cause milk residues in lactating cows, as detected radioimmuno- assay(Charm II) and HPLC test methods. 56(1) : 70-77
18. tsai CE, Kondo F. 1994. Simple continuous and simultaneous determination of tetracycline residue. Res Vat Sci 56 : 277-283
19. Baker SA, Long AR. 1994. Preparation of milk sample for immunoassay and liquid chromatographic screening using MSPD. JAOAC 77(4) : 844-854.
20. Korsrud GO, Macneil JD. 1987. A Comparision of three bioassay techniques and high performance chromatography for the detection of CRT residues in swine tissue. Food Addit Contam 692 : 149-153
21. Moats WA, Raida Harikkhan. 1995. Rapid HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk. J Agric Food Chem 43 : 931-934
22. 강환구, 손성완, 조병훈 등. 1996. 시료 고체상 분산(matrix solid phase dispersion) 전처리법을 이용한 식육중 테트라싸이클린계 항생물질 동시 정량분석. 대한수의학회지 36(3) : 541-550
23. 송성옥, 조명행, 신광순 등. 1994. HPLC를 이용한 식육류의 잔류 테트라싸이클린계 항생물질의 동시 분석법. 한국수의 공중보건학회지 18(4) : 343-351.
24. Carignan G, Carrier K, Sved S. 1993. Assay of oxytetracycline residues in salmon muscle by liquid chromatography with ultraviolet detection. SJOAC 76(2) : 325-328
25. Oka H, Ikai Y, Hayakawa J, et al. 1994. Improvement of chemica analysis of antibiotics. 22. Identification of residual tetracyclines in honey by Frit FAB/LC/MS using a volatile mobile phase. J Agric Foos Chem 42 : 2215-2219
26. 조태행. 1978. 축산식품의 잔류 항생물질. 우유, 계육 및 계란을 중심으로. 한국수의 공중보건학회지 2 : 56-71
27. 박병옥, 백미순, 권기호 등. 1991. 원유중의 잔류 항생물질 및 설파제 조사. 한가위지 14 : 63-69
28. 김창수, 이성권, 고태오 등. 1996. 경기 남부지역 원유중의 설파제 잔류 조사. 한가위지 19(1) : 39-45
29. 박종명, 손성완, 조태행 등. 1990. 국내산 돈육 및 계육중의 항균물질 잔류 조사. 한국수의공중보건학회지 14(1) : 61-68
30. 박종명, 이광직, 조태행 등. 1991. 국내산 우육, 돈육 및 계육중의 항생물질 잔류조사. 한국수의공중보건학회지. 15(3) : 287-291

유전자분석에 의한 쇠고기 품종감별법 연구

한성태[1], 박선준, 정찬우, 곽학구, 최해연

충청북도 축산위생연구소

Research of Identification method of the cattle breed using the gene discrimination method

Soung-Tae Han[1], Sun-Jun Park, Chan-Woo Jung, Hak-Koo Kwak, Hae-Yeun Choi

Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute,

Abstract

This study was carried out to research identification method which discriminate Hanwoo and Hostein meat using Melanocrotin receptor 1(MC1R) gene associated with coat colors of cattle by PCR-RFLP analysis.

Analytical project have been progressed from 2004 and most samples requested have been from school. Form of them were various such as lump, fragment, slice, grind meats.

It has been impassible to collect sample for experiment in various part excepting lump meat.

The Genomic DNA extraction process of existing method was as follows : cell lysis, protein removal, protein precipitation, DNA dehydration & precipitation, DNA stabilization.

The gross requirement time of this method is about 5 hours. It is long time.

To solve this problems, It was tested with a crusher which could grind and with a new extraction kit which employed the principle that magnetic silica beads bind genomic DNA present in a lysate solution.

With the result that, It has been passible to collect many sample in various part and it has been not necessary to perform protein removal process using harmful reagent, or high-speed centrifugation. The gross requirement time is about 2.3 hours. It is some short time.

Key words : Melanocrotin receptor 1, PCR-RFLP analysis, various part, a crusher gross requirement time, magnetic silica beads,

서 론

분류학상 동일종에 속하면서 형태적 또는 생리적으로 다른 많은 개체군 또는 계통이 분리 육성된 것을 품종이라 한다.[1)]

소의 경우 순수한 고기소 품종만도 50여 품종이 있고 육용종, 역용종, 겸용종 등을 모두 합하면 약 500여개 이상의 품종이 있다.[2)]

우리나라 고유의 소 품종은 한우로 체장은 짧고 이마가 넓으며 비경이 길고 눈은 크며 성질이 온순하고 뿔은 외하방을 향하는 특징을 갖고 있다. 모색은 대부분 순적색이나 간혹 이모색이 출현하는 경우도 있다. 모색은 경제 능력과는 관계없으나 외형상의 특징으로서 한우의 순종개량에 있어서 주요인의 하나로 고려되고 있다. 한우의 모색을 단일화하기 위한 노력으로 한우 개량에 모색을 중요시하여 1938년 제정된 심사표준에 “피모는 적색으로”라고 하였고, 1970년 개정된 심사표준에도 “모색은 황갈색인 것”으로 규정하여 강화하는 등 그간 일부 모색의 도태를 추진하였다.[1)] 최근에는 유전자 분석기술의 발달로 DNA 수준에서 종 특이적인 DNA 염기서열의 차이에 따른 축종 판별은 물론 동일한 종내에서 품종판별이 가능하게 되었다.[3)]

또한 이러한 기술개발을 촉진케 한 원인은 우루과이 라운드(UR) 협상 및 자유무역협정(FTA)에 따른 수입개방화라는 환경변화에서 찾을 수 있다. 쇠고기가 수입되면서 국내산 젖소고기와 함께 한우로 둔갑 판매되는 부정 유통 사례가 발생되어 한우고기에 대한 소비자 신뢰도 회복이 시급한 과제로 남아 있다.

한우고기는 값은 비싸지만 품질과 인지도 면에서 소비자가 기꺼이 비싼 값을 지불하고 구매할 만큼의 시장을 형성하고 있지만 판매장에 진열된 상태에서는 원산지 및 품종확인은 불가능하다. 이러한 부정유통 사례를 차단하여 한우 산업 경쟁력 강화 및 소비자 권익보호를 위해 우리연구소에서는 2004년도부터 기술전수 및 기술축적을 통해 2005년부터 유전자 분석법을 이용한 한우고기 판별사업을 실시하고 있다.

검사의뢰는 교육청 및 각급 학교, 행정기관, 일반 민원으로 구분되며, 검사용 시료의 형태는 덩어리 고기, 조각 고기, 가늘게 자른 고기, 곱게 간 고기로 50~200g 정도 채취하여 의뢰하고 있다.

유전자분석은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)법을 기초하여 극소량의 DNA를 대량 증폭 후 분석하기 때문에 시료의 양보다는 정확한 DNA 추출이 분석결과와 밀접한 관계를 갖는다.[3)] 따라서 DNA추출을 위해 대량의 시료가 필요하지 않았지만 한우고기 판별법의 경우 검사시료 특성상 덩어리고기 외에 다른 형태의 시료는 부정유통 목적으로 다른 품종의 고기가 혼합될 가능성이 높기 때문에 한건의 의뢰 시료에서 전처리 양을 늘려 검출 확률을 높일 필요성이 있었다.

이러한 사업목적에 적합하게 분석 방법을 개선하고자 기존의 방법과 새로운 방법을 비교 실험하였다. 본 연구에서는 의뢰받은 시료를 한번에 가능한 많이 검사할 수 있는 방법을 찾고자 하였으며 더불어 검사소요시간을 단축하여 검사의 효율성을 높이고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료

공시 재료로는 도축장에서 채취한 한우와 젖소고기를 사용하였다.

분석방법

가. 일반적 방법[4~5)]

1) 시료전처리

지방부분을 피해 1g정도를 채취하여 1.5㎖ tube에 넣고 EDTA-Nuclei Lysis Mix solution 0.6㎖씩 분주한다.

2) DNA 추출(10tube 기준)

구분	시약	반응시간 (h)
세포파괴 및 핵산유리	EDTA/Nuclei Lysis Mix solution	0.5
단백질 제거 · 분해	Proteinase K	3
Protein 침강	Protein Precipitation Sol.	0.5
수분제거 및 DNA 침전	Isopropanol	0.5
수분제거 · DNA 안정화	Ethanol	0.5
건조 및 회수	DNA free 증류수	2
계		5

위 추출방법은 농촌진흥청 축산연구소에서 기술 이전 받은 방법으로서 핵산 추출킷트로 생산되는 제품-Wizard Genomic Purification Kit (Promega Co. USA)- 을 사용하였다.

TBE buffer(90mM tris-borate, 2mM EDTA, pH 8.0)로 2% agarose gel을 만들고 ethidium bromide 용액을 10,000:1로 희석하여 gel tray에서 굳인 후 회수한 용액 6㎕를 2㎕ loading buffer와 혼합하여 전기영동하고 이미지분석 장치로 추출된 DNA를 확인한다.

3) 중합효소연쇄반응(PCR)에 의한 MCIR의 증폭

가) Primer

MCIR 유전자의 변이를 탐색하기 위한 primer는 Kriegesmann 등(1999)이 발표한 MC I R 유전자(Genebank accession number Y19103)의 염기서열을 근거로 Forward primer는 5'-TGC CAA GAA CCG CAA CCT GCA CT - 3'로, Revers primer는 5'- GGT TAT GAA GAG CAG GCT GGT GA -3'로 제작하여 사용하였다.

나) PCR 조건

PCR을 위해 PCR ×10 buffer 2.5㎕. 2.5mM dNTP mixture 2.5㎕. 10 pmole의 primer 1㎕. 25ng의 genomic DNA 1㎕, 1U의 Taq DNA polymerase(Takara Taq, Japan)를 넣고 최종 부피가 25㎕가 되게 하였다.

PCR 수행은 94℃에서 5분간 predenaturation 한 후 94℃ 30초, 65℃ 30초, 72℃에서 1분의 cycle을 35회 반복 수행한 후 마지막으로 72℃에서 10분간 extention 과정을 거쳐 4℃까지 온도를 낮추도록 설정하였다.

PCR Product 6㎕를 2㎕ loading buffer와 혼합하여 2% agarose gel에서 MCIR 유전자의 일부가 350bp의 크기로 증폭되었는지를 확인하였다.

4) 제한효소 처리에 의한 DNA 절단 및 전기영동

PCR 종료 후 350bp로 증폭된 MCIR 유전자를 일정크기로 절단하기 위해 제한효소 MspA1 I (Promega. USA) 8㎕와 증폭산물 7㎕를 혼합하여 총 volume을 15㎕로 조정한 후 37℃에서 3시간 이상 반응시켰다. 제한효소로 절단하여 얻어진 DNA 단편을 확인하기 위해 TBE buffer(90mM tris-borate, 2mM EDTA, pH 8.0)가 함유된 2% Metaphor agarose gel (Takara, JAPAN)로 전기영동 하여 분리한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 UV 상에 발현된 DNA band를 분석하였다.

나. 개선 방법

1) 시료전처리

지방부분을 피해 1g정도 10개를 채취하여 2.0㎖ tube에 넣고 Φ 0.3㎜ 쇠구슬 3개와 0.2㎖ DNA free 증류수를 분주한다.

파쇄기(3000RPM/M)에서 4분간 파쇄 후 용해 · 흡착액 1㎖를 분주한 2.0㎖ tube에 4g 정도를 넣는다.

2) DNA 추출(10tube 기준)

구 분	시 약	반응시간 (h)
세포파괴 및 핵산유리 단백질 제거 · 분해 Protein 침강	용해 · 흡착액	1
DNA 흡착	비드	0.1
수분제거 및 DNA 침전	세정액	0.1
수분제거 · DNA 안정화	Ethanol	0.1
건조 및 회수	DNA free 증류수	1
계		2.3

위 추출방법은 핵산추출킷트로 생산되는 제품 - Genome MagExtractor Kit (Toyobo Co. JAPAN)- 을 사용하였으며 추출된 DNA 양 확인은 위와 동일하게 하였다.

3) PCR에 의한 MCIR의 증폭

가) Primer

일반적 방법에서 제작한 primer 사용함.

나) PCR 조건

PCR을 위해 Prime taq premix × 2(Genetbio. KOREA) 12.5$\mu\ell$, 10 pmole의 Forward & Revers primer 각각 1$\mu\ell$, 25ng의 genomic DNA 2$\mu\ell$, D·W 8.5$\mu\ell$ 를 넣고 최종 부피가 25$\mu\ell$가 되게 하였다.

PCR 수행은 94℃에서 5분간 predenaturation 한 후 94℃ 30초, 68℃ 30초, 72℃에서 1분의 cycle을 31회 반복 수행한 후 마지막으로 72℃에서 10분간 extention 과정을 거쳐 4℃까지 온도를 낮추도록 설정 하였으며 증폭여부는 위와 동일한 방법으로 확인하였다.

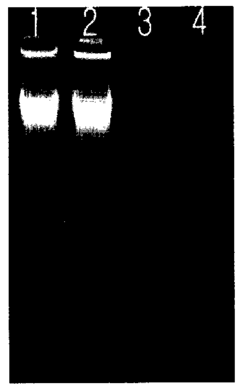
4) 제한효소 처리에 의한 DNA 절단 및 전기영동

일반적 방법과 동일한 방법으로 분석하였다.

5) 결 과

추출한 DNA를 분석한 결과 Fig 1과 같이 첫째방법에 의한 결과는 밴드가 끌리는 현상을 볼 수 있었으며 둘째 방법의 경우 선명한 밴드를 관찰 할 수 있었다.

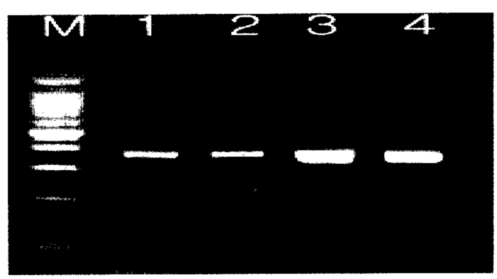
Fig 1. DNA 전기영동사진



Line 1, 2 : 일반적 방법
Line 3, 4 : 개선 방법

Fig 2와 같이 제작된 PCR용 taq premix를 사용한 경우 유전자 증폭 밴드가 더 선명하게 나타났다.

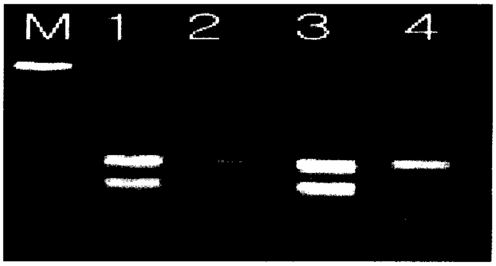
Fig 2. PCR Product의 전기영동사진



M : 표준크기 표시인자
Line 1, 2 : 일반적 방법, Line 3, 4 : 개선 방법

Fig 3과 같이 제한효소 처리 결과에서는 두 방법간의 뚜렷한 차이점을 분석할 수 없었다.

Fig 3. 제한효소처리 유전자의 전기영동사진



M : 표준크기 표시인자
Line 1, 2 : 일반적 방법, Line 3, 4 : 개선 방법
Line 1, 3 : 한우표준형, Line 2, 4 : 젖소표준형

고찰 및 결론

본 연구에서 소의 모색발현을 조절하는 MC1R 유전자로 PCR-RFLP기법을 이용하여 한우고기를 판별하는 기술을 일반적 방법과 개선방법으로 비교실험 하였다.

시료 전처리 과정에서 전자 방법의 경우 시료의 양을 증가할 경우 양에 비례하는 DNA 추출 시간이 소요되는 반면 후자 방법에서는 검사시료의 채취량을 전자보다 10배 정도 많이 하여도 추출 시간에는 큰 차이 없이 검사가 가능하였다.

후자의 경우 검사 시료를 곱게 파쇄하여 혼합한 후 일부를 취하여 DNA를 추출하기 때문에 하나의 시료에서 검사 양을 증가 시킬 수 있었고 이는 한우고기를 타 품종과 혼합하여 유통시키는 부정유통사례의 적발 가능성을 높일 수 있었다.

실제 최근 2년간 8건의 적발사례 중 4건이 혼합하여 유통시킨 것으로 나타났다.

DNA추출 방법 중 소량의 시약을 직접 혼합할 때 작은 오차가 생길 수 있으며 혼합시약이 많을 경우 더 큰 오차가 생길 수 있다. 때문에 미리 혼합해서 시판되는 제품을 사용하여 그 결과를 비교해 보았다.

그 결과 후자의 경우 추출시간은 2.7시간 정도 단축되었고 깨끗한 추출물을 얻을 수 있었다.

전자의 경우 지질과 단백질 성분의 잔재로 Fig 1의 전기영동 사진에서처럼 끌림 현상이 나타났으며 이는 중합효소연쇄반응(PCR) 결과에서 처럼 유전자 증폭에 약간의 저해요인으로 작용한 것으로 사료되었다.(Fig 2의 line 1 · 2)

반면에 DNA만을 선택적으로 결합하는 비드를 사용하는 후자의 경우에는 보다 순도 높은 DNA를 얻을 수 있었으며, 중합효소연쇄반응(PCR) 결과처럼 전자보다 적은 cycle로도 좋은 PCR 산물을 얻을 수 있었다. (Fig 2의 line 3 · 4) 또한 일정 농도의 PCR 산물만 있으면 결과 판정에는 영향을 주지 않았다.(Fig 3)

결과적으로 파쇄기를 사용하고 비드 방식의 제품을 사용했을 경우에 보다 많은 양을 검사할 수 있어서 부적합시료 검출 가능성을 높일 수 있을 것으로 사료되며 재조된 PCR 재료를 응용함으로써 실험 과정에 발생할 수 있는 오차를 최소화하고 검사 소요시간도 단축시킬 수 있었다.

충북 도내 소재 학교급식과 관련된 교육청 및 학교에서 유전자분석이 대부분 의뢰되며, 8건의 부적합 건수 중 단속기관의 2건을 제외한 6건이 학교 급식에서 나왔다. 이러한 학교급식의 부적합건수는 2005년 5건에서 2006년 1건으로 줄어 크게 개선된 결과를 얻었으며, 이는 학교 급식관계자가 납품업체 관리를 위해 꾸준히 노력한 결과와 함께 의심의 여지가 없는 유전자 분석 기술의 결실이라 사료된다.

현재 한우와 젖소고기 판별법은 널리 보급되어 유통질서 확립을 위해 사용되고 있으며 최근 개발된 수입육과의 판별법은 장비가 더 필요하고 검사시간이 4~5일정도 소요되는

단점이 있어 극히 소수의 연구기관에 보급되어 있다.

축산식품산업의 발전과 안전하고 우수한 축산물 공급 기반조성 및 학교급식 환경 개선을 위해 앞으로 더 신속하고 간편한 유전자 분석법의 개발과 보급이 필요하다.

V. 참고문헌

1. 농촌진흥청 축산연구소 자료실. 한우의 주요 특성
2. 이기만. 1970. 한우의 형질과 그 상관에 관한 연구. 한국축산학회지 12:141-1426. 김환경. 1963. 제주지방우의 모색분포에 관한 연구. 동아논총 제 1집 pp. 33-45
3. 김태현, 윤두학, 박응우, 이혜영. 오성종, 정일경, 탁태영, 김경남, 한재용. 2000. 소품종별 Melanocotin Receptor 1(MCR1) 유전자의 유전자형 빈도에 관한 연구. 동물자원지. 42:735
4. 오홍록, 상병찬, 이창수. 1997. DNA 분석 기법을 이용한 한우육 판별의 실용화에 관한 연구. 농림부. 최종 연구보고서
5. 정의룡. 김우태. 김연수, 한상기. 2000. 소 모색관련 유전자 MC1R의 PCR-RFLP marker를 이용한 한우육 판별. 동물자원지. 42:379

청주 재래시장에서 유통되는 가금의 조류인플루엔자 바이러스 분리 및 유전적특성

유기조, 이종화, 안양수, 이청산, 최해연

충청북도 축산위생연구소

Study of low pathogenic avian influenza viruses in Cheongju live-bird markets

Gi-Jo Yoo, Jong-Hwa Lee, Yang-Soo Ahn, Chung-San Lee, Hae-Yeun Choi

Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute

Abstract

In live-bird markets various species of live poultry are being continuously circulating in a confined area. Therefore, avian influenza viruses originating from different species achieve a suitable environment to generate reassortant viruses of a special kind. Due to the possibility of the influenza virus to transmit from poultry to humans in this area, the isolation and characterization of avian influenza viruses of poultry in live-bird markets of Cheongju have been proceeded to provide basic information on domestic avian influenza viruses which are currently causing problems. The research on surveillance and analysis of avian influenza viruses in live-bird markets presented information as listed below.

1. 67 out of 273 fecal samples of ducks and chickens in live-bird markets, were detected positive of avian influenza virus. (24.5% positive of virus)
2. Among 164 fecal samples of live-bird market chickens, 41 samples were detected positive.
3. Out of 109 fecal samples of live-bird market ducks, 26 were detected positive of avian influenza virus.
4. 67 viruses isolated from live-bird market ducks and chickens revealed that 32 and 35 viruses were of subtype H3N2 and H9N2, respectively. (chickens : 4 isolates were H3N2 and 29 isolates were H9N2, ducks : 28 isolates were H3N2 and 6 isolates were H9N2)

Key words : avian influenza virus, live-bird market chickens, H3N2, H9N2

서 론

조류인플루엔자 (Avian influenza : AI)는 *Orthomyxoviridae*과(科, family), A형 Influenza virus속(屬, genus)으로[1] 국제수역사무국(Office International des Epizooties : OIE)에서 List A 질병으로 분류[2]되며, 국내에서는 고병원성 조류인플루엔자는 제1종가축전염병으로 규정하고 있다.

AIV에는 다양한 아형이 있는데, 바이러스 표면에 존재하는 HA의 특성에 따라 H1부터 H15까지 15종이 있으며, NA라는 특수효소의 특성에 따라 N1부터 N9까지 9종의 아형으로 구분 된다[1]. 따라서 H형과 N형을 조합하면 A형 인플루엔자 바이러스는 이론적으로 총 135종의 아형이 존재하게 된다. AIV의 가장 큰 특징 중의 하나는 8개의 RNA 분절로 인하여 복제과정에서 쉽게 변이가 일어난다는 점이다. 서로 다른 두 아형의 AIV가 동일 개체에 동시에 감염되면 두 AIV의 RNA 분절 간에 유전자 재편성이 가능하며, 이로 인하여 두 바이러스 간에 유전자의 교환이 일어나 대변이에 의해 전혀 새로운 바이러스의 출현을 초래할 수 있다[3].

조류인플루엔자 바이러스에 의해 20세기동안 4번의 큰 pandemic의 발생에 의해 많은 인명 피해와 가금류의 폐사로 인하여 경제적 큰 손실이 있었다. 이 모든 바이러스는 유전적 분석을 통하여 사람의 인플루엔자는 직・간접적으로 조류인플루엔자바이러스로부터 유래되었음이 밝혀졌다.[4, 5] 특히 최근 동남아시아에서 문제가 되고 있는 조류 인플루엔자 바이러스 H5N1, H9N2, 캐나다의 H7N3, 네덜란드에서 문제가 되었던 H7N7 subtypes들 모두 야생 또는 가금의 조류바이러스가 직접 또는 변이를 통해 사람에게 전파되어 많은 인명 피해를 발생시킨 경우라 할 수 있다.

조류인플루엔자는 역시 인플루엔자 바이러스라는 점에서는 지난 세월 동안 인류에게 문제가 되었던 다른 독감과 유사하게 취급되었지만 그 유전적 형태는 다른 종류이어서, 그동안(1997년 홍콩의 첫 보고 이전까지) 가금류 사육 농가 외에서는 크게 문제가 되지 않았고, 조류인플루엔자는 주로 야생 오리 등의 수생 조류에 지속적으로 감염되어 수생 조류들에서만 가벼운 감염만 일으키는 것으로 생각하여 왔습니다. 그러던 중 사람이 사육하는 오리, 닭 등의 가금류에서 대규모로 치명적인 결과를 야기 시킨 조류인플루엔자가 발생하기 시작하였는데, 그것이 1997년에 홍콩에서 처음으로 사람에게 감염을 일으켜 치명적인 결과를 나타내었다[6]. 이러한 사례에서 알 수 있듯이 유럽과 동남아시아에서 최근 심각한 문제가 되고 있는 조류인플루엔자 바이러스는 야생조류에서 유래되어 사람이 사육하는 가금류(오리, 닭, 메추리 등)에 감염이 일어난 후 사람에게 기회 감염으로 많은 인명 피해를 내고 있음을 알 수 있다[6].

특히 1997년 5월에 Hong Kong 조류인플루엔자의 원인이 Hong Kong내의 조류시장으로 밝혀지면서 무려 1,500만 마리의 가금류를 단 3일 만에 긴급 살처분 하였으며 막대한 경제적 손실을 초래하였다.

재래시장(Live-bird market)은 대부분은 살아 있는 여러 가금류가 야외시장의 일정한 장소에서 지속적으로 판매되고 있기 때문에, 각기 다른 가금류간의 특이 조류인플루엔자 바이러스들이 재조합 바이러스를 만들기에 적합한 환경을 가지고 있다[7, 8]. 또한 Live-brid market은 여러 가금들 뿐 만 아니라, 구매자인 사람도 항상 여러 살아있는 조류들에 노출되어 있기 때문에, 사람에게 감염 가능한 재조합 바이러스가 여러 가금들에 생겨날 경우 인체감염이 이어질 수 있는 장소이기도 하다.

이에 본 연구에서는 청주 재래시장에서 유통되는 가금의 조류 인플루엔자 바이러스 분리 및 유전적 특성을 분석하여 최근 국내 문제가 되고 있는 조류인플루엔자 바이러스의 유전학적 비교분석에 의한 국내 조류인플루엔자에 대한 정확한 기초 정보를 수집하고자 본 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

실험재료 및 가검물

바이러스 분리를 위해 청주 재래시장에서 살아있는 가금류(닭, 오리)의 분변을 채취하여 실험재료로 사용하였다. 하나의 개체에서 배설된 분변은 2g씩 15㎖ conical tube에 각각 채취했다. 샘플채취 기간은 2005년 12월부터 2006년 11월까지로 1년간 실시하였다.

실험방법

① 바이러스분리

채취된 분변은 항생제(Streptomycin 2㎎/㎖, PenicillinG 2000IU/㎖, Kanamycin 0.25㎎/㎖)를 포함한 PBS에 4시간이내 재부유한 후 3500rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 다시 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 최종 부유액인 상층액을 11주령 SPF부화란의 요막강(allantoic fluid)내에 200㎕씩 접종하였다. 48시간 37℃에서 배양 후 요막강액을 분리하여 0.5% 닭 혈구를 이용하여 HA test를 실시였다.

② 바이러스 유전적특성 분석

RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 바이러스 RNA는 Viral Gene-Spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit(iNtRON biotechnology, Korea)의 지침에 따라 추출하였으며 추출한 바이러스 RNA는 I-AIV(H9) Detection Kit(iNtRON biotechnology, Korea)로 RT-PCR을 진행하였다. 방법으로는 enzyme mix 8㎕에 RNA template 2㎕를 첨가하여 진단용액을 넣은 후 최종부피를 20㎕로 맞춘 후 잘 섞어 Reverse transcription(45℃/30min), Pre-PCR(94℃/5min), PCR(denaturation 94℃/30sec, annealing 50℃/30sec, extension 72℃/40sec, 40cycles), post-PCR(72℃/5min)을 핵산 증폭기(ThermoHybaid PCR machine)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1.2% agarose gel(Invitrogen, USA)상에서 전기영동한 뒤 5X loading dye로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 H9 유전자 크기는 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen, USA)를 같이 전기영동 함으로써 확인하였다.

HA test 에서 양성 반응을 보인 샘플에서 RNA를 분리한후 influenza virus의 특이 primer를 이용하여 Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)을 수행하였다. RT-PCR과 multiplex PCR 방법을 통해서 조류 인플루엔자확인 및 각 분리주의 subtype을 구별하였다. 유전자를 분석하기 위해 RT-PCR로 조류인플루엔자의 HA 유전자를 증폭 시킨 후 agarose gel에서 순수 분리된 유전자을 (주)마크로젠에 유전자 분석을 의뢰하였다. 분석된 유전자들은 DNAStar 유전자 분석 프로그램을 사용하여 기존에 알려진 데이터와 유전적 특성을 비교분석 하였다.

③ phylogenic 분석 및 HA 유전자의 비교

청주 재래시장에서 분리된 조류인플루엔자 바이러스의 역학적 유래와 기존 국내 분리주와 연관성을 조사하기 위하여 DNAStar software인 MegAlign과 NJ plot software를 이용하여 phylogenic 분석을 하였다.

HA 유전자의 cleavage site를 비교 분석하기 위하여 MegAlign software를 이용하여 유전자서열을 아미노산 서열로 바꾸어 국내 분리주 및 중국 분리 인플루엔자 바이러스의 HA 유전자를 비교분석하였다.

결 과

청주의 재래시장에서 닭과 오리 분변에서 조류인플루엔자에 바이러스 감염 여부를 확인한 결과 총 273건 중 67건의 분변에서 바이러스가 검출되어 24.5%의 검출율을 나타냈으며, 4월에서 56건의 분변 중 5건이 검출되어 8.9%로 가장 낮은 감염율을 나타냈으며, 8월에서 20건의 분변 중 15건의 분변에서 바이러스가 검출되어 75.0%의 높은 감염율을 나타났다.(Table 1)

Table 1. 재래시장에서 가금(닭, 오리)의 조류인플루엔자 감염수수

월 별	계	'05.12	'06.1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
분변수	273	9	14	16	36	56	16	10	8	20	16	36	36
양성감염수	67	5	4	2	4	5	4	1	1	15	9	12	5
분리율(%)	24.5	55.6	28.6	12.5	11.1	8.9	25.0	10.0	12.5	75.0	56.3	33.3	13.9

재래시장에서 닭의 분변에서 분리된 바이러스 감염율은 총 164건중 41건이 양성수수로 25.0%의 평균 감염률을 나타내었고, 2006년 3월중 21건의 분변 중 1건이 감염 양성으로 4.8%의 가장 낮게 감염 되었으며, 8월중에는 12건 분변에서 10건이 감염양성으로 83.3%의 년중 가장 높은 감염율을 나타내었다.(Table 2)

Table 2. 계절별 재래시장에서 닭의 조류인플루엔자 바이러스 감염수수

월 별	계	'05.12	'06.1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
닭분변수	164	5	10	12	21	33	10	6	5	12	9	20	21
감염수수	41	3	3	1	1	3	2	1	1	10	6	7	3
감염율(%)	25.0	60.0	30.0	8.3	4.8	9.1	20.0	16.6	20.0	83.3	66.7	35.0	14.3

재래시장에서 오리의 분변에서 분리된 바이러스 감염율은 총 109건중 26건이 양성수수로 23.9%의 평균 감염률을 나타내었고, 2006년 6, 7월중 7건의 분변중 감염 양성건이 없었으며, 8월중에는 8건 분변에서 5건이 감염양성으로 62.5%의 년중 가장 높은 감염율을 나타내었다.(Table 3)

Table 3. 계절별 재래시장에서 오리의 조류인플루엔자 바이러스 감염수수

월 별	계	'05.12	'06.1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
오리분변수	109	4	4	4	15	23	6	4	3	8	7	16	15
감염수수	26	2	1	1	3	2	2	0	0	5	3	5	2
감염율(%)	23.9	50.0	25.0	25.0	20.0	8.7	33.3	0.0	0.0	62.5	42.9	31.3	13.3

재래시장의 닭과 오리에서 분리된 67개의 바이러스에 대한 subtype를 구분한 결과 32건의 H3N2와 35건의 H9N2의 조류인플루엔자 바이러스 subtype이 분리 되었으며, 닭에서는 H3N2 subtype이 33건 중 4건이고, H9N2 subtype이 29건으로 많았다. 반면 오리에서는 H3N2 subtype이 34건 중 28건으로 H9N2 subtype이 6건보다 많아서 오리에서는 H3N2 subtype이 주로 분리되었고, H9N2 subtype이 닭에서 더 많이 분리되는 것을 알 수 있었다. HA test에서는 양성반응을 보였지만 RT-PCR에서 조류인플루엔자로 확인되지 않은 4개의 바이러스가 있었다. (Table 4)

Table 4. 계절별 재래시장에서 닭, 오리에서 분리된 조류인플루엔자바이러스의 유형

축종별	subtype	H3N2	H9N2	비 고(미확인)
합 계	67건	32	35	4※
닭분변	33	4	29	4
오리분변	34	28	6	0

※ *조류인플루엔자가 아닌 다른 바이러스로 추정*

고 찰

2003년 고병원성 조류인플루엔자가 최초로 발생되면서 이로 인하여 축산관련 농가와 가축방역기관에 비상이 걸렸으며, 또한 인체감염에 대한 우려로 국민 모두가 큰 관심을 갖게 되었다.

우리나라는 1996년 3월 경기도 화성 등 3개 지역 5개 농장에서 저병원성 바이러스 (A/Chicken/Anyang/MS96 ; H9N2)로 확인된[10] 이후 현재는 전국의 산란계 농장으로 확산되어 산란율저하와 다양한 폐사를 동반함으로서 양계산업에 막대한 손실을 초래 하고 있다. 또한 2001년 중국산 수입육으로부터 HPAI (A/Duck/Anyang/AVL-1/01;H5N1)바이러스가 분리된바 있으며[11], 2003년 12월 HPAI(H5N1)가 충북 음성에서 최초 신고된 이 후 전국적으로 발생하여 큰 피해를 준 바 있다. 현재 국내에 유행하고 있는 LPAI 바이러스는 1996년과 동일한 혈청형의 AIV (H9N2)로 확인되고 있다[12]. 국내 바이러스와 혈청형이 같은 바이러스(H9N2)가 5~6년 전부터 이란 등 중동 국가에서 폭발적으로 발생되어 종계에서 육계에 이르기까지 막대한 경제적 손실을 주고 있으며 육계의 경우 약 65%의 폐사율을 기록하기도 하였다.[13, 14]

우리나라의 철새는 여름과 겨울에 먹이, 번식, 온도 및 태풍의 영향으로 여름철새(백로류 등 64종), 겨울철새(오리류, 기러기류 등116종), 통과새(도요류, 물떼새류 등 103종), 텃새 (까치, 박새류 등 57종) 등 다양한 종이 분포되어 조류인플루엔자의 전파가능성을 내재하고 있는 실정이며, 주변 국가인 중국은 야생조류와 거위, 태국 동물원 호랑이와 표범의 감염 등 고병원성의 조류인플루엔자가 발생되고 있다[15].

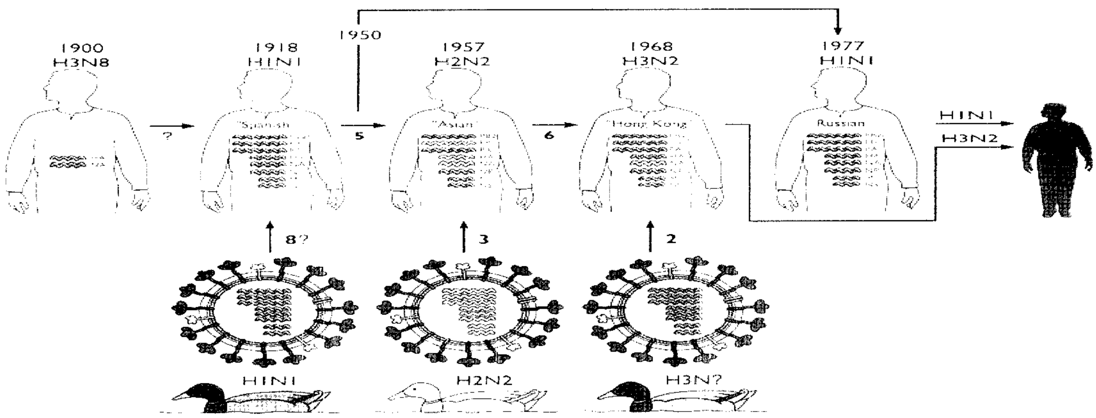
조류인플루엔자바이러스는 다양한 아형이 있는데, 바이러스 표면에 존재하는 HA의 특성에 따라 H1부터 H15까지 15종이 있으며, NA라는 특수효소의 특성에 따라 N1부터 N9까지 9종의 아형으로 구분 된다[1].

Type A influenza virus는 Orthomyxovirus로서 segmented negative sense RNA 바이러스로, 8개의 segmented genes들에 의해 10개의 viral 단백질을 cording 한다. 10개의 단백질 중 표면 단백질인 Hemagglutinin(세포의 수용체에 binding 하는 단백질로 virus 감염에 중요한 요소로 작용)과 Neuraminidase(세포로

부터 바이러스가 떨어져 나오는데 중요한 역할을 하는 효소)에 의해 각 subtypes을 나눌 수 있다 (예 H1N1, H3N2......). 조류, 특히 야생조류는 자연계에 존재하는 15개의 Hem-agglutinin(HA)과 9개의 Neuraminidase(NA) subtypes의 인플루엔자 바이러스의 자연숙주로 알려져 있다[1, 10].

조류인플루엔자 바이러스에 의해 지난 20세기 동안 4번의 큰 pandemic의 발생에 의해 많은 인명피해와 큰 경제적 손실이 있었다.<Fig 1>

이 모든 바이러스는 유전적 분석을 통하여 사람의 인플루엔자는 직·간접적으로 조류인플루엔자 바이러스로부터 유래되었음이 밝혀졌다[6, 10]. 특히 최근 동남아시아에서 문제가 되고 있는 조류 인플루엔자 바이러스 H5N1, H9N2, 캐나다의 H7N3, 그리고 네덜란드에서 문제가 되었던 H7N7 subtypes들 모두 야생 또는 가금의 조류바이러스가 직접 또는 변이를 통해 사람에게 전파되어 많은 인명 피해를 낸 경우라 할 수 있다.



<Fig 1>. 1918년부터 1997년까지의 조류인플루엔자 바이러스의 gene pool의 이동에 의한 인체인플루엔자 바이러스의 pandemic 발생 도표

조류인플루엔자의 최근 발생현황은 인플루엔자 바이러스는 점에서는 지난 세월 동안 인류에게 문제가 되던 다른 독감과 마찬가지이지만 그 유전적 형태는 다른 종류이어서, 그동안은(1997년 홍콩의 첫보고 이전까지는) 가금류 사육농가 외에는 큰 문제가 되지는 않았다.

이전의 연구에 의하면, 조류인플루엔자는 주로 야생 오리 등의 수생 조류에 지속적으로 감염되어 왔으나 이러한 수생 조류들에서는 가벼운 감염만 일으키는 것으로 생각하여 왔으나, 사육하는 오리, 닭 등의 가금류에서 대규모 피해를 주는 조류인플루엔자가 발생하기 시작하였는데, 그것이 1997년에 홍콩에서 처음으로 인간에게 감염을 일으켜 결국에는 사람을 사망하게 하는 결과를 초래하게 되었다.

1997년 5월, 홍콩에서 3살의 어린이가 폐렴을 동반한 급성의 중증 호흡기 질환으로 사망한 사례가 발생하였으며, 당시 여러가지 조사를 통하여 이 어린이는 독감의 원인이 되는 인플루엔자바이러스 중에서 그동안은 조류에서만 감염이 보고되었던 H5N1의 subtype의 바이러스에 감염되었던 것으로 밝혀졌으며, 그런 후 홍콩에서 총18명의 감염자가 발생하여 6명이 사망하였고, 결국 그 원인이 홍콩 내의 조류시장으로 밝혀졌으며, 1999년에 홍콩에서 두명의 사람이 역시 조류인플루엔자의 일종 인플루엔자 바이러스 H9N2에 감염되었으나 다행히 두명 모두 회복하였다.

2003년에 중국을 여행한 두명의 홍콩인이 인플루엔자 바이러스 H5N1에 감염되어 한명은 사망하고 한명은 회복하였으며, 같은해 네덜

란드에서 인플루엔자바이러스 H7N7이 가금류에서 집단 발생하여 80명 이상의 사람이 감염되어 1명이 사망하였으며, 동년 홍콩에서 조류인플루엔자 H9N2에 어린이 1인이 감염되었으나 회복되었다.

이후 아시아 지역을 강타한 조류인플루엔자는 베트남, 태국, 캄보디아, 중국 등 8개국으로 확산 되었고, 이로 인하여 24명의 인명 피해와 가금류 1억 2,000만 마리가 살처분이 이루어졌고, 우리나라는 2003년 12월 첫 발생이 보고되었다.

한동안 잠잠하던 조류인플루엔자는 2004년 7월에 다시 발생하였으며, 베트남과 태국, 캄보디아, 인도네시아, 중국, 말레이시아에서 제2차 조류인플루엔자가 확산되었다, 이로 인해 8명이 숨졌으며 가금류 100만 마리가 살처분되었다.

위의 여러 예에서 알 수 있듯이 유럽과 동남아시아에서 최근 심각한 문제가 되고 있는 조류인플루엔자 바이러스는 야생조류에서 유래 되어 인간이 사육하는 가금류(닭, 오리 메추리 등)에서 감염을 발생 후, 기회감염으로 많은 인명 피해를 내고 있음을 알 수 있다. 특히 1997년 5월에 홍콩의 조류인플루엔자의 원인이 조류시장으로 밝혀지면서 야생조류 뿐만 아니라 재래시장 인근에 존재하는 가금류의 문제를 인식하게 되었다. Live-bird market은 대부분은 살아 있는 여러 가금류가 조류시장에 한데 모여져 있는 유통되고 있기 때문에, 각기 다른 가금종간의 특이 조류 인플루엔자 바이러스들이 재조합 바이러스를 만들기 적합한 환경을 가지고 있다.

또한 Live-bird market은 여러 가금류들 뿐 만 아니라 구매자인 사람도 항상 여러 살아 있는 조류들에 노출되어져 있기 때문에 사람에게 감염이 가능한 재조합바이러스가 여러 가금들 사이에서 생겨날 경우 인체 감염으로 이어질 수 있는 장소이기도 하다.

지금까지의 국내연구 결과에 의하면 국내 Live-bird market에서는 주로 H9N2 바이러스가 분리 보고되고 있었지만, 알려지지 않았던 H3N2와 H6N1의 조류인플루엔자 바이러스가 Live-bird market에서 분리되고 있는 것으로 판명되었다[4].

국내 Live-bird market의 가금에서 분리한 조류인플루엔자 바이러스의 유전자 분석 및 유전학적 비교분석에 의한 정확한 기초 정보를 수집하고, 중국과 홍콩의 Live-bird market에서 분리된 H9N2 바이러스의(예, A/Quail/Hong Kong/G1/97) 표면의 glycoprotein을 제외한 internal gene을 비교 분석하여 보면, 1997년 홍콩에서 18명의 인체 감염과 6명을 인명피해를 내었던 H5N1바이러스와 동일한 유전적 특징을 가지고 있는 것으로 나타나 있다[5].

이러한 예에서 조류에서는 비록 약독성의 바이러스로 존재 하지만, 병원성이 다른 바이러스와의 재조합 또는 변이를 통하여 사람과 가축에 질병을 일으키는 병원성 바이러스로 변화 할 수 있음을 나타내는 사례로 볼 수 있다.

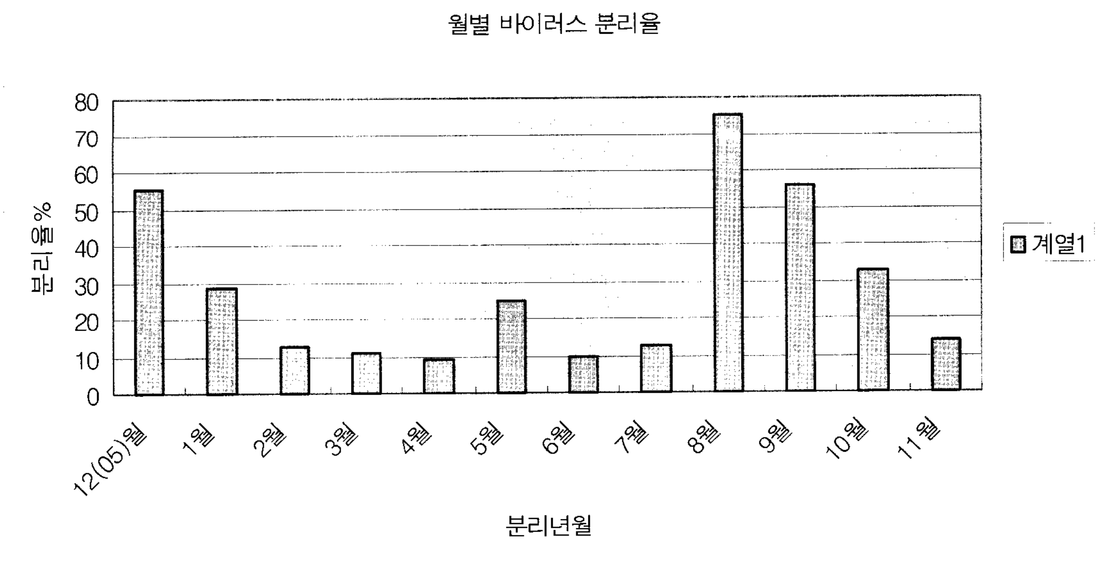
1996년 국내에 처음으로 닭에서 심한 임상증상과 함께 분리된 조류 인플루엔자 바이러스가 보고되었다. (A/Chicken/Korea/38394-9600/96).[9] 유전적 분석결과 인플루엔자바이러스는 당시 Hong Kong의 오리에서 분리된 바이러스 <A/Duck/Hong Kong/ Y437/97-like (H9N2)>와 상당히 상동성을 나타내어 이 바이러스가 역학적으로 중국에서부터 유래된 바이러스로 추정이 되었다[7]. 2003년 겨울, 국내에서도 고병원성의 조류 인플루엔자 바이러스 H5N1가 가금류에서 분리되어 심각한 경제적 손실과 사람에게 전파 가능성으로 인하여 사회적 불안을 주었다.

최근의 연구 결과에 의하면 우리나라에서 분리된 H5N1 바이러스는 최근의 동남아시아에서 문제가 되고 있는 조류인플루엔자 바이러스 H5N1(genotype Z)과는 달리 사람에 감염가능성이 없는 바이러스로 판명되었다. 하지만, 우리나라에 보고 된 조류인플루엔자 바이러스가 지리적으로 가까운 중국에서 유래하고 있다는 사실은, 중국에서 만연하고 있는 사람에 감염가능성이 높은 H9N2 바이러스뿐만 아니라 사람에 치명적인 H5N1

조류인플루엔자 바이러스의 유입 가능성에 대하여 간과하여서는 안 될 것이다.

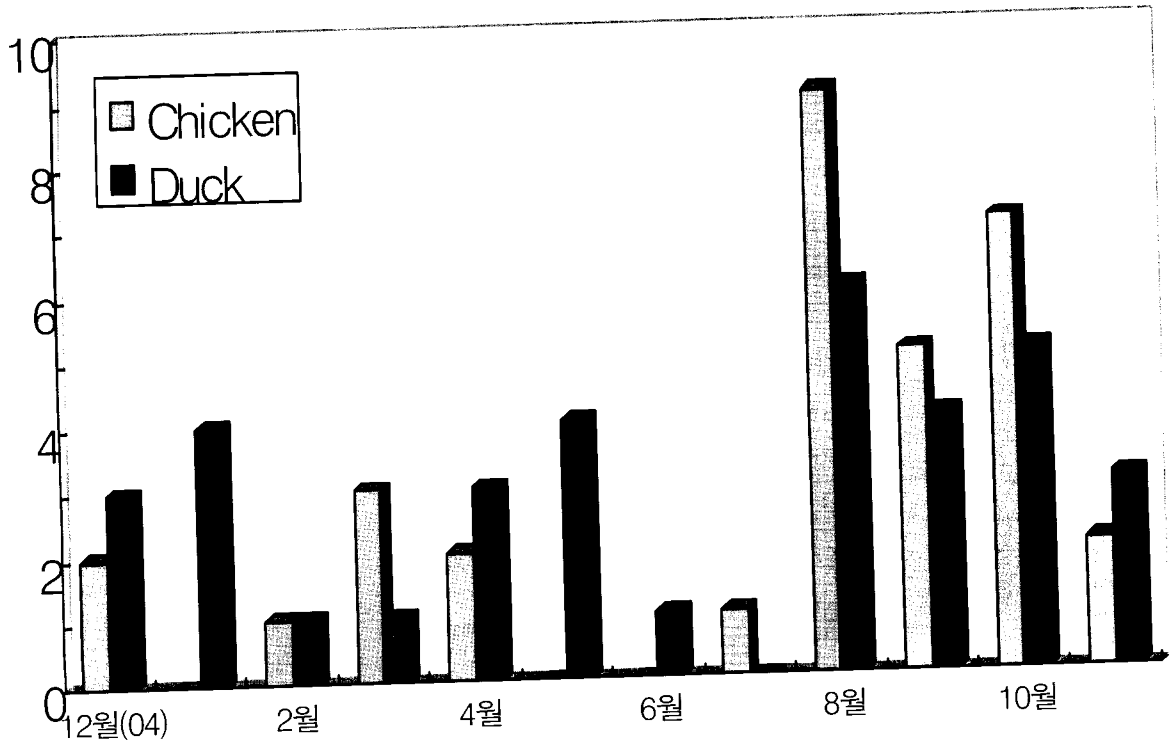
국내 Live-bird market의 여러 가금으로부터 분리되는 조류인플루엔자 바이러스에는 어떠한 subtype들이 있으며, 이들 바이러스가 기존의 국내 분리바이러스 및 중국과 동남아에서 분리되는 바이러스들과의 유전학적 비교분석을 통해 국내 조류 인플루엔자에 대한 정확한 기초 정보를 수집함으로서 앞으로 조류인플루엔자바이러스 발생에 따른 대책을 수립하는데 기초정보로 매우 중요하다고 할 수 있다.

더 나아가 국내 분리 조류인플루엔자 바이러스의 인체 감염가능성에 대하여 여러 동물실험 분석은 국내 실정에 맞는 방역대책을 수립하는 기초 자료가 될 뿐만 아니라, 국내 자체 vaccine 개발에 중요한 자료로 활용될 수 있다.



<Graph 1> 월별 바이러스 분리율

위 Graph 1은 청주지역의 재래시장에 대한 가금(닭, 오리)류의 분변에서 조류인플루엔자 바이러스를 2005. 12월부터 2006.11월까지 총 273건의 분변 중 67건에서 바이러스가 분리되어 24.5%의 감염율을 나타내 높은 감염을 보였으며, 닭에 대하여 바이러스 감염을 조사한 결과 164건중 41건이 분리되어 24.0%의 검출률을 나타냈으며 오리의 분변에서는 109건중 26건이 바이러스가 분리되어 23.9%의 감염율을 나타내었다. 바이러스 분리가 가을철이 가장 높게 분리 되었으며, 봄철이 낮게 분리되었다. 이는 일반적으로 겨울철인 2003년, 2004년의 발생상황을 살펴 볼때 인플루엔자 바이러스가 가장 많이 배출될 것으로 생각되었으나, 본 연구 조사로 볼때 가을철에 많은 바이러스가 분리된 결과로 늦가을이나 초겨울에 바이러스 배출량이 증가되어 발병 가능성이 큰 것을 예측 할 수 있는 점을 파악하게 되었다.



<Graph 2>. 월별, 가금별 바이러스 분리 현황

위 Graph 2는 재래시장에서 월별, 닭과 오리에서 2005. 12월~2006. 11월까지 분변에서 닭과 오리에서 바이러스를 분리한 현황을 나타내 주고 있으며, 닭에서는 여름인 8월에서 가장 높은 감염을 나타내고 있으며, 겨울철인 1월과 2월에 오히려 낮게 바이러스가 분리되었으며, 오리에서는 비교적 고르게 년중 바이러스가 분리된 것을 관찰 할 수 있었으며, [illegible]는 [illegible]의 경우는 항상 년중 지속적으로 바이러스 감염 및 배출이 지속되어 Live-bird market인 재래시장에서 닭을 비롯한 다른 가금류에게 종간 변이 바이러스를 전파시키는 잠복감염으로 병원성의 인플루엔자 바이러스를 감염 및 발병 시킬 수 있는 요인으로 작용 가능성이 큼을 알 수 있다. 이러한 문제점은 방역상 중요한 관심사항이며, 가금류는 물론 사람에게도 가축을 다루는 사람들에게 질병을 발생시키는 위험요인으로 작용 할 수 있어 대책 마련이 필요한 사항이다.

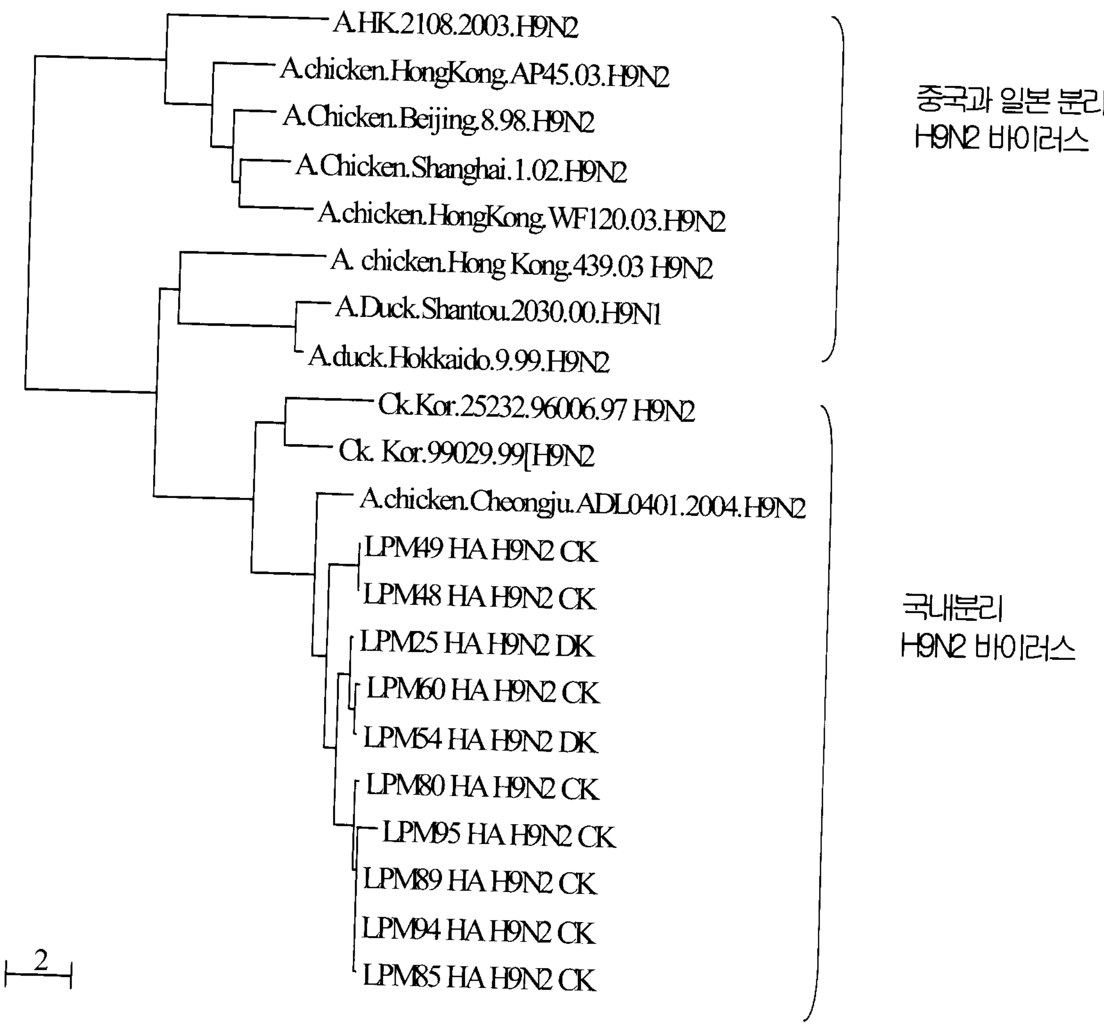
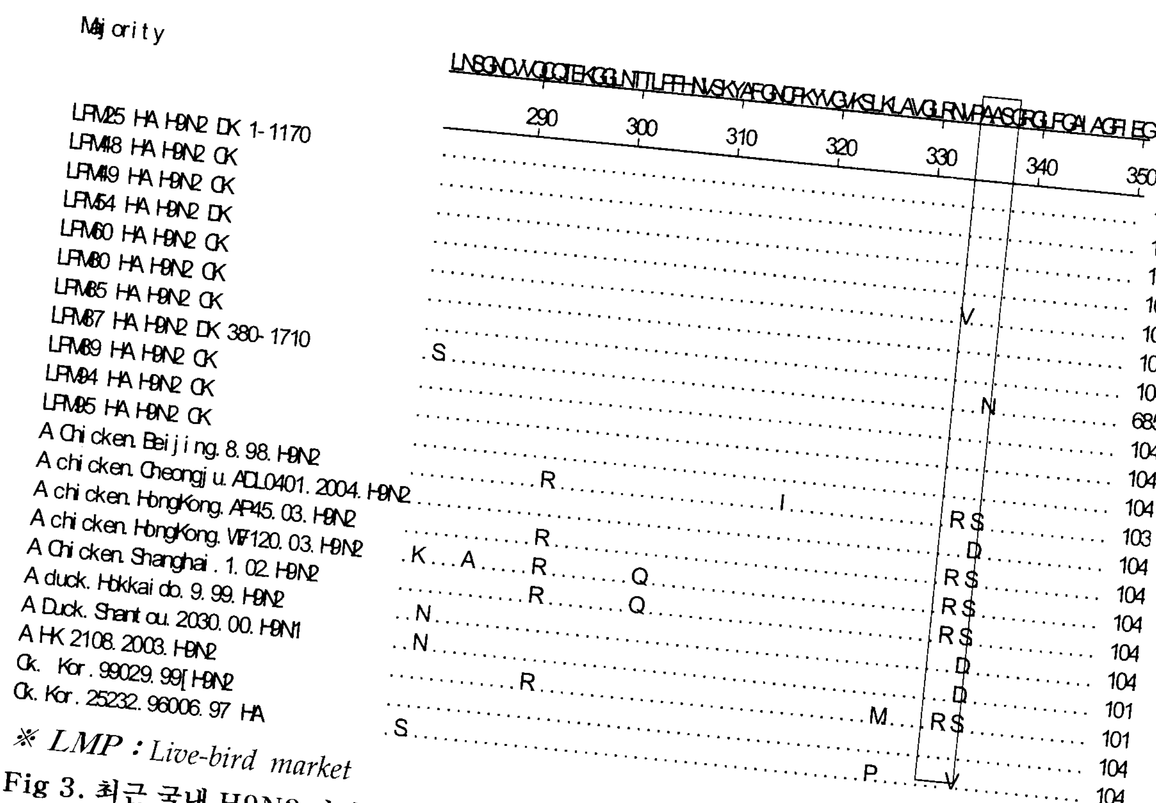


Fig 2. H9인플루엔자 바이러스의 HA 유전자 분석을 통한 국내 분리 바이러스의 역학적 유래 분석

위 그림2.는 재래시장에서 2005. 12월~2006. 11월까지 닭과 오리에서 분리된 H9N2 subtype의 바이러스를 유전자 분석결과 국내 분리 H9N2 바이러스는 1997년부터 국내에서 분리되던 H9N2 바이러스와 유전자적으로 매우 유사함을 알 수 있었다.

중국의 사람과 가축이 감염되어 심각한 경제적 손실을 발하고 있는 바이러스와 는 우 `적으로 분리되어 있는 것으로 보아 국'' 러스는 중국이나 일본에서 분 이러스에서 유래한 바이러스는 확인되었다.



※ *LMP : Live-bird market*

Fig 3. 최근 국내 H9N2 바이러스의 HA1 protein 중 connecting peptide 비교분석.

우리나라의 가금에 흔히 감염되어 있는 조류인플루엔자 바이러스는 H9N2 type이다. 이들 H9N2 바이러스의 병원성과 가장 관계가 깊은 HA1 protein 중 connecting peptide를 Hong Kong 및 한국의 분리 바이러스와 비교 분석했을 때, 최근 분리주의 connecting peptide가 점차 변해가고 있음을 알 수 있었다.(fig 3)

국내 분리 H9N2 바이러스는 Hong Kong 지역에서 인체감염을 나타내었던 바이러스들과는 유전적으로 다른 것으로 판명되었다. 예전 국내 분리주인 A/Chicken/Korea/38394-9600/96과는 전체적으로 높은 유전적 homology를 보였지만 최근 분리 바이러스는 병원성과 가장 관계가 깊은 connecting peptide가 변해가고 있음을 알 수 있었다. 최근 국내 분리바이러스들의 상호 비교할 때 적어도 2가지 이상의 유전적으로 다른 H9N2 바이러스가 국내에 존재하고 있음을 알 수 있다.

2005년 12월부터 2006년 11월까지의 1년간 총 67개의 조류인플루엔자 바이러스를 live-bird market으로 분리하였다. Fig 1에 나타난 결과처럼 live-bird market에서의 조류인플루엔자 바이러스 분리율은 초가을부터 이른 봄 사이에 높은 분리율(약 41%)을 나타내는 반면 여름의 경우 낮은 분리율을 나타내는 것을 알 수 있었다. Live-bird market에서의 조류인플루엔자 바이러스의 분리 율은 계절적으로 차이가 있었지만 1년 연중 지속적으로 분리되는 것으로 보아 live-bird market에서의 조류인플루엔자 바이러스는 endemic한 것으로 판명되었다. Live-bird market에서의 조류인플루엔자 바이러스의 중요한 숙주가 닭과 오리 등의 조류임이 판명되었다.

결 론

조류인플루엔자 바이러스에 의해 4번의 큰 pandemic의 발생에 의해 많은 인명 피해와 가금류의 폐사로 인하여 경제적 큰 손실이 발생 되었으며, 동남아시아에서 문제가 되었던 조류 인플루엔자 바이러스 H5N1, H9N2, 캐나다의 H7N3, 그리고 네덜란드의 H7N7 subtypes들 모두 야생 또는 가금의 조류바이러스가 직접 또는 변이를 통해 사람에게 전파되어 많은 인명 피해를 발생시켰다.

특히 1997년 5월에 Hong Kong 조류인플루엔자의 원인이 Hong Kong내의 조류시장으로 밝혀져 사회적 반향을 불러왔다.

재래시장(Live-bird market)에서는 살아있는 상태로 여러 종류의 가금류가 야외시장의 지정된 장소에서 지속적으로 판매되고 있기 때문에, 이종 가금류간의 특이 조류인플루엔자 바이러스들이 재조합 바이러스를 만들기에 적합한 환경을 가지는 조건을 갖게 되므로 가금류와 인체감염으로 이어질 수 있는 장소이기도 하다.

그러므로 본 연구에서는 청주재래시장에서 유통되는 가금의 조류 인플루엔자 바이러스 분리 및 유전적 특성을 분석하여 최근 국내 문제가 되고 있는 조류인플루엔자 바이러스의 유전학적 비교분석에 의한 국내 조류인플루엔자에 대한 정확한 기초 정보를 수집하고자 실시한 연구조사 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 청주의 재래시장에서 닭과 오리 분변에서 조류인플루엔자에 바이러스 감염 여부를 확인한 결과 총 273건중 67건의 분변에서 바이러스가 검출되어 24.5%의 검출율을 나타냈다.

2. 재래시장에서 닭의 분변에서 분리된 바이러스 감염율은 총 164건중 41건이 양성수수로 24.0%의 평균 감염률을 나타내었고, 2006년 3월중 21건의 분변중 1건이 감염양성으로 4.8%의 가장 낮게 감염 되었으며, 8월중에는 12건 분변에서 10건이 감염양성으로 83.3%의 년중 가장 높은 감염율을 나타내었다.

3. 재래시장에서 오리의 분변에서 분리된 바이러스 감염율은 총 109건 중 26건이 양성수수로 23.9%의 평균 감염률을 나타내었고, 2006년 6, 7월중 7건의 분변중 감염 양성건이 없었으며, 8월중에는 8건 분변에서 5건이 감염양성으로 62.5%의 년중 가장 높은 감염율을 나타내었다.

4. 재래시장의 닭과 오리에서 분리된 67개의 바이러스에 대한 subtype를 구분한 결과 32건의 H3N2와 35건의 H9N2의 조류인플루엔자 바이러스 subtype이 분리 되었으며, 닭에서는 H3N2 subtype이 33건중 4건이고 H9N2 subtype이 29건으로 많았다. 반면 오리에서는 H3N2 subtype이 34건중 28건으로 H9N2 subtype이 6건보다 많아서 오리에서는 H3N2 subtype이 주로 분리되었다.

이상과 같은 결과를 얻었으며, 인플루엔자 바이러스가 계절별 가을이 봄보다 많게 분리되어 늦가을이 인플루엔자가 발생하기 좋은 조건임을 본 조사를 하면서 알게 되었고, 바이러스도 H9N2 뿐만 아니라 H3N2의 subtype도 분리되었으며, 인근 중국과 일본에서 발견된 H9N2의 유전적 형태가 다른 것을 증명하게 되었다.

참고문헌

1. Easterday, B.C., V.S. Hinshaw. and D. Halvorson. (1997) Influenza. In : Diseas of Poultry, 10th ed. B.W. Calnek., H Barnes., C.W. Beard., L.R. Mcdoug and Y.M. Saif, eds. Iowa State Univer Press, Ames, IA., pp.583-605.

2. Woolcock, M.D., M.D. McFarland., S. Lai., R.P. Chin. (2001) Enhanced recovery of avian influenza virus isolates by a combination of chicken embryo inoculation methods. Avian Dis., 45: 1030-1035.
3. Liu, M., Y.Guan., M. Peiris., S. He., R.J. Webby., D. Perez. and R.G. Webster. (2003) The quest of influenza a viruses for new hosts. Avian Dis., 47(3): 849-856.
4. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. 1989. J. Virol. 63, 4603-4608.
5. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol.Rev.1992. 56, 152-179.
6. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. 2000. Virology 267, 279-288.
7. Avian influenza viruses in Korean live poultry markets and their pathogenic potential. 2005. Virology. 332, *529-537*
8. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. 2004. Virol. 78, 8609-8614.
9. Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96. 2000. Avian Dis. 44, 527-535.1. Lee, C.W., C.S. S., Y.J. L. and I.P. M. (2000) Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96. Avian Dis., 44: 527-535.
10. Lee, C.W., C.S. S., Y.J. L. and I.P. M. (2000) Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96. Avian Dis., 44: 527-535.
11. Tumpey, T.M., D.L. Suarez., L.E.L. Perkins., D.A. Senne., J. Lee., Y.J. Lee., I.P. Mo., H.W. Sung. and D.E. Swayne. (2003) Evaluation of a highpahogenicity H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. Avian Dis., 47: 951-955.
12. Sung, H.W. (2003) 공중보건 위생측면에서의 조류 인플루엔자 바이러스 및 최근 국내 유행주의 특성. 2003년 가금질병연구회 학술세미나., pp 5-16.
13. Nili, H. and K. Asasi. (2003) Avian influenza(H9N2) outbreak in Iran. Avian Dis., 47: 828-831.
14. Bano, S., K. Naeem. and S.A. Malik. (2003) Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. Avian Dis., 47: 817-822.
15. Sung, H.W. (2006) 조류 인플루엔자 바이러스의 특성 및 동물별 감염역학. 2006년 가금질병연구회 학술세미나. p 9-18.
16. An occurrence of non-highly pathogenic avian influenza in Korea. In Proceedings of the Forth International Symposium on Avian Influenza (D.Swayne and R.Slemons, Eds) (United States Animal Health Association), 1997.379-383.

부루세라병 혈청검사 양성 수소와 12개월령이하 소에서의 균 분리 및 동정

류재윤[1], 변정운, 이희영, 이용창, 이종진, 남향미[*], 송영각

충청북도축산위생연구소 제천지소,

Isolation of *Brucella* spp. from sero-positive native bulls and below twelve months native cattles.

Jae-Yun Ryu[1], Jung-Hyun Bun, Hee-Young Lee, Yong-Chang Lee, Jong-Jin Lee, Hyang-Mi Nam[*], Young-Gak Song

Jae Chun-branch, ChungBuk Livestock and Veterinary Reserch Institute.
[*] National Veterinary Reserch Quarantine Service

Abstract

This study was conducted to investigate the characteristics of brucellosis in Korean native cattles including bulls and below twelve months cattles. *Brucella abortus* was isolated and identified from testis, Intestinal Lymph node and supramammary lymph nodes of cattles confirmed as brucellosis-positivie by serological tests and epidemiological evidences (24 cases) from September 2006 to March 2007.

All of the sera were screened and confirmed by RBT and STAT, respectively. Of 74 bulls serum samples examined, 21 (28.4%) samples were identified positive for brucellosis by the RBT-STAT.

Total 63 samples on the results of isolation of *Brucella* organism from sera-positive bulls cases, 2 cases (16.7%) were confirmed from testis, 3 cases (25.0%) from Intestinal Lymph node. But blood, fecal, uria, water and soil are not isolated *Brucella*.

All *Brucella* specific 16s r-RNA with 905-bp band were detected by PCR assay.

Total 63 samples on the results of isolation of *Brucella* organism from sera-positive below twelve months cattles, 1 cases (25.0%) were confirmed from testis, 4 cases (40.0%) from supramammary lymph nodes and 1 cases (25.0%) from Intestinal Lymph node.

Conclusionally to control and eradicate bovine brucellosis in korea, include native bulls and below twelve months cattles.

We might have to highly emphasize the proper preventive screening of *Brucella* contaminated bulls group and young cattle (below twelve months) group especially for human public health.

Key words : *Brucella abortus*, PCR

서 론

부루세라병은 *Brucella*속균에 의한 소, 돼지, 산양, 면양, 개 및 기타 동물에 감염하여 생식기관 및 태막의 염증과 유산, 불임증 등이 주 특징이고, 제2종 법정전염병으로 이병은 동물 뿐 만 아니라 사람에게 감염하여 파상열을 일으키는 인수공통전염병으로서 공중 위생상 매우 중요시 되고 있으며, 원인균인 Brucella 속균은 그람음성의 작은 간균이며, *B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. ovis, B. canis B. neotomae,*의 6균종이 있으며, 편성 세포내 기생균으로 macrophage내에서도 증식하며, 분리에는 5~10% CO_2 가 요구되며, 균의 저항성은 비교적 약하며, 우유의 저온 살균으로 쉽게 살균되고, 균의 생존성은 태반 중에서 수개월, 흙에서 37일간, 물에서 57일간, 직사광선에서 5시간 생존하는 것으로 알려졌으며, 부루셀라균종에 따라 감수성의 차이가 있고, *B. melitensis*는 면양, 산양 및 사람에, *B. abortus*는 소, *B. suis*는 돼지, *B. ovis*는 면양, *B. neotomae*는 다람쥐, *B. canis*는 개에 감수성이 높지만, 다른 가축 및 동물에도 서로 교차감염 할 수 있다. 유산태아, 태막, 후산 등에 균이 농후하게 들어 있으며, 유산 후 질루에 일시 배설되고 우유를 통해 배설되어 감염원이 되며 보균하고 있는 소, 돼지 등이 전염원이 된다. 오염된 사료, 물 등에 의한 경구감염이 가장 중요한 자연감염이고, 이밖에 창상 감염, 결막 감염, 유방을 통한 감염, 교미나 인공수정을 통한 생식기 감염, 태반 감염 등이 가능하다.[1 10)]

사람에서의 부루세라 병원성은 *Br. melitensis* > *Br. suis* > *Br. abortus* > *Br. canis* 순이며, 잠복기는 2~4주이며 때로는 수개월이 가는 경우도 있다. 또한 사람에 대한 전염은 분만우의 후산물, 유산 송아지와의 접촉 및 섭취, 살균하지 않은 우유 및 유제품의 섭취에 주로 기인하며, 식육에 의한 감염가능성은 희박하다. 또한 직업병으로 수의사, 축주, 식육 취급자, 인공수정사, 실험실 종사자들이 주로 감염되며, 임상증상으로 파상열, 피로, 오한, 두통, 근육통, 식욕감소, 관절염, 임파절염, 척수염, 수막뇌염, 골수염, 심내막염, 신장염 등을 일으킬 수 있으며 사람과 사람과의 전파는 안되는 것으로 알려져 있고, 감염된 사람에 대한 치료는 항생제로 치료가 가능하며 재발 방지위해 임상증상이 사라져도 6주 이상 반드시 투여하여야 하며, 치료하지 않아 만성경과시는 입원치료 필요한 질병이다.[6-10)]

부루세라균은 숙주세포 내에 기생하기 때문에 항생제 치료에 의해 빠른 효과를 볼 수 없으며, 우리나라는 적발도태법의 정책을 실시하고 있으며, 이 질병의 근절을 위해 여러가지 방법의 혈청검사로 항체의 유무를 검사하여 양성우를 색출하는 있으나, 체내에 감염세균을 보유하고 있음에도 불구하고 항체 형성이 매우 미약하여 혈청학적인 방법으로 검출이 안 될 수도 있다. 또한 심한 스트레스나, 분만 혹은 임신 등의 원인과 혈구의 파괴 등으로 혈청학적 양성을 보일 수 있다. 또한 혈청학적 음성이라고 해서 항체형성기 등을 고려해서 반드시 음성이라고 할 수 없는 맹점을 가지고 있기 때문에 부루세라 세균의 분리 동정이 중요시 되고 있는 상황이다.[8-14)]

정부에서는 소 부루세라병 방역강화에서 2013년 근절 목표로 감염농장 색출을 위한 검사 확대와 농가의 예방 노력 확립 등 다각적인 방역대책 추진함에서 모든 거래 암소, 10두 이상 농장은 연2회 실시하고, 수집상·중개상은 연4회, 사육 소 및 다발지역 일제 검사를 실시하고 있으며, 살처분 보상금을 가축시세의 100%→80%→60%로 조정하였으며, 2007년에는 감염농장 색출을 조속히 마무리하고 근절기반 조성을 위해 "소부루세라병 방역 강화대책" 마련하여 1세이상 모든 한우, 육우 및 유우에 대한 정기검사, 평균감염율 30%초과하는 다발지역은 연2회 검사 실시를 계획하고 있고, 발생농장의 인근 500m이내 사육 소에 대한 의무검사를 계획하고 있다.[5,10)]

본 연구의 목적은 수소의 경우에는 단지 고환이나 부고환의 국소감염만을 일으키므로 눈에 띄는 증상이 없으므로, 임상증상으로 판단하기 지난하므로 반드시 혈청검사를 수행하여야만 감염여부를 판정할 수 있기 때문에 수소에 대한 혈청검사실시가 꼭 필요한 사항임을 인식하고, 우리나라에서 금년까지 검사하지 않았던 수소에 대한 부루세라병 검사를 실시하고, 또한 12개월령 이하에서의 감염우에 대한 조사를 수행함으로써 수소 및 12개월령 이하 감염우에 대한 부루세라병 감염실태, 부루세라병 감염경로에 따른 역학조사 및 부루세라병 확산 방지를 위한 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시 농장 및 재료

충청북도 축산위생연구소 제천지소 관내의 수소를 비육하는 전형적인 축산농가로서 부루세라병이 세차례(2006년 9월~2007년 3월) 연속적으로 발생한 농장을 공시농장으로 취하여 이 농장의 부루세라병 혈청검사 양성우를 중심으로 시료를 채취하였다.

최초 부루세라병 발생시에는 한우 51두를 사육하고 있었으며, 최초 부루세라 발생은 15두가 발생하였고, 두 번째 부루세라 발생은 11두, 세 번째 부루세라병은 2두가 발생하였다. 공시 재료로는 두 번째, 세 번째 발생한 개체 12두에서 채취한 고환, 뇨, 분변, 장간막임파절, 혈액, 농장주변 토양, 음수등 63건을 채취하여 시료로 공시 하였으며, 12개월령이하 감염우에 대한 시료의 공시는 수소 4두와 암소 10두 총 14두에서 고환, 장간막임파절, 상유방임파절, 혈액등 32건에 대하여 공시하였다.

혈청학적 검사

Rose Bengal test(RBT)와 Standard Tube Aggultination test(STAT)를 통하여 Brucella spp에 대한 항체 검사를 하였다. 1차 시험은 실온에서 1시간정도 방치한 30$\mu\ell$의 혈청과 RBT 진단액(Brucella abortus 1119-3균을 Rose Bengal dye 로 염색)을 30$\mu\ell$혼합하여 4분 동안 잘 흔들어서 반응시킨 후 즉시 응집정도에 관계없이 응집이 일어나면 양성, 응집이 일어나지 않을 경우 음성으로 판정하였으며, RBT에서 양성인 혈청은 다시 STAT 진단액(Brucella abortus 1119-3균에 페놀식염수를 가한 부유액) 2㎖에 25배, 50배, 100배, 200배로 희석하여 37℃에서 48시간 배양하여 100배 이상 응집된 것을 양성으로 하였다. 또한 표준양성혈청 및 음성혈청을 매 검사 시 대조군으로 사용하였다.[15-20] 또한 부루세라 항체 진단킷트(Dip-stick, 에니젠)를 이용하여 RBT와 STAT의 결과와 비교하여 보았다.

미생물학적 검사

항 응고체 EDTA로 처리된 혈액 1㎖를 9㎖의 Trypticase^{TM} Soy broth, Brucella broth에 접종하여 5% CO_2배양기에서 배양하였다. Bacitracin 25,000 unit/10㎖을 1ℓ의 증류수에 용해하여 기초배지에 첨가하였다. 배양 4일 후에 100$\mu\ell$의 배양액을 표준 Brucella agar에 분주하고 3주간 배양하였다. 또한 고환 및 장간막 임파절은 항생제가(Bacitracin 25,000 unit/10㎖)포함된 Trypticase^{Tm} soy broth에서 3-4일간 배양하였다. 이후 항생제가 포함된 Brucella agar에서 10일간 5% CO_2 배양기에서 배양하였다[13]. 채취된 음수, 뇨 및 분변시료는 10배 희석하여 세균 분리를 시도하였다. 각 희석액의 100$\mu\ell$를 항생제가 포함된 Brucella agar에 15일 동안 배양하였으며 배양후 4일째 직경 1~2mm의 원형, 투명한 담황색, 위에서 내려다보면 볼록한 형태의 유백색이며, 염색소견은 그람음성, 구간균, 비운동성을 가지며

아포 및 편모나 섬모가 없으며, 미호기성으로 느린 증식성의 세균학적인 특징을 가진 것으로 의심되는 집락을 생화학적 검사 및 PCR을 이용하여 분리 동정하였다.[18-27]

PCR

혈액 및 분리된 세균집락에서 DNA 추출은 시판되는 DNA extract kit(QIAGEN)를 사용하였다. 추출된 DNA는 PCR법으로 검사할 때까지 20℃에 보관하였고[14], Master Mix (QIAGEN)를 사용하여 일반적인 방법에 의해서 PCR을 실시하였다. 16S rRNA(905bp)의 프라이머를 사용하였고, F4 5'-TCG AGC GCC CGC AAG GGG - 3', R2 5'-AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA-3'을 사용하였다., PCR 환경은 predenaturation은 95℃ 5분, denaturation at 95℃ 30초, annealing 54℃ 90초, 30cycle, extention은 72℃ 90초로 하고, 최종적 extention은 72℃ 6분으로 반응시켰다. PCR이 완료되면 반응혼합액 10㎕를 1x TAE buffer를 포함한 1.5% agarose gel(ethidium bromide 1㎕/㎖, Bioneer)에 분획시키어 전기영동을 실시하였다.[13,20-27]
전기영동이 끝난 gel을 UV illuminator에서 DNA band 증폭유무를 확인하였다.[25-26]

결 과

table 1. Detection of Brucella spp. infection farms by various serum test

No. of times (frequency)	Herds	Sex(A)			No. of positive RBT-STAT(B)		Positive rate A/B*100(%)	
		Male	female	calfs	Male	female	Male	female
first	51	38	9	4	9	6	23.7	66.7
seconds	32	27	5		10	1	37.0	20.0
thirds	13	9	4		2		22.2	
total	96	74	18	4	21	7	28.4	38.9

* RBT : Rose Bengal test
* STAT : Standard Tube Aggultination test

부루세라 양성우에 대한 혈청검사의 결과(로즈뱅갈테스트, 시험관 응집반응)에서 부루세라병 양성 발생농장은 6개월 동안 세번 연속 양성 반응을 보였다. 첫번째 발생에서 15두, 두 번째 11두, 마지막에서 2두의 양성을 보였으며, table 1과같이 발생의 순서에 따라 수소에 대한 감염율은 23.7%, 37.0%, 22.2%의 감염율을 보였고, 암소에 대한 감염율은 66.7%, 20.0%, 0%의 결과를 나타내었다.

전체적인 농장의 감염율은 29.2%를 나타내었고, 수소에 감염율은 28.4%, 암소의 감염율은 38.9%의 결과를 나타내었다.

table 2. Isoation rate of Brucella organisms by antibody titers of 12 brucella reactor native bulls

Agglutination titer	No. of positive bull	No. of positive Dip-stick	No. of positive culture & PCR(B)	Specimens			Total
				Testis	Intestinal Lymph node	Blood	
Below 100	2	1					
200	5	5	2	1	1		2
Above 400	5	5	3	1	2		3
Total	12	11	5	2	3		5

부루세라 양성우의 양성 항체가별, 각 양성 항체가 장기별균 분리를 한 결과 table 2와 같다. 혈청검사 양성우에 대한 역가는 200배와 400배에서 각각 5두씩 나타났으며, 100배에서는 2두가 확인 되었다.

또한 간이진단킷트(Dip-stick)에서는 11두의 양성우(91.7%) 성적을 나타났다.

부루세라균 분리 및 PCR 검사에서는 400배 역가에서 3두, 200배에서 2두의 균분리를 할 수 있었다. 또한 역가에 따른 장기별 세균 분리 결과는 총 5건의 세균 분리를 하였는데 고환에서 2건 , 장간막 임파절에서 3건의 세균 분리 결과를 나타내었다.

table 3. Isoation rate of Brucella organisms from various specimens in sero-positive native bulls

	Specimens						Total
	Testis	Intestinal Lymph node	Uria	Blood	Fecal	Water,soil	
No. of test(A)	12	12	10	12	12	5	63
No. of positive culture & PCR(B)	2	3	0	0	0	0	5
A/B*100(%)	16.7	25.0	0	0	0	0	7.94

장기별 부루세라균 동정율은 table 3.과 같다. 고환에서 12건중 2건(16.7%)이 분리가 되었고, 장간막 임파절에서 3건(25.0%), 혈액, 뇨와 분변 음용수, 토양 등 에서는 분리가 되지 않았다.

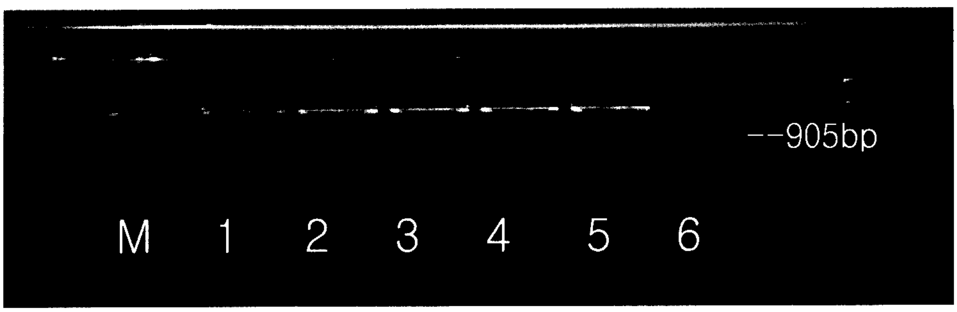
총 63건의 시료장기중에서 5건(7.94%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 장간막임파절에서는 24건중 5건(20.8%)의 균 분리를 나타내었다.

table 4. Isoation rate of Brucella organisms from various specimens in sero-positive indigenous below twelve months cattles.

	Specimens				Total
	Testis	Supramammary lymph node	Intestinal Lymph node	Blood	
No. of test(A)	4	10	4	14	32
No. of positive culture & PCR(B)	1	4	1	0	6
A/B*100(%)	25	40	25	0	18.8

12개월령 이하에서 부루세라병 혈청검사 결과 양성축에 대한 장기별 부루세라균 동정율은 table 4.와 같다. 고환에서 4건중 1건(25%)이 분리가 되었고, 상유방임파절에서 4건(40%), 장간막 임파절에서 1건(25%)이 분리되었으며, 뇌와 혈액에서는 분리되지 않았다. 총 32건의 시료장기중에서 6건(18.8%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 상유방 임파절 및 장간막 임파절에서는 18건중 6건(33.3%)의 균 분리를 나타내었다.

Fig 1. Fig 1. Amplification patterns of 16S rRNA gene of B abortus isolates by PCR using 16S rRNA primers.



M : DNA ladder marker,
Lane 1 : Standard strain, B abortus(biotype1),
Lane 2-6 : isolates,
Lane 2 : A farm(Testis),
Lane 3 : A farm(Supramammary lymph nodes)
Lane 4 : A farm(Intestinal Lymph node) , Lane 5 : B farm(Testis),
Lane 6 : B farm(Supramammary lymph nodes)
M : DNA ladder marker

고 찰

부루세라병은 인수공통 전염병으로서 비교적 폭넓은 숙주범위를 가지는 병원균으로 소, 돼지, 면양, 강아지 등에 일차적으로 감염된 후 전염 매개체인 생물학적 요소인 소, 말, 돼지, 사슴과 기계적 매개체인 쥐, 고양이, 야생조수, 흡혈곤충인 진드기, 모기, 파리와 차량 및 기구, 수례, 장화, 착유기 등을 들수 있으며, 이들과 접촉이 빈번한 직업인 축주, 인공수정사, 수의사의 감염이 될 수 있으므로 가축에서는 발생될 경우 질병근절을 위하여 살처분 정책을 실시하고 있다. 이를 위해서는 질병발생 초기에 빠르고 정확한 진단이 이루어져야 한다. 또한 우리나라에서는 12개월령 이상의 암소에 대한 혈청검사를 위주로 부루세라 검색 정책을 펼치고 있으므로 수소 및 12개월령 이하에 대한 혈청검사나 부루세라균 동정에 대한 기초 자료가 부족한 것 같아 본 연구를 수행하였다.

또한 본 연구의 목적은 수소의 경우에는 단지 고환이나 부고환의 국소 감염만을 일으키므로 눈에 띄는 증상이 없으므로, 임상 증상으로 판단하기 지난하므로 반드시 혈청 검사를 수행하여야만 감염여부를 판정할 수 있기 때문에 수소에 대한 혈청검사가 꼭 필요한 사항임을 인식하고, 우리나라에서 검사하지 않았던 수소에 대한 부루세라병 검사를 실시하고, 또한 12개월령 이하에서의 감염우에 대한 조사를 수행함으로써 수소 및 12개월령 이하 감염우에 대한 부루세라병 감염실태, 부루세라병 감염경로에 따른 역학조사 및 본병의 확산 방지를 위한 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

또한 부루세라병의 진단은 세균을 직접 분리 동정하는 것이 가장 확실한 진단법이지만 시간이 많이 걸리고, 잠복감염에서 세균의 분리율이 낮은 점이 단점이며, 혈청학적진단법은 가장 간단하면서 빠른 시간 안에 판정할 수 있으나, 비특이성 반응이 많이 나타나고, 만성 감염증이나 감염초기에는 검출하지 못하는 경우가 많아 최근에는 민감성과 특이성이 높은 직접중합효소연쇄반응(Direct PCR)이 진단에 응용되고 있는 상황이다. 이와 같이 PCR기법을 이용한 진단법은 부루세라균을 확인하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라 항체 수준이 낮은 예에서도 부루세라균을 신속히 검출할 수 있으므로 혈청학적 방법과 병행하여 혈액, 임파절, 우유, 정액 및 질분비물 등의 재료로부터 직접 부루세라균을 검출하는데 많이 사용되리라 생각되며, 질병진단 기관에서 진단을 위한 모든 장비의 구입 및 인력보강을 하여 정확한 부루세라 살처분 정책에 활용 될 수 있으리라 생각된다.

부루세라병 양성 발생농장은 6개월 동안 3회 연속 혈청검사 양성 반응을 보였다. 처음 본병이 발병 했을때의 총 사육두수 51두중 15두가 감염되어 29.4%의 감염율을 보였고, 두 번째 발병에서는 32두중 11두가 발병하여 34.4%, 세번째는 13두 중 2두로 15.4%의 감염율을 나타내었다. 또한 수소의 감염율은 23.7%, 37.0%, 22.2%의 감염율을 보였고, 암소의 감염율은 66.7%, 20.0%, 0%의 결과를 나타내었다. 전체적인 농장의 감염율은 29.2%를 나타내었고, 수소에 감염율은 28.4%, 암소의 감염율은 38.9%의 결과를 나타내었다.

3회 연속 재발생한 농가로 심 등[10]은 양성 동거우를 재검사 한 결과 1개월 이내에 발생이 50.2%, 1개월~6개월은 26.6%의 부루세라병의 재발생을 확인 할 수 있었다. 또한 본병 발생율의 조사는 심 등[10]의 연구에서 12개월 이상 암소에서만의 발생율과 재발생율을 나타내었으나 본 조사에서는 수소에 대한 재발생을 확인 할 수 있었으며, 암소와 비슷한 결과를 얻을 수 있었다.

부루세라 양성우의 양성 항체가 별로 균 분리를 실시하여 각 양성 항체가에서 장기별 균 분리를 한 결과 혈청검사 양성우에 대한 역가는 200배와 400배에서 각각 5두씩 나타

났으며, 100배에서는 2두의 혈청역가를 나타내었다. 또한 간이진단킷트(Dip-stick)에서는 12두 중 11두의 양성우를 나타내어 91.7%의 일치율을 나타내었다.

부루세라균 분리 및 PCR 검사에서는 총 12두의 양성우중 5두(41.7%)에서 세균을 분리하였는데 역가별로 세분해 보면 400배에서 3두, 200배에서 2두의 균 분리를 할 수 있었다. 혈청역가가 높을수록 균 분리율은 다소 높은 것으로 나타났다.

장기별 부루세라균 동정율은 고환에서 12건 중 2건(16.7%)과 장간막임파절에서 3건(25.0%)이 분리가 되었고, 혈액과 뇨, 분변, 음용수, 토양 등에서도 분리가 되지 않았다.

총 63건의 시료장기 중에서 5건(7.94%)의 균동정이 이루어졌으며, 고환과 장간막임파절에서 24건중 5건(20.8%)의 균 분리를 나타내었다.

수의과학검염원 김 등[5]의 연구에 의하면 림프절에서 800건 중 219건(27.4%), 근육에서 0.79%, 전혈 3.64%, 정소 51건중 3건(5.9%), 난소 14.2% 등의 분리율이며, 정 등[8]은 비강 분비물 4건과 질 분비물 1건의 균 분리와 수소에서는 혈청과 전혈에서 세균 분리가 안된 것을 볼 수 있었다. 또한 응집반응에서 양성우로 판정된 개체에서 실질 장기별 부루세라균의 분리율은 Yanupsky 등[14]은 상유방임파절에서 80%로 가장 높고, 유방 59%, 우유 45%, 자궁 42%, 비장 37%의 순으로 보고하였고, 정 등[8]은 상유방 임파절 55.6%, 유즙 40.7%로 보고 하였다. Park NC 등[11]은 부루세라균 분리주중 상유방임파절에서 79.5%가 분리되었음을 보고한 바 있다. 본 실험에서는 대한 균 분리 수행으로 고환에서 58%, 장간막임파절에서 50%의 분리율을 나타낸 것은 김 등[5]의 연구보다 균 분리율이 다소 높게 나타났다. 기타 다른 연구자들은 주로 암소에 대한 세균 분리를 수행하였으나, 본 연구는 수소에서의 세균분리를 수행하였으므로 다소 차이가 나는 것 같다.

본 연구에서는 정 등[8]의 연구와 같이 혈액 36건중 한건도 원인균이 분리 되지 않았으나, 수의과학검역원 김 등[5]은 907건 중 33건(3.64%)의 세균분리를 보고하여, 시료가 적을 경우의 낮은 분리율로 인한 사례라 판단된다. 부루세라균은 AUSVETPLAN(Australian veterinary emergency plan. version3.0, 2005년)에 의하면 감염 초기에만 세균을 분리할 수 있다는 보고가 있으며, 혈액내 박테리아가 지속되는 균혈증 기간 중에는 임상증세가 없으며, 수주 내지 몇 개월이 지속되기도 한다. 그 후 균이 임신자궁, 젖소의 유방, 거세하지 않은 수소의 고환, 부생식선 등에 국소화하여 존재한다고 한다.

또한 본 실험에서 분변, 뇨, 물, 토양 등 환경으로부터 얻은 시료에서는 부루세라균을 검출할 수 없었으나, 감염된 소로부터 다른 가축이나 사람에게 감염시킬 수 있는 환경적 요인들을 배제 할 수는 없는 것 같다.[18]

12개월령 이하에서 부루세라병 혈청검사 결과 양성축의 장기별 부루세라균 분리율은 고환에서 4건 중 1건(25%), 상유방임파절 4건(40%), 장간막임파절 1건(25.0%)이 분리 되었으며, 혈액, 뇨 및 분변에서는 분리 되지 않았다. 총 32건의 시료장기 중에서 6건(18.8%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 상유방임파절, 장간막임파절에서는 24건중 6건(25%)의 균 분리를 나타내었다. 정 등[8]에 의하면 양성우 동거축의 송아지(암, 수) 68두에서 혈액에서 균 분리를 할 수 없었다고 보고하였다.

12개월 이상의 개체에 대한 균 분리 및 혈청검사 결과 보고는 상당히 많이 보고되었지만, 성성숙이 되지 않은 12개월령 이하 소에 대한 혈청검사 및 세균분리 보고 자료는 찾을 수 없었다. AUSVETPLAN에 의하면 '감염은 모든 연령의 소에서 일어날 수 있으나 대부분의 경우 성성숙한 동물에서 지속된다. 감염된 젖을

먹은 송아지는 수 주 동안 분변을 통해 병원성 부루세라균을 배출한다'라고 되어있으며, 또한 선천적으로 감염된 송아지는 초유 항체로 인해 양성 혈청반응을 나타내고, 그 후에 음성혈청반응을 나타내며 세균이 배출되는 때, 즉 임신이나 유산 시까지 발현하지 않는다(Lapraik et al., 1975)라고 되어있으며, 또한 B. abortus는 오염된 먹이나 물의 섭취 또는 유산되거나 분만 직후 감염된 동물의 태반, 태아 또는 생식기를 핥으므로서 전파된다. 흡입이나 직접접촉 특히 상처난 피부나 점막 등이 요인이 된다(Nicoletti 1980). 이런 방식으로 감염된 처녀우는 혈청학적 검사로는 찾아내지 못하고, 성숙기 이후 감염의 근원이 된다. 청정 우군으로의 질병전파는 주로 잠복 감염된 젖소나 처녀우의 유입에 의한다 라고 되어있다.

이상과 같은 연구를 수행함으로서 수소 및 12개월령 이하 소에 대한 부루세라균 분리나 혈청학적 진단의 미비점을 보완하고 부루세라 근절 정책에 있어서 수소 및 7~12개월령 이하 소에 대한 부루세라 검사의 필요성을 인식하여, 부루세라 방역 및 근절 정책에 기초적 자료가 되었으면 하는 바램에서 본 연구를 수행하였다.

결 론

부루세라병 감염 수소와 12개월령 이하의 감염우에서 혈청학적 검사와 함께 세균학적, 분자생물학적 기법을 활용하여 부루세라균을 분리 동정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 수소에 대한 부루세라 혈청검사결과 74건 중 21건(28.4%)이 로즈뱅갈검사법과 시험관 응집반응에서 양성을 나타내었다.
2. PCR 검사에서는 분리된 모든 부루세라균은 16s r-RNA 프라이머에서 905-bp 밴드가 형성되었다.
3. 장기별 세균 분리 결과는 고환에서 12건 중 2건(16.7%), 장간막임파절에서 3건(25%) 등 총 5건이 분리되었으나, 혈액, 뇨, 분변, 음용수, 토양 등에서는 분리되지 않았다.
4. 총 63건의 시료장기중에서 5건(7.94%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 장간막임파절에서는 24건중 5건(20.8%)의 균 분리를 나타내였다.
5. 12개월령 이하에서 부루세라병 혈청검사 결과 양성축에 대한 장기별 부루세라균 동정율은 고환에서 4건 중 1건(25%), 상유방임파절 4건(40%), 장간막임파절 1건(25%)이 분리되었으며, 혈액과 뇨, 분변에서는 분리되지 않았다.
6. 총 32건의 시료장기중에서 6건(18.8%)의 균 동정이 이루어졌으며, 고환과 상유방임파절 및 장간막임파절에서는 18건중 6건(33.3%)의 균 분리를 나타내었다.

참고문헌

1. Forbes LB, Tessaro SV. 1993. Transmission of brucellosis from reindeer to cattle. JAVMA 15 ; 203(2): 289~294.
2. Forbes LB, Tessaro SV. 1996. Infection of cattle with Brucella abortus biovar 1 isolated from a bison in Wood Buffalo National Park. Can Vet J 37(7): 415~419.
3. Repina LP, Nikulina AI, Kosilov LA. 1993. A case of human infection with brucellosis from a cat. AH Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 4 : 66~68.
4. Lopez-Merino A. 1991. Brucellosis. Advance in perspectives. Publication Tcnica del INDRE-SSA 6: 1~54.

5. Kim ST, Yoon KB et al. 2005. Brucellosis outbreak of Korean indigenous cattle at Yeongwol and Pyeongchang country Korea. *Korean J Vet Serv(2005)* 28(4): 387 - 392.
6. Rijpens NP, Jannes G, Asbroeck MV, et al. 1996. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S RNA spacer probes. *J Clin Microbiol* 62 : 683-1688.
7. Leal-Klevezas DS, Martinex-Vazquex IO, Lopez-Marino A, et al. 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 33 : 3087-3090.
8. Jung SC, Jung BY, Woo SR, et al. 1998. Development of PCR assay for the detection of *Brucella* spp in bovine serum. *J Vet Med Assoc* 38(2): 345- 352.
9. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ. 1984. Genus Brucella Meyer and Shaw 1920, 173[AL]. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Ed: Krieg NL, Holt JG. Vol 1. Williams & Wilkins, Baltimore and London : 377-388.
10. Sim HS, Ko TO, Yoo SJ, et al. 1996. Studies on outbreak of bovine brucellosis in Kyeonggi province. I. The epidemiological characters of brucella- reactor cattle and properties of isolated *Brucella abortus*. *Korean J Vet Serv* 19(3): 189-198.
11. Park NC, Kim SY, Cho KH, et al. 1998. Studies on the brucellosis in Kyongbuk area. *Korean J Vet Serv* 21(4): 451-465.
12. Timoney JF, Gillespie JH, Scott EW, et al. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and infectious disease of domestic animals.* 8 ed. Comstock Publishing Associate, Ithaca and London : 127-138.
13. Bae J. 1999. Generation of baculovirus-*Brucella abortus* heat shock protein recombinants; Mouse immune responses against the recombinants, and *B. abortus* superoxide dismutase and L7/L12 recombinant proteins. Ph. D. thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
14. Yagupsky P. 1999. Detection of Brucel-lae in blood cultures. *J Clin Microbiol* 37 : 3437-3442.
15. Perry MB, Bundle DR. 1990. Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* 0157:H7, *Brucella melitensis,* and *Brucella abortus*. *Infect Immun* 58 : 1391-1395.
16. Mittal KR, Tizard IR. 1980. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res Vet Sci* 28 : 311-314.
17. Alton GG. 1975. Jones LM. *Laboratory techniques in brucellosis.* World Health Organization, Geneva : 1-163.
18. USDA. 1985. *Brucellosis Eradication* ; Uniform methods and rules. Animal and Plant Health Inspection Service, Iowa
19. Diaz-Aparicio E, Marin C, Alonso-Urmeneta B, et al. 1994. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J Clin Microbiol* 32 : 1159-1165.
20. Leal-Klevezas DS, Martnez-Vzquez IO, Lpez-Merino A, et al. 1995. Single step PCR for the detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. J Cin Microbiol 33: 3087~3090.
21. Leal-Klevezas DS, Barbabosa-Pliego R, Flores-Trujillo M, et al.. 1999. Epidemiological

molecular de un foco primario de brucelosis en el Estado de Maxico. Biotecnol Apl 16: 149~153.

22. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, 1992. Detection of Brucella by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. J Vet Diagn Invest 4: 79~83.

23. Fekete A, Bantle JA, Halling SM,, et al.. 1990. Preliminary development of a diagnostic tests for Brucella using polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol 69 : 21 6~227.

24. Herman L, Ridder HD. 1992. Identification of Brucella spp. by Using the polymerase chain reaction. App Env Microbiol 58: 2099~2101.

25. Leal-Klevezas Ds, Martnez-Vzquez IO, Garca-Cant J, et al.. 2000. Use of polymerase chain reaction to detect Brucella abortus biovar 1 in infected goats. J Vet Microbiol 75: 91~97.

26. Bricke BJ, Halling SM. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv 1, 2, and 4, *Brucella melitensis, Brucella ovis, and Brucella suis* bv 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 32 : 2660-2666.

27. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, et al. 1990. Rapid, sensitive detection of *Brucella abortus* by polymerase chain reaction without extraction of DNA. *Biotech Techniques* 4 : 31-34.

토종닭에서 가금콜레라(Fowl Cholera) 발생

이종진[1], 김환희, 변철섭, 이은정, 육민정, 박재명

충청북도축산위생연구소북부지소

Outbreak of Fowlnative Cholera in chickens

Jong-Jin Lee[1], Hwan-Hee Kim, Chul-sub Byun, Eun-Jeong Lee, Min-Jeong Yuk, Jae-Myoung Park

Northern Branch, Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Chungju, 380-230, Korea

Abstract

Fowl cholera(FC), which has been classified as reportable animal disease in Korea, occurred in the backyard farm located in Chungju, Chungbuk province. The farm was not ordinary domestic poultry farm but backyard farm with main cultivation of fruits.

The farmer reported unusual mortality of chickens which were grazed in his own fruit farm without any poultry house. There was a lots of opportunities to contact with wild animals including wild birds freely.

Clinical signs observed in the chickens were torticolis, mucous excretion from mouth and greenish diarrhea. On the necropsy we found multifocal necrosis on the surface of liver, hemorrhages in the epicardium and ovary and mucopurulent exudates in the joint. The causative agents was isolated from the liver of chickens collected from the farms and identified as *Pasteurella multocida* using biochemical tests of bacteria. Also, the isolated bacteria were inoculated into specific pathogen free chickens to evaluate the pathogenicity.

High mortality and similar pathological lesions compared to those of chickens died in the farm were observed.

We report the first case of fowl cholera of the chickens in Korea and further studies are needed to evaluate the serotype, genotype and pathogenicity of isolated *Pasteurella multocida.*

Key words : Domestic poultry, Fowl Cholera(FC), *Pasteurella multocida*

서 론

가금콜레라(Fowl Cholera)는 avian cholera, avian pasteurellosis, avian hemorrhagic septicemia로 불리우기도 했으며, 야생조류, 닭 및 집오리 등 가축에서 급성 패혈증을 일으키고, 신경증상과 함께 심장 및 근위 출혈, 간에 다발성 괴사 반점 등의 육안적 병변[1]을 보이며 제2종 가축전염병[2]으로 지정되어 있다.

원인균은 *Pasteurella multocida*로서 캡슐(Capsule)이 균체를 외부를 덮고 있는데, 캡슐의 형태에 따라 혈청 그룹은 A, B, D, E, F 5종으로 구분된다. 그리고 균체항원의 혈청형은 16종으로 숙주 특이성이 높은 세균이다. 조류에서는 E형을 제외한 나머지 A, B, D, F 4개 혈청형이 감염될 수 있는 것으로 보고되었으며 특히 A와 D의 혈청형이 야생오리 및 가금류에 감염되어 높은 폐사율을 보인다. 또한 *Pasteurella multocida*는 열, 햇볕, 건조 및 소독에 약하기 때문에 56℃ 15분, 60℃ 10분에 사멸하며, 알데히드제, 포르말린제 등 소독제에 쉽게 사멸된다고 알려졌다[1,3,4].

가금콜레라에 감염된 닭은 급성형과 만성형으로 구분할 수 있고 서로 상이한 증상을 보인다. 급성형은 갑작스런 패혈증에 의하여 야기되며 감염 24~48시간 후부터 폐사가 시작된다. 여름철에 흔히 볼 수 있는 임상형은 구강 및 비강내 점액성 삼출물을 흘리고, 벼슬이나 육수에 청색증이 나타나기도 한다. 또한 심한 침울과 쇠약과 함께 움직임을 싫어하며, 깃털이 불량하고, 간혹 수양성 설사증상이 관찰되기도 한다. 부검소견으로서는 내부장기(심장, 폐, 복강내 지방, 장)의 점상출혈과 함께 간에서의 다발성 과사반점, 난포파열 및 충·출혈이 관찰된다[1,3,].

만성형은 가을과 겨울에 흔히 관찰되며, 급성경과 후 만성형으로 전환되거나 병원성이 낮은 균주에 감염되었을 때 발생된다. 흔히 감염 2주 이내에 군집내 10~20% 폐사율을 보인다. 만성형으로 이환된 개체에서는 눈과 코에서 삼출물과 감염부위에 치즈모양의 염증성 삼출물을 볼 수 있다. 부검소견으로는 화농성관절염, 안면부종 및 섬유소성복막염을 관찰할 수 있다[1,3].

본 발생 사례는 2007년 1월 충북 충주시 신니면 소재 토종닭과 오리를 사육하는 농가에서 병성감정 의뢰된 폐사된 닭에 관한 것이다. 의뢰된 가검물에 대하여 병성감정[5]을 실시하여 *Pasteurella multocida*를 분리·동정하였고, 분리균의 병원성 회수시험을 실시한 결과 최종 가금콜레라(Fowl Cholera)로 진단하였다.

이는 국내에서 야생조수가 아닌 가축사육 농가에서 발생한 흔치않은 사례로, 본 사례를 통해 분리·동정된 가금콜레라 병원체의 생화학적 특성, 조직소견 및 임상증상 등을 조사 연구하여 양축농가의 가축 사양관리 및 가축전염병 예방에 도움이 되고자 하였다.

증 례

병성감정

2007년 1월 충북 충주시 신니면 소재 300여수 규모의 토종닭 사육농가에서 70~80수 정도가 졸음, 신경증상을 보이고 있고, 그중 약 50여수가 폐사되었다는 조류인플루엔자병 의심 신고가 있었다. 이에 농장현장에 역학조사 및 임상증상을 관찰 하였으며, 발생한 닭 중 생체 4수와 사체 1수 총 5수에 대하여 총배설강에서 시료를 면봉으로 채취하여, 조류인플루엔자 간이 키트 검사를 실시한 결과 전수 음성이었다.

실험실 검사를 위한 시료로 농장 방문 당시 발생한 폐사체 1수와 신경증상을 보이는 생체 2수를 실험실로 운반하였다. 동 가검물을 병성감정 재료로 원인균 분리 및 조직검사 등에 사용하였으며, 분리된 균에 대한 병원성 확인 시험은 충북대학교 수의과대학에서 사육하고 있는 SPF 닭을 사용하였다. 또한 분리균에 대한 항생제 감수성검사는 축산위생연구소 북부지소에 보유하고 있는 16종의 항생제 disk(Oxoid)를 이용하여 각 항생제별 감수성을 확인하였다.


A


B

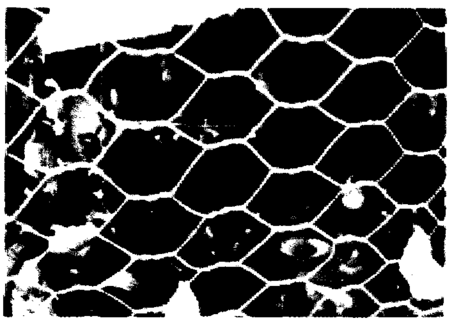
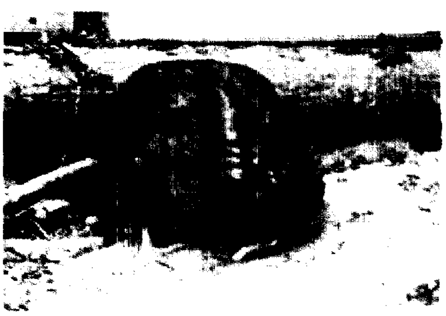

C

Fig 1. Farm views with history of fowl cholera outbreak (A,B.C)


(a)


(b)


(c)


(d)

Fig 2. Clinical signs showed in the chickens collected at the farms with history of fowl cholera outbreak

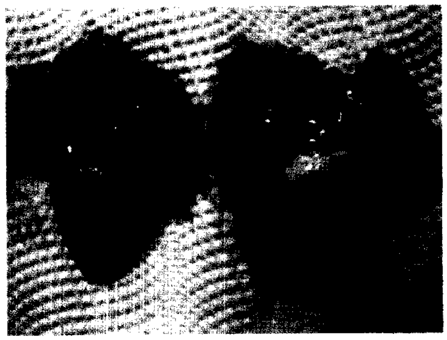
Note neurological signs of head(a), swollen eye(b), mucous excretion from mouth(c), and greenish feces around the cloaca.

(A)

(B)

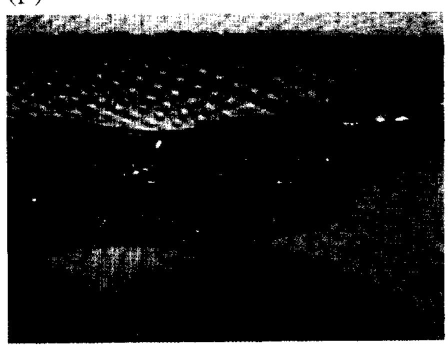
(C)

(D)



(E)

(F)



(G)

Fig 3. Gross pathological changes in the various organs collected from chickens infected with fowl cholera.
Note perihepatitis(A,B), ovarian rupture with hemorrhage(C), mucopurulent exudates in the joint(D), petechial hemorrhage in the heart(E), hemorrhages in the serosa and mucosa of intestine(F,G).

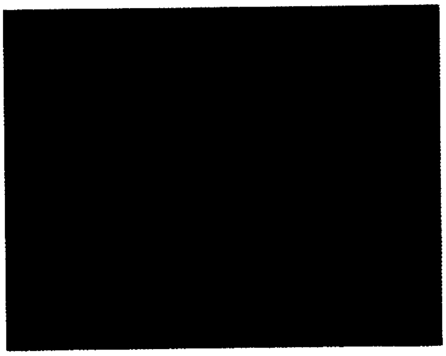


Fig 4. *Pasteurella multocida* iso lated in the lover of the chickens collected from the farms(Gram stain, ×1,000)

역학조사

농장주는 축산업(가금류)을 주업으로 하는 농가가 아니고 과수원을 경영하며, 약 10개월령의 닭(토종닭) 300수와 오리 7수를 과수원 주변에서 개방형(방목형)으로 방사하여 사육하고 있었으며, 가금류 외 개 3두를 함께 사육하고 있었다. 또한 반경 500m내의 인근 사육농장으로는 약 1,000두 규모의 양돈장이 있으나 조사 당시까지 특정 전염병이 발생한 한 병력은 없었다. 금회 발생된 계군은 2006년 3월경에 초생추를 구입하였으며, 동 계군은 일정한 사료급여 없이 주변에서 자유로이 먹이를 섭취하는 형태였다. 이와 같은 역학조사 결과를 분석하면 축주는 주업이 과수원 경영이었기 때문에 사육가금에 대한 방역상 관심부재와 질병발생 예방차원의 관리가 매우 허술한 것으로 나타났다. 또 외부와 차단된 계사에서 사육하는 것이 아니라 야산 과수원에 방사하여 사육함으로서 야생조수나 사람과의 접촉 등 외부 오염원에 완전 노출됨을 고려할 때 질병 발생 원인은 외부 요인에 의한 기계적 접촉인 것으로 추정 되었다.

임상증상

패혈증과 함께 갑작스런 폐사를 특징으로 하며 여름철에 주로 발생하는 급성형과는 달리 겨울철에 발생하였다는 계절적 특징과 급속한 폐사가 일어나지 않는 점에서 본 사례는 만성형 가금콜레라라 추정되었다.

임상증상으로는 침울하며 활력 저하가 있었고, 고개를 아래로 하고 졸고 있는 모습이었으며(Fig2의 a), 외형적으로 안면부종(Fig2의 b), 관절염 증상(Fig3의 (D)), 구강과 비강에는 점액성 삼출물(Fig 2의 c)이 있었고, 일부에서는 총배설강 주변에 녹색변이 붙어 있었다(Fig 2의 d).

부검소견

부검소견으로서는 사체 1수에서 간장과 복막 주변에 대장균증과 유사하게 현저한 섬유소성 삼출물이 덮여 있었으며(Fig3의 (A)), 간장은 종대 되었고, 다발성 괴사반점이 있었으며 (Fig3의 (B)), 대부분의 내부 장기에 충혈과 출혈 소견이 관찰되었다. 또한 장관 내외부의 점상 충·출혈(Fig3의 (F), (G)), 난포파열과 난포주변의 충혈 소견도 관찰되었다(Fig3의 (C)). 심장의 표면에서는 산발적 점상출혈과 충혈 소견이 보였고(Fig3의 (E)), 관절부위 절개면에서 점도가 있는 치즈양 염증성 삼출물이 저류하고 있었다(Fig3의 (D)). 이러한 부검소견은 야외 감염 예에서 보다 인공감염 후 병원성 시험을 한 사례에서 더욱 뚜렷하였고, 이러한 육안적 부검소견은 닭의 대장균증, 살모넬라증 등과의 감별진단을 필요로 하였다.

세균분리 및 항생제 감수성 시험

세균 분리는 검사 의뢰된 감염닭 3수의 간, 구강, 안검에서 각각 가검물을 채취하여 Brain Heart Infusion (BHI)broth에 1일 증균 배양후 blood agar, MacConkey agar, Rambach agar에 하루 배양 하였다. 일부 오염된 안검과 구강에서 채취한 시료에서는 MacConkey agar 및 Rambach agar에 E.coli 등이 함께 분리 되었으나, 간장에서 채취한 시료는 MacConkey agar 및 Rambach agar 에서 배양이 되지 않았으나, Blood agar에서 흰색 colony가 형성 되어 Gram stain을 실시한 결과 Gram negative 양단염색 간균을 관찰

할 수 있었다(Fig 4). 세균동정은 생화학적 성상차이로 동정하는VITEK® (bio Merieux Vitek Inc.)을 이용하여 동정하였는데, 29가지 생화학적 성상을 분석한 결과 *Pasteurella multocida*로 최종 동정하였다(Table 1, 2).

또한 야외 분리균 과 SPF 닭에서 분리된 *Pasteurella multocida*를 항생제 disk 16종 (Oxoid)을 이용하여 항생제 감수성을 검사한 결과 Penicillin G, Piperacillin, Norfloxacin, Cephalothin, Chloramphenicol, Tetracyline 순으로 감수성이 높았다(Table 3).

병원성 확인

분리균에 대한 숙주에서의 병원성 재현은 충북대학교 수의과대학에서 제공한 약 4개월령의 SPF 닭 5수를 이용하였으며, 병원성 검증을 위한 병원체는 야외 가검물에서 분리한 *Pasteurella multocida*를 TSB(Tryptic soy broth)에 2일간 증균 배양한 후 사용하였으며 Fowl cholera의 정확한 재현을 위하여 공격접종 경로와 접종량을 달리하였다(Table 2). 즉 1수는 주사기로 복강에 500μl를 접종하였고, 4수는 자연감염경로인 구강 및 비강에 각각 200μl, 240μl씩 접종하였다.

배양균의 접종결과 복강접종을 실시한 1수는 24시간 만에 폐사 되었고, 비강과 구개부위로 투입한 4수중 2수는 48시간 후 폐사 하였다. 또한 폐사한 SPF 닭 3수의 간에서 야외 분리균과 동일한 방법으로 세균 동정을 실시한 결과 3수 모두에서 동일균이 분리 되었다 (Table 1).

이와 같이 SPF닭을 통한 병원성 확인결과 야외에서 발생한 폐사 비율보다 높은 병원성을 나타내었으며 임상병리학적 소견도 더욱 뚜렷하였는데, 이는 야외에서 자연스럽게 오염된 것보다 많은 양의 병원체를 실험실에서 인위적으로 체내로 주입하였고, SPF닭을 이용한 결과로 판단된다.

고 찰

가금콜레라(Fowl Cholera)는 우리나라에서 현행 가축전염병예방법상 제2종 가축전염병으로 규정되어 있지만 그동안 발생사례가 거의 없었다. 세계적으로는 대부분의 나라에서 발생하고 있으나 사육된 닭보다 야생 오리 등에서 산발적으로 발생하고 있는 질병으로 알려져 있으며, 폐사율이나 임상증상은 환경에 따라 다양하게 나타날 수 있다고 보고되어 있다[1]. 가금콜레라의 원인체인 *Pasteurella multocida*는 야생 조류에서 감염예가 많으며 감염 조류는 비강에 다량 보균하고 있으며, 포유류와 쥐, 너구리 등도 보균하고 있으나, 이들에서 분리된 균주들은 조류에 대해서 비병원성인 것으로 보고되어 있다[1,2].

이번 토종닭에서 분리한 *Pasteurella multocida*는 발생농장의 환경상 야생동물과의 접촉에 의한 것으로 추정은 할 수 있으나 구체적 증거는 없다. 국내에서 유일하게 대규모로 발생되어 보고된 가금콜레라는 2004년 10월 충남 서산시 천수만에서의 발생으로 당시 약 13,000수의 가창오리가 폐사되었으며 발생원인은 규명되지 않았다. 이와 같이 세계적으로 본 질병은 야생 거위나 오리등 대부분 야생조류에서 주로 발생하였고, 사육하는 가금류 중 다수의 폐사를 일으켰다고 보고된 것은 칠면조, 오리 등 이었으며, 닭에서는 낮은 폐사를 보이면서 만성형으로 발현했다고 보고 된 바 있다[1].

그러나 우리나라에서 사육하는 닭에서 가금콜레라가 발생하여 보고된 것은 본 사례가 처음이다. 금회 발생 사례를 통하여 국내 양계산업에 가금콜레라(Fowl Cholera)에 대한 관심 제고와, 향후 본 질병에 대한 신속한 진단 및 예방대책을 세우는데 도움이 되었으면 한다.

또한 가금콜레라(Fowl Cholera)는 사양 및 방역관리만 철저히 하면 얼마든지 예방할 수 있으며, 신속한 진단으로 효과적인 치료를 수행할 수 있기 때문에, 이 질병에 대한 지속적이 홍보와 방역대책이 필요하겠다.

Table 1. Biochemical characteristics of the *Pasteurella multocida* isolated in infected chickens (n=6)

well NO.	Medium	Quan'ty	Result(n=6)	
			natural route(n=3)	artifical route(n=3)
1	Glucose(oxidative)	30.0㎍	3	3
2	Growth control	0.3㎍	3	3
3	Esculin	22.5㎍	-	-
4	Plant Indican	45.0㎍	-	-
5	Urea	0.15㎍	-	-
6	Citrate	52.5㎍	-	-
7	Malonate	0.16㎍	-	-
8	Tryptophan	0.15㎍	-	-
9	Polymyxin	94.0U	-	-
10	Lactose	96.0㎍	-	-
11	Maltose	30.0㎍	-	-
12	Mannitol	19.0㎍	-	-
13	Xylose	30.0㎍	-	-
14	Raffinose	30.0㎍	-	-
15	Sorbitol	19.0㎍	-	-
16	Sucrose	30.0㎍	-	-
17	Inositol	19.0㎍	-	-
18	Adonitol	19.0㎍	-	-
19	H2S	30.0㎍	-	-
20	ONPG	50.0㎍	-	-
21	Rhamnose	30.0㎍	-	-
22	L-Arabianose	30.0㎍	-	-
23	Arginine	0.27㎎	-	-
24	Lysine	0.27㎎	-	-
25	Decarboxylase	150㎍	-	-
26	Ornithine	0.27㎍	3	3
27	Oxidase		3	3
28	Catalase		3	3
29	Hemolysis		-	-

Table 2. Summary of challenge test with *Pasteurella multocida* isolated from backyard farm

Number of birds	Challenge route	Method	Mortality at DPI*		
			1	2	>2
1	abdominal cavity	injection	1		
4	nasal + oral	drinking		2	

*: Days Post-Inoculation

Table 3. Antimicrobial drugs susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated in case (n=6)

	Susceptibility			
	Total	Resistant	Intermediate	Susceptible
Sulfamethazole	6		4	2
Ampicillin	6		5	1
Chloramphenicol	6		1	5
Penicillin G	6			6
Rifampicin	6	1	5	
Neomycin	6	5	1	
Gentamycin	6	5	1	
Metronidazole	6		6	
Amoxycillin	6		6	
Piperacillin	6			6
Tetracycline	6		1	5
Vancomycin	6	5	1	
Streptomycin	6	5	1	
Kanamycin	6	5	2	
Norfloxacin	6			6
Cephalothin	6		1	5

결 론

2007년 1월 충북 충주시에서 발생한 폐사 닭에 대하여 병성감정을 실시한 결과 아래와 같이 가축 제2종 전염병인 가금 콜레라(Fowl Cholera)로 판정하였다.

1. 발생농장에 대한 역학조사결과 일정한 축사 없이 과수원에서 방사하여 사육하는 환경으로서 야생조수에 노출된 것 등을 고려할 때 외부 접촉에 의한 질병발생이라 추정할 수 있었다.

2. 주요 임상증상은 머리를 숙이고 조는 신경증상을 동반하였고, 안면부종, 관절염, 구강과 비강에 소량의 점액성 삼출물, 소수에서 총배설강 주위에 녹색설사변 등이 발견되었다.

3. 부검소견으로서 간장은 종대 되어 있었고. 표면에 다발성 괴사반점이 있었다.
소장과 대장은 외부와 내부에 충혈소견이 있었고, 특히 난포가 파열되어 난포주변 충혈소견이 있었으며, 심장에서는 표면에 산발 점상충혈이 보였다.

4. 야외 분리 *Pasteurella multocida*를 증균하여 SPF 닭 5수에 접종한 결과, 복강내 접종한 1수는 24시간 후 폐사하였고, 구강 및 비강에 동시 접종한 4수중 2수는 48시간 후에 폐사하여 병원성이 높은 것으로 판정이 되었다.

5. 검출된 *Pasteurella multocida*균에 대한 항생제 감수성을 검사한 결과 Penicillin G, Piperacillin, Norfloxacin, Cephalothin, Chloramphenicol, Tetracycline 순으로 감수성이 있었다.

참고문헌

1. Calnek. B. W. 1997. Disease of Poultry, 10th edition. Iowa State University Press : 143~159
2. 법제처. 2005. 현행법령집, 가축전염병예방법. 28(I). 한국법제연구원: 295~341
3. 농림부, 수의과학검역원. 2003. 가축전염병 편람. 건양기획인쇄 : 3~5
4. Johon F. Timoney, James H. Gillespie, Fredric W. Scott et al. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8th edition. Cornell University Press : 104~116
5. 농림부, 수의과학검역원. 2004. 가축질병 병성감정실시요령. 건양기획인쇄 : 380~383

유산양에서 관절염 · 뇌염 발생

손소연[1], 류대열, 손현수, 강신석, 박재명, 변현섭, 최해연

충청북도 축산위생연구소 남부지소

Outbreak of carprine arthritis-encephalitis in dairy goat flocks

So-Yeon Son[1], Hyeon-Soo Son, Dae-Yeol Ryu, Sin-Seok Kang, Jae-Myoung Park, Hyeon-Seop Byeon, Hae-Yeun Choi

Southern Branch of Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Yeongdong, 370-803, Korea

Abstract

This is a case report on the occurrence of caprine arthritis-encephalitis (CAE) disease among dairy goats in a local farm located in Yeongdong-gun, Chungbuk. Previously, it was reported that the farm experienced intermittent deaths numbering 15 of the 97 goats raised for 5 months. Most of the goats less than 6 months of age were suffering from ataxia and posterior paresis, body tremor and abnormal head posterior. Affected animals frequently had stunted growth and had a rough coat. Goats more than 6 months of age were affected with an insidious, chronic arthritis characterized by articular swelling ("big knee") of the carpal, hock, and stifle joints. Necropsy revealed severely swollen mesenteric lymph nodes, underflow of 2-3㎖ synovial fluid in the articular space and fibrous proliferation of synovial membrane. Histopathological examination showed perivascular accumulations of mononuclear inflammatory cells in the white matter of the brain, proliferative synovitis characterized by villous hypertrophy, synovial cell hyperplasia and infiltration by mononuclear inflammatory cells. Pulmonary lesions consists of patchy interstitial pneumonia with hyperplasia of lymphoid tissues and an extensive mononuclear inflammatory cell infiltration into the alveolar septa. Confirmation by nested PCR involves amplification of a 296 bp (1st PCR) and 184 bp (2nd PCR) fragments corresponding to the gag region of the CAE virus. This is the first time CAE has been reported in a local farm in Korea and emphasizes the importances of developing preventive measures against CAE.

Key words : Dairy goat, Caprine arthritis-encephalitis virus, First PCR, Nested PCR

서 론

산양의 관절염·뇌염 (carprine arthritis-encephalitis, CAE)은 산양을 사육하고 있는 대부분의 국가에서 발생하고 있으며[1], 캐나다, 미국 (1980년대)[2], 남미, 뉴질랜드 등지에서도 보고되었고, 일본에서는 2002년에 발생을 확인하였고 현재 청정화사업이 완료되었다[1].

유산양의 관절염·뇌염의 원인체는 *Retroviridae*과, *Lentivirus*속에 속하는 carprine arthritis-encephalitis virus (CAEV)이다[3,4].

이 외에도 *Retroviridae*과, *Lentivirus*속에 속하는 가축의 전염병 바이러스로서는 CAEV와 유전성 및 항원성이 유사한 면양의 Maedi-Visna 바이러스[5], 말전염성빈혈바이러스 (EIAV), 사람의 후천성 면역 결핍증 바이러스 (HIV)[6]가 있으며, 이들은 비종양성 바이러스로서 지속감염으로 느리게 병원성을 일으키는 것이 특징이다[7].

본 질병은 주로 1～4개월 된 어린 유·산양에서는 보행실조, 후구마비, 전신경련, 두부자세 등의 이상 등의 증상을 나타내는데 이환된 동물은 종종 수척해지며 털은 거칠고 건조해지며 준임상적인 또는 임상적인 간질성 폐렴을 일으킨다. 일반적으로 발열은 없으며, 기민해져 주위상황에 민감하고 경계태세를 취하는 모습을 볼 수 있다. 어린 일령에서는 임상증상으로 볼 때 뇌염형과 폐렴형이 관찰되며, 성축의 경우 뇌염형에서 살아남은 동물은 무릎관절, 손목관절 등에 비화농성 관절염이 잠행성으로 진행되어 관절의 종대가 나타나 소위 “big knee”라고 불리워지는 관절염형과 회복 불가능의 비유량이 떨어지는 유방염형의 형태로 진행된다. 이와 같이 임상증상에 따라 주로 6개월 미만의 어린 유산양에서 관찰되는 뇌염형에서는 운동실조, 후구마비, 침울, 사경, 선회운동 등의 신경증상이 확인된다. 유방염형은 유방이 단단해지고, 비유량이 줄어들다가 1-2주 후 자연 치유된다고 알려져 있으나 유량은 정상으로 회복은 되지 않는 특징이 있으며, 폐렴형에서는 간질성 폐렴이 일어나 만성적으로 기침을 한다[4,7].

대표적인 조직병리학적 소견은 뇌조직에서 대뇌 백질부의 혈관주위에 단핵염증세포의 침윤을 특징으로 하는 비화농성 혈관주위염과 신경섬유의 탈수초화, 관절조직에서 활액막 융모의 비후 및 활액막하 혈관주위의 단핵염증세포의 침윤을 특징으로 하는 증식성 활액막염을 들 수 있으며, 폐조직에서는 폐포벽에 단핵염증 세포의 침윤으로 인해 림프결절이 형성되는 간질성 폐렴의 소견이 관찰 된다[4,7].

산양의 관절염 뇌염 바이러스의 주요 감염 표적세포는 단핵구와 거대세포[4]이며, 유즙 특히 초유중의 대식세포[8]에 의한 수직감염이 주요 전파경로이지만, 태반감염과 접촉감염도 드물게 이루어짐이 확인되었다[7,9]. 또한 모든 종류의 산양이 감수성이 있고 실험적으로 면양도 감염이 이루어진 바[9]가 있으나, 그중 유산양이 가장 감수성이 높은 것으로 알려져 있다[7].

본 병의 진단은 병력청취, 임상증상, 조직병리학적 소견을 기초로 하여 한천겔면역확산법 (AGID)과 효소면역측정법 (ELISA)을 통한 항체 확인[2,10], PCR을 이용한 바이러스 핵산 검출 및 바이러스 분리로써 가능하다[7].

최근 충북 관내 양축농가에서 전염병 발생 신고를 통하여 역학조사 및 정밀검사를 실시한 결과 산양의 CAE로 진단되어 국내 발생사실이 확인되었기에 보고하는 바이다.

증 례

유산양에서 관절염 발생 신고 접수

2006년 2월, 영동군 소재의 유산양 사육

농가로부터 충청북도 가축전염병대책상황실(본소 방역과)에 산양에서 관절염이 발생하고 있다는 신고 접수 후, 동년 7월까지 수차례에 걸쳐 농가 방문하여 검사하였다.

발생상황

발생 농장주로부터 첫 신고 당시의 역학조사 결과 총 사육두수는 97두(암 92, 수 5)이었고, 호주 및 뉴질랜드 산으로 수입 4~5세대의 유산양(자아넨) 중 8두가 관절의 종창, 파행, 다리의 외전 등의 임상증상을 보였으며, 일부는 기립불능 상태였다.

축종은 충남 서산지역에서 사육하던 유산양 전체를 인수하였으며, 2005년 10월에 현 장소로 입식 사육한 이후부터 2006년 2월까지 약 23두가 발생하여 도태 또는 폐사하였으며, 원 사육지에서도 동일한 임상사례가 있었다고 품고하였다.

본 연구소에서는 임상증상을 종합한 결과[7] 산양의 CAE와 유사하다고 판단되어 생후 3년 된 유산양 생축 1두와 환축의 혈액 5점, 건강축의 혈액 11점을 국립수의과학검역원에 정밀검사 의뢰하였다.

PCR을 이용한 유전자 검출 및 CAEV 표준주와의 유전자 염기서열 분석 결과 96%의 동질성을 보여 국내에서는 처음으로 산양의 CAE로 진단되었다.

이에 농장에서 사육중인 유산양 전체에 대한 CAE 감염여부를 조사하기 위해 전두수 채혈하였고 PCR 결과 92두 중 52두에서 CAE 양성 반응이 나왔다. 따라서 본 연구소에서는 동 질병의 국내 첫 발생이라는 점과 그 발생 정도의 심각성을 파악하여 농가에 대한 지속적인 모니터링을 실시하였다. 2006년 3월 생후 7일경부터 후구마비, 경련과 같은 신경증상을 나타내었던 15일령 된 산양의 폐사체 1두를 추가로 병성감정 의뢰받았고 검사결과 간질성 폐렴을 주요 병리소견으로 보였으며 PCR 결과 CAE 양성반응을 나타내었다.

상기 농장에서는 2006년 5월 뉴질랜드에서 수입한 유산양 45두를 추가로 농장에 입식하였으며, 6월에는 호주에서 수입한 유산양 109두를 추가로 입식하여 7월 현재 사육두수는 260두로 파악되었다. 또한 기존의 CAE 양성축으로 부터 태어나 어미로부터 격리되어 56℃에서 60분간 멸균시킨 초유로 사육된 3~4개월령의 어린 유산양 14마리를 채혈하여 검사한 결과 총 4마리에서 PCR 양성 반응을 확인 할 수 있었으며, 그 중 2마리에서 사경, 사지 마비 등의 현저한 신경증상이 관찰되었다.

상기한 CAE 발생 농가 이외의 본 연구소 관내 유산양 농가 9호에 대한 임상적 예찰실시 결과 전 농가에서 과학적으로 확인된 바는 없었으나 농장의 품고조사 결과 CAE와 유사한 증상을 나타내고 있어 정밀 검사 시 양성으로 진단될 가능성이 있다고 판단되었으며, CAE 발생 농가와 인접한 흑염소 사육 8 농가에 대한 예찰실시결과 유산양에서와 같은 증상은 관찰되지 않았다.

환경위생 상태

CAE 발생농장은 충북 영동군 심천면 산간오지에 위치한 농장으로 방역상 주변 환경과는 격리된 지역이었으며 사육형태는 겨울철엔 축사 내 방사, 여름철은 임간방목을 실시하는데, 월 2회 이상 정기소독을 실시하는 등 비교적 방역위생관리를 잘 하고 있었다.

환축은 대부분 6개월령 이상의 성축으로서 주요 증상은 관절부의 확연한 종창으로 절뚝거리며 주로 무릎관절이나 비관절보다는 손목관절에서 발생 예가 많았다. 촉진 결과 열감이 없고 종대 및 경화된 상태이었고, 중증예에서는 다리를 땅에 딛지 못하고 들고 다니며 기립불능, 다리의 외전이 있었으며

임상증상

Fig 1. abduction and swelling of the carpal joint

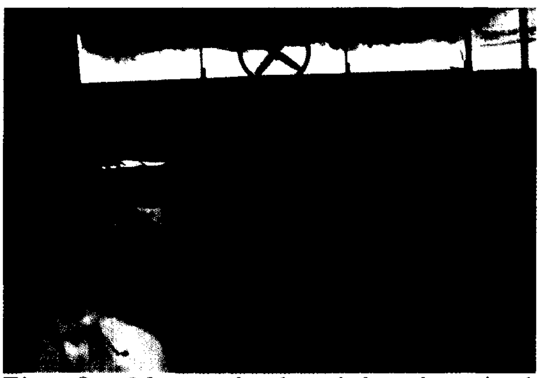


Fig 2. Most of the infected animals exhibited the signs of depression, ataxia and posterior paresis

Fig 3. The animal showing the signs of chronic arthropathy

수척해지다가 빠르면 1개월, 느리면 3~4개월 만에 폐사로 이어졌다(Fig 1~3). 성축의 CAE 양성축에서 유방염 증상은 대부분 관절의 종대와 동시에 나타났으며, 한번 증상이 나타나면 정상적인 비유량으로의 회복은 어려웠다.

3~4개월령 어린 유산양에서는 관절염에 의한 증상보다는 뇌염이나 폐렴에 의한 증상이 두드러지는 경향이 있었고, 뇌염에 의한 증상으로는 보행실조, 후구마비, 전신경련, 두부자세의 이상 등이 있었다.

부검소견

전반적으로 실질장기의 특이적인 병변소견은 없었으며 관절부에 병소가 집중되었다.

관절 골두가 비대해지고 경화되었으며, 관절강 내부에는 섬유소성 염증산물인 섬유소가 거미줄처럼 얽혀져 있었으며, 2~3㎖의 혈액성 관절액이 저류되어 있었다. 특이적인 소견으로서 연골부위에 궤양(반흔)소가 관찰되었다.(Fig 4~6).

조직학적 소견

뇌조직 소견으로는 대뇌 백질부의 혈관주위에 단핵염증세포의 침윤이 인정되었으며, 대뇌 피질부에서는 층상괴사, 괴사소에서는 혈관주위강의 확대, 신경망의 해면상 변화, 신경세포의 괴사 및 혈관주위로 단핵염증세포의 침윤이 관찰되었다(Fig 7, 8).

소뇌에서는 Purkinje cell의 염색질 융해로 핵이 완전히 소실된 소견이 보여졌다(Fig 9).

폐조직에서는 폐포벽에 단핵 염증세포의 침윤으로 폐포벽이 비후되고 국소적으로 림프구성 결절이 생성되는 간질성 폐렴 소견이 관찰되었다(Fig 10, 11). 기타 장기에서는 특이소견이 관찰되지 않았다.

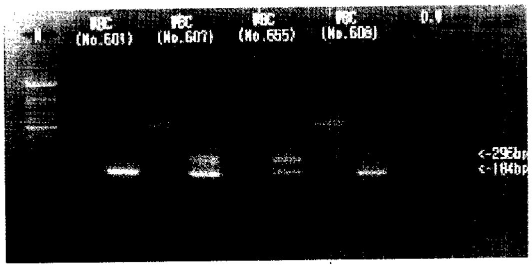


Fig 12. PCR patterns for CAEV.
First PCR product : 296 bp, nested PCR product : 184 bp, Lane M : 100 bp DNA ladder, Lane 1, 2, 3, 4 : PBL extracted from healthy animal, Lane 5, 6, 7, 8 : PBL extracted from diseased animal, Lane 9, 10 : D. W. (control)

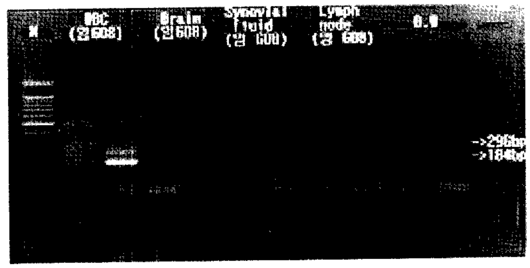


Fig 13. PCR patterns for diseased animal showing severe clinical signs. First PCR product : 296 bp, nested PCR product : 184 bp. Lane M : 100 bp DNA ladder, Lane 1, 2 : PBL, Lane 3, 4 : brain, Lane 5, 6 : Synovial fluid, Lane 7, 8 : mesen- teric lymph node, Lane 9, 10 : D. W. (control)

고 찰

충북 관내 농가에서 사육 중인 유산양은 1994년부터 주로 호주와 뉴질랜드에서 수입되었으며, 당시 수입위생검역조건에서 CAE는 별도로 관리하지 않았으나 1999년 12월 7일부터 호주 및 뉴질랜드산 우제류 동물 및 그 생산물의 수입위생조건에 따라 검역 후 수입이 허용되기 시작했다. 그동안 국내에서는 만성적인 영양실조와 단순관절염, 외상 등으로 오인하여 추정되는 원인에 의하여 문제시 되지 않아 발생확인이 공식적으로 이루어지지 않았었다. 산양의 CAE는 전세계적으로 효과적인 예방약이나 치료제는 없는 것으로 알려져 있다. 그러나 일본의 경우를 보면 사육축에 대한 CAE 항체 검사 후 감염축을 제거하며, 수직감염을 예방하기 위해 분만과 동시에 어미와 새끼를 격리하여 사육하고, 초유는 저온처리 (56℃, 60분)하여 새끼에게 급여하거나 인공초유 및 대용유로 급여함으로써 청정화에 성공한 사례가 있다. 또한 CAE 항체 양성 농장에 대해서는 항체음성군과 양성군을 격리사육하며, 질병의 지속적인 감염을 예방하기 위해 페놀 또는 4급 암모니아 혼합액을 사용하여 사육용 기자재의 주기적 소독을 실시하는 것이 바람직하다.

본 질병은 현재까지 국내 발생사례가 없어 현행 가축전염병예방법상 법적 관리를 받지 못하고 있는 실정이나 금회 발생확인 됨으로 인하여 향후 증가가 예상되는 유산양 농가의 피해방지를 위한 적절한 방역대책을 마련할 필요가 있다. 또한 CAE의 감염이 유산양에 흔하게 발생되는 점이 없지 않아 있지만, 모든 품종의 산양에서 감수성이 있다는 문헌적 자료[7]를 고려하여 볼 때, 한국산 재래산양의 감수성 여부에 대한 정밀 역학조사가 필요한 것으로 사료된다.

이번 충북 영동의 CAE 발생이 국내에서는 첫 발생인 점을 감안하여 볼 때, 각 시 · 도 방역기관에서는 관할 유산양 농가에서 사육하는 유산양 중 CAE 감염축 (항체 양성축)과 비감염축 (항체음성축)을 가려낼 수 있도록 신속하게 혈중 항체를 검출할 수 있는 AGID 법과 혈중 항체를 검출하는 신뢰도가 96%

이상으로 알려진 ELISA[2,10] 및 CAEV의 유전자 확인이 가능한 PCR 등을 진단법으로 이용할 수 있도록 실험실에 대한 지원대책을 마련하도록 힘써야 할 것이다. 아울러 타농장의 감염여부 확인 및 CAE 발생 동향을 조사하기 위해 CAE 비 발생 농장과 흑염소 사육농장에 대한 혈청학적 모니터링 검사가 꼭 필요하다고 본다. 인접 일본 동물질병연구소 사례에 따르면 2002년도에 첫 발생보고 이후 정부차원에서 청정화 사업을 전개하였으며, 청정화의 근거로 발생농장에 대한 감염 및 예방수칙 지도, 정기적인 혈청검사 결과 양성 개체의 도태, 양성군의 정기검사 결과 3회 이상 연속 음성 판정 시 청정농장으로 인증하여 2002년도 발생 이후 현재에 이르러서는 전국적인 청정화 선포단계에 있다. 다행히 국내에서 유산양 사육농가는 제한적이고 그 수가 많지 않아 비교적 초기단계에서 국가적 차원에서 방역 및 청정화 사업에 힘쓸 경우 감염이 만연되거나 상황이 심각해지기 전에 청정화가 가능할 것으로 보이며, 스위스의 CAE 청정화 program[11]같은 경우 좋은 본보기가 된다고 할 수 있다.

아직까지 본 질병에 대한 유효한 백신이 없는 관계로 CAEV에 대한 효과적인 백신 및 치료법 개발에 대한 연구가 더 진행되어져야 할 것이며, 한국산 재래 산양(흑염소)에 대한 CAE 감수성 연구 및 전국적인 유산양 농가에 대한 예찰활동이 강화되어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

충북 영동에서 발생된 산양의 관절염 발생 사례는 임상증상, 병리조직소견, 혈액 등의 CAEV 핵산검출, CAEV 표준주와의 96% 상동성이 확인되어 국내 최초로 "산양의 관절염·뇌염(carprine arthritis-encephalitis : CAE)으로 확인보고하며, 역학조사, 임상증상, 조직병리학적 소견 등을 기초로 CAEV의 유전자 검출 및 확인에 의한 진단법을 수립하였다.

참고문헌

1. Konishi M, Tsuduku S, Haritani M, et al. 2004. An epidemic of caprine arthritis encephalitis in Japan : isolation of the virus. *J Vet Med Sci* 66(8) : 911-917.
2. Herrmann LM, Cheevers WP, McGuire TC, et al. 2003. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus : diagnostic tool for successful eradication. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(2) : 267-271.
3. 최원필, 강신영, 고홍범 등. 1996. 최신수의미생물학·면역학. 경북대학교출판부, 대구 : 314-316.
4. 최원필, 송희종, 김순재 등. 1994. 수의전염병학. 경북대학교출판부, 대구 : 158.
5. Saman E, Van Eynde G, Lujan L, et al. 1999. A new sensitive serological assay for etection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(5) : 734-740.
6. Morin T, Guiguen F, Bouzar BA, et al. 2003. Clearance of a productive lentivirus infection in calves experimentally inoculated with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol* 77(11) : 6430-6437.
7. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic

animals. 8 eds. Cornell University Press, Ithaca : 873-875.

8. Le Jan C, Bellaton C, Greenland T, et al. 2005. Mammary transmission of caprine arthritis encephalitis virus : a 3D model for *in vitro* study. *Reprod Nutr Dev* 45(4) : 513-523.
9. Pisoni G, Quasso A, Moroni P. 2005. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks : evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339(2) : 147-152.
10. Herrmann LM, Cheevers WP, Marshall KL, et al. 2003. Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(5) : 862-865.
11. Shah C, Huder JB, Boni J, et al. 2004. Direct evidence for natural transmission of small ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J Virol* 78(14) : 7518-7522.

도축한우에서 발견된 결핵병

변현섭[1], 이현주[1], 이상명[1], 한성태[1], 곽학구[1], 최해연[1], 조윤상[3], 안병우[2]

충청북도축산위생연구소[1], 충북대학교 수의과대학[2], 국립수의과학검역원[3]

Bovine tuberculosis found at slaughtered Korean native cattles

Hyeon-seop Byun[1] , Hyun-ju Lee[1], Sang-myung Lee[1], Seong-Tae Han[1], Hak-Koo Kwak[1], Hae-Yeun Choi[1], Yun-Sang Cho[3], Byung-Woo Ahn[2]

[1]*Chungbuk livestock and Veterinary Service Laboratory, Cheongwon 363-931, Korea*
[2]*The Collage of Veterinary Medicine, Chungbuk National University*
[3]*National Veterinary Reserch & Qarantine Service, Anyang, 430-824, Korea*

Abstract

There were eight Korean native cattles affected with bovine tuberculosis(BTB) detected by inspectors at slaughterhouses located in Chung-buk province from May 2006 through July 2007. Postmortem finding of BTB cases was characterized by the presence of several caseous or calcified nodules encapsulated by connective tissue from the pleural/peritoneal surface, liver, lung and neighboring lymph nodes. On microscopic examination to the lesion, microscopic typical lesions and characteristic cells of BTB could be observed such as calcified zone stained with hematoxylin densely at the center of the nodule and necrotized tissue and cell debris surrounded by epithelioid cells, macrophages and a few Langhans' type giant cells. In addition, lymphocytes and fibroblasts was also seen. At the periphery of this lesion, fibrosis was found that prevent further infect to the surrounding healthy alveolar tissue.

Key words : Bovine tuberculosis, Korean native cattle, Postmortem/histopathological findings

서 론

소 결핵병은 *Mycobacterium bovis*에 의한 만성 소모성 질환으로 결핵 결절 형성을 특징으로 하는 제2종 법정가축전염병이며 동시에 인수공통전염병이다[1)]. 사람으로의

전파는 주로 감염된 소의 고기나 우유를 생으로 먹었을 경우로 감염된 사람은 폐와 내장에 결핵 병변이 유발되고 쇠약해지거나 사망에 이르게 된다[2].

최근 우리나라에서는 결핵환자 발생의 증가가 사회문제시 되고 있다. 질병관리본부 및 대한결핵협회의 자료에 의하면 월 3,000명 정도의 신규 환자가 발생하고 있고, 결핵환자 사망률 또한 OECD 국가 중 최고라 한다.[3),4)] 이처럼 발병이 증가하는 원인에는 환자관리 소홀로 인한 사람 간 호흡기 전파가 주된 이유겠지만[4)] 축산물을 통한 감염 가능성 또한 염두해 봐야 할 것이다.

축산물 중 우유를 통한 결핵의 감염은 살균처리가 일반적이지 않았던 1950년대 이전에는 폐결핵 원인의 약 30%는 우형결핵균이었으나[5)] 대부분 우유를 살균 처리하는 오늘날에는 우유 섭취를 통한 위험은 거의 없다. 그렇지만 우유와 달리 살균과정 없이 축산물을 생식을 하는 경우라면 여전히 위험성은 남아있다. 특히 결핵에 이환 된 것인지 모르고 식육을 생식했을 경우 즉, 소의 간, 비장, 고기 등을 세척 외에 별다른 처리 없이 날 것으로 먹는 음식문화를 가진 우리나라 경우에 있어 더욱 그러하다. 감염 식육이나 부산물의 섭취를 통한 결핵환자 발생에 관한 조사나 연구는 실시되지 않아 관련 자료는 살펴볼 수 없었으나 여러 면에서 결핵과 유사한 인수공통전염병인 부루세라가 직접적인 가축과의 접촉이 없었음에도 평소 날고기와 생간을 자주 생식했던 도축장 근무자나 식육처리업자에게 발생했다는 정 등의 보고서[6)]는 결핵 또한 충분히 생식을 통해 감염될 수 있음을 짐작케 한다.

최근 충북지역 소재 도축장에서 결핵병에 걸린 한우가 발견되어 폐기되는 사례가 8건 있었다. 도축검사 과정에서 결핵에 걸린 한우를 발견하여 폐기하는 경우는 매우 드문 일이나 높은 관심을 가져야 할 부분으로 여겨진다. 따라서 본 사례 보고를 통해 잘 비육되고 건강한 소에서도 결핵병변이 나타날 수 있음을 알려 검사업무에 종사하는 자들의 주의를 환기시키고 지속적인 자료 수집을 통해 검사업무의 정확성과 신뢰도를 높여 안전한 축산물 공급에 기여하고자 한다.

증 례

증례별 발생부위 및 특징

Table 1. Examples of slaughtered Korea native cattles affected with bovine tuberculosis found at slaughter houses

Case	Sex	Age	BW(kg)	Region	Date
1	f	3	400	충남공주	06.03.07
2	f	2	550	충남천안	06.06.26
3	f	3	510	충남연기	06.06.27
4	m	2	700	전남장수	06.09.13
5	f	4	470	충북청원	07.02.05
6	m	1	670	경기수원	07.02.08
7	f	3	400	충남연기	07.03.13
8	f	4	620	충남예산	07.06.21

2006년도와 2007년 상반기에 걸쳐 충북지역 도축장으로 출하된 소 49,916두에 대한 생체 및 해체검사 결과 총 8건의 우결핵 이환 한우가 발견되었다(Table 1). 각 증례별로 나타나는 병변의 발생부위와 특징은 Table 2 에 정리하였다.

육안 소견

결핵 이환우에서는 공통적으로 도체의 복벽이나 흉벽에 0.5~1cm의 광택이 있는 진주 모양의 노란색 결절이 다발하였으며 경우에 따라 여러 개의 결절이 서로 융합되어 부정형으로 존재하였다. 각각의 결절은 결합조직에 둘러 싸여 흉벽에 단단히 부착되어 있고 칼로

Table 2. Characteristics of the affected cattles and their organs which nodules have formed.

Case	Organs	Characteristics
1 2 3	• pearl disease	• thoracic wall and lung • pleural and abdominal surface
4	• no lesions at lung • severe calcified nodules • young cattle	• liver • mediastinal LN
5	• severe swollen LN(10cm*8cm) • caseous necrosis	• associated LN with respiratory tract • lung paranchyma
6	• young cattle	
7 8	• emaciation • swollen superficial LN • pearl disease • caseous necrosis	• lung and associated LN • heart and pericardial sac

* LN = lymph node

절개시 모래를 써는 느낌을 주었다.

흉막과 복막의 표면에는 1~2mm의 붉은색 피하 반점들이 산재하고 우유빛의 뿌연 물질들이 복막 전체를 뒤덮고 있었으며, 복막의 절개면은 두터워져 있었다(Fig 1).

폐의 허탈은 관찰되지 않았으며 폐의 표면과 심부에는 직경 2~3cm의 표면이 거친 누런색 결절이 흰 막에 둘러싸인 채 표면과 심부에 돌출되어 존재하였다(Fig 2).

폐의 종격림프절은 정상보다 5~6배 정도 커져있고 잘랐을 때 실질은 소실되었고, 누런색과 회백색의 과립상 내용물이 막에 싸인 채 구획되어 대체되어 있었다. 내용물은 매우 단단하며 모래를 써는 느낌을 주었다(Fig 3).

간의 표면에도 복벽에서 나타나는 것과 같은 결절이 산발적으로 나타났고 심부에는 흰막에 둘러싸여 주위 조직과 명확히 구분되는5~6cm의 과립상의 누런색 내용물이 존재하였다.(Fig 4)

병리조직학적 관찰

병리조직학적 소견을 관찰하기 위하여 육안상 분별 가능한 병변 부위와 부속림프절 및 주요 실질장기를 Table 2와 같이 채취하였다.

Table 2의 장기 중 결절부위를 중심으로 적당한 크기로 잘라 10% 중성 포르말린에 고정한 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 H&E 염색(Hematoxylin & Eosin stain)을 실시하였다. 관찰 결과 복벽 결절을 비롯해 간, 폐 등에서 나타나는 조직병리학적 소견은 증례마다 유사했다.

저배율 관찰시 결절 중심부에서는 칼슘 침착으로 Hematoxylin에 진하게 염색되는

부분이 있었으며 주위에는 호산성으로 염색되는 괴사된 세포 및 파편들이 존재하였다. 결절의 가장자리에서는 섬유아세포의 증식과 결합조직의 형성이 두드러졌다.(Fig 5)

고배율에서는 결절의 중심에 괴사된 세포 파편들이 산발적으로 존재하고 원형이나 난원형의 세포질이 풍부한 유상피세포(Epithelioid macropahge)와 대식구가 혼재하고(Fig. 6) 여러 개의 핵이 세포질 가장자리에서 말발굽 형태의 랑한스 타입 거대 세포(Langhans' type multinucleate giant cell)도 산발적으로 나타났다(Fig 7). 결절의 가장자리로 갈수록 세포질이 거의 없고 둥글고 진한 핵을 가진 림프구와 난원형의 형질세포(plasma cell)가 섬유아세포와 결합조직 사이에서 관찰되었으며 결절의 외곽은 섬유조직에 의해 둘러싸여 있었다. 섬유조직 내에는 모세혈관이 형성되어 적혈구 또한 관찰되었다.(Fig 8)

Fig 2. The cut surface of the lung. Several pulmonary nodules(arrow) have protruded from the cut surface. Rightmost nodule contained cheese-like materials(arrow head).

Fig 1. Lots of yellowish single nodules or clusters resembled "pearl" have occured on the surface of peritoneum and diaphragm. This presentation has been termed "pearl disease"

Fig 3. The mediastinal lymph node has lost lymphatic architectural pattern. It has been replaced by yellowish caseo-calcarious materials. When you cut typical tuberculosis lesions like above with a blade, you can feel "gritty" because of the mineralization.

Fig 4. Large calcified nodule located between both thumbs is present in the liver(arrow). Note the caseo-calcarious pattern and gritty feeling. Several small nodules are also seen on the surface(arrow head).

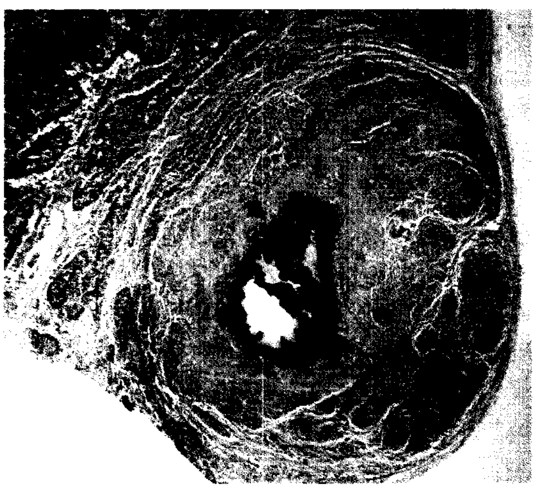


Fig 5. The entire appearance of the tubercle in the mediastinal lymphnode. At the center, calcification(arrow) stained with hematoxylin densely has occurred. From the center to the edge, the necrotized tissue debris stained with eosin could be seen. At the edge, fibrotissue is surrounding the tubercle to protect from extension of the organism.

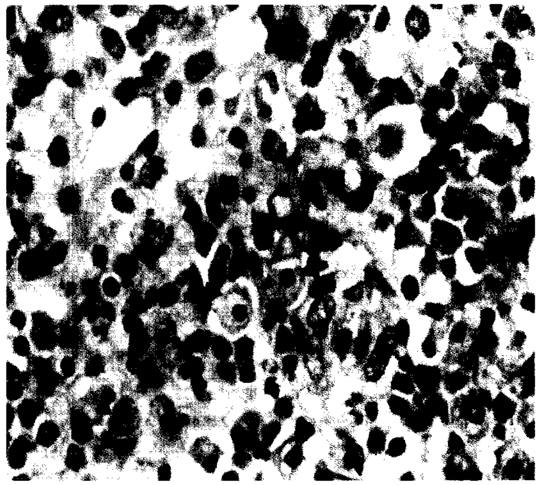


Fig 6. The epithelioid cell(arrow), an activated form of macrophage, has a large granular eosinophilic cytoplasm and rounded dark nucleus.

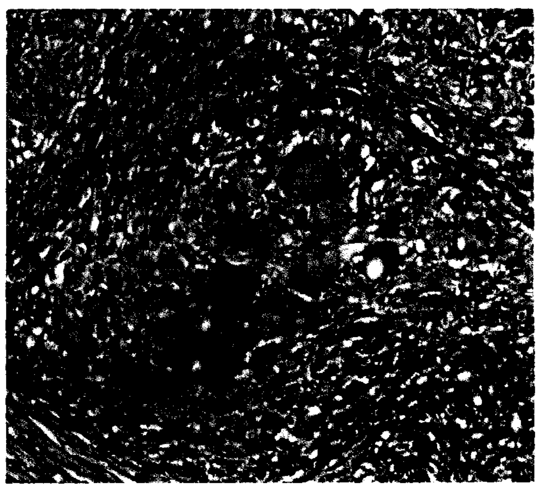


Fig 7. The Langhans' type giant cells, a characteristic cell of tuberculosis, have formed by fusion of two or more activated macrophage into one large cell having two or more horse shoe-like nuclei at the periphery of cytoplasm

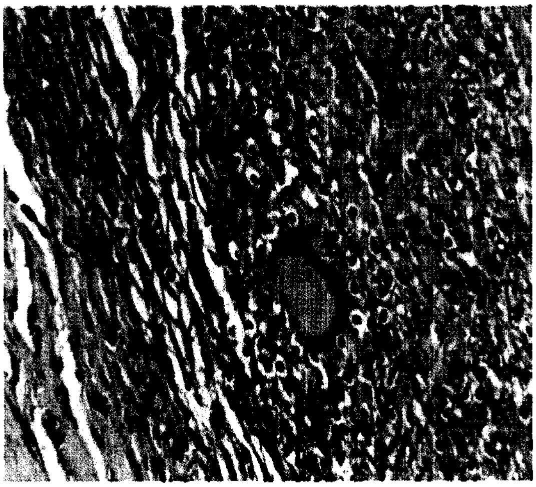


Fig 8. At the periphery of tubercle. Fibrosis has occurred(arrow). Multiple fibrotissues run like a stream. The capillary has also formed.

고 찰

8건의 우결핵병 증례에서 나타나는 병변의 공통된 특징은 폐, 간과 같은 실질장기와 체강벽에 다양한 크기의 석회화된 결절(tubercle)이 형성되었다는 점이다. 결절의 형성 부위는 균의 침입 문호에 따라 다르게 나타나는데 일반적으로 성우에서는 호흡기 감염이 주로 이루어지며 폐와 주위 림프절에서 결절이 형성된다. 송아지에서는 오염된 우유에 의한 소화기 감염이 주된 경로로 장이나 장간막 림프절, 간의 실질에서 형성 된다[2].

기도를 통해 침입한 균이 폐포에 도달하면 호중구나 폐포 대식구에 의해 탐식 된다. 그러나 탐식이 되더라도 세포벽 성분 중 glycolipid 등에 의해 파괴되지 않고 대식구 세포질 안에서 분열 증식 하여 대식구를 파괴하고 더욱 분열 증식한 후 공기를 타고 세기관지를 따라 폐 전체로 확산한다. 균이 림프계까지 침입하게 되면 림프액을 따라 폐의 부속림프절인 기관 기관지림프절과 종격림프절에서 정착하여 병소를 형성하며[7,8] 이러한 폐와 부속 림프절의 초기 병소를 primary tuberculosis(Ghon complex)라 한다.

만일 균이 primary tuberculosis에만 머물지 않고 대식구의 이동에 따라 림프관과 혈관을 타고 전신으로 확산될 경우 전신 장기와 관련 림프절에 수많은 노란색의 결절을 형성되게 되는데 이를 miliary tuberculosis라고 하며, 시간이 경과함에 따라 결절이 단독 혹은 융합되어 복벽이나 흉벽에서 진주 모양으로 다발하게 나타나는 경우를 진주병(pearl disease)이라 한다[8].

결절의 건락화는 숙주의 세포매개성 과민 반응과정에서 실질세포가 손상을 받아 유발된다. 손상된 세포와 원인균의 파편이 크림양으로 나타나며. 시간이 더 경과하면 칼슘염이 침착되고 굳어져 석회화되고 결절의 가장자리는 섬유조직이 증식함하여 하얀 막으로 둘러싸이게 되는데 도축 검사시 이와 같은 석회화된 결절은 해당 개체를 이환우로 잠정 진단 할 수 있는 주요 지표가 된다. 그러나 만약 결절이 석회화 되지 않았거나 경우에 따라 농과 같은 크림양의 내용물이 존재하는 경우에는 만성의 경과를 취하는 화농균에 의한 농양과 유사하여 구분이 필요하다.(Table 3)

육안적으로 명확한 구분은 어렵지만 일반적으로 농양은 원형이며 두터운 결합조직성 피막에 의해 싸여있다. 절개 시 안쪽에는 액상의 농이 가득 차있으며, 농의 색깔은 존재하는 균이 생성하는 색소에 따라 회색에서 크림색, 녹색, 붉은색 등으로 다양하게 나타난다.
(노란색 : *Staphylococcus*와 *Streptococcus*,
녹 색 : *Pseudomonas aeruginosa*,
붉은색 : *Serratia marcescens*)[8]. 반면 건락화된 결핵결절은 결합조직에 의해 피막화된 것과 내용물이 크림양인 것은 농양과 유사하지만 외형적으로 특정한 형태가 없는 부정형이며 절개시 크림양 내용물이 실질조직 사이사이에서 혼재되어 존재한다는 점에서는 어느 정도 차이는 있으며 내용물의 성상 또한 농과

Table 3. The examples of the differentiation between chronic abscess and caseous tubercle

	Chronic abscess	Caseous tubercle
Appearance	Round shape surrounded with fibrous capsule and contained yellow-whitish pus at the inner space	Round to oval and firm. but almost irregular shape
Cut surface	Purulent to caseous	Caseous to crumbly exudate sometimes laminated and mineralized
Growth rate	Tend to grow faster	Several weeks
Histopathology	Liquified pus having lots of neutrophils and tissue debris admixed with degenerating macrophages, lymphocytes and bacteria[11]	Epithelioid cells and macrophages Langhans' type giant cells Acid fast bacilli

유사하게 보이지만 이는 초기 결핵 병변에서 형성된 경우로 시간이 지나면 굳거나 딱딱하게 변하게 된다. 이러한 결절을 이용해 항산성 염색을 실시할 경우 농에서는 볼 수 없는 붉은 색으로 염색되는 간균을 관찰할 수 있다. 그렇지만 석회화가 심하게 진행된 경우에서 있어서는 항산성균을 확인하기가 어렵다[8].

병리조직학적으로 농양은 중심부에 괴사소와 농이 존재하고 농과 피막 사이에 대식구 및 림프구가 주된 세포로 나타난나[11] 결핵결절의 경우 시간 경과에 따라 다양한 종류의 단핵구성 염증세포(mononuclear cell)가 나타난다. 건락화 되지 않은 초기에는 림프구에 의해 활성화된 epithelioid cell과 대식구가 주로 존재하고 경우에 따라 이들이 서로 융합하여 하나의 Langhans' type giant cell도 나타나고 림프구, 형질세포, 대식구는 결절의 가장자리에서 주로 분포한다. 시간이 경과하여 세포매개성 과민반응이 유발되고 건락성괴사가 일어나면 결절 중심부에는 침착된 칼슘으로 인해 호염기성으로 나타나고 그 주변부는 파괴된 세포 파편으로 호산성을 나타낸다.

결절의 가장자리에서는 섬유아세포 증식에 따른 섬유조직의 형성이 두드러진다.[8),11)]

도축검사 시 소에서 결핵과 유사한 병변을 형성함으로서 감별해야하는 질병으로는 가성결핵과 요네병이 있다. 가성결핵은 주로 면양이나 산양에서 하악이나 목, 종격림프절, 폐, 간장, 피하조직 등에서 건락성 병변을 형성하며 말, 돼지, 소에서도 발생했다는 보고가 있다. 요네병 또한 주로 면양, 염소, 사슴에서 발생하나 소에서는 드물게 나타난다[9].

지금까지의 우결핵에 병변의 여러 특징과 구분해야할 것과의 차이점에 대해 기술해 보았다. 금회 우결핵병 증례를 토대로 축산물 검사에 유용하게 활용 할 수 있을 것으로 사료되며 향후 진단법의 개발에 대해 심도 있는 조사 연구를 수행하고자 한다.

결 론

도축장에서 도축검사 중 발견된 결핵병 이환한우 8두의 병변에 대한 육안적/조직병리학적 관찰을 실시한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 생체검사 과정에서 결핵병에 대해 무증상의 소였으나 해체검사 결과 복벽과 흉벽, 간, 폐 등의 실질 장기 및 부속 림프절에 다양한 크기의 결절이 형성되어 있었다.

2. 결핵결절에 대한 조직병리학적 관찰 결과 괴사소를 중심으로 epithelioid cell과 대식구가 주를 이루고 Langhans' type giant cell과 림프구, 형질세포 등이 나타나는 육아종성 염증이 관찰되었다.

참고문헌

1. 수의전염병학교수협의회. 1997. 수의전염병학. 경북대학교 출판부. 67-70
2. 한국수의공중보건학회. 1989. 한국수의공중보건학. 문운당. 69-72.
3. 질병관리 본부(www.cdc.go.kr). 2006. 보도자료(결핵 없는 세상을 위하여). 국내 결핵 현황 및 국제 현황.
4. 대한결핵협회(www.knta.or.kr). 통계자료. 연도별 결핵신환자 발생추이
5. 성명숙, 김신, 김상윤 등. 1997. Tuberculin(PPD) 양성 반응 우에 나타난 결핵 결절 및 림프절의 시험동물 접종 및 균분리 동정에 관한 연구. 한국가축위생학회지. 20(2): 205-2156.
6. 정성수, 김성범, 박대원등. 2004. 감염된 가축과의 직접 접촉 없이 발생한 브루셀라증 환자1례와 축산 부산물 시장에서의 역학조사. 감염과 화학요법. 36(3):170-174
7. J.M. Pollock, J. D. Rodgers, M.D. Welsh. 2006, Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection, *Veterinary Microbiology*, 112:141-150.
8. M. Donald McGaviin, James F.Zachary. 2006. Pathologic basis of veterinary disease 4th edition. Mosby. 22～23, 156～157, 163～165, 526～527.
9. 김용한. 2002. 우결핵(Bovine Tuberculosis). 한국수의병릭학회지. 6(2):53-60.
10. Kumar, Abbas, Fausto. 2006. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease 7Th edition. Elsevier saunders. 82～83, 381～386.
11. 박남용. 1999. 수의병리조직 칼라 아틀라스. 전남대학교 출판부. 62, 99.

도축출하 소에서 발견된 요독증 증례

김덕순[1], 이은정, 박장홍*

축산위생연구소북부지소, 가축위생방역지원본부충청북도본부*

Uremia in slaughtered cattle

Duk Soon Kim[1], Eun Jeong Lee, Jang Hong Park*

Northern Branch, Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Chungju, 380-230, Korea
*Chungbuk branch, Livestok Health Control Assosiation Cheongju, 360-809 Korea**

Abstract

Uremia was diagnosed in a slaughtered 20-month old cattle. It had no special clinical signs, but many lesions due to uremia observed at post-mortem inspection. It had a lot of ascites. Kidney and urianry bladder, ureter were enlarged, congested, hemorrhagic, and it slightly smelled nasty. However, the precise cause of uremia could not be determined.

Key word : Uremia, Kidney, Urinary bladder, Bull

Introduction

혈중의 단백질 또는 아미노산의 질소성 최종 대사물질이 정상보다 높은 농도로 존재하는 것을 질소혈증이라 하며, 이러한 질소혈증과 더불어 기면, 우울, 식욕부진, 구토, 체중감소 등의 임상증상을 동반한 것을 요독증이라 하고, 신장 기능 부전으로 나타나는 전신성 병변과 임상 증상과 관련된 증후군으로 정의할 수 있다. 요독증은 요로결석, 신장염, 중독 등에 의해 나타날 수 있다.[1,2)]

요독증에 의한 병변은 만성신장질환과 함께 하나 또는 그 이상이 나타날 수 있다. 신장은 신장질병의 종류와 그것의 진행정도에 따라 병변이 나타난다. 식욕부진과 단백질 소실, 독소에 의해 악액질이 발생하고 혀의 아래나 가장자리에서 궤양성 구내염이 나타날 수 있다.

요독증에 걸린 동물은 종종 조혈호르몬의 감소와 적혈구 파괴로 인해 빈혈이 나타난다.

또한 위 점막이 발적되고, 출혈이나 궤양이 나타날 수 있다. 위염은 구토와 식욕부진을 야기한다. 위장 내용물에 혈액이 포함되고, 암모니아 향이 나타난다. 지속적인 단백질 감소로 인해 저단백혈증이 나타나 체내 삼투압 불균형이 발생하여, 혈액내 Fluid가 조직으로 소실되어 전신부종이 나타난다.[1-2)]

Stymptom

도축장에 출하된 20개월령의 수소에서 anorexia 이외에 외견상 특별한 임상증상이

없었으나 해체검사 결과 요독증으로 보이는 소견이 있어 폐기되었다. 부검소견은 복수가 가득 차 있었으며, 신장 및 방광, 요관에 비대, 출혈, 괴사 등의 심한 염증소견이 나타났다. 복막 및 백내장의 충혈소견도 나타났다. 복부 전체가 근육수종을 보였고, 지육에서 이상취가 발생하였다. Fig 1은 신장을, Fig 2는 방광을 찍은 사진이다.

Discussion

신장은 대사산물을 제거하기 위해 뇨를 형성하고, 체내의 체액을 일정하게 유지, 조절하며, erythropoietin, rennin, vitamin D_3와 같은 호르몬을 생성하는 기관이다. 신장은 대량의 혈액이 통과하는 기관으로 신장에서 나온 혈액은 전신순환을 통해 다른 장기 및 조직으로 되돌아간다.[1,3] 따라서 신장에서 발견되는 병변은 다른 장기와 지육전체의 질병과 결함의 식별에 매우 중요한 지표가 된다.

Fig 1. Kidney. enlarged, hemorrhagic

Fig 2. Urinary bladder and Ureter.
enlarged, hemorrhagic, ecrotizing

신장기능 장애에 영향을 미친 원인균이나 독소가 다른 장기나 조직에도 존재할 가능성이 높기 때문이다. 본 케이스의 경우, 심한 복수와 지육에서의 이상취로 미루어볼 때, 오랜 신장기능장애로 인해 요독증이 발생했다고 판단되어진다. 하지만 요독증을 일으킨 일차적인 원인은 불분명하다.

Referances

1. M. Donald McGavin, James F. Zachary. 2006. Pathologic basis of veterinary disease. 4th ed. Mosby. St. Louse : 641-645
2. Dae-Yong Kim. 1999. Systemic veterinary pathology : 1-27
3. Won-Il Jeong, Sun-Hee Do, et al. 2006. Canine renal failure syndrom in dogs. *J. Vet. Sci.* 7(3) : 299-301

가축전염병 분류의 새로운 개편

박재명[1], 이종진

충청북도축산위생연구소북부지소

Reclassification of an Legal Communicable Disease

Jae-Myoung Park[1] Jong-Jin Lee

Northern Branch, Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Chungju, 380-230, Korea

개 요

강학상의 전염병이란 병원체가 인간이나 동물에 침입하여 그 장기(臟器)에 자리 잡고 증식하는 것을 총칭하여 감염(感染)이라고 하며, 이 감염에 의한 증세의 발현을 감염증이라고 한다. 감염에는 전혀 증세가 없이 면역만 생기는 불현성 감염과, 증세가 나타나는 현성 감염이 있으며 때로는 감염증과 전염병을 동의어로도 쓰이기도 한다.[1] 반면, 행정법상의 가축전염병이라 함은 가축전염병예방법에서 정한 소 등 15개 축종(소・말・나귀·노새·면양·산양·칠면조·오리·거위·돼지·개· 닭·꿀벌·사슴·토끼)과 동법 시행령에서 정하는 2개 축종(고양이, 타조)에서 발생하는 제1종 가축전염병 15종과 제2종가축전염병 29종, 그리고 가축전염병예방법시행규칙에서 정한 18종의 전염병을 의미한다.[2] 이와 같이 법으로 제정한 목적은 동 질병에 대해 국가 또는 지방자치단체가 관여하여 동 질병의 발생이나 퍼지는 것을 막음으로써 축산업의 발전과 공중위생의 향상에 기함을 그 목적으로 하고 있다. 현행 가축전염병예방법상 제1종과 제2종가축전염병의 분류의 기준은 OIE에서 정하는 전염성이 가장 강한 list A급 질병 15종을 제1종 전염병으로 규정하였고,[3] 제2종 전염병은 국내 발생의 빈도, 인체감염의 여부, 축산업의 피해 규모 등을 고려해서 가축전염병예방법 또는 가축전염병예방법 시행규칙에서 별도로 정하고 있다.

각 전염병 群별 방역규정을 살펴보면 제1종 가축전염병에 대해서 '격리와 가축사육시설의 폐쇄 명령 등'을 규정하고 있으며, 시장군수가 살처분을 명할 수 있으며, 그중에도 특정질병(6종 : 우역, 우폐역, 구제역, 돼지콜레라, 아프리카돼지콜레라, 고병원성조류인플루엔자)은 지체없이 살처분을 명하거나 도태명령의 근거를 마련하고 있다. 제1종 전염병 중에서도 각 질병별로 조치사항이 다르게 규정 되어있고, 제2종 전염병의 경우도 질병별 처리 절차가 명확하게 규정되지 않아 동일 질병에 대해 각 자치단체별 방역규모 또는 방식 및 사후 관리에 있어서 각기 다른 방법을 취하고 있는 실정이 현실이다. 이에 비해 사람의 전염병예방법은 일단 개괄적인 질병 분류에 있어 국가에 의해 환자격리가 필요한 질병(1군, 6종), 예방접종이 필요한 질병(2군, 9종), 모니터링 및 집중 예방 홍보가 필요한 질병(3군, 18종), 방역대책 긴급 수립이 필요한 질병(4군, 15종), 유행여부 조사 및 감시대상 질병(지정 전염병 9종) 등 5개 군으로 나누어 분류하였고, 각 群별 신고방법, 처리방법 및

개괄적인 조치사항에 대한 SOP성격의 표준 규정을 만들어 각 군별 즉시 신고질병인지, 경과 후 신고가능한지 등 가축전염병예방법에 비해 비교적 구체화 되어 있다.[4,5)]

변천과정

우리나라 가축전염병예방법의 근대 역사는 1961.12.30 조선가축전염병예방령과 조선우결핵병예방령을 폐지하고, 가축전염병예방법(법률907호 1961.12.30)을 제정하여 근대적인 법령을 마련하였다. 그동안 국가의 경제·사회적 여건의 변화와 질병발생 상황에 맞추어 현재까지 12회의 개정과정을 거치면서 현재는 2005.3.31 일부 개정 법률(법률 제7434호)이 적용 되고 있다. 가축전염병예방법은 가축의 전염성질병이 발생하거나 퍼지는 것을 막음으로써 축산업의 발전과 공중위생의 향상에 기여함을 목적으로 하며, 법률과 대통령령, 부령으로 구성되었는데 질병의 특성과 경제적 손실, 국민건강에 미치는 영향을 고려하여 그때마다 변경하여 왔다.

1961년 제정당시 23종의 가축전염병을 법정전염병으로 지정한 이래 1982.4.1(법률 제3548호)에 의거 1종과 2종 전염병으로 구분하여 지정했으며, 1995.1.5(법률 제4885)호에 의해 부령에 의해 1종과 2종전염병을 추가할 수 있도록 하위 법령에 위임하기 시작하였고, 2002.12.26(법률 제6817호)는 제2종 전염병만 부령으로 위임할 수 있도록 제한하였다. (Table 1)[6)]

1961년도 제정당시에는 우역·탄저·기종저 등 23종의 질병을 전염병으로 규정하였고, 1982.4.1 법률 제3548호에 의거 우역·탄저·기종저 등 29종을 1종전염병으로, 가성피저, 수포성구내염 등 10종을 2종전염병으로 변경하였다. 1994.12.22 법률 제4796호는 구역·아프리카마역을 제2종전염병으로 추가하였으며, 1995.1.5 법률 제4885호로 1종가축전염병 26종, 2종가축전염병은 19종으로 변경하되 부령으로 추가 할 수 있도록 하여 1995.8.1 농림부령으로 6종이 추가 되었다. 또한 1997.5. 10 농림부령 제1256호에 따라 9종으로 늘었으며, 1997.9.7. 27종의 농림부령에 의한 2종전염병을 지정하였다. 이후 2002.12.26 법률 6817호에 의거 1종15종, 2종 29종으로 변경하고, 다시 2003.9.24 농림부령에서 정하는 2종전염병을 18종으로 지정하여 현재에 이르고 있다.

Table 1 전염병분류의 과정

개정일	법률번호	주요내용				비 고
		계	1종	2종	지정	
1961. 12. 30	법률 제907호	23	23	-	-	
1982. 04. 01	법률 제3548호	39	29	10	-	1, 2종으로 구분
1984. 12. 31	법률 제3762호	〃	〃	〃	-	
1994. 12. 11	법률 제4796호	41	29	12	-	
1995. 01. 05	법률 제4885호	51	26	19	6	부령으로 1,2종 지정 위임
1996. 08. 08.	법률 제5153호	54	26	19	9	
1997. 12. 13	법률 제5453호	〃	〃	〃	〃	
1999. 03. 31	법률 제5952호	57	15	15	27	OIE 질병분류 참고
2000. 01 28	법률 제6224호	〃	〃	〃	〃	
2000. 12. 29	법률 제6305호	〃	〃	〃	〃	
2001. 01. 26	법률 제6379호	〃	〃	〃	〃	
2002. 12. 26	법률 제6817호	62	15	29	18종	부령으로 2종만 지정 위임
2005. 03. 31	법률 제7434호	〃	〃	〃	〃	

분류기준

가축전염병의 지정 또는 분류기준은 당시의 경제적·사회적 여건의 변화와 질병발생 상황에 맞추어 변화된 것이며[5], 1961년 제정 당시 지정한 23종의 가축 전염병의 분류 또는 지정의 변화가 없다가, 1982년 처음으로 1종과 2종을 구분하여 39종의 법정전염병으로 대폭 확대하여 국가관리를 하였다. 이 당시의 시대적 상황은 도입우에서 발생한 기생충성 질병(타이레리아병, 아나플라즈마병 등)이 축산업계의 화두가 되었고, 이를 계기로 외래성 질병에 대한 인식변화로 이들 질병을 대폭 보강한 것으로 판단된다.(Table 1) 또 1995년은 법률에 의해서만 정했던 가축전염병을 보다 탄력적으로 대응하기 위해 부령에 의해 추가로 지정할 수 있도록 하여 전염병의 관리항목 지정에 유연성을 강조하였다.

1999년 구제역이 대만과 영국에 발생하여 재난성 가축전염병은 그 나라의 축산기반을 흔드는 결과를 초래한다는 점에 깊이 인식하여, 국제수역사무국(OIE)에서 규정한 List A 심급성 전염병을 1종전염병으로, 기타 전염병은 2종 전염병으로 분류하여 세계화 추세에 맞게 지정하였다. 1999.3.31. 개정된 법률 제5952호는 List A급의 심급성 전염병을 1종으로 정한 사례 이외에는 질병으로 인한 피해의 정도에 따라 1종과 2종으로 구별했을 것이라고 사료된다. 그러나 전염속도의 기준, 인체보건과 역학관계, 전염병 발생시 조치사항 또는 모니터링, 예방접종 허용 여부, 진단방법의 난이도 등에 의한 다양한 방법에 의해 분류되지 못하고, 조치 사항은 개별 질병별로 따로 정하고 있는 실정이다. 따라서 법을 집행하는

Table2. 1종 가축전염병의 변천과정

연도별	계	추가내역	제외내역
1961	23종 (신설)	우역, 탄저, 기종저, 우폐역, 비저, 구제역, 가성피저, 마전염성빈혈, 부루세라병, 우류행열, 류행성뇌염, 결핵병, 피로푸라즈마병, 아나푸라즈마병, 출혈성패혈증, 광견병, 돈코레라, 돈단독, 뉴캣슬병, 가금페스트, 가금코레라, 추백리, 부저병 -23종-	
1982	29종 (신설)	바베시아병, 블루텅병, 아프리카돼지콜레라, 돈수포병, 톡소프라즈마병, 가성광견병, 가금인플루엔자, 닭전염성기관염 -8종-	가금페스트,가성피저 -2종-
1995	26종	리프트계곡열, 럼프스킨병, 가성우역, 양두, 수포성구내염**, 아프리카마역, 돼지텟센병** -7종-	우행열, 유행성뇌염, 타이레리아, 바베시아, 아나프라즈마, 돼지단독, 출혈성패혈증, 톡소프라즈마, 가성광견병, 닭전염성기관염(10종)
1999	15종		탄저*, 기종저*, 비저*, 마전염성빈혈*, 부루세라병*, 결핵병*, 광견병*, 가금콜레라, 추백리*, 부저병*, 돼지텟센병* -11종-
2002	15종	고병원성조류인플루엔자 -1종-	가금인플루엔자 -1종-

*1종→2종 **2종→1종

Table 3. 2종 가축전염병의 변천과정

연도별	계	추가내역	제외내역
1982	10 (신설)	가성피저·수포성구내염·돼지전염성위장염·돼지텟센병·돈두·닭마이코플라즈마병·가성결핵·닭뇌척수염·소토스파이라병·소백혈병 -10종-	
1994	12	구역,아프리카마역 -2종-	
1995	19	소유행열*, 소아까바네병, 소이바라기병, 츄산병, 마전염성동맥염, 돼지오제스키병*, 돼지단독*, 돼지일본뇌염, PRRS, PED, AR, MG, ILT, IB*, 마렉병, IBD -16종-	가성피저,수포성구내염, 돼지텟센병, 돈두, 닭마이코프라즈마, 소토스파라이라, 소백혈병, 구역, 아프리카마역 -9종-
	(6) (신설)	IBR, 타이레리아병*, 바베시아병*, 아나프라즈마병*, 백혈병*, 마전염성유산증 -6종-	
1996	(9)	말전염성자궁염, 소해면상뇌증, 스크래피, 마전염성유산 -4종-	마전염성유산 -1종-
1999	15	탄저*, 기종저*, 부루세라병*, 결핵병*, 소해면상뇌증, 비저*, 마전염성빈혈*, 돼지텟센병*, 부저병*,구역, 광견병*, 추백리* -12종-	TGE, AE, 소유행열, 소아까바네병, 소이바라기병, 츄산병, 돼지단독, 돼지일본뇌염, PRRS, PED, AR, MG, ILT, IB, 마렉병, IBD -16종-
2002	29	소유행열, 소아까바네병, 돼지일본뇌염, MG, Q열, 스크래피**, 마전염성자궁염**, 동부말뇌염, 서부말뇌염, 베네주엘라말뇌염, 가금티푸스**, 가금콜레라, LPAI, CWD -14종-	
	(18)	소렙토스피라병, TGE, 돼지단독, PRRS, PED, AR,AE, ILT IB, MD, IBD, 오리바이러스성간염, 오리바이러스성 장염 -13종-	말전염성자궁염, 소해면상뇌증, 스크래피, 가슴티푸스 -4종-

*1종→2종, **부령→2종

일선 기관에서 어려움을 느끼고 있다. 현행 법령에서 전염병 발생했을 경우 조치상의 차이점을 살펴보면 1종과 2종의 가장 큰 차이는 살처분 명령과 사육시설의 폐쇄 가능성 여부, 사체의 재활용 여부 등이 가장 큰 차이점으로 보인다. 그러나 1종과 2종의 분류별로 조치하기 보다는 분류와 상관없이 개별적 질병에 따라 공통적인 조치사항이 많음을 Table 5를 통해서 알 수 있다.

그러나 사람의 '전염병예방법'은 '가축전염병예방법'과 달리 각 군별 전염병에 대한 정의가 되어 있으며 전파속도, 공중보건상 위해정도, 예방접종 상태 등에 따라 구체적이고 세분화해서 분류하고 있다.(Table 6)

Table 4. 현행 가축전염병

분 류	대상 전염병
제1종	우역 · 우폐역 · 구제역 · 가성우역 · 블루텅병 · 리프트계곡열 · 럼프스킨병 · 양두 · 수포성구내염 · 아프리카마역 · 아프리카돼지콜레라 · 돼지콜레라 · 돼지수포병 · 뉴캣슬병 · 고병원성가금인플루엔자 -15종-
제2종	탄저 · 기종저 · 부루세라병 · 결핵병 · 요네병 · 소해면상뇌증 · 소유행열 · 소아까바네병 · 큐열 · 돼지오제스 키병 · 돼지일본뇌염 · 돼지텟센병 · 스크래피 · 비저 · 말전염성빈혈 · 말전염성동맥염 · 구역 · 말전염성자궁염 · 동부말뇌염 · 서부말뇌염 · 베네주엘라말뇌염 · 추백리 · 가금티프스 · 가금콜레라 · 닭마이코플라즈마병 · 저병원성가금 인플루엔자 · 광견병 · 사슴만성소모성질병 · 부저병 -29종-
제2종(부령)	소전염성비기관염 · 타이레리아(Theileriosis, 타이레리아 팔바 및 애눌라타에 한한다) · 바베시아병(Babesiosis, 바베시아 비제미나 및 보비스에 한한다) · 아나플라즈마(Anaplasmosis, 아나플라즈마 마지나레에 한한다) · 소백혈병 · 소렙토스피라병(Leptospirosis) · 돼지전염성 위장염 · 돼지단독 · 돼지생식기호흡기증후군 · 돼지유행성설사 · 돼지위축 성비염 · 닭뇌척수염 · 닭전염성후두기관염 · 닭전염성기관지염 · 마렉병(Marek's dis ease) · 닭전염성F낭병 · 오리바이러스성간염 · 오리바이러스성장염 -18종-

개선방향

가축전염병은 인체 전염병보다 더욱 전염력이 강한 질병이 많으며, 그 숫자에 있어서도 인체 전염병의 숫자를 훨씬 능가하고 있으며, 산업화에 의한 가축의 대량생산, 무역자유화로 외래성 전염병의 발생은 훨씬 증가하고 있는 추세이다.

우리나라 초기 법정전염병은 그 질병명은 주로 일본에서 쓰고 있던 법령을 참고했거나 이전 일제 강점기에 제정된 '조선가축전염병 예방법'을 많이 참고했을 것으로 사료된다. 이후 수차례 개정을 통하여 현재에 이르렀으나 가축의 산업화 인한 가축 전염병에 대한 의의와 조치 방법에 대해 좀 더 현실성 있게 재정립하고 세분 할 필요가 있다고 본다. 왜냐하면 법령상 1종 가축전염병과 2종 가축전염병이 법에 의해 정의가 되어 있지 않으며, 일반 통념상의 추상적 개념으로 정립되어 있다. Table 5에서와 같이 1종 전염병과 2종 전염병간 조치사항에 있어서는 질병군별 기준으로 하기보다는 개별 질병별로 혼용되고 있으며, 때에 따라서는 2종 전염병의 방역강도가 1종 전염병보다 더 강한 경우도 있다.

개별적인 SOP가 마련된 질병을 보면 구제역, 고병원성조류인플루엔자, 뉴캣슬병, 해외악성전염병, 결핵병 및 부루세라병, 추백리 · 가금티푸스 등은 1,2종에 관계없이 고시로 제정되어 엄격하게 관리하고 있는데 반해, 발생될 때 마다 행정지시에 의해 관리되는 단순 발생보고에 지나지 않는 경우도 있다. 따라서 전염력, 발생시 사후관리 방법, 예방가능 여부 등을 고려하여 전염병의 분류를 세분화하고, 각 군별 법령에 의한 정의가 필요하며, 각 군별로 조치사항에 대한 표준화하여 종식까지 필요한 조치가 필요하다고 생각된다. 예를 들면 제1종가축전염병은 법의 목적과 가장 일치하는 질병, 즉 전파 속도가 빨라 축산업의

Table 5. 가축전염병 군별 조치사항

근거 및 주요 조치사항	1종	2종	지정	하위법령
11.12.14. 죽거나 병든 가축의 신고	즉시	즉시	즉시	
13. 역학조사	우역, 우폐역, FMD, ASF, HC, HPAI	BSE	×	
15. 검사,주사, 약물목욕,투약 (공동방역의 실시) - 소유자+농협, 방역본부, 수의사회	구제역, HC	AD	×	부령제18조
- 소유자+수의사회(주사/표시)	×	광견병	×	
- 소유자+부령에 의한 단체 중 2이상	×	BR, TB, PD, FT	×	
18. 질병관리등급의 부여 - 검사증명서 휴대의무	FMD, HC,	ND, BR, TB, AD	×	부령19조 ①의 1
-예방접종 표시의무	우역, FMD, HC	광견병	×	부령19조 ①의 2
19. 사육시설 폐쇄 - 폐쇄	○ 우역, 우폐역, FMD, ASF, HC, HPAI	△ ND, BSE, CWD	×	대통령령제6조①
- 사육제한 명령	○	○	○	대통령령제7조①
20. 살처분 명령(재량)	○	△ BR, TB, AD	-	
- 지역내 지체없이 살처분	우역,우폐역, FMD, HC, ASF, HPAI	×	×	
- 살처분을 명령(강제)	우역,우폐역, FMD, HC, ASF, HPAI	BR, TB, AD	-	부령제23조①의1,2
21. 도태의 권고 - 도태목적도축장 출하	○ (살처분 동거가축)	△ BR, TB, AD		부령제24조①의1,2
22. 사체처분의 제한 - 열처리 재활용	×	△ TB, AD, BR		대통령령 제8조
24. 발굴의 금지	3년	3년 탄저, 기종저 20년		
28. 2종전염병의 준용	법제19조제①항1호, ②항, ③항 제20조①항 본문, ②항 제21조			

※ FMD(Foot and Mouse Disease), ASF(African Swine Disease), HC(Hog Cholera), HPAI(Highly Pathogenic Avian Influenza), BSE(Bovine Spongiform Encephalopathy), AD(Aujesky's Disease), BR(Brucellosis), TB(Bovine Tuberculosis), PD(Pullorum Disease), FT(Fowl Typhoid), CWD(Chronic Wasting Disease), ND(Newcastle Disease)

발전에 저해 하며, 국제 교역에 영향을 주는 질병으로 종식방법은 이동제한, 예방접종 살처분 등을 실시하고, 제2종은 사람의 공중 보건에 관계된 인수공통전염병으로 국민공중 위생에 영향을 주는 질병으로 보건복지부와 함께 공조가 필요한 질병이며, 종식방법은 이동제한, 살처분 등이며, 제3종은 국내 예방 접종을 시행중인 질병으로 농가 자율방역으로

Table 6. 사람의 법정전염병 분류기준

분류	분류기준(법령상 정의)	분류근거
제1군 전염병	전파속도가 빠르고 국민건강에 미치는 위해정도가 너무 커 발생 또는 유행즉시 방역대책을 수립해야 하는 질병	전염병예방법 제2조 ①의 1
제2군 전염병	예방접종을 통하여 예방 또는 관리가 가능하여 국가 예방접종사업의 대상이 되는 질병	전염병예방법 제2조 ①의 2
제3군 전염병	간헐적으로 유행할 가능성이 있어 지속적으로 그 발생을 감시하고 예방대책의 수립이 필요한 전염병	전염병예방법 제2조 ①의 3
제4군 전염병	국내에서 새로 발생한 신종전염병 증후군, 재출현전염병 또는 국내 유입이 우려되는 해외유행 전염병으로서 방역 대책의 긴급한 수립이 인정되는 전염병	보건복지부령
지정 전염병	제1군 내지 제4군 전염병 외에 유행여부의 조사를 위하여 감시활동이 필요하다고 인정되어 보건복지부장관이 지정하는 전염병	보건복지부령

Table 7. 사람의 법정전염병 종류

분류	종 류
제1군 전염병	콜레라. 페스트. 장티푸스. 파라티푸스. 세균성이질. 장출혈성대장균감염증 -6종-
제2군	디프테리아. 백일해. 파상풍. 홍역. 유행성이하선염. 풍진. 폴리오. B형간염 일본뇌염. 수두 -10종-
제3군	말라리아. 결핵. 한센병. 성병. 성홍열. 수막구균성수막염. 레지오넬라증 비브리오패혈증. 발진티푸스. 발진열. 쯔쯔가무시증. 렙토스피라증. 브루셀라증. 탄저. 공수병. 신증후군출혈열(유행성출혈열). 인플루엔자. 후천성면역결핍증 (AIDS) -18종-
제4군	황열. 뎅기열. 마버그열. 에볼라열. 라싸열. 리슈마니아증. 바베시아증. 아프리카수면병. 크립토스포리디움증. 주혈흡충증. 요우스. 핀타. 두창. 보툴리눔독소증. 중증급성호흡기증후군. 조류인플루엔자 인체감염증. 야토병. 큐열 19. 급성출혈열증상, 급성호흡기증상, 급성설사증상, 급성황달증상 또는 급성신경증상을 나타내는 신종전염병증후군 -19종-
지정 전염병	A형 간염 · C형 간염 · 반코마이신내성황색포도상구균 · 샤가스병 · 광동주혈선충증 · 유극악구충증 · 사상충증 · 크로이츠펠트야콥병 -9종-

Table 8. 법정전염병의 관련조치 사항

분류	신고와 등록의 의무	정기예방접종	예방조치/건강진단
제1군 전염병	환자발생 및 발생우려시 신고인 : 진료의사, 가족, 기관장 신고시기 : 즉시신고 신고접수처 : 보건소장->시장	디프테리아와 보건복지부가 지정하는 종류	교통차단,집합제한, 음식물관리, 소독, 격리(원인균이 나오지 않을 때까지)
제2군 전염병	1종과 동일	백일해, 파상풍, 폴리오, 홍역, 기타 장관이 지정한 것	
제3군 전염병	보건소에 등록 매월보고 : 신고접수처는 1종, 2종 전염과 동일 발병7일이내 신고	결핵, B형간염	-발병기간동안 취업제한 -결핵:1년 1회, -나병:1년 1회 -성병:매개우려인 중 업종에 따라 주1회~6개월에 1회
제4군 전염병	즉시신고		
지정 전염병	7일이내 신고		

예방이 가능하나 발생시 전염력이 비교적 높아 축산업에 영향을 줄 수 있는 질병으로 이동제한과 소독을 병행해서 추가 발생이 없을 경우 종식 가능한 질병군으로 하며, 제4종은 국내 예방접종이 시행되지 않고 국내 발생이 없으나, 특히 국가에서 특별히 관여하여 모니터링이 필요한 질병이며, 제5종은 질병으로 농가 피해가 크지만 자율 방역에 의해 충분히 예방가능 한 질병으로서 홍보위주 방역토록 분류하고, 발생 통계조사를 실시한다. 또한 특정의 지방병에 대해서는 지방정부에서 별도의 전염병 지정이 가능하도록 위임근거를 두어 해당 자치단체가 주도하여 중점 관리를 유도하는 것도 바람직한 방향으로 사료된다.[5)]

참고문헌

1. 두산세계백과사전
2. 대한민국현행법령 제28-1권 가축전염병예방법
3. 일본의가축전염병예방법 대한수의사회지 33권 10호(1997.10) P619~623
4. 대한민국현행법령 제37-2권 전염병예방법
5. 우리나라 법정 전염병의 재분류 /김정순, 대한의사협회 1997.4(447권) pp386-390
6. 법제처 홈페이지(http://www.moleg.go.kr/)

HPLC를 이용한 축산물가공품의 타르색소 분석

한성태[1], 장래훈, 이진성, 유기조, 최해연

충청북도 축산위생연구소

Analysis of synthetic color additive in livestock processing products using HPLC

Seong-Tae Han[1], Rea-Hun Jang, Jin-Seong Lee, Ki-Jo Ryu, Hae-Yeun Choi

Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute,

Abstract

This study was performed to establish analysis condition of synthetic color additive in livestock processing products using HPLC that was not specified in the law, Livestock products processing standard and ingredient standard. The advantages of this method are that the detection limit consistency is low, that the simultaneous analysis is possible.

To verify validity of analysis method, simultaneous analysis of 9 standard synthetic color additives permitted in korea, R2, R3, R40, R102, B1, B2, G3, Y4, Y5, with a UV detector 254nm was carried out.

In the same condition, when Nova-pak C_{18}(3.9mm I.D × 300mm, 4㎛) was used, all colors were detected except R102 , but when Xeterra RP_{18}(4.6mm × 250mm, 5㎛) was, all colors were detected including R102.

The colors solution for analysis were eluted from 27 livestock processing products including Ham, Grinded meat, Extracted meat, Sausage.

Very desirably, 9 synthetic color additives were not found in 27 solutions.

To investigate recovery rates of colors, In order for respectively to become 50μg/㎖, it added 9 standard synthetic color additives in analytical objective samples, 3 repetitions it experimented from optimum wave length

As a result of investigation recovery rates of colors, Average 87.8% It got a very good record

Key words : synthetic color additive, livestock processing products, HPLC, simultaneous analysis, recovery rates

서 론

태양빛을 받아 자연속에서 생산된 식품의 원료들은 각기 그 고유의 색, 즉 천연색소를 지니고 있다. 천연색소는 식물성 색소로서 chlorophyll, carotenoid, antoxanthin, anthocyanin, flavonoid 등과 동물성 색소 hemoglobin, myoglobin 등이 있다[1]. 색소는 소비자의 기호성을 좌우하는 중요한 요인이지만 이를 식품으로 조리·가공 혹은 유통하는 동안에 변색 또는 퇴색하기 쉬워 천연의 색을 그대로 유지하기가 매우 어렵다. 그러므로 식품에 따라서는 식품의 천연색을 보완하거나 미화하여 선호도를 높이기 위한 인공적인 착색료의 사용이 요구되어 졌다. 화학적으로 안정하고 저렴한 가격으로 공급이 가능한 합성색소가 널리 사용됨에 따라 자연계에 있는 식물에서 추출한 색소를 식품 착색에 이용하였을 때 생기는 색상의 단조로움과 가격적 부담이 크게 감소하게 되었다.

합성색소는 타르계와 비타르계로 나뉘며 타르계 색소는 아조계(azo type), 크산틴계(xanthene type), 트리페닐메탄계(triphenyl methane type)와 인디고계(sulfonated indigo type)로 분류되고 있다. 아조계는 적색제2호(R2), 적색제40호(R40), 황색제4호(Y4), 황색제5호(Y5), 크산틴계는 적색제3호(R3), 트리페닐메탄계는 청색제1호(B1)와 녹색제3호(G3); 인디고계는 청색제2호(B2)로 분류된다[1-2].

착색료로서 많이 사용되고 있는 타르색소는 석탄타르 등에 함유된 벤젠핵(benzene ring)이나 나프탈렌핵(naphthalene ring)을 이용하여 합성한 물질로서 현재 우리나라 식품첨가물공전에 식용색소 9종(녹색 제3호, 청색 제1호, 청색제2호, 적색제2호, 적색제3호, 적색제40호, 적색제102호, 황색제4호, 황색제5호) 및 그 알루미늄레이크(적색3호, 적색102호 제외, 알루미늄레이크 포함 16종)의 타르색소가 지정되어 있고, 모두 산성 타르색소에 속하며 지용성 색소는 안전성 문제로 사용이 금지되어 있는 실정이다[3].

최근에는 현재 허용되고 있는 타르색소 중 적색 제2호(R2)의 경우 쥐에서 임신율을 저하시키고 사산을 일으키는 등 배자(胚子)독성을 유발하고, 황색제5호(Y5)는 2년간 장기 투여 시 일부 개에서 체중감소와 설사를 초래하였다는 보고가 있으며 황색 제4호(Y4)의 경우에도 어린이 과민증을 유발하는 원인이 된다는 보고도 있다. 또한 적색 제3호(R3)의 경우도 미국 식품의약품청(FDA)에서 발암성 판정을 받은 바 있다[3].

외국의 허용 현황을 보면 일본 12종(4), EU 16종(5), 미국 9종(6) 등 국가마다 허용된 종류와 사용기준이 다르다. Codex나 외국의 경우에는 우리나라와 같이 사용가능한 식품만을 규정하는 것과는 달리 사용 가능식품 및 최대 사용량을 규제하는 추세다[4-6].

합성타르색소는 불특정다수에게 지속적으로 노출되고 있으며 미량이지만 인체에 다양한 경로로 흡수되기 때문에 생체기능에 변화를 가져오고 발암성 및 유전적인 독성 등 안전성에 영향을 미치게 된다는 보고가 있어, 이들에 대한 안정성 및 유해성에 대한 논란이 계속 제기되고 있다[7-8].

식품색소의 추출 및 정제에 관한 초기 방법 중의 하나가 탈지양모를 사용하는 방법(wool dyeing procedure)이며 축산물 가공기준 및 성분규격에 기재된 타르색소의 분석법에서 사용되고 있으나 염료분자의 비가역적인 화학적 변화를 초래 할 수 있는 등 몇가지 문제로 인해 검출한계농도가 매우 높은 것으로 알려져 있다[8-9].

본 연구에서는 축산물가공기준 및 성분규격의 시험방법에는 기재되어 있지 않지만 기존의 방법보다는 검출 한계농도가 낮으면서 정량적인 측정이 가능한 고속액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 우리나라에서 허용되고 있는 9종의 타르색소에 대한 분석법을 현재의 실험실 조건에 맞게 적용하고, 추후 축산물 가공품의 타르색소의 사용실태를 파악하고 사용량에 대한 기준규격 설정 및 식품의 안전성 확보를 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

위탁 계약업체에서 검사 의뢰하는 축산물 가공품 중 햄류 10종, 분쇄가공육제품 10종, 식육추출가공품 5종, 소시지 2종 총 27품목을 대상으로 하였다.

시약 표준품[10]

Acetonitrile(ACN), methanol(MeOH), hexane, ethanol(EtOH) 이상은 Merck사 제품을, ammonium acetate, ammonia water, acetic acid 이상은 WAKO사 제품을, tetrabutyl-ammonium bromide(TBA-Br)는 JUNSEI 제품을 사용하였고, 색소 표준품들은 TCI (Tokyo Chemical Industry)사 제품을 사용하였다.

색소의 정량

각 식용색소 표준품 100㎎에 물을 가해 100㎖(1000μg/㎖)로 한 후, 그 용액을 각각 100배(10μg/㎖), 50배(20μg/㎖), 20배(50μg/㎖)로 희석하였다. 그 희석용액 20$\mu\ell$를 HPLC 분석(Waters 2690 _ alliance, Waters 486 _ Tunable absorbance detector)에 이용하였으며 얻어진 피크의 머무름 시간(Retentiontime)을 비교하여 정성을 하고 검량선을 작성・비교하여 시료중에 색소의 함량을 산출하였다.

회수율

분석대상 시료를 취하여 각각 50μg/㎖가 되도록 색소를 첨가한 후 색소별 최적 파장에서 회수율을 3회 반복 실험하였다.

시료용액의 조제[10]

시료 5g을 취하여(지방을 함유한 시료의 경우는 헥산 50㎖로 2회 추출하여 지방제거) 25㎖의 물을 가한 후 때때로 흔들어 혼합하면서 80℃의 수욕 상에서 30분간 가온하였다. 원심분리(3,000RPM, 10분)하여 침전물을 제거하고 전량을 취해 1% 암모니아수로 pH를 5~6으로 조정한 후 가수하여 25㎖로 맞춘다. Sep-pakC_{18} cartridge(WAT020515,Waters)를 메탄올 10㎖ 및 0.1% TBA-Br 수용액 10㎖로 순차적으로 세정한 다음, 시료용액의 전량을 취하여 칼럼에 천천히 흘려보내 액을 용출시킨 후, 물 10㎖로 세정하였다. 이어 cartridge에 0.1% 염산-메탄올용액 10㎖ 및 1% 암모니아성 메탄올 2㎖를 순차적으로 가하여 색소를 모두 용출시킨 후 증발농축 시켰다. 잔류물에 0.5% 암모니아수 1㎖를 가한 후 물로 정확히 10㎖로 맞추고 0.45μm filter로 여과하여 HPLC용 시료용액으로 하였다.

HPLC에 의한 타르색소 분석[10-11]

Nova-Pak C_{18}(3.9mm I.d × 300mm, 4μm)을 이용하여 A용매 [0.025 M ammonium acetate (containing 0.01 M TBA-Br)/ ACN/ MeOH = 62:28:10, v/v] 및 B용매 [0.025 M ammonium acetate (containing 0.01 M TBA-Br)/ ACN/ MeOH = 50:40:10, v/v]를 조제하여 A:B = 100:0 → 0:100/10 min(curve #10), 0:100/20 min, 100:0/26 min의 조건으로 A와 B용매의 조성을 진행 시간별로 달리하는 구배 용매 조성법(gradient mode)을 이용하였다. 검출파장으로는 모든 색소가 비교적 높은 흡광도를 보이는 254nm에서 각 시료중의 타르색소 함량을 분석하였다.

결 과

합성착색료 동시분석결과

250nm 단일파장에서 각 9종의 착색료를 50ppm(50μg/㎖)으로 희석하여 동시 분석한 결과이며 녹색제3호(G3), 청색제1호(B1)는 다소 낮은 검출률을 보였으며 청색 제2호와 황색 제4호는 높은 검출률을 보였다. 그러나 적색 제102호(R102)는 전혀 검출되지 않았다.Fig 1)

동일한 조건에서 Column을 Xeterra RP_{18} (4.6mm × 250mm, 5μm)만 교체했을 경우 적색 제102호(R102)을 포함한 9종의 색소가 검출되었다. Fig 2)

Figure 1. 9종의 착색료 동시분석 결과

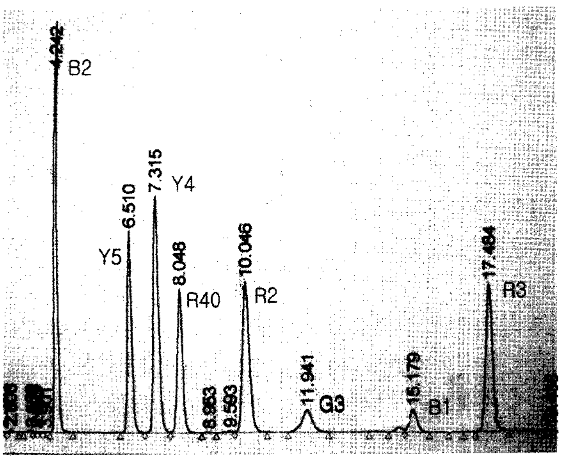
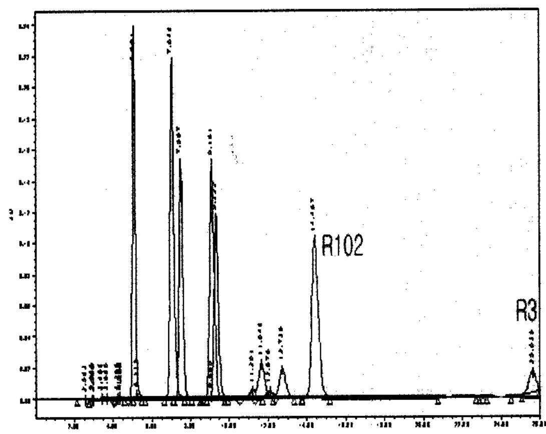


Figure 2. Column 교체 후 동시분석 결과



R2 : 적색제2호, R3 : 적색제3호, R40 : 적색제40호, R102 : 적색제102호, Y4 : 황색제4호, Y5 : 황색제5호, G3 :녹색제3호, B1 : 청색제1호, B2 : 청색제2호

색소함량 분석결과

검사시료에 대한 타르색소 함량분석결과 모두 검출되지 않았다.

타르색소의 회수율

분석대상 시료에 대한 회수율 결과는 Table 1과 같으며 햄류와 소시지류의 경우 평균 회수율은 각각 85.2%, 86.5%로써 다소 낮았으며 이는 시험용액 조제시 일부 색소가 완전히 용출되지 않거나 Sep-pak C_{18}에 대한 흡착력이 양호하지 못하여 낮은 회수율을 보였다. 또한 적색 계통은 산성 조건하에서는 광선의 영향이 크며 254nm 보다는 520nm~540nm 파장대가 적합하다는 보고에서와 같이 다소 낮은 회수율을 보였다. 254nm의 단일 파장에서 9종의 타르계 화합물을 동시분석한 결과 평균 회수율이 87.8%로 확인되었다.

고 찰

식품에 첨가되는 타르색소는 우리나라 식품첨가물공전에 식용색소 적색제2호 등 9종의 타르색소가 식품첨가물로 허용되어 있으며, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식, 조제유류, 영아용조제식, 성장기용 조제식에는 사용할 수 없으며 또한 면류, 단무지, 김치, 천연식품 등 일부 국민 다소비 식품을 포함한 47개 품목에도 사용을 허용하고 있지 않으나, 그 외 과자류, 빙과류 등 가공식품에는 사용을 허용하고 있다.

타르색소의 일일 허용섭취량은 Table 2와 같이 각 색소마다 차이가 있고 적색제2호와 적색제3호는 다른 색소에 비해 낮은 편이다.

모든 검사시료에서 합성착색료가 검출되지 않은 것은 축산물가공품의 성분규격 기준이 소시지류를 제외하고는 모든 축산물 가공품에 타르 색소를 첨가하지 못하게 되어있으며, 가공업체에서 이 기준을 잘 준수하였기 때문인 것으로 생각되며 검사한 소시지류도 타르 색소를 첨가하지 않은 제품으로 사료되었다.

9종의 합성착색료 중 청색제1호(B1), 녹색제3호(G3)의 검출률이 다소 떨어지는 양상을 보이고 있으며, 적색 제102호(R102)는 위의 동시분석 조건에서는 검출되지 않아(Figure 1 참고) 동일한 조건하에 Column을 Xeterra RP_{18}(4.6mm × 250mm, 5μm)로 교체 했을 때 14.407분에 검출되었지만(Figure 2참고) 이런 조건에서는 몇몇 다른 착색료와 피크의 머무름 시간(Retention time)이 유사하게 나타났으며 적색 제3호의 검출률도 현저히 감소되어

Table 1. Recovery rates of nine tar colors by HPLC

Tar color	A	B	C	D	Average (tar colors)
R2(Amaranth)	89.5	88.6	91.7	87.2	89.3
R3(Erythrosine)	82.4	89.5	94.6	83.2	87.4
R40(Allura red)	85.6	87.1	88.7	86.3	86.9
R102(Ponceau 4R)	87.4	88.1	89.3	87.7	88.1
Y4(Tartrazine)	88.6	89.9	91.7	88.9	89.8
Y5(Sunset yellow FCF)	89.5	91.4	93.6	90.4	91.2
G3(Fast green FCF)	81.2	84.5	87.6	85.4	84.7
B1(Brilliant blue FCF)	80.5	84.9	89.7	85.1	85.1
B2(Indigocarmine)	81.9	89.3	93.8	84.7	87.4
Average(sample)	85.2	88.1	91.2	86.5	87.8

A : 햄류, B : 분쇄가공육제품, C : 식육추출가공품, D : 소시지

Table 2. Acceptable Daily Intake(일일허용섭취량)

색소명	영문명	ADI (mg/kg · bw)
식용적색적색제2호	Amaranth	0~0.75
식용적색적색제3호	Erythrosine	0~2.5
식용색소적색제40호	Allura Red	0~7.0
식용색소적색제102호	New Coccine	0~4.0
식용색소황색제4호	Tartarzine	0~7.5
식용색소황색제5호	SunsetYellow FCF	0~5.0
식용색소녹색제3호	Fast Green FCF	0~12.5
식용색소청색제1호	Brilliant Blue FCF	0~1.25
식용색소청색제2호	Indigo Carmine	0~5.0

9종의 동시분석 조건으로서 활용하기 위해서는 용매조성의 변화, 시간(Run time)의 변화 등 다른 조건의 적용이 필요한 것으로 생각된다.

평균 회수율 87.8%는 다른 논문[8~11]의 회수율 74%~94%와 비교 시 다소 양호한 결과로 사료된다. 또한 동시 다분석법에 의해 의심되는 색소가 검출되었을 경우 회수율을 높이기 위해 시료의 특성에 맞게 전처리절차 및 최적파장 등의 변화가 필요함을 알 수 있었다.

결 론

고속액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 우리나라에서 허용되고 있는 9종의 타르색소에 대한 분석법을 현재의 실험실 조건에 맞게 적용하고자 하였으며, 추후 축산물 가공품의 타르색소의 사용실태를 파악하고 사용량에 대한 기준규격 설정 및 식품의 안전성 확보를

위한 기초 자료로 활용하고자 연구한 결과는 다음과 같다.

1. 피크의 머루름 시간 별 색소 구분
   : 적색제2호(R2) : 10.046
   : 적색제3호(R3) : 17.484
   : 적색제40호(R40) : 8.048
   : 적색제102호(R102) : 검출 못함.(Column 교체로 검출가능)
   : 황색제4호(Y4) : 7.315
   : 황색제5호(Y5) : 6.510
   : 녹색제3호(G3) : 11.941
   : 청색제1호(B1) : 15.179
   : 청색제2호(B2) : 4.242

2. 검사시료로 사용된 축산물가공품 중 햄류 10종, 분쇄가공육제품 10종, 식육추출가공품 5종, 소시지 2종 등 총 27품목 모두 타르 색소가 없는 것으로 분석되었다.

3. 평균 회수율 87.8%로 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Lee, J,O., Kim, S.H., Yoon, H.J., Lee, C.H., Park, S.K. and Lee, C.W. (1999) Study for systematic analysis of synthetic color additives in foods(Ⅱ), The annual report of KFDA, 3, 129-148
2. Moon, B.S. (1998) Food Additives, Soohaksa, Seoul, p.114-149
3. Yun, M.H., Kim, G.J., Kim, J.I., Hwang, S.I., Mun, S.K., Jung. E.J. and Kim, J.G. (2000) Evaluation of tar dyes used in commercial foods, J. Food Hyg. Safety, 15, 108-113
4. Ministry of Health and Welfare (1999) The Japanese standards for food additives (7th edition), Tokyo, Japan
5. HMSO (1995) The colours in food regulations, United Kingdom, p.185-196
6. National Archives and Records Administration (1996) Code of federal regulations. Washington, DC, USA
7. Jo, Y.H., and Han, T.S. (1997) Safe use of coloring agent and administrative status of each conutry, Food Technology, 10, 28-54
8. Yun, M.H., Kim, G.J., Kim, J.I., Hwang, S.I., Mun, S.K., Jung. E.J. and Kim, J.G. (2000) Evaluation of tar dyes used in commercial foods, J. Food Hyg. Safety, 15, 108-113
9. Brown, J.P., Dietrich, P.S. and Bakner, C.M. (1979) Mutagenicity testiong of some drug and cosmetic dye lakes with the salmonells mammalian microsome assay, Mutation Reserach, 66, 181-185
10. Ha, G.W., Kim, M.H., Oh, H.Y., Huh, O.S. and Han, U.S. (1998) Studies on genetic virulence of external use pigment, J. Food Hyg. Safety, 13, 135-142
11. Lee, J.O., Kim, S.H., Yoon, H.J., Lee, C.H., Park, S.K. and Lee, C.W. (1998) Study for systematic analysis of synthetic color additives in foods(I), The annual report of KFDA, 2, 107-115

PCR과 ELISA를 이용한 PRRS 진단 및 항체 조사

윤호규, 이종화, 김환희, 이청산

충청북도축산위생연구소북부지소

Diagnosis and antibody survey of PRRS virus by ELISA and PCR

Ho-Gyu Yoon, Jong-Hwa Lee, Hwan-Hee Kim, Cheong-San Lee

Northern Branch of Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute

Abstract

The studies were performed for the PRRS antigen and antibody detection from breeding farms, artificial insemination(AI) center and growing farms in chungju and eumsung area between March to October, 2005.

The results were as follows :

1. The results of PRRS antibody test were positive in 0% AI center, 22.5% Breeding farms and 72% growing farms by ELISA method, respective.
2. By ELISA method, PRRS antibody test were positive in 75.3% chungju and 68.7% eumsung classified by No. of test
3. By ELISA method, PRRS antibody test were positive in 80% chungju and 70% eumsung classified by No. of farms
4. Specific PRRS primers were successfully amplified ORF7 448bp on agarose gel

Key words : PRRS, ELISA, PCR

서 론

최근 국립수의과학검역원에 따르면 지난해 돼지호흡기질병 가운데 발병률이 가장 높았던 질병은 돼지생식기호흡기증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)으로 모돈에는 유산, 사산, 조산 등의 번식장애를 일으키고 자돈이나 육성돈에서는 기침, 호흡곤란, 폐렴 등 호흡기질병의 감염을 용이하게 만드는 질환으로 세균 및 타 바이러스 혼합감염 시 폐사율이 높은 질병이다. PRRS 바이러스는 Arteriviridae에 속하며 피막이 있는

RNA 바이러스로 지속감염을 유발하고 바이러스가 백혈구(대식세포)내에 살며 오랜 기간 동안 조직부위에 은거한다[1,2]. PRRS 바이러스 유전자의 크기는 약 15kb로 8개의 opening reading frame(ORF)로 구성되어 있고, 증명된 3개의 중요한 구조적 단백질로 nucleocapsid protein ORF7은 14-15 kDa, membrane protein ORF6 18-19 kDa, envelope glycoprotein ORF5 24-25 kDa이 있고, 다른 구조적 glycoprotein으로 ORF 4, 3, 2가 있다[3,4]. 또한 바이러스 strain사이에 변이가 심한 것으로 알려져 있어 환경의 변화에 잘 적응할 수 있으며 병의 근절이 쉽지 않다는 것을 의미하기도 한다. PRRS 감염여부를 진단하기 위해서는 바이러스의 분리·동정 또는 항원의 증명, 바이러스 특이항체의 검출 등이 있고, 백신을 실시하지 않은 돈군은 혈청학적 진단법인 혈청중화시험, 면역효소단층법, 간접형광항체법 (indirectimmunofluorescent antibody assay, IFA)[5], 효소면역법 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)[6,7]등이 보고되었으며, 이중 IFA와 ELISA 방법이 널리 사용되고 있다.

PRRS의 1987년 미국에서 첫 발생이 보고된 이후 유럽에서는 1990년 독일, 영국, 네덜란드 등 세계 각국에서 확인되었으며 국내에서는 1993년 처음으로 바이러스가 분리되었으며[8], 혈청학적 검사결과에 따르면 1980년대 후반부터 발생되었던 것으로 추정되고 있다[9].

PRRS가 임신돈에 감염되면 태반을 통한 감염이 일어나며 감염부위에 따라 임상증상 정도의 차이가 있을 수 있으며, 임신말기의 유·사산과 재발정 증가, 분만율 저하 등의 임상증상으로 엄청난 경제적인 피해를 초래하게 될 뿐 아니라, 웅돈의 정액을 통하여 바이러스 배출이 이루어져 인공수정(AI) 및 자연교배를 통하여 급속히 전파될 수 있는 질병[10-15]으로 웅돈의 정기적인 검사를 실시하여 감염돈은 바로 도태시키는 등 질병관리가 요구되고 있는 실정이다.

바이러스는 보통 혈중 항체가 형성되면 바이러스가 더 이상 존재하지 않는 것으로 알려져 있으나 PRRS는 항체 존재 유무와 관계없이 바이러스가 배출되는 것으로 보고되어 있다[16]. PRRS는 호흡기로 감염되면 단독적으로 질병을 일으키는 경우는 드물고 이유자돈 및 육성돈에서 대부분 세균성질병이 이차적으로 감염되어 폐사율 증가, 사료효율 저하 등을 일으키는 경우가 많다[17~20]. 특히 호흡기형은 특별한 임상증상을 관찰할 수 없기 때문에 무심코 방치함으로써 잠재적인 피해가 클 것으로 추정되며, 농장의 기본적인 사양관리와 환경의 개선 및 단계별 분리사육 등을 병행한 백신의 접종으로 개선할 수 있다고 보고되어 있다[21~23].

종돈이나 웅돈을 통한 질병 전파를 차단하는 수직전파는 임상증상이 잘 나타나지 않는 관계로 혈청학적 검사를 통하여 감염상황에 따라 감염돈을 도태하거나 예방접종을 고려한다. 감염된 돼지수가 적을 때는 도태가 바람직하며 감염된 수가 많을 때는 예방접종을 실시할 수 있다. PRRS는 번식장애와 호흡기질환이 복합적으로 나타나는 질병으로 바이러스 감염에 의한 번식장애의 주요 특징은 주로 임신말기 유산 또는 조산 태아 분만, 사산 및 미이라 자돈의 발생, 자돈의 이유전 폐사율의 급증, 이유후 폐사율 증가, 발정회귀의 지연 등이며, 이 증상들은 감염된 모돈과 그 모돈에서 태어난 자돈들에 집중되어 있다. 최근에 PMWS의 주요 질병으로 써코바이러스와 더불어 이유후 자돈의 폐사 원인의 주요 질병으로 문제시되고 있는 질병이다.

본 연구는 충북 북부지역 충주, 음성지역의 종돈장 ,AI센터, 일반 양돈장에서 사육중인 모돈, 웅돈, 후보모돈 및 비육돈에 대하여 PRRS 바이러스 분리동정을 위해 역전사 효소 중합연쇄 반응(reverse transcription and polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하고 ELISA를 이용한 돼지의 항체를 조사함으로써 감염실태와 질병확산방지 및 질병 예방의 방역 지도의 기초 자료로 활용하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

관내 종돈장 2농가에서 40두(모돈 20, 후보돈 20), AI센터 2농가는 반기별 10두씩(웅돈) 20두, 일반양돈장에서는 농가당 5두씩을 채혈하여, 충주에서 30농가(모돈 15, 비육돈 15) 150두, 음성에서 30농가(모돈 15, 비육돈 15) 150두 총60농가에서 300두를 실험에 사용하였고, PCR 실험을 위하여 전혈에서 백혈구를 분리하여 PCR을 실시하였다.

검사방법

RT-PCR : ELISA 항체검사결과 양성으로 나타난 양돈장에서 전혈에서 분리 한 백혈구를 RLT buffer 600$\mu\ell$와 샘플 300$\mu\ell$를 넣고 vortexing한 후 70% ethanol 600$\mu\ell$ 첨가하여 다시 vortexing하고, mini column에 반응액 750$\mu\ell$를 넣고 13,000rpm 1분간 원심하여 튜브 속 용액을 제거한 후 남은 750$\mu\ell$ 용액을 다시 원심후 용액을 제거하였다. 이어서 RW1 buffer 700$\mu\ell$ 첨가한 후 13,000rpm에서 1분간 원심하고 column을 새로운 튜브에 놓고 이를 2번 반복 실행한 후 column 에 용액에 남지 않도록 완전히 제거하였다. Column을 새로운 튜브에 넣고 50$\mu\ell$ RNase-free water를 첨가하여 10분후 13,000rpm에서 2분간 원심하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 Bioneer kit 및 ONESTEP RT-PCR KIT(Cat. NO. 210210, Qiagen)를 사용하여 Table 1과 같이 ORF7 primer를 사용하였다.

BIONEER : 추출한 RNA를 ORF 7, reverse primer 1$\mu\ell$를 첨가하여 70℃ 5min 반응시킨후 (template mix) Bioneer사의 RT preMIX(Cat. K-2041)에 14$\mu\ell$ RNAfree water를 첨가하여 42℃ 60min, 94℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성한 후 Bioneer PCR Premix (Cat. K-2013)에 반응산물 10$\mu\ell$, RNAfree water 39$\mu\ell$, ORF7 primer를 0.5$\mu\ell$씩 첨가하여 최종량 50$\mu\ell$가 되게 하였다. 증폭과정은 PCR 기기(Takara PCR thermal cycler MP)를 사용하여 predenaturation은 95℃ 10분, denaturation은 95℃ 30′, annealing은 45℃ 30′, extension은 72℃ 45′으로 하여 30회 반복 하고 최종적으로 95℃ 30′, 45℃ 1분, 72℃ 5분간 반응시켰다.

Quiagen(one step) : PCR 반응은 RNase-free water 12$\mu\ell$, 5× onestep RT-PCR buffer 5$\mu\ell$, dNTP MIX 1$\mu\ell$, onestep RT-PCR Enzyme MIX 1$\mu\ell$, ORF6 primer pairs 0.5$\mu\ell$ 첨가 후 Template RNA 5$\mu\ell$ 넣어 총25$\mu\ell$가 되게 하였다. 증폭과정은 PCR Peltier thermal cycler를 사용하였고, predenaturation 은 57℃ 10분, 42℃ 60분, 94℃ 10분, denaturation은 95℃ 30′, annealing은 45℃ 30′, extension은 72℃ 45′으로 하여 30회 반복 하고 최종적으로 95℃ 30′, 45℃ 1분, 72℃ 10분 반응시켰다. PCR이 완료되면 반응액 10$\mu\ell$와 loading dye 2$\mu\ell$를 1.2% agarose gel(ethidium bromide 1μg/㎖, Bioneer)에 단편의 크기를 확인하기 위해 100bp DNA Marker와 함께 1×TAE buffer가 들어있는 전기영동 tank에 gel을 침적시킨 후 120V/cm, 60분간(Owl EasyCast Minigel system) 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel을 UV illuminator에서 RNA band 증폭 유무를 확인하였다.

Table 1. The primer used in RT-PCR

Primers	Sequences(5′-3′)	PCR product
PORF7F1	5′-GGGGATCCTTGTTAAATATGCC-3′	448 bp
PORR7R1	5′-GGGAATTCACCACGCATTC-3′	

ELISA

시판되고 있는 PRRS 항체진단 ELISA kit (Herdcheck PRRS virus antibody test kit, IDEXX, USA)를 사용하였다. 비동화 혈청을 희석액 390$\mu\ell$에 혈청 10$\mu\ell$첨가하여 40배 희석하여 ELISA 검사용 plate에 100$\mu\ell$씩 분주하고 실온에서 30분간 incubation 시켰다. 반응이 끝난 후 세척액 300$\mu\ell$으로 5회 세척하여 anti-porcine HRPO conjugate를 100$\mu\ell$씩 분주하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 plate를 5회 세척하고 TMB substrate를 100$\mu\ell$씩 분주하여 실온에서 15분간 반응시키고, 각각의 well에 stop solution을 100$\mu\ell$씩 첨가하여 반응을 정지시킨 후 흡광도(650nm)를 측정하였다.

결 과

ELISA를 이용한 생식기호흡기증후군(PRRS) 항체검사 결과는 Table 2에서와 같이 AI 센타 2곳에서 상반기 하반기 10두씩을 각각 검사한 결과 모두 음성으로 나타났으며, 종돈장 2곳을 조사한 결과는 A 종돈장은 모돈 및 후보돈에서 모두 음성으로 나타났으나 B 종돈장은 모돈에서 10두중 9두(90%)가 양성으로 판정되었는데 확인한 결과 상반기에 백신을 실시하였으며 후보돈은 10두 모두 음성으로 나타내었다.

양돈장에서 개체별 항체검사는 총 300두중 216두가 항체 양성을 보여 72.0%의 양성율을 보였는데, 충주지역에서는 전체 30농가에서 150두(모돈 75, 비육돈 75)를 채혈하여 검사한 결과 113두가 양성으로 나타나 75.3%의 양성율을 보였는데, 모돈 75두중 55두(73.3%)가 양성으로 나타났으며, 비육돈에서는 75두중 58두(77.3%)가 양성으로 나타나 모돈 보다 높은 양성율을 나타내었다. 음성지역의 개체별 항체검사는 전체 30농가에서 150두 중 103두가 양성으로 68.7%의 양성율을 보였으며 모돈의 경우 75두 중 53두(70.7%)가 양성을 보였으며, 비육돈에서는 75두 중 50두(66.7%)가 양성으로 나타나 비교적 낮은 양성율을 나타내었다.

양돈장의 농가별 항체검사 결과는 전체 60농가 중 45농가가 양성으로 나타나 75.0%의 양성율을 나타내었다. 충주지역은 30농가 중 24농가가 양성을 나타내어 80%의 양성율을 나타내었는데, 모돈이 15호 중 12호(80.0%)가 양성을 보여 높은 양성율을 나타내었고, 비육돈은 15농가 중 12호(80.0%)가 양성을 보여 모돈과 같은 높은 양성율을 나타내었으며, 음성지역은 전체 30농가 중 21농가가 양성을 보여 70%의 양성율을 보였는데, 모돈은 15농가 중 11농가(77.3%)가 양성을 보여 충주지역보다 다소 낮은 양성율을 나타내었고, 비육돈 15농가 중 10농가(66.7%)가 양성을 보여 비교적 낮은 항체 양성율을 나타내었다.

이상의 결과로 개체별 및 농가별의 생식기호흡기증후군의 항체 양성율이 높게 분포되어 대부분의 돼지 사육농가에 만연된 것으로 분석되며 양성 농가에 대한 보다 효과적인 방역의 필요성이 요구되는 실정이다.

항체 검사결과 양성으로 나타난 양돈장의 PRRS 바이러스 감염여부를 PCR로 항원검사하기 위하여 전혈로부터 백혈구를 분리하여 PCR 검사를 수행한 결과 ORF7 유전자 증폭산물을 확인하였으며 전기영동 결과 448bp 밴드를 확인하였다. ORF7 유전자 증폭산물의 전기영동 양상은 Fig.1.과 같이 나타났다.

Fig. 1. Represenative patterns of agarose gel electrophoresis of PCR ampiified products to PRRS virusl (ORF7, 448bp)

Table 2. Result of antibody to the PRRS virus

Division	Farms (No.)	No of samples	antibody positive % (farms)	Positive / Tested (farms)	
				Boar, Sow	Gilt
AI center	A(1)	20	0	0/20	-
	B(1)	20	0	0/20	-
Breeding farms	A(1)	20	0	0/10	0/10
	B(1)	20	45(1)	9/10(1)	0/10
chungju	Breeding pig(15)	75	73.3(80.0)	55/75(12)	
	Growing pig(15)	75	77.3(80.0)		58/75(12)
eumsung	Breeding pig(15)	75	70.7(77.3)	53/75 (11)	-
	Growing pig(15)	75	66.7(66.7)		50/75(10)
	Total	380	59.2(71.9)	117/210(24)	108/170(22)

고 찰

PRRS는 병을 일으키는 정도가 매우 다양하기 때문에 혈청검사 등을 통하여 농장의 감염여부를 조사하여야 하며, 외부 구입시에 감염되지 않는 농장에서 구입하여, 최소한 30일간은 격리 사육하는 것이 좋으며 PRRS 바이러스가 농장 내에 침입하지 못하도록 차단방역 및 소독 등의 방역조치가 선행되야 한다. 소독은 바이러스 외막에 효과가 있는 소독제를 선택하여 사용하고 접촉이 주된 전파방법으로 사람, 차량, 기구등에 바이러스가 침입하지 않도록 주의해야 한다.

PRRS 바이러스는 접촉감염, 공기감염, 웅돈을 통한 전파 등 전파경로가 다양하며 전파속도가 빨라서 일단 감염이 이루어지면 농장은 단시간에 바이러스가 만연되어 바이러스 배설이 장기간 지속되므로 근절이 용이하지 않은 것으로 알려 져 있다. 이러한 피해를 줄이기 위해서는 예방접종, 조기 이유방식, 성장 단계별 분리 사육 등 다양한 대책이 강구되어야 하며, 바이러스 진단은 세포배양을 통하여 바이러스를 확인하고 있지만 세포배양은 수일의 시간이 소요되고 숙련된 기술이 필요하므로 빠르게 진단할 수 있는 PCR 방법이 확립되어져야 할 것이다. 국내 PRRS 분리주의 유전적 특징에 대한 연구에 따르면 미국 및 유럽 분리주에 특이적인 primer를 이용해 PCR 반응을 실험한 결과 양성반응을 나타남이 보고된 바 있다.[24,25] 본 연구는 RT-PCR[26,27]을 통한 RNA 진단법을 상용화 되어있는 킷트를 사용하여 진단 시간을 단축할 수 있었으며 ORF 7 primer를 사용한[28] PCR 진단법으로 항체양성 농가의 PRRS 유전자 증폭산물을 확인할 수 있었다.

PRRS 바이러스는 모돈 및 웅돈에서는 대부분 특이 증상이 관찰되지 않고 대부분 혈청검사를 통하여 감염여부가 파악되는 경우가 많으므로 정기적인 혈청검사의 필요성이 요구되고 있다. 육성돈에서는 호흡기증상이 관찰되는 경우가 많고 세균 및 써코바이러스 등 혼합 감염으로 인한 폐사율이 높아져 최근 심각한 질병으로 대두되고 있어 보다 효과적인 질병근절 대책이 필요하다. 본 질병을 근절을 위해서는 예방 접종만으로는 어렵고, 항체가 검사결과 야외균주에 의한 감염으로 확인될 때에는 우선적으로 도태 처리하는 것을 권장한다.

이번 PRRS 바이러스 항체 검사결과 충주 음성지역에서 현재 PRRS 농가별 항체양성율이 평균 75%를 상회하는 결과를 나타내었듯이 대부분의 양돈장에 만연된 것으로 나타나

전반적인 위생관리 및 사양관리의 점검이 요구되며, 무분별한 백신접종은 백신균주와 야외균주의 혼재에 따른 농장 상황의 악화를 초래할 수 있으므로 후보 모돈 선발 및 입식 시 본 질병에 대한 점검이 절실하며 일괄적인 사양관리 체계를 확립하고 질병 차단을 위한 최선의 방역이 선행되어야 할 것으로 생각한다.

PRRS 바이러스는 정액으로 전염이 가능한 질병으로 AI center 및 종돈장의 정기적인 검사항목에 추가하여 철저한 검사가 이루어지도록 하여, 감염돈의 신속한 도태를 위한 관계법령을 개정을 통하여 효과적인 질병 확산 방지 및 예방이 가능 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 2005년 충북 북부지역인 충주, 음성지역의 종돈장, AI센터, 양돈장에서 사육중인 모돈, 웅돈, 후보모돈 및 비육돈에 대하여 PRRS 바이러스 항원검사를 위해 역전사 효소 중합연쇄 반응(reverse transcription and polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하고 ELISA를 이용한 돼지의 항체를 조사함으로써 감염실태와 질병확산방지 및 질병예방의 방역지도의 기초자료로 활용하고자 실시한 조사결과는 다음과 같다.

1. PRRS의 ELISA 항체검사 결과는 AI 센터 2개소 모두 음성이었고, 종돈장은 평균 양성율이 22.5%이었으며, 양돈장은 72% 이었다.

2. 개체별 PRRS의 항체 양성율은 전체 조사대상중 72% 이었으며, 충주지역 75.3%,, 음성지역에서는 68.7% 이었다.

3. 농가별 PRRS의 항체 양성율은 전체 조사대상에서 75% 이었으며, 충주지역 80%, 음성지역에서는 70% 이었다.

4. PRRS primer ORF7에서 448 bp의 유전 증폭결과를 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Conzelman KK, Visser N, Van Woensel P, et al. 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of arterivirus group. *Virology* 193 : 329-339.
2. Cavanagh D. 1997. Nidovirales : A new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142 : 629-633.
3. Snijder E, Meulenberg JJM. 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 79 : 961-979.
4. Meulenberg JJM, Hulst MM, De Meijer EJ, et al. 1993. Lelystad virus, the causative antigen of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is relatedto LDV and EAV. *Virology* 192 : 62-72.
5. Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, et al. 1992. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest* 4 : 144-147.
6. Albina E, Leforban Y, Baron T, et al. 1992. An enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Ann Res Vet* 23 : 167-176.
7. Houben S, Callebaut P, Pensaert MB. 1995. Comparative study of a blocking enzyme linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J Virol Methods* 51 : 125-128.
8. 권창의, 권병준, 이항정 등. 1994. 돼지생식기 및 호흡기증후군 바이러스의 국내 분리주 작성에 관한 연구, 대한수의학회지 34(1) : 77-83.

9. Shin JH, Kang YB, Kim YJ, et al. 1993. Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. *RDA J Agri Sci* 35(2) : 572-576.
10. 김현수, 공신국. 1999. 야외농장으로부터 수집된 돼지혈청가검물에서 돼지생식기호흡기 바이러스 항체검사. 한가위지 22(4) : 371-375.
11. 김현수, 공신국. 1999. 돼지 농장으로부터 수집한 혈청가검물에서 돼지생식기호흡기 바이러스 분리 및 동정. 한가위지 22(4) : 363-370.
12. 박최규, 류영수, 권창희 등. 1998. 돼지 생식기 호흡기증후군 바이러스 항체 검색에 있어 간접형광항체법(IFA)과 효소면역법(ELISA)의 진단효율 비교. 대한수의학회지 38(2) : 314-318.
13. 박최규, 장정호, 강영배 등. 1999. 돼지 생식기 호흡기증후군 바이러스의 항체분포 및 역학조사. 대한수의학회지 39(1) : 111-117.
14. 한경수, 류광수, 박봉균. 1999. 한국의 돼지 생식기호흡기증후군 발생경향. 대한수의학회지 39(1) : 133-137.
15. 공신국, 이건택, 이관복 등. 2003. 당진지역 돼지생식기호흡기증후군 항체가 조사. 한가위지 26(3) : 227-231.
16. Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, et al. 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *JAVMA* 104 : 1943- 1948.
17. Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, et al.. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Routes of excretion. *Vet Mivrobiol* 57 : 69-81.
18. Zimmerman JJ, Yoon KJ, Wills RW, et al. 1997. General overview of PRRSV: A perspective from the United States. *Vet Microbiol* 55 : 187-196.
19. Christianson WT, Joo HS. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome : a review. *Swine Health Prod* 2 : 10-28.
20. Benfild DA, Collins JE, Dee SA, et al. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: *Disease of swine.* 8th ed, Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA : 201-232.
21. Park CK, Lyoo YS, Choi SH, et al. 1996. An elimination of microbiological pathogens in the newly established swine herd from contaminated farm by modified medicated early weaning. *Proc 14th IPVS* : 486.
22. Christianson WT, Connor JC, Crowe CK, et al. 1994. Elimination of PRRS virus with isowean. *Proc 13th IPVS* : 68.
23. Dee SA, Joo HS. 1994. Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Vet Rec* 135 : 6-9.
24. 류영수, 박최규, 이창희. 1998. Nested PCR 및 RT-PCR기법을 이용한 PRRSV의 정액 내 신속감별진단법. 대한수의학회지 38(1) : 77-83.
25. Christopher-Hennings J. Nelson JK, Hines RJ, et al. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiol* 33 : 1730-1734.
26. 박최규, 류영수, Paul PS. 1998 RT-PCR 기법을 이용한 돼지 로타바이러스 주요 혈청형 감별진단. 대한수의학회지 38(1) : 85-89.
27. 안재문, 조우영, 이종인 등. 1999. RT-PCR 기법을 이용한 분변내 소 코로나바이러스 검출. 한가위지 22(3) : 239-245.
28. 황의경, 김재훈, 김병한 등. 1998. 돼지 유사산증의 발병요인. 수의과학논문집 40(1): 48-53.

유산양의 유방염 원인균 분리 및 항생제 감수성시험

유기조, 류대열, 서황원, 이청산, 최해연

충청북도 축산위생연구소

Milk goat mastitis and susceptibility of the isolates to antibiotic drugs

Gi-Jo Yoo, Dae-Yeol Rhu, Hwang-Won Suh, Chung-San Lee, Hae-Yeun Choi

Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute

Abstract

Unlike foreign countries which graze milk goats all year long, Korean milk goats are grazed from April to late October, which are after ward skept in dense environments such as barns or yards until the next year of late March. Due to these rearing methods, the milk goat industry is gradually declined, and increased the occurrence of mastitis and other diseases leaded to economical loss in farms. Also, antibiotics which are used to prevent and cure goat mastitis are becoming a major interest in the area of public health. Medications used for milk goat mastitis are sometimes applied to milk cows which results in the abuse of antibiotics. Therefore we surveyed milk goats with mastitis and determined the bacteria which caused the infection. Sensitivity of the bacteria to antibiotics used in the cure of mastitis was also tested. Overall we expect this research to contribute in the prevention and cure of milk goat mastitis.

Investigation in the prevalence of mastitis in goats from Boen, Okcheon, Youngdong in Chungbuk province and the determination in sensitivity of the isolated bacteria to antibiotics, gave conclusions as below.

1. Among 272 milk goats, 68 milk goats had mastitis revealing (25.00%) of infection.

2. We investigated mastitis in milk goats according to each season. In the spring 11 out of 65 milk goats (16.92%), in the summer 20 out of 71 milk goats (28.17%), in the fall 21 out of 70 milk goats (30.00%), and in the winter 16 out of 66 milk goats (24.24%) had mastitis, which revealed fall as the highest season of infection.

3. Investigation of mastitis in milk goats with different birth experiences was proceeded. 15

out of 68 first birth given milk goats (22.06%), 22 out of 73 second birth given milk goats(30.14%), 31 out of 131 more than third bird given milk goats (23.66%) were diagnosed with mastitis.

4. The bacteria isolated from 68 milk goats with mastitis revealed that 53 out of 68 milk goats (77.94%) were infected with Stap. Spp, 16 out of 68 (23.53%) were infected with Strep. Spp, 8 out of 68 (11.76%) were infected with Corynebacterium and E.coli, and 11 out of 68 (16.18%) were infected with Pseuodomonas, Klebsiella.

5. Antibiotic sensitivity of the bacteria isolated from mastitis infected milking goats showed that Stap. Spp was sensitive to AN, Am, CF, GM, K, and N and Strep. Spp was sensitive to AN, CF, and K. E. coli was sensitive to AN and N, and Corynbacteriun showed sensitivity to AN, GM, and S.

Key words : milk goats, mastitis, Stap. Spp, Strep. Spp, Corynebacterium, E.coli.
Correponding author

서 론

산양유는 오랜 옛날부터 전통적으로 건강 식품은 물론 영양학적으로 영양소를 가장 골고루 갖춘 완벽한 안전식품으로 인정되어 과거 들판에서 흔히 사육되어 볼 수 있었으며, 옛날 시골 가정에서 적은 양이나마 손쉽게 구할 수 있었던 단백질 공급원 이었다.

그러나 생산되는 산양유 양이 부족 하였으며 산양유 특유의 노린내와 비린내로 인하여 많은 소비가 이루어지지 못하였다. 그렇지만 국내에 젖소 도입에 따른 유량의 급격한 생산증가와 포장 및 가공기술의 발달에 따른 대량생산은 대량 소비로 이어져 우리나라에 낙농이 산업으로 자리를 잡게 되자 들판의 유산양이 거의 사라졌으나, 최근 뉴질랜드 등 외국에서 수입되어 유산양이 대량으로 사육 되면서 산양유의 생산도 자연스럽게 증가 되었으며, 이에 따른 과거의 산양 특유의 노린내 등 마시기에 불편을 주던 냄새가 제거 되면서 위생상태 등 품질이 크게 향상 되었다.

과거의 산양이 자연 방목되어 신선함과 깨끗함이 소비자들로 하여금 소비를 유발 시켰으며, 또한 오랫동안 마셔오던 우유에서 새로운 산양유에 대한 호기심, 일부 소비자의 우유에 대한 편견, 어린이의 아토피성 알러지 반응, 산양유의 모유와 같은 성분의 발견 등은 산양유의 소비 증가로 이어져 수요가 공급을 초과하는 현상도 발생되기도 하였다.

우리나라의 유산양의 사육형태는 외국의 4계절 방목과는 달리 4월~11월까지 방목하고, 이후 축사 및 운동장에서 다음해 3월말까지 밀집 사육되는 방식이다. 이러한 사육방식은 일부 유산양의 급격한 사양형태의 전환으로 유방염 등 유산양의 질병발생은 산양유의 품질저하, 생산량의 감소로 농가에 경제적인 손실을 줄뿐만 아니라, 최근 산양유의 위생이 강조되어 왔으며, 질병의 예방 및 치료목적으로 사용되는 항균, 항생제가 공중보건상 주요한 관심사로 대두되는 실정이다. 이에 유산양에 대한 치료 및 예방목적으로 사용되는 유방염의 약제가 젖소에 준하여 사용되기도 하여, 항생제의 남용과 오용으로 피해가 발생하고 있어 본 연구자는 유산양의 유방염의 감염 실태조사, 유산양의 유방염 발생 원인균 규명 및 항생제 감수성시험으로 유산양의 유방염 치료 및 예방에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료

본 실험에 사용한 산양유는 보은, 옥천, 영동 지역의 유산양 11개 농장에서 당일 채취한 시료가 CMT2+이상의 집합산양유와 유방염 의심 개체별 시료를 수집하여 얼음이 있는 아이스 박스에 보관하여 실험실에 즉시 이동하여 실험에 공하였다.

배양 및 균분리

유방염의심 산양유를 blood agar base(Difco)에 면양혈액 5%를 혼합한 혈액한천 평판배지를 증균・분리용 배지로 이용하여 세균배양기에 24~48시간 35~37℃에 배양한 균주를 이용하였다.

배양된 세균집락을 API kit(BioMerieux® sa)에 24~48시간 35~37℃에 배양검사 및 그람염색에 의한 직접 현미경 검경으로 각각 세균분리를 실시하였다.

유방염 감염의 기준은 CMT2+ 이상, 체세포 수가 100만/㎖이상(MDA지침, Minnesota Department of Agriculture)의 유산양유로 한다.

항생제 감수성시험실시

항생제 내성시험은 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 방법에 따라 표준 평판 디스크 확산법으로 실시하여, 생리식염수에 분리균주를 부유 시킨 후 MacFarland No. 0.5가 되게 탁도를 맞추어 mueller-hinton medium(Difco) 평판배지에 도말한 다음 BBL사의 sensi-disk인 Amikacin 외 13종을 사용하여 35~37℃에서 24~48시간 배양 후 발육억제대의 직경을 측정하여 항생제 내성 여부를 판정하였다.

결과 및 고찰

Table 1. 유방염 감염조사

검사두수	양성두수	양성율
272	68	25.00%

보은, 옥천, 영동지역에서 사육되는 유산양 농장에 2004년 4월부터 12월 까지 유방염에 대하여 검사한 결과 Table 1에서처럼 유산양 272두 중 68(25.00%)두가 유방염에 감염된 것으로 조사 되었다.

Table 2. 계절별 유방염 감염조사

계절별	검사두수	감염두수	감염율(%)
계	272	68	25.00
봄	65	11	16.92
여름	71	20	28.17
가을	70	21	30.00
겨울	66	16	24.24

유산양에 대한 계절별 유방염 감염율은 Table 2와 같이 봄에 65두중 11두(16.92%), 여름 71두중 20두(28.17%), 가을 70두중 21두(30.00%), 겨울 66두중 16두(24.24%)로 각각 나타났으며, 가을이 가장 유방염 감염이 높게, 봄이 가장 낮게 나타났으며, 이러한 결과로는 겨울에 집단 사육으로 유방염에 대한 관리가 용이하며, 겨울철은 세균증식이 감소되어 감염율이 낮았으며, 이후 지속적으로 관리되어 봄에 유방염 감염이 가장 낮게 나타났으며, 여름과 가을에 야외 및 축사내부에서 세균 등에 쉽게 노출이 용이하고 방목사육으로 인한 유산양에 대한 개체별 사양관리가 어려워 유방염 감염이 높게 나타난 것으로 판단된다.

Table 3. 산차별 유방염 감염조사

산자수	검사두수	양성두수	양성율(%)
1산	68	15	22.06
2산	73	22	30.14
3산 이상	131	31	23.66

Table 3과 같이 유산양에 대한 산차별 유방염 검사를 실시한 결과 1산 68두 중 15두(22.06%)가 2산 73두 중 22두(30.14%), 3산 이상 131두중 31두(23.66%)가 각각 유방염에 감염을 나타내었다. 2산에서 가장 높게 나타났으며, 1산과 3산 이상에서 비슷하게 감염된 것으로 조사 되었다.

이는 2산의 경우 1두를 분만 하나, 일부 2두 이상 분만 시 유량의 변화 등 여러가지 생리적인 변화에서 기인 된 것으로 판단되며, 초산은 대부분 봄에 착유를 시작하는 경우가 많아 방목으로 이어지는 사육형태로 비교적 사양관리가 양호한 시기이며, 3산 이상의 유산양은 사양 환경에 잘 적응된 우수한 개체 위주의 사육을 하기 때문으로 사료된다.

Table 4.유방염 원인균 분리

유방염원인균	검사두수	발생두수	발생율(%)
Stap. spp	68	53	77.94
Strep. spp	68	16	23.53
Coryne-bacterium	68	8	11.76
E. coli	68	8	11.76
Pseudomonas, Klebsiella등	68	11	16.18

유방염에 감염된 68두에 대한 원인균을 분리한 결과 Table 4와 같이 Stap. spp가 68두 중 53두(77.94%), Strep. spp 16두(23.53%), Corynebacterium과 E. coli가 8두(11.76%), Pseudomonas, Klebsiella는 11두(16.18%)의 유방염 원인균이 분리 되었다.

분리된 세균 중 Stap. spp가 77.94%의 높은 감염율을 나타내어 방목 및 사양관리에서 외상과 기타질환의 발생에서 감염 가능성이 높으므로 신속한 치료가 이루어져야 할 것으로 판단되며, 다른 원인균으로는 Strep. spp 등 낮은 감염을 보였으며, 복합 감염도 일부 있었으나, 낮게 분리되어 별도의 검사 성적은 제시하지 않았다.

유방염에 감염된 유산양에서 분리된 세균에 대하여 항생제 감수성검사를 실시한 결과 Table 5와 같이 Stap. spp에 대하여 AN, Am, CF, GM, K, N에는 감수성을 나타냈으며, Lin, Nor, P, SXT에는 내성하며, Te, CL에 대하여는 중등도의 감수성을 나타냈다. Strep. spp에 대한 검사결과 AN, CF, K는 감수성을 Am, GM, S, Lin, Nor, Te에 중등도의 감수성을 N, SXT, CL은 감수성에 내성임을 나타났고, E.coli의 경우 AN, N에 감수성을 GM, K, S, Lin, Nor에 중등도의 감수성을 Am, CF, P, Te, SXT, CL에 내성임을 보였으며, Corynebacterium에서는 AN, GM, S에 감수성을 CF, K, N, CL에는 중등도의 감수성을 Lin, Nor, P, Te, SXT에 내성하는 검사결과를 얻었으며, AN은 대부분의 유방염에 치료가 잘되는 약제로 나타났고, CF, GM, K, S, N는 비교적 감수성이 좋은 약제로, N, Lin, Nor, P, Te, SXT, CL은 감수성이 좋지 않은 약제 검사결과 나타났다.

Table 5. 분리된 유방염 원인균(Stap.spp, Strep.spp, E.coli, Corynebacterium, Klebsiella. spp)등의 항생제 내성검사

Antibiotics	Resistant Zone Diameter of reference	Microorganisms of antibiotics susceptible test			
		Stap. spp	Strep. spp	E.coli	Corynebacterium
AN(30μg)	<14	++	++	++	++
Am(10)	<13	++	+	−	±
CF(30)	<14	++	++	−	+
GM(10)	<12	++	+	+	++
K(30)	<13	++	++	+	+
S(10)	<12	±	+	+	++
N(30)	<12	++	−	++	+
Lin(2)	<12	−	+	+	−
Nor(10)	<12	−	+	+	−
P(10 IU)	<13	−	+	−	−
Te(30)	<14	+	+	−	−
SXT(24/1.3)	<10	−	−	−	−
CL(10)	<12	+	−	−	+

AN(Amikacin), Am(Ampicillin), CF(Cephalothin), GM(Gentamicin), K(Kanamycin), S(Streptomycin), N(Neomycin), Lin(Lincomycin), Nor(Norfloxacin), P(Penicillin), Te(Tetracycline), SXT(Sulfamethoxazole+Trimethoprim), Cl(Colistin)

결 론

보은, 옥천, 영동지역에서 사육되는 유산양의 유방염 및 항생제 감수성 조사를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 착유중인 유산양에 272두 대한 유방염 감염 조사를 실시한 결과 68두가 유방염에 감염되어 25.00%의 감염율을 나타났다.

2. 착유중인 유산양 272두에 대한 계절별 유방염 감염을 조사한 결과 봄이 65두중 11두(16.92%), 여름이 71두중 20(28.17%), 가을이 70두중 21두(30.00%), 겨울이 66두중 16두(24.24%)로 조사되어 가을이 가장 높은 유방염 감염을 나타났다.

3. 착유중인 유산양의 산차별 유방염을 조사한 결과 초산에서 68두중 15두(22.06%), 2산에서 73두중 22두(30.14%), 3산 이상의 유산양에서 131두중 31두(23.66%) 각각의 유방염 감염을 나타내었다.

4. 유방염에 감염된 유산양 68두에 대한 원인균을 세균 분리한 결과 Stap. spp가 68두중 53두(77.94%)로 나타났고, Strep. spp가 68두중 16두(23.53%), Corynebacterium과 E. coli가 68두중 8두(11.76%)로 나타났고, Pseudomonas, Klebsiella 등이 68두중 11두(16.18%)의 유방염 원인균이 분리 되었다.

5. 유방염에 감염된 유산양에서 분리된 세균에 대하여 항생제 감수성검사를 실시한 결과

Stap. spp에 대하여 AN, Am, CF, GM, K, N이 감수성을 나타냈으며, Lin, Nor, P, SXT에 내성하며 Te, CL에 대하여는 중등도의 감수성을 나타냈다. Strep. spp에 대한 검사결과 AN, CF, K는 감수성을 Am, GM, S, Lin, Nor, Te에 중등도의 감수성을 N, SXT, CL은 감수성에 내성임을 나타났고, E. coli의 경우 AN, N에 감수성을 GM, K, S, Lin, Nor에 중등도의 감수성을 Am, CF, P, Te, SXT, CL에 내성하며, Corynebacterium은 AN, GM, S에 감수성을 CF, K, N, CL에는 중등도의 감수성을 Lin, Nor, P, Te, SXT에 내성하는 검사 결과를 얻었다.

참고문헌

1. 허정호, 정명호. 1998. 젖소 유방염 관리에 따른 세균 및 체세포수등급 실태 조사분석. 한국가축위생학회지. 21(3). : 285~300.
2. 김신, 김순태 등. 경북지역 젖소 유방염 우유 및 각종 동물로부터 분리한 포도구균의 동정 및 항생제 감수성. 한국가축위생학회지. 1998. 21(3). : 301~311.
3. 성명숙, 김규섭 등. 유우에서 포도상구균 백신과 면역증강제 투여 후 우유의 체세포수 변화 및 분리된 포도상구균의 항생제 내성에 관한 조사. 한국가축위생학회지. 2000. 23(1). : 61~69.
4. 김신, 오유미 등. 경북북부지역 젖소 유방염 우유 및 각종 동물로부터 분리한 staphylococcus aureus의 항균제 내성과 MRSA검출에 관한 연구. 한국가축 위생학회지. 2000. 23(2) : 153~163.
5. Steers E Plotz el, and Gravwes BS : 1959. Inocular replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother, 9 : 307.*
6. 문진산, 주이석 등. 목장 원유중 체세포수에 따른 유방염 원인균 양상 및 목장 사양관리에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지. 1997. 21(4). 345~353.
7. McDonald JS. 1977. *Streptococcal and Staphylococal* mastitis. *JAVMA*170 : 1157~1159.
8. 김두. 1988. 유우 임상형 유방염 원인균과 항생제 감수성의 변화양상. 대한수의학회지. 28(2) : 397~404.
9. Vet Res. 34(2003) 689-716 © INRA, EDP Sciences, 2003 DOI : 10.1051/vetres : 2003030.
10. Hinckley L.S., 1990. Revision of the somatic cell count standart for goat milk, Dairy Food Environ. Sanitat. 10. 548-549.

충북지역 원유 유질 · 유성분 변화에 대한 조사 및 원유검사 제도에 관한 고찰

이종진[1], 이은정, 박재명

충청북도축산위생연구소북부지소

A observative study on the Quality and Ingredient changes of Raw milk in Chung-Buk by the season, and a examination system

Jong-Jin Lee[1], Eun-Jeong Lee, Jae-Myoung Park

Northern Branch, Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Chungju, 380-230, Korea

서 론

우리나라에서 낙농업은 1962년 뉴질랜드에서 매년 젖소를 들여오기 시작하면서 본격적으로 발전하기 시작하였으며, 국민소득의 향상과 함께 우유의 생산과 소비가 증가함에 따라 유제품의 종류는 더욱 다양화되어 백색우유뿐 아니라 유산균 발효유, 유지방농축식품인 버터, 고단백질식품인 치즈, 아이스크림이 개발되어 호황을 누려왔다. 특히 우유는 완전식품이라 불릴 만큼 우수한 식품으로 단백질, 유당, 지방, 비타민, 무기질 등이 함유되어 있어 필수 영양소 공급원으로 국민 생활 향상에 중요한 위치에 있다. 그러나 최근 들어서는 우유소비량이 점점 하향곡선을 그리고 있다. 이는 다양한 청량음료가 범람하고 영향수준이 향상되면서 우유의 소비량이 격감한 것으로 추측된다. 또한 수입 개방과 노동력의 3D 기피현상으로 낙농의 생산원가 급등 대비 소득의 하락은 낙농업 경쟁력 악화에 크게 기여했다.

이에 국내소비 증가뿐 아니라 국제경쟁력을 갖춘 낙농업이 되기 위해서는 생산성을 높이고 위생적인 고품질 원유를 값싸게 공급해야 할 것이다. 우리나라에서도 1992년 10월 축산물 위생처리법 시행규칙 개정이래, 1993년 6월 1일 세균수는 5개 등급, 체세포수는 4개 등급으로 나누어 등급별 차등 가격제를 실시하여 국내 원유의 질적 향상에 제도적인 기반을 마련하였다. 이후 위생수준 향상에 따라 등급조정을 계속하여 왔는데, 세균수의 경우 4번에 걸쳐, 체세포수의 경우 6번에 걸쳐 위생등급 및 등급간 가격차를 조정하였다. 현재는 2002년 국립수의과학검역원고시 제2002-4호에 의거 개정된 원유위생 기준인 세균수 5개 등급, 원유 1ml당 1급A 3만 미만, 1급B 3만~10만 미만, 2급 10만~25만, 3급 25만~50만 이하, 4급 50만 초과, 체세포수도 5개 등급인 1급 20만 미만, 2급 20만~35만, 3급 35만~50만 미만, 4급 50만~75만 이하, 5급 75만 초과로 초창기의 등급에 비해 훨씬 강화 되었다.

또한 계속되는 원유공급 과잉으로 인한 낙농진흥회 및 유업체에서 강행한 원유쿼터제 등으로 저생산성 유우의 조기 도태를 실시한 결과 우유의 품질은 점점 향상됐다. 이와 같은 원유의 위생등급 상향조절과 유질 향상의 시대적 흐름에 발맞추어 낙농가의 위생기술과 사명감은 계속적으로 증가되어 오고 있다.

이에 본 연구에서는 검사공영제 도입으로 충청북도축산위생연구소에서 실시하는 집유 원유에 대하여 현재의 지역별 유질 상태를 파악하고 계절에 따라 유질의 흐름을 기록하여 지역특색에 맞는 유질향상에 기여하고자 실행하였다. 또한 현재 실시하고 있는 유대기준 정책의 개선방향에 대해 고찰하였으며 특히 원유검사 시초부터 계속 실시되어온 유지방 중심의 유대정책과 체세포수 및 세균수의 유질 상태를 지역별, 계절별로 분석하여 앞으로의 합당한 유대정책 자료에 밑거름이 되고자 실시하였다.

재료 및 방법

연구조사기간 및 대상

충북축산위생연구소에서 실시하는 원유검사 공영검사 사업의 일환으로 검사 의뢰 받은 우유 중, 2003년부터 2005년까지 집유선을 옮기지 않고 일일 착유량 400~600ℓ인 농가를 도내 3개 지역 청원・진천・음성에서 지역별로 각 20농가씩 총 60농가를 선정하였고, 충북의 가장 오지인 제천・단양지역의 착유농가(14농가)와 비교하여 조사하였다. 검사는 월 2회씩 원유 시료 총 5,328개를 채취하여 검사하였고, 지역별, 계절별 정리하여 세균수, 체세포수, 그리고 유지율을 측정하였다. 봄은 3월~5월, 여름은 6월~8월, 가을은 9월~11월, 그리고 겨울은 12월~익년 2월까지를 기준으로 하여 유질 상태를 파악하였다.

시료채취 및 운반

시료채취 및 운반은 낙농진흥회에서 실시하였으며 이는 집유 및 원유검사 표준화 요령에 기준하여 실시하였다.

검사방법

세균수 검사

신속정확하게 측정하기위해 총 세균수 검사기기로는 형광현미경법인 Bactoscan 8000을 이용하였으며, 이 기기는 수의과학검역원에서 제공하는 표준용액으로 매주 측정하여 교정하였다. Bactoscan 8000의 측정원리는 원유중의 미생물을 형광염색 물질로 염색하여 형광현미경을 통해 연속적으로 세균을 세는 자동화된 미생물 계수장치이다. 즉, 40℃되게 처리한 원유를 lysing 용액으로 카제인과 체세포 등을 용해시켜 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)에 의해 분해시키고, 미생물은 acridine orange용액으로 염색 후 continuous flow epifluorescent 현미경에 의해 측정한다.

체세포수 검사

원유중 체세포수를 검사하는 기기로는 레이저빔을 이용하는 Somacounter를 사용하였으며, 검사방법은 제조회사가 추천하는 방식을 따랐다. 또한 체세포수에 대한 원유등급은 수의과학검역원 고시 2002-4호를 적용하였다. Somacounter의 측정원리는 원유중에 포함되어 있는 모든 체세포에 형광물질을 도포시켜 일정 시간동안 형광발광세포를 측정하는 원리이다.

유지방 검사

유지방검사 기기로는 적외선 스펙트럼 파장법을 이용하는 Bentley 2000을 이용하였으며, 이 기기는 항시 수의과학검역원에서 일괄 제공하는 표준용액으로 매주 측정하여 교정하였다.

Bentley 2000의 측정원리는 적외선 스펙트럼 파장법을 이용한 것으로 적외선 투과에 의한 문자의 진동에 기인하는 특정문자의 파장대를 측정하는 IR흡광도법으로서 유성분을 정량한다.

결 과

지역별 · 계절별 원유중 세균수 검사결과

2003년 봄부터 2005년 겨울까지 일일 착유량 400~600ℓ를 납유하는 청원 · 진천 · 음성지역의 60농가와, 충북의 가장 오지인 제천 · 단양지역 14농가 총 74농가의 집합유(bulk milk)에서 5,328개의 시료를 채취하여 세균수를 검사한 바는 Table 1과 같다. 즉, 2003년부터 2005년까지 3년간 청원 · 진천 · 음성지역 60농가의 세균수 평균 등급별 분포도는 1A등급 87%, 1B등급 11%, 2등급 1%, 기타 1%로 조사되었고, 제천 · 단양지역 14농가의 세균수 평균 등급별 분포도는 1A등급 79% 1B등급 13% 2등급 5% 기타 3%를 기록하였다.

또한 2003년부터 2005년까지 연도별 지역간 세균수 등급을 비교한 결과는 Figure 1과 같다. 즉, 2003년 청원 · 진천 · 음성지역의 세균수 등급별 분포도는 1A등급 87% 1B등급 11% 2등급 1% 기타 1%, 제천 · 단양지역은 각각 82%, 13%, 2%, 2%로 나타났으며, 2004년 에도 청원 · 진천 · 음성지역의 세균수 등급별 분포도는 각각 87%, 11%, 2%, 0%, 제천 · 단양지역은 각각 83%, 10%, 5%, 2%로 나타났다. 또한, 2005년 청원 · 진천 · 음성지역의 세균수 등급별 분포도는 각각 86%, 12%, 1%, 1%, 제천 · 단양지역은 각각 79%, 13%, 5%, 3%로 나타났다.

2003년부터 2005년까지 계절별 지역간 세균수 등급을 비교한 결과는 Figure2와 같다. 즉, 2003년부터 2005년까지 3년간 봄(3월~5월)중 청원 · 진천 · 음성지역의 세균수는 1A등급 88% 1B등급 10% 2등급 1% 기타 1%, 제천 · 단양지역은 각각 81%, 12%, 4%, 2%로 나타났으며, 여름(6월~8월)중 청원 · 진천 · 음성지역의 세균수는 각각 79%, 17%, 3%, 1%, 제천 · 단양지역은 각각 69%, 18%, 6%, 4%로 나타났다. 또한, 가을(9월~11월)중 청원 · 진천 · 음성지역의 세균수 등급별 분포도는 각각 88%, 11%, 1%, 0%, 제천 · 단양지역은 각각 81%, 12%, 5%, 2%로 나타났으며, 겨울(12월~2월)중 청원 · 진천 · 음성지역은 각각 91%, 8%, 1%, 0%, 제천 · 단양지역은 각각 85%, 11%, 4%, 1%로 나타났다.

본 연구결과 세균수의 지역적 차이는 청원 · 진천 · 음성지역이 제천 · 단양지역보다 세균수 1등급이 지속적으로 약 3~6% 높았다. 이는 임의로 선정한 농가가 아닌 객관적으로 일정 수준에 오른 청원 · 진천 · 음성지역 낙농가와 임의로 선정한 제천 · 단양지역과 비교하여 나타난 당연한 결과라 생각 되지만, 전체적으로 꾸준히 높은 세균수 등급을 유지 하였다. 계절별로는 모든 지역에서 여름철에 1A등급이 10% 가량 감소하였다. 이는 아직도 여름철 세균의 증식을 완벽하게 막을 수 있는 착유기술 이나 냉각시설이 부족하기 때문 이라 생각된다.

지역별 · 계절별 원유중 체세포수 검사결과

2003년 봄부터 2005년 겨울까지 청원 · 진천 · 음성지역 농가와, 제천 · 단양지역의 시료를 채취하여 체세포수를 검사한 바는 Table 2와 같다. 즉, 2003년부터 2005년까지 3년간 청원 · 진천 · 음성지역 60농가의 체세포수 평균 등급별 분포도는 1등급 28%, 2등급 29%, 3등급 22%, 4등급 13%, 5등급 8%로 조사 되었고, 제천 · 단양지역 14농가의 체세포수 평균 등급별 분포도는 1등급 25%, 2등급 29%, 3등급 23%, 4등급 15%, 5등급 8%를 기록하였다.

2003년부터 2005년까지 연도별 지역간 체세포수 등급을 비교한 결과는 Figure 3과 같다. 즉, 2003년 청원 · 진천 · 음성지역의 체세포수 등급별 분포도는 1등급 28% 2등급 29% 3등급 22% 4등급 13%, 5등급 8%, 제천 · 단양지역은 각각 31%, 24%, 23%, 14%, 8%로 나타났으며, 2004년 청원 · 진천 · 음성지역의 체세포수 분포도는 각각 28%, 30%, 22%, 13%, 8% 제천 · 단양지역은 각각 24%, 25%, 26%, 15%, 10%로 나타났다.

Table 1. The number and rate of five SPC ranges of bulk milk collected from dairy farms in Chung-Buk Cheong-Won, Chin-Chon, Eum-Sung, and Je-Chon · Dan-yang by the season.

SPC* × 1,000

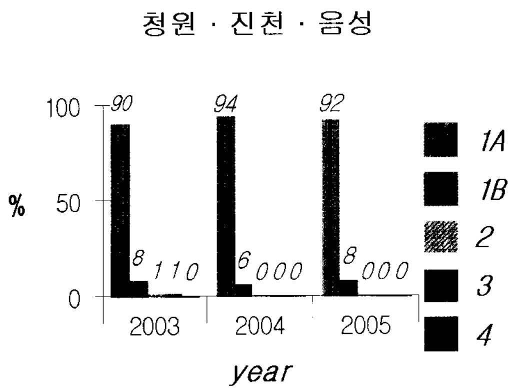
year	season	No. of sample	Cheong-Won(120)					Chin-Chon(120)					Eum-Sung(120)					Je-Chon · Dan-Yang(84)				
			1A	1B	2	3	4	1A	1B	2	3	4	1A	1B	2	3	4	1A	1B	2	3	4
2003	Spring	444	108	10	1	1	-	98	15	5	1	1	112	7	1	-	-	65	11	5	2	1
	Summer	444	99	17	3	1	-	85	27	4	2	2	102	15	2	-	1	56	17	6	3	2
	Fall	444	110	9	1	-	-	100	18	1	1	-	110	10	-	-	-	67	12	3	2	-
	Winter	444	114	6	-	-	-	101	15	2	1	1	115	5	-	-	-	70	10	3	1	-
2004	Spring	444	113	7	-	-	-	96	19	4	1	-	106	12	2	-	-	69	11	2	2	-
	Summer	444	95	21	2	1	1	88	27	4	1	-	97	18	4	1	-	58	16	5	4	1
	Fall	444	112	7	1	-	-	99	19	2	-	-	112	7	1	-	-	70	8	4	2	-
	Winter	444	116	4	-	-	-	99	17	2	1	1	114	6	-	-	-	71	9	3	1	-
2005	Spring	444	110	9	1	-	-	101	16	2	1	-	109	11	-	-	-	70	8	4	2	-
	Summer	444	100	17	2	1	-	87	27	4	2	-	101	17	2	-	-	61	13	5	3	2
	Fall	444	109	10	1	-	-	98	20	1	-	1	105	15	-	-	-	67	10	5	2	-
	Winter	444	115	5	-	-	-	100	20	-	-	-	110	10	-	-	-	72	8	3	1	-
	Total	5,328	1,301	122	12	4	1	1,152	240	21	11	6	1,293	133	12	1	1	796	133	48	25	6
	Average	1,776	434	41	4	1	-	384	80	10	4	2	431	44	4	-	-	265	44	16	8	2

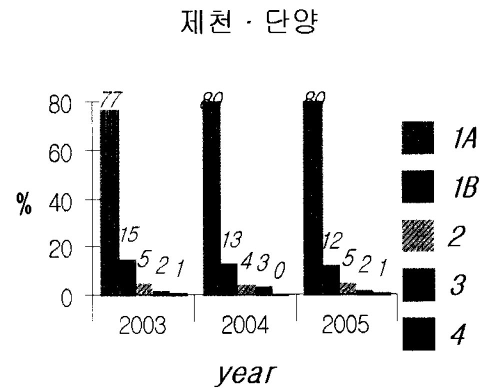
* SPC : Standard Plate Counts.

year	season	%	Cheong-Won(%)					Chin-Chon(%)					Eum-Sung(%)					Je-Chon · Dan-Yang(%)				
			1A	1B	2	3	4	1A	1B	2	3	4	1A	1B	2	3	4	1A	1B	2	3	4
2003	Spring	100	90	8	1	1		82	13	4	1	1	93	6	1			77	13	6	2	1
	Summer	100	83	14	3	1		71	23	3	2	2	85	13	2		1	67	20	7	4	2
	Fall	100	92	8	1			83	15	1	1		92	8				80	14	4	2	
	Winter	100	95	5				84	13	2	1	1	96	4				83	12	4	1	
2004	Spring	100	94	6				80	16	3	1		88	10	2			82	13	2	2	
	Summer	100	78	18	2	1	1	73	23	3	1		81	15	3	1		69	19	6	5	1
	Fall	100	93	6	1			83	16	2			93	6	1			83	10	5	2	
	Winter	100	97	3				83	14	2	1	1	95	5				85	11	4	1	
2005	Spring	100	92	8				84	13	2	1		91	9				80	10	5	2	
	Summer	100	83	14	2	1		73	23	3	2		84	14	2			73	15	6	4	2
	Fall	100	91	8	1			82	17	1		1	88	13				80	12	6	2	
	Winter	100	96	4				83	17				92	8				86	10	4	1	
	Average	100	90	8	1	1		80	17	2	1		90	9	1			79	13	5	2	1

1*rateA: 30 >* 1*rateB: 30~100* 2*rate: 100~250* 3*rate: 250~500* 4*rate: 500 <*

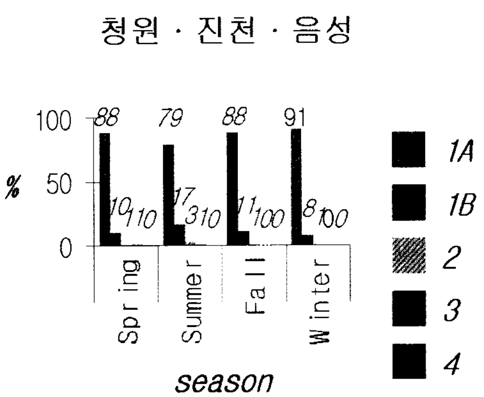
Figure 1. The rate of five SPC ranges of bulk milk collected from dairy farms in Chung-Buk by the year.

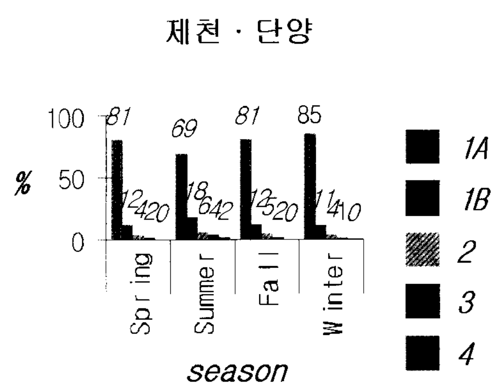




1rateA: 30 > *1rateB: 30~100*
2rate: 100~250
3rate: 250~500
4rate: 500 <

Figure 2. The rate of five SPC ranges of bulk milk collected from dairy farms in Chung-Buk by the season.





1rateA: 30 >
1rateB: 30 ~ 100
2rate: 100 ~ 250
3rate: 250 ~ 500

또한, 2005년 청원·진천·음성지역의 체세포수 등급별 분포도는 각각 27%, 29%, 21%, 15%, 8%, 제천·단양지역은 각각 25%, 29%, 23%, 15%, 8%로 나타났다.

2003년부터 2005년까지 계절별 지역간 체세포수 등급을 비교한 결과는 Figure 4와 같다. 즉, 봄(3월~5월)중 청원·진천·음성지역의 체세포수 등급별 분포도는 1등급 28% 2등급 31% 3등급 22% 4등급 13%, 5등급 7%, 제천·단양지역은 각각 25%, 24%, 26%, 16%, 9%로 나타났으며, 여름(6월~8월)중 청원·진천·음성지역의 체세포수는 각각 23%, 27%, 22%, 19%, 10%, 제천·단양 지역은 각각 31%, 31%, 14%, 17%, 7%로 나타났다. 또한, 가을(9월~11월)중 청원·진천·음성지역의 체세포수 등급별 분포도는 각각 29%, 29%, 21%, 14%, 8%, 제천·단양지역은 각각 24%, 34%, 22%, 13%, 7%로 나타났으며, 겨울(12월~2월)중 청원·진천·음성지역의 체세포수는 각각 29%, 30%, 21%, 12%, 8%, 제천·단양지역은 각각 28%, 31%, 21%, 13%, 7%로 나타났다.

2003년부터 2005년까지 청원·진천·음성지역 농가와 제천·단양지역 농가를 대상으로 체세포수 등급을 비교한 결과 세균수와는 달리 계절 및 지역별 등급 격차는 거의 없었다. 이는 어느 지역이건 젖소의 건강 특히 유방염에 대한 관리는 과거에 비해 어느 정도 일정 수준에는 올라가 있다는 증거이긴 하나, 아직도 유방염에 대한 문제는 계속 중시되고 노력해야 할 과제임을 입증한 결과이다.

지역별·계절별 원유중 유지방 검사 결과

2003년부터 2005년까지 3년간 청원·진천·음성의 집유 농가와, 제천·단양지역의 집유농가 총 74농가의 집합유(bulk milk)에서 5,328개의 시료를 채취하여 유지방율을 검사한 바는 Table 5와 같다. 즉, 2003년부터 2005년까지 3년간 각 지역별 유지방율 평균은 청원지역 3.98%, 진천지역 3.99%, 음성지역 4.02%, 제천·단양지역 3.82%로 나타났으며, 가장 높은 유지율을 나타낸 음성지역과 제천·단양지역은 약 0.2%의 차이를 보였으나, 대체적으로 모든 지역의 유지율은 비슷하였으며 상당한 수준의 유지율을 기록하였다.

2003년부터 2005년까지 연도별, 계절별 유지율을 비교한 결과는 Figure 5와 같다. 즉, 2003년도 청원, 진천, 음성, 제천·단양지역의 유지율은 각각 3.92%, 3.96%, 3.99%, 3.81%를 나타냈으며, 2004년도에는 각각 4.0%, 4.01%, 4.02%, 3.82%를 나타냈다. 또한 2005년도 각 지역별 유지율은 4.03%, 4.02%, 4.05%, 3.83%를 나타냈다. 이결과로 볼 때 청원, 진천, 음성 간 유지율 차이는 거의 없었으나 제천·단양과의 차는 약 0.2% 정도의 차이를 보였다. 이는 그동안 유지방중심의 유대정책에 맞추어 오랜 경험과 높은 수준을 갖춘 낙농가일수록 지속적으로 유지율을 높이는데 많은 노력을 했다는 증거이다.

또한 2003년부터 2005년까지 3년간 봄(3월~5월)중 청원, 진천, 음성, 제천·단양지역의 평균 유지율은 각각 3.97%, 4.0%, 4.05%, 3.83%를 나타냈고, 여름(6월~8월)중 평균 유지율은 각각 3.78%, 3.83%, 3.84%, 3.63%를 나타냈다. 또한, 가을(9월~11월)중 지역별 평균유지율은 각각 4.0%, 3.99%, 4.03%, 3.86%를 나타냈다. 그리고 겨울(12월~2월)중 지역별 평균유지율은 각각 4.17%, 4.15%, 4.17%, 3.96%를 나타냈다.

청초와 수분 급여가 상대적으로 많은 하절기에 평균 유지율이 3.63%~3.85 %/mℓ를 기록하였고, 농후사료 위주로 급여하는 겨울에는 3.96%~4.2%/mℓ에 육박하였다. 또한 유지율 평균이 가장 낮았던 2003년 여름철 청원 지역 3.71%/mℓ과 제천·단양의 경우에도 3.62%/mℓ을 기록한 것으로 비추어볼 때 원유의 유지율은 상당히 높은 수준에 와있음을 알 수 있었다.

Table 2. The number and rate of five SCC ranges of bulk milk collected from dairy farms in Cheong-Won, Chin-Chon, Eum-Sung, and Je-Chon · Dan-yang by the season.

SCC* × 1,000

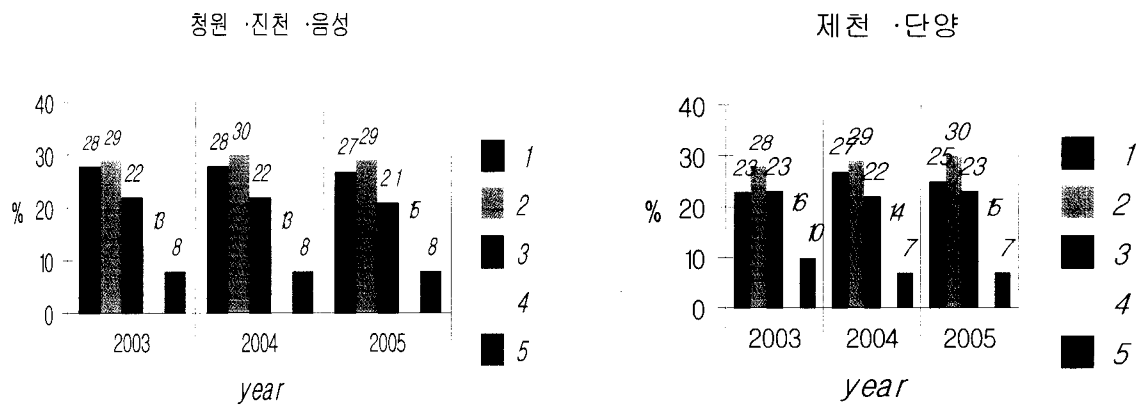
year	season	No. of sample	Cheong-Won(120)					Chin-Chon(120)					Eum-Sung(120)					Je-Chon · Dan-Yang(84)				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
2003	Spring	444	32	40	23	18	7	35	31	30	17	7	30	39	27	14	10	17	20	24	15	8
	Summer	444	32	35	27	18	8	32	30	26	19	13	27	35	28	17	13	21	16	18	18	11
	Fall	444	36	33	25	15	11	35	31	30	14	10	34	35	25	16	10	15	33	18	10	8
	Winter	444	36	35	20	17	12	38	35	30	10	7	35	37	28	10	10	23	25	17	12	7
2004	Spring	444	35	37	24	15	9	35	35	29	13	8	30	40	27	12	11	26	20	19	12	7
	Summer	444	33	32	26	18	11	31	32	25	18	14	32	35	26	14	13	18	24	20	15	7
	Fall	444	35	36	24	15	10	36	33	25	16	10	31	38	25	17	9	23	26	19	10	6
	Winter	444	37	34	26	14	9	33	36	27	14	10	32	38	26	16	8	25	27	17	10	5
2005	Spring	444	37	35	25	15	8	34	35	26	17	8	31	38	27	16	8	20	21	22	13	8
	Summer	444	29	33	28	20	10	33	29	28	22	8	27	34	30	19	10	18	27	18	15	6
	Fall	444	35	33	21	18	13	35	35	23	19	8	33	37	24	17	9	23	26	19	12	4
	Winter	444	38	36	20	15	11	36	34	26	15	9	26	40	27	17	10	23	26	19	10	6
	Total	5,328	415	419	289	198	119	413	396	325	194	112	368	446	320	185	121	252	291	230	152	83
	Average	1,776	138	140	96	66	40	138	132	108	65	37	123	149	107	62	40	84	97	77	51	28

* SCC : Somatic cell counts.

year	season	%	Cheong-Won					Chin-Chon					Eum-Sung					Je-Chon · Dan-Yang				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
2003	Spring	100	27	33	19	15	6	29	26	25	14	6	25	33	23	12	8	20	24	29	18	10
	Summer	100	27	29	23	15	7	27	25	22	16	11	23	29	23	14	11	25	19	21	21	13
	Fall	100	30	28	21	13	9	29	26	25	12	8	28	29	21	13	8	18	39	21	12	10
	Winter	100	30	29	17	14	10	32	29	25	8	6	29	31	23	8	8	27	30	20	14	8
2004	Spring	100	29	31	20	13	8	29	29	24	11	7	25	33	23	10	9	31	24	23	14	8
	Summer	100	28	27	22	15	9	26	27	21	15	12	27	29	22	12	11	21	29	24	18	8
	Fall	100	29	30	20	13	8	30	28	21	13	8	26	32	21	14	8	27	31	23	12	7
	Winter	100	31	28	22	12	8	28	30	23	12	8	27	32	22	13	7	30	32	20	12	6
2005	Spring	100	31	29	21	13	7	28	29	22	14	7	26	32	23	13	7	24	25	26	15	10
	Summer	100	24	28	23	17	8	28	24	23	18	7	23	28	25	16	8	21	32	21	18	7
	Fall	100	29	28	18	15	11	29	29	19	16	7	28	31	20	14	8	27	31	23	14	5
	Winter	100	32	30	17	13	9	30	28	22	13	8	22	33	23	14	8	27	31	23	12	7
	Average	100	29	29	20	14	8	29	28	23	13	8	26	31	22	13	8	25	29	23	15	8

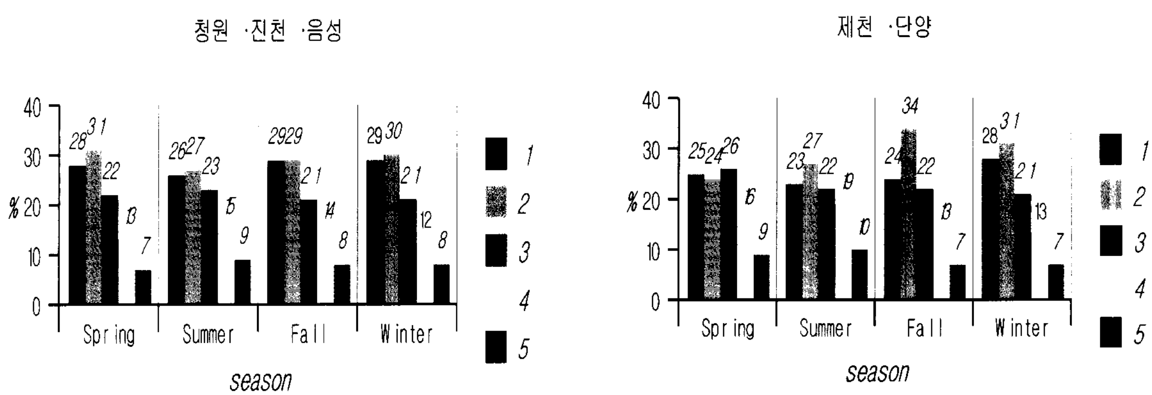
1rate: 200 >　2rate: 200~350　3rate: 350~500　4rate: 500~750　5rate: 750 <

Figure 3. The rate of five SCC ranges of bulk milk collected from dairy farms in Cheong-Won · Chin-Chon · Eum-Sung by the year.



1rate : 200 >
2rate : 200 ~ 350
3rate : 350 ~ 500
4rate : 500 ~ 750
5rate : 750 <

Figure 4. The rate of five SCC ranges of bulk milk collected from dairy farms in Chung-Buk by the season.



1rate : 200 >
2rate : 200 ~ 350
3rate : 350 ~' 500
4rate : 500 ~ 750
5rate : 750 <

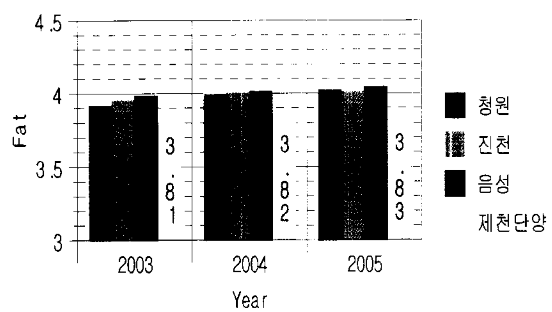
Table 5. The average FAT rate of bulk milk collected from regional dairy farms in Chung-Buk by the season.

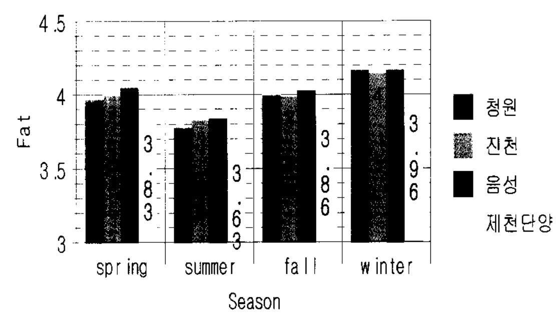
FAT*(%)

year	season	No. of sample	Cheong-Won	Chin-Chon	Eum-Sung	Je-Chon · Dan-Yang
			FAT(%)	FAT(%)	FAT(%)	FAT(%)
2003	Spring	120(84)	3.89	3.91	4.03	3.82
	Summer	120(84)	3.71	3.82	3.75	3.62
	Fall	120(84)	3.98	3.98	4.07	3.85
	Winter	120(84)	4.08	4.11	4.12	3.95
2004	Spring	120(84)	3.98	4.02	4.01	3.85
	Summer	120(84)	3.78	3.88	3.87	3.67
	Fall	120(84)	4.02	4.01	4.00	3.86
	Winter	120(84)	4.21	4.12	4.21	3.89
2005	Spring	120(84)	4.04	4.08	4.1	3.81
	Summer	120(84)	3.84	3.79	3.90	3.6
	Fall	120(84)	4.01	3.99	4.02	3.88
	Winter	120(84)	4.23	4.21	4.17	4.03
	Total	1,440(1,008)	47.77	47.92	48.25	45.83
	Average	120(84)	3.98	3.99	4.02	3.82

* FAT : The average FAT rate of raw milk

Figure 5. The Fat rate of bulk milk collected from dairy farms in Cheong-Won, Chin-Chon, Eum-Sung, and Je-Chon · Dan-yang by the year and the season.





고 찰

우리나라에 낙농업이 본격적으로 발전하여 원유검사를 실시한 이래 처음부터 지금까지 계속 실시하고 있는 유지율 검사와 1993년 6월 고름우유 등의 사회적 파동과 더불어 우유의 위생과 유우의 건강의 지표로서 검사 되어온 원유의 세균수와 체세포수를 중심으로 우리 지역의 2003년부터 2005년까지의 연중 유질과 유성분의 변화를 조사하였다. 원유의 위생적 품질을 좌우하는 가장 큰 요인은 세균오염과 유방염유의 혼입이다. 원유 중 각종 세균의

숫자는 원유생산 당시 환경위생과 착유후의 원유관리 상태를 나타내는 지표이며, 착유우의 건강상태 특히 유방염 감염여부를 판정하기 위한 체세포수는 유즙을 합성하는 유선조직의 건강상태를 알려주는 지표로 이용되고 있다. 또한 유성분 중 유지방은 60~70%의 포화 지방산과 25~35%의 불포화 지방산으로 구성되어 있으며 우유의 중요한 영양소로서 원유의 품질에 커다란 역할을 하고 있다. 이러한 이유로 우리나라에서는 지금까지 유지율, 세균수 및 체세포수 3가지를 통해서 원유의 품질을 평가하고, 그것을 근거로 원유 값을 책정하고 있다.

이에 본 연구에서는 점점 원유의 소비가 저하되어 낙농가들의 경제적 어려움이 더해가고, well-being시대의 사회적 흐름 및 소비자들의 요구가 거세지는 시대에 현재 시행하고 있는 원유검사 제도에 대하여 고찰해 보았다.

원유가격의 산정은 원유의 위생등급기준(수의과학검역원고시 제2002-4호, 2002. 6. 15)을 기준으로 하여 2004년 9월 16일부터 시행된 Table 7 의 유대조견표에 따르고 있다. 즉 원유가격은 원유의 기본가격(584원/L) + 가격요소별 가격(Table 6) 으로 결정 되어진다.

Table 6. The price difference by essential elements (%, won/L)

Fat(%)	3.0>	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9	4.0	4.1	4.2	4.3≤
price difference	-103.00	-41.20	-30.90	-20.60	-10.30	0.00	10.30	20.60	30.90	41.20	51.50	61.80	66.95	72.10	77.25

SCC		
Rate	Range (×1,000)	price difference (won/L)
1 rate	200 >	51.50
2 rate	200~350	23.69
3 rate	350~500	3.09
4 rate	500~750	-25.75
5 rate	750 <	-41.20

SPC		
Rate	Range (×1,000)	price difference (won/L)
1A rate	30	52.53
1B rate	30~100	36.05
2 rate	100~250	3.09
3 rate	250~500	-15.45
4 rate	500 <	-90.64

본 연구를 수행하기위해 검사 농가를 선정함에 있어서 임의의 표본농가가 아닌 유량 400~600ℓ를 납유하는 전업 낙농가를 지역별로 선정한 이유는 수입개방과 3D업의 기피현상 등으로 점점 사양길에 접어드는 낙농업을 일으키기 위해서는 건실한 집유 농가를 중심으로 분석이 되어져야 하고 평가 되어져야 하며 그렇지 못할 시는 도태 될 수밖에 없는 현실을 감안한 것이다. 그리고 충북의 가장 오지인 제천·단양지역과 비교함으로써 낙농 선진지와 유질의 차이를 비교하여 낙농업의 평준화 정도를 확인하였다. 즉, 본 연구 결과 지역적으로 오지이며 소규모 낙농가가 많은 제천·단양 지역의 유질과 유성분이 다소 떨어지는 경향이 있는 것은 사실이나 그 차이는 크지 않았다는 것을 알 수 있었다. 이로서 원유의 품질은 어느 지역이건 거의 평준화 된 것을 확인 할 수 있었다.

Table 7. Raw milk price(won/L)

Rate		FAT (%)														
SCC	SPC	3.0 미만	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9	4.0	4.1	4.2	4.3 이상
1 rate	1A rate	585.03	646.83	657.13	667.43	677.73	688.03	698.33	708.63	718.93	729.23	739.53	749.83	754.98	760.13	765.28
	1B rate	568.55	630.35	640.65	650.95	661.25	671.55	681.85	692.15	702.45	712.75	723.05	733.35	738.50	743.65	748.80
	2 rate	535.59	597.39	607.69	617.99	628.29	638.59	648.89	659.19	669.49	679.79	690.09	700.39	705.54	710.69	715.84
	3 rate	517.05	578.85	589.15	599.45	609.75	620.05	630.35	640.65	650.95	661.25	671.55	681.85	687.00	692.15	697.30
	4 rate	441.86	503.66	513.96	524.26	534.56	544.86	555.16	565.46	575.76	586.06	596.36	606.66	611.81	616.96	622.11
2 rate	1A rate	557.22	619.02	629.32	639.62	649.92	660.22	670.52	680.82	691.12	701.42	711.72	722.02	727.17	732.32	737.47
	1B rate	540.74	602.54	612.84	623.14	633.44	643.74	654.04	664.34	674.64	684.94	695.24	705.54	710.69	715.84	720.99
	2 rate	507.78	569.58	579.88	590.18	600.48	610.78	621.08	631.38	641.68	651.98	662.28	672.58	677.73	682.88	688.03
	3 rate	489.24	551.04	561.34	571.64	581.94	592.24	602.54	612.84	623.14	633.44	643.74	654.04	659.19	664.34	669.49
	4 rate	414.05	475.85	486.15	496.45	506.75	517.05	527.35	537.65	547.95	558.25	568.55	578.85	584.00	589.15	594.30
3 rate	1A rate	536.62	598.42	608.72	619.02	629.32	639.62	649.92	660.22	670.52	680.82	691.12	701.42	706.57	711.72	716.87
	1B rate	520.14	581.94	592.24	602.54	612.84	623.14	633.44	643.74	654.04	664.34	674.64	684.94	690.09	695.24	700.39
	2 rate	487.18	548.98	559.28	569.58	579.88	590.18	600.48	610.78	621.08	631.38	641.68	651.98	657.13	662.28	667.43
	3 rate	468.64	530.44	540.74	551.04	561.34	571.64	581.94	592.24	602.54	612.84	623.14	633.44	638.59	643.74	648.89
	4 rate	393.45	455.25	465.55	475.85	486.15	496.45	506.75	517.05	527.35	537.65	547.95	558.25	563.40	568.55	573.70
4 rate	1A rate	507.78	569.58	579.88	590.18	600.48	610.78	621.08	631.38	641.68	651.98	662.28	672.58	677.73	682.88	688.03
	1B rate	491.30	553.10	563.40	573.70	584.00	594.30	604.60	614.90	625.20	635.50	645.80	656.10	661.25	666.40	671.55
	2 rate	458.34	520.14	530.44	540.74	551.04	561.34	571.64	581.94	592.24	602.54	612.84	623.14	628.29	633.44	638.59
	3 rate	439.80	501.60	511.90	522.20	532.50	542.80	553.10	563.40	573.70	584.00	594.30	604.60	609.75	614.90	620.05
	4 rate	364.61	426.41	436.71	447.01	457.31	467.61	477.91	488.21	498.51	508.81	519.11	529.41	534.56	539.71	544.86
5 rate	1A rate	492.33	554.13	564.43	574.73	585.03	595.33	605.63	615.93	626.23	636.53	646.83	657.13	662.28	667.43	672.58
	1B rate	475.85	537.65	547.95	558.25	568.55	578.85	589.15	599.45	609.75	620.05	630.35	640.65	645.80	650.95	656.10
	2 rate	442.89	504.69	514.99	525.29	535.59	545.89	556.19	566.49	576.79	587.09	597.39	607.69	612.84	617.99	623.14
	3 rate	424.35	486.15	496.45	506.75	517.05	527.35	537.65	547.95	558.25	568.55	578.85	589.15	594.30	599.45	604.60
	4 rate	349.16	410.96	421.26	431.56	441.86	452.16	462.46	472.76	483.06	493.36	503.66	513.96	519.11	524.26	529.41

또한 선정된 충북지역의 건실한 낙농가의 원유를 현 유대기준에서 중심이 되는 유지방, 세균수, 체세포수를 중심으로 분석해 본 결과 현재의 유대기준에 몇 가지 문제점을 발견 할 수 있었다. 이에 본 연구는 이 연구결과를 토대로 현재 실시하고 있는 원유검사 제도의 몇 가지 문제점을 제기 하고자 한다.

2003년부터 2005년까지 낙농가의 계절별 일정 유지율 이상의 분포도는 Figure 6과 같다. 즉 유지율 3.4%이상의 분포도는 봄 90%, 여름 75%, 가을 89%, 겨울 95%를 나타내 예상대로 여름에 가장 낮은 분포도를 보였으나 상당한 수준에 올랐음을 알 수 있었다.

더구나 3.00%이상 농가는 봄 97%, 여름 93%, 가을 97%, 겨울 99%를 나타내 거의 100%에 육박했다.

원유검사를 처음 실시한 70년대부터 국내 원유가격을 산정하는 검사기준이 유지율 한 가지만으로 측정 하였거나, 유지율이 상당한 비중을 차지하고 있었기 때문에, 대부분의 농가들은 산유량은 다소 떨어지더라도 유지율이 높은 개체는 사육하고 산유량이 높고 건강한 개체라 해도 유지율이 낮은 개체는 도태 시켰으며, 유지율을 높이기 위해 청초 등의 조사료보다 농후사료를 선호하여 젖소의 경제적 수명을 단축 시켰던 것이 사실이다. 현재 각 유업체별 임의로 유지방을 제거한 저지방우유 혹은 무지방 우유를 Figure 7과

같이 경쟁적으로 생산하고 있다. 이는 저지방을 지향하는 소비자의 수요가 증가하고 있다는 것을 입증하는 것이고 유업체에서 그 취향에 맞추고 있다는 것이다. 그러므로 현재의 유지방 중심의 유대정책을 고집하는 것은 시대적 흐름에 맞지 않는 정책이다. 이제는 유지방 중심 유대정책의 제도적 개선에 대하여 연구해야 할 것이다. 즉 원유가격의 가격 요소 중 유지율을 삭제하는 것에 대하여 생각 해 봐야 할 것이며, 원유에 가수 등의 부정행위를 예방하기 위해 유지율검사는 유지하되 일정수준 유지방율(예 3.4% 혹은 3.0%)을 기준으로 pass, fail로 규정하는 2분법적 유대계산 방법을 취하는 방법 또한 고려해볼 사항이며, 또한 유지율 검사를 폐지하는 대신 현대 사회에 중시되는 영양소인 유단백질 또는 무지고형분 등의 유성분 검사로 대치 등의 방법은 보다 더 신중하게 연구 해봐야 할 것이다.

2003년 봄부터 2005년 겨울까지 3년간 청원・진천・음성지역 표본 60농가의 체세포수는 1급 28%, 2급 29 %, 3급 22%, 4급 13%, 5급 8%로 등급별로 다양하게 분포 되어 있는

Figure 6. A distribution chart of milk fat rates in ChungWon, Chin Chun and EumSung from 2003 to 2005 by the season.

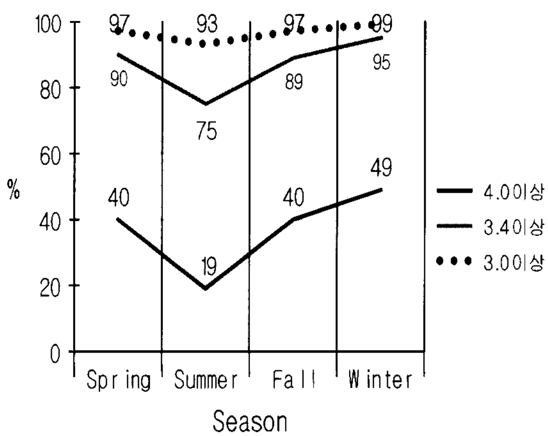
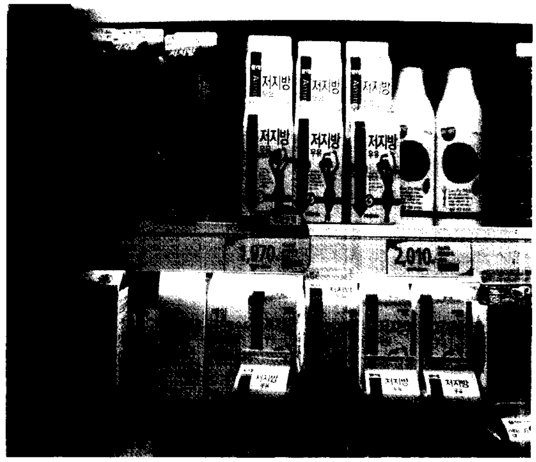
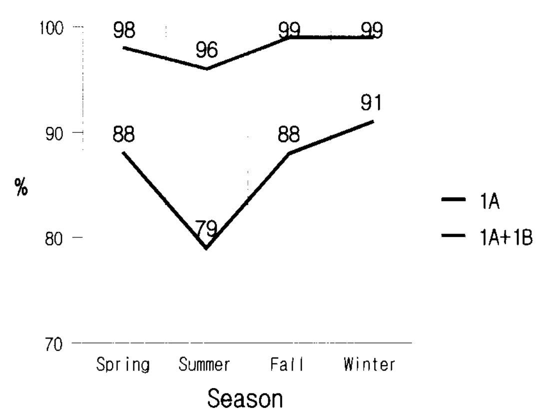


Figure 7. The low milk selling on the market



반면, 계절별 세균수의 분포는 Figure 8과 같다. 즉 세균수 1A등급은 봄 88%, 여름 79%, 가을 88%, 겨울 91%를 나타냈고, 1A등급+1B등급은 봄 98%. 여름 96%, 가을 99%, 겨울 99%를 나타냈다. 이는 3년간 1A등급+1B등급이 평균 98%이상으로 원유 위생의 지표인 세균수의 감소는 상당한 수준에 도달해 있음을 알 수 있었다.

Figure 8. A distribution chart of SPC First grade(1A,1B) in Chung Won, ChinChun and EumSung from 2003 to 2005 by the season.



본 연구에서 알 수 있었던 체세포수 등급별 분포도에 의하면 낙농초기부터 지금까지 젖소의 건강과 경제적 수명을 대표하는 유방염 문제는 아직까지도 극복해야 할 문제임을 알 수 있었다. 즉 현재 실시하고 있는 체세포수 위생등급을 계속 유지하거나 상향 조절 하여 점점 고급화 되어가는 젖소의 질병 차단을 위해 더욱 노력해야 할 것이다. 그러나 세균수는 현행제도에서 전체의 98%가 1등급으로 상향 평준화 된 것을 고려할 때, 각 유업체에서 특별관리 하고 있는 특수 우유의 등급제 같이 세균수를 더 낮추어 고른 등급의 분포로 조정하여 유질의 향상을 꾀하거나, 일정기준 즉 현재의 1등급정도 전후의 기준을 두어 pass, fail로 단순화 하는 등의 검사 기준변화에 대해 연구해야 할 것이다.

저지방 식품을 선호하는 소비자들의 소비 형태와 고품질 원유의 생산 그리고 낙농 산업의 경쟁력 제고를 위해 원유가격 제도 개선 방향에 대해 보다 많은 연구 및 토론이 필요할 것이다.

결 론

본 연구는 2003년 3월부터 2006년 2월까지 축산위생연구소에서 실시하고 있는 원유검사를 바탕으로 일일 착유량 400~600ℓ를 납유하는 청원·진천·음성지역의 농가와, 오지인 제천·단양지역농가의 집합유(bulk milk)에서 시료를 채취하여 세균수, 체세포수, 유지율을 조사하였다. 이를 계절별로 가중평균 계산하여 계절별, 지역별로 세균수, 체세포수와 유지율을 조사한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 2003년 봄부터 2005년 겨울까지 3년간 청원·진천·음성지역의 세균수 분포도는 1A등급 87%, 1B등급 11%, 2등급 1% 기타 1%로 조사 되었고, 제천·단양지역농가는 각 79%, 13%, 5%, 3%를 기록하였다.

2. 충북지역의 계절별 세균수등급 분포도는 봄 중엔 1A등급 87% 1B등급 10% 2등급 1% 기타 0%, 여름 중엔 각각 77%, 17%, 3%, 2%,로 나타났다. 또한 가을엔 각각 87%, 11%, 2%, 1%로 나타났으며, 겨울 중엔 각각 90%, 9%, 1%, 0%, 로 나타났다.

3. 2003년 봄부터 2005년 겨울까지 3년간 청원·진천·음성지역의 체세포수 분포도는 1등급 28% 2등급 29% 3등급 22% 4등급 13%, 5등급 8%, 제천·단양지역은 각각 25%, 29%, 23%, 15%, 8%로 나타났다.

4. 충북지역 봄 중 체세포수 분포도는 1등급 27%, 2등급 29%, 3등급 23%, 4등급 13%, 5등급 7%, 여름엔 각각 25%, 27%, 23%, 16%, 9%,로 나타났다. 또한, 가을의 성적은 각각 28%, 30%, 21%, 13%, 8%,이며, 겨울은 각각 29%, 30%, 21%, 12%, 8%로 나타났다.

5. 2003년 봄부터 2005년 겨울까지 3년간 각 지역별 유지율 평균은 청원지역 3.98%, 진천지역 3.99%, 음성지역 4.02%, 제천·단양지역 3.82%로 나타났으며, 대체적으로 모든 지역의 유지율은 비슷하였으며 상당한 수준의 유지율을 기록하였다.

6. 2003년부터 2005년까지 3년간 봄 중 청원, 진천, 음성, 제천·단양지역의 평균 유지율은 각각 3.97%, 4.0%, 4.05%, 3.83%를 나타냈고, 여름은 각각 3.78%, 3.83%, 3.84%, 3.63%이었다. 또한, 가을의 평균유지율은 각각 4.0%, 3.99%, 4.03%, 3.86%이며, 겨울 지역별 평균유지율은 각각 4.17%, 4.15%, 4.17%, 3.96%였다.

참고문헌

1. 장종근. 2005. 낙농산업 경쟁력 제고를 위한 원유 가격 제도 개선방향. 국제 유가공 심포지움
2. 김한중. 1997. 최근 국내산 원유의 위생학적 유질변동에 관한 조사연구. 건국대학교 : 3~23
3. 손봉환, 강구식. 1991. 체세포수를 주로한 원유질의 평가. 한국가축위생학회:87~103
4. 배동호. 1994. 한국 원유 생산업의 문제점과 발전 방향. 한국낙농학회, 축산학회 심포지움 : 23~52
5. 강정훈. 1998. 원유의 위생학적 연구(고품질 원유의 생산・이용 중심으로). 건국대학교 : 3~27
6. 정충일. 1998. 원유와 유제품의 품질향상을 위한 실행 방안. 한국 낙농 산업의 구조 조정
7. 농림부. 1999. 낙농진흥법시행규칙. 농림부령 1302호
8. 국립수의과학검역원. 2002. 원유의위생등급 개정. 국립수의과학검역원고시 제2002-4호
9. 농림부. 1999. 원유검사공영화실시요령. 농림부고시 제1999-38호
10. 김현욱, 강영재, 김동진 등. 1996. 낙농 및 식품미생물학. 선진문화사.
11. 손봉환. 1997. 원유의 세균학적 질 : 법적 요구와 지불제도-EU와 IDP회원국 현황. 대한수의사학회지. Vol. 33, No. 4 : 222~234

직원현황

(043-220-5550부터)

소속	직명	직급	성명	전화
검사과	소　장	연구관	최해연	5600
	과　장	수의 5	곽학구	5550
	총괄주사	행정 6	변인순	5551
		행정 9	이범우	5552
		기능 7	박순권	5553
		기능 7	허낙범	5554
		기능 9	홍미영	5558
	주무주사	수의 6	정찬우	5561
		연구사	한성태	5562
		수의 6	박선준	5563
		연구사	변현섭	5564
		수의 7	이현주	5565
		수의 7	이상명	5566
	파트리더	연구사	윤호규	5585
		연구사	이진성	5586
		연구사	이보영	5587
방역과	과　장	연구관	이청산	5570
	주무연구사	연구사	유기조	5571
		수의 6	이종화	5572
		수의 7	서황원	5574
		수의 7	안양수	5575
		공익수의사	조순제	5575
	파트리더	연구사	장래훈	5581
		수의 6	류대열	5582
		연구사	어종연	5583
종축시험장	장　장	농업 5	조준식	5590
	주무주사	농업 6	김권식	5591
		농업 6	최동수	5592
		기능 8	김영숙	5593
		기능 8	김석기	5594
		기능 8	김홍일	5595
		기능 9	김용식	5596
		기능 10	박권순	5597
		연구사	이동엽	5601
종축시험장		연구사	정경섭	5602
		기능 9	최지연	5603
		기능 10	박상희	5604
	파트리더	연구관	최재원	5599
		연구사	전순홍	5605
		수의 7	최지현	5606
		기능 8	신동식	5607
		기능 10	정의철	5608
북부지소	지소장	수의 5	박재명	5620
		주무연구사	이종진	5621
		수의 6	변철섭	5621
		수의 7	김환희	5621
		기능 8	김영운	5621
		기능 9	손재훈	5621
	파트리더	수의 6	이은정	5621
		수의 6	육민정	5621
		수의 7	김덕순	5621
		수의 7	김지혜	5621
		수의 7	서지연	5621
남부지소	지소장	수의 5	김정태	5630
	주무주사	수의 6	최필규	5631
		수의 6	손현수	5631
		연구사	이기창	5631
		수의 7	손소연	5631
		기능 7	이진도	5631
		기능 10	김소현	5631
		공익수의사	김학정	5631
제천지소	지소장	연구관	송영각	5640
	주무주사	수의 6	변정운	5641
		수의 6	유재윤	5641
		수의 7	이희영	5641
		수의 7	이용창	5641
		연구사	노정미	5641
		기능 8	신석주	5641

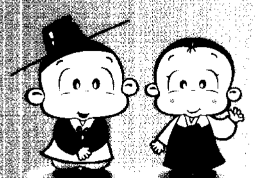
2006년 시험연구결과 보고서

- 발행인 : 최해연
- 편집인 : 곽학구, 한성태
- 발행처 : 충청북도축산위생연구소

  충북 청원군 내수읍 구성리 420번지

  Tel. (043) 220-5561 Fax. (043) 220-5569

  http://cbfarm.net/labs/livestock/
- 인쇄소 : 대청정판사
- 인 쇄 : 2007년 8월 일
- 발 행 : 2007년 3월 일



2007 시험연구보고서