구제역 백신접종 국가에서 NSP 항체검출과 처리과정에 대한 고찰

박 종 현
농림수산검역검사본부
서울지역본부 가축질병방역센터장/수의연구관
parkjhvet@korea.kr

일반적으로 구제역의 진단은 구제역에 감염된 동물로부터 유래된 조직 및 체액으로부터 항원, 핵산의 검출 및 바이러스의 분리 동정으로 진단이 가능하다. 바이러스 구조단백질 특이항체의 검출도 진단을 위해 사용할 수 있으며, 백신 접종 후에는 구제역바이러스 비구조 단백질 (NSP, non-structural protein)에 대한 항체는 감염표지로 사용할 수 있다. 구제역의 발생 이후 청정국으로 인정되기 위해서는 감염과 순환의 증거가 없어야 한다. 혈청학적으로 감염항체로 알려진 NSP 항체에 대한 예찰이 이루어져야 한다. 그러나 바이러스의 순환의 증거를 확인하기 위해 NSP 항체를 검출하기 위한 노력을 기울여야 하며, 검사결과 NSP 항체가 검출되었다 할지라도 모든 상황이 구제역 발생 때문에 일어난 일이라 판단할 수는 없기 때문에 후속적인 추가 조사를 실시하여 NSP 항체가 존재하는 상황에 대한 철저한 규명이 필요하다. 따라서 본 글에서는 구제역에 대한 백신접종 국가에서 현재까지 NSP항체 양성축의 검출사례 조사와 처리과정을 고찰하고자 하였다.

백신접종 국가에서의 NSP 항체검출 사례 및 처리

1. 터키

백신접종 지역인 터키에서 2003년 1,310두를 검사한 결과 16두의 양성(소 11, 양 5)이 확인되었고, 전체적으로는 1.22%(소 1.6%, 양 0.7%)가 양성으로 확인되었다. 이를 표 1과 같이 다시 분석해보면 백신접종 28일째 1.3% (14/1,046)과 60일째에 0.7% (2/264)의 양성율을 보였다. 이 결과를 토대로 양성결과를 나타내는 의심되는 역학그룹에 대해서 야외 능동예찰을 수행하여 어떤 임상증상을 보이는 감염이 확인되지 않았다. NSP에 대한 양성 항체를 갖는 동물은 오래 전에 감염되었거나 무증상으로 감염되어 아직까지 양성으로 남아 있는 항체인 것으로 최종적으로 결론지었다.

NSP 양성항체의 검출에 대해 다음과 같은 4가지 상황을 추정하였다. 1) NSP 항체양성은 이 지역에서 바이러스 순환으로 보기에는 너무 낮은 양성율을 보이고 있으며, 2) 전에 감염된 지역에서 NSP항체가 검출된 지역으로 동물이 이동된 것이 확인되었고, 3) 전에 감염되었던 동물에서 항체가 검사시점까지 남아 있었다. 4) 위양성 (false positive)의 가능성도 고려할 수 있다. 양성항체가 검출된 16마리 중 14마리가 2년령 이상이라는 상황도 이러한 상황을 뒷받침해 주고 있다.

Table 1. 터키에서의 NSP-ELISA에 의한 검사결과

구분	검사건수	양성건수	양성율(%)
백신접종 28일	1,046	14	1.3
백신접종 60일	264	2	0.7
총계	1,310	16	1.22

2. 이스라엘

2004년 1월에 이스라엘에서 구제역 발생동안 구제역 야외 노출 하에 백신 접종 젖소 농장과 육우 농장을 표 2와 같이 조사하였다. 발생 및 비발생 지역에 상관없이 젖소 사육농장에서 24개월령 이하에서 1.1% (3/215)와 24개월 이상에서 2.9% (12/410)으로 연령이 높을수록 NSP 항체 양성반응이 높아 졌으며, 육우 사육농장에서 7개월령 이하에서 26.3%

(36/145)와 7개월령 이상에서 86% (98/114)로 확인된 바 있다. 임상증상은 연령과 연관성 있게 도입 소에서 나타났고, 구제역에 대해 야외 노출 전에 백신접종이 4개월 이상된 비육소에서 86%가 나타났고, 바이러스 노출 전에 백신접종이 4개월 이하로 한번 접종한 경우 30%의 NSP 항체 양성으로 확인되었다. 야외노출 백신 접종 후 4개월 이상된 동물에서 임상증상이 나타났다. 반복적으로 접종된 경우는 NSP 항체 양성 반응개체가 비교적 적었으며, 임상증상도 없었다.

Table 2. 이스라엘 발생상황에서의 NSP 양성항체의 검출상황

분 류	감염지역의 NSP 항체양성율 (%)	비감염지역의 NSP 항체양성율 (%)
육우 사육농장	51.7 (134/259)	6.7 (8/120)
젖소 사육농장	4.1 (12/293)	0.6 (2/332)

3. 대만

대만의 경우 2009년 구제역 재발생 이후 돼지에서의 NSP 항체를 검출하기 위한 실험을 표 3와 같이 대규모로 실시하였으며, NSP 항체 킷트는 UBI NSP ELISA 와 Cedi-test를 이용하였다. 총 53,759두를 검사하여 43개 농장에서 NSP 양성 항체농장을 확인하였다. 확인된 농장에 대한 농장당 14개 샘플링 검사에서 추가적인 검사로 임상검사와 Cedi-ELISA와 UBI NSP ELISA를 이용하여 최종적으로 4개 농장을 구제역 양성농장으로 분류하였다. 임상검사와 혈청학적인 조사에 따른 감염농장의 NSP ELISA 검사는 돼지 사육농장에서 바이러스 순환을 확인하는 데 사용될 수 있음을 제시하였다.

Table 3. 대만에서 NSP-ELISA 양성 검출 농장과 추적 검사결과 (2009년)

검사월	샘플수	Cedi-test 반응 농장수	Cedi-test +UBI ELISA 반응농장수	추적검사-최종 양성농장수
1	1,003	0	0	0
2	3,261	3	1	0
3	5,551	5	2	0
4	5,131	4	2	1
5	5,808	13	6	0
6	6,196	22	12	1
7	4,819	7	2	1
8	5,742	22	14	0
9	4,580	3	1	1
10	5,228	4	1	0
11	4,306	6	2	0
12	2,134	3	0	0
총계	53,759	92	43	4

4. 남미

남미에서는 표 4와 같이 소에서 NSP를 이용한 항체진단법의 정확도를 평가하였다. 접종 후 진단의 특이도(진짜 음성을 진짜 음성으로 확인할 수 있는 확률)는 백신접종이 여러번 계속되는 동물에서 정확도가 낮아지는 것을 확인할 수 있다. 따라서 이러한 NSP 양성결과를 해석이 가능한 적용할 만한 새로운 진단법의 적용이 추가적으로 필요하다. 진단법으로는 웨스턴 블롯팅법 (EITB, Electro-immuno transfer blotting technique)을 적용하여 99.5% 이상의 특이도를 보일 수 있다고 설명하고 있다. 이 결과는 양과 돼지의 적용 결과도 비슷하다. 항원검사 (인후두액 검사)도 병행한다면 거의 완벽하게 검출이 가능하다고 평가하고 있다.

Table 4. 남미에서의 NSP 항체 진단법을 이용한 진단 특이도 및 민감도 (OIE, 2001)

가축의 백신접종 상황	ELISA 검사의 정확도		
	검사두수	진단특이도(%)	진단민감도(%)
미접종	12,804	99.05	–
1회 백신접종	3,500	98.49	–
다중 접종, 2년령 이하	79,649	97.90	–
다중 접종, 2년령 이상	2,517	95.20	–
자연감염, 미접종	1,000	–	98.80

※ Panaftosa (Pan American Foot and Mouth Disease Center)의 야외시험 결과

5. 기타

실험적으로 네델란드에서 A형 또는 O형 등의 백신 (6PD50 이상의 항원역가)을 접종한 후 4주후에 1.3 % (1/78)의 NSP 항체 양성개체 (Cedi-NSP kit 이용)가 확인된 바 있고, 대조군에서도 3.6% (1/28) 의 반응을 보였으며, 이 동물에 구제역바이러스 공격 접종 후 7일째에 백신 접종군에서는 75.6% (59/78) 및 대조군에서는 96.4% (27/28)의 양성을 확인하였다. 이 네델란드 발생시의 검사결과는 NSP-ELISA 진단법의 특이도는 99.0%로 확인된 바 있다.

NSP 항체양성 확인시 추가적 조사과정

백신접종의 상황에도 NSP 항체양성 결과가 확인이 되면 일단은 바이러스가 순환되고 있다는 가정하에 처리하여야 한다. 추가절차는 구제역 백신 접종군에서 예찰을 통해 나온 결과를

바탕으로 수행되어야한다. 이 조사는 모든 가능성에 대한 증거를 확보하는 차원에서 조사되어야 한다. 모든 역학적인 정보가 기반이 되어야 하고 그 역학적 결과는 보고서에 언급되어야 한다. 다음은 OIE에서 추천하는 추가적 조사 방법이다.

1) 임상증상 조사에 따라서 추가적으로 2번째 혈청 샘플은 일정기간이 경과 후 그 동물로부터 수행되어야 하며 이 기간 동안 백신접종 되지 않아야 하고 개별적으로 개체가 확인이 가능해야 한다. 2차 검사에서 통계적으로 NSP 양성항체를 갖은 개체는 동일하거나 1차 검사결과보다 적게 검출되어야 한다. 샘플링된 개체는 명백히 진단결과가 확인될 때까지는 이동되어서는 안 되며, 동일개체를 대상으로 3번째 재검사가 어렵다면 새로운 혈청학적인 검사는 적절한 시점에 수행되어야 한다. 초기 실험계획을 디자인할 때 반복적으로 검사가 가능하도록 개체인식이 가능하여야 한다. 이들 동물은 이동되지 않고 백신접종하지 않아야 하고, 적절한 기간 내에 재검사를 원칙으로 한다.

2) 임상증상 검사에 따라서, 혈청검사 샘플은 초기 샘플링과 물리적으로 접촉한 감수성 동물의 통계적으로 대표적인 샘플수로 채취되어야 하고, 항체 반응의 의미와 발생율 등으로 해석할 때 바이러스 순환이 되지 않는다면 통계학적으로 유의한 변화를 보이지 않아야 한다.

3) 임상증상 검사에 이어 역학적으로 관련된 동물군은 혈청학적 검사가 이루어져야 하고 만약 바이러스가 순환되지 않는다면 이 검사의 분석결과 이에 따르는 만족스런 결과가 나와야 한다.

4) 감시동물은 사용될 수 있다. 이들이 어리고 백신접종 안한 동물 또는 모체 이행항체가 거의 없는 샘플링 영역 내에 거주하는 같은 종의 동물이 가능하다. 바이러스 순환이 안된다면 이 동물들은 혈청학적으로 음성이 되어야 한다. 만약 다른 감수성 축종, 즉 백신접종 안된 동물이 존재할 경우, 부가적인 혈청학적인 증거를 제공하도록 감시동물로 활용이 가능하다. 실험실 결과는 임상적인 상황의 맥락에서 조사되어야 하고, 필수적인 정보가 혈청학적 조사를 뒷받침할 필요가 있으며, 바이러스 순환 가능성을 평가하는 것이 필요하며, 축산 생산시스템의 특징, 의심축과 그 관련군의 임상적인 예찰결과, 그 지역에서의 백신접종의 횟수, 양성 반응축과 연계된 위생적 처리절차와 그 과거 배경, 동물 확인과 이동의 통제, 과거 구제역 전파에서 지역적인 의미 등의 다른 요소들, 전체적인 조사과정이 예찰 시스템내에서 표준매뉴얼(SOP)로서 문서화 되어야 할 것이다.

NSP 항체양성 반응 및 처리절차에 대한 고찰

NSP 검출법은 비교적 매우 민감하고 특이도가 높다. 감염 후 8-15일 이상의 감염된 동물에서 진단 민감도는 100%에 근접한다. 그러나 백신접종 동물이 바이러스에 노출되었을 때 임상증상의 발현없이 감염되고 그 민감도도 낮아진다. 결과적으로 NSP (3ABC) ELISA는 개체검사를 위한 시험이라기 보다는 동물군을 검사하는 집단 검사수준에서 사용되어야 한다.

NSP ELISA에 대해서 더욱 정밀한 추가적인 실험법이 이어져야 하며 더 큰 규모의 검사가 필요하다. Lubroth 등 (1996)은 야외상황에서의 반복적인 백신접종한 혈청을 조사할 경우, 우연적이거나 의문스러운 NSP 항체 양성반응이 검출된다고 하였고, Bergman 등 (1993)은 반복적으로 백신 접종된 연령이 높은 동물에서 웨스턴 블롯(EITB)에서도 1개 또는 2개 이상의 양성 반응선 (밴드)을 확인할 수 있다고 하였다. Mackay 등(1998)의 연구에서도 구제역 NSP 항체의 검출만으로 전에 감염된 사실이라는 것을 명확하게 말할 수는 없다고 하였다. 이 때문에 추가적인 실험법이 필요하다.

백신 접종된 반추수는 바이러스에 감염되어도 무증상으로 보일 수 있고, 바이러스를 배출할 가능성이 있다. 그러므로 백신접종 개체군에서도 감염의 가능성을 고려하는 것이 필요하다. 바이러스에 노출 위험과 새로운 바이러스가 생성되는 원천이 될 가능성이 있다. 일부 반추수는 바이러스를 지니는 캐리어가 될 수 있다. 캐리어가 된 동물의 질병 전파는 현재까지는 확인되지 않고 있으나, 바이러스의 NSP 항체를 백신접종(SP) 항체와 같이 검사하고, 만약 백신접종 군이 무증상으로 감염되었다고 의심이 된다면 구제역 바이러스를 검출하기 위한 실험을 수행하는 것이 필요하다. 그 바이러스 검출 및 바이러스 RNA 검출 등 결과들은 적절한 샘플에서 수행할 수 있는 데 프로방 샘플, 혈액, 젖, 비강 도말 등이 검사시료로 사용 가능할 것이다. 소 유래 초대 갑상선 세포를 이용한 프로방 샘플의 바이러스 배양은 비 백신접종 캐리어 반추수에서 구제역 바이러스를 검출을 위한 가능한 방법으로 생

각된다. 바이러스 검출 실험법의 민감도는 현재까지는 변화가 커서 문제가 될 수 있는데, 특히 프로방 검사법은 다음의 문제점을 안고 있다. 1) 캐리어 동물의 바이러스 배출은 매우 간헐적이다. 2) 진짜 양성의 경우에도 의음성으로 판정될 수 있는 경우가 있으며, 프로방 샘플은 비교적 안정되지 않은 시료이기 때문에 샘플링 및 이동과정 중에 바이러스가 불활화 될 가능성도 존재한다. 바이러스 분리 동정법은 캐리어 동물을 검출하기 위한 100%의 민감도를 나타내지 않는다. PCR과 같이 수행되는 프로방 샘플링은 보다 민감도를 올릴 수 있는 방법이다. 그러나 구제역 비발생을 확인하기 위하여 바이러스 검사를 위한 노력이 필요하다 할지라도 프로방 검사법은 위에서 언급된 사항과 같이 현실적으로 실재상황에 적용하기 매우 어려운 방법으로 알려져 있으므로 적용시 신중을 기할 필요가 있다.

참 고 문 헌

- Bergman, I.E., et.al. (1993). Diagnosis of persistent aphtovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. Am. J. Vet.Res. 1993; 54(6): 825-31
- Bulut A. N., et al. A seroservey to trace non-structural proteins to FMDV conducted with the sera from Thrace Region of Turkey. http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/docs/research_group/Izmir/App10.pdf
- Chen, S. P. et. al. (2011). Application of non-structural protein ELISA kits in nationwide FMD surveillance in pigs to demonstrate virus circulation in Taiwan. Veterinary Microbiology 152 : 266-269

Chenard G., et al. (2008). Cedivac-FMD can be used according to a marker vaccine principle. Veterinary Microbiology. 128, 65-71

- Lubroth, J., et. al. (1996). Cattle response to FMDV nonstructural proteins as antigens within vaccines produced using different concentrations. Res. Vet. Sci. 59:70-8
- Mackay, D.J.K., et. al. (1998). Antibody to the nonstructural proteins of FMDV in vaccinated animals exposed to infection. Vaccine 16(5): 446-59
- OIE (2012). Chapter 2.1.5. Foot and mouth disease, Terrestrial Manual
- OIE. (2012). Chapter 8.5. Foot and mouth disease, Terrestrial Animal Health Code.
- OIE. (2002). Report of the meeting of the OIE Ad hoc group on evaluation of non structural protein tests for foot and mouth disease diagnosis. Paris, 2-4 October.
- Yadin, H., et. al (2007). The NSp immune response of vaccinated animals after in-field exposure to FMDV. Vaccine 25 : 8298-305