

< Original Article >

## 2016년 구제역 비구조단백질(NSP) 항체 지속 검출농가에서 구제역바이러스 검출을 위한 로프법 적용

하병석<sup>1</sup> · 김태성<sup>1</sup> · 이진우<sup>1</sup> · 이현지<sup>1</sup> · 이수미<sup>1</sup> · 박혜진<sup>1</sup> · 나진주<sup>1</sup> · 유소윤<sup>1</sup>  
신문균<sup>1</sup> · 변재원<sup>1</sup> · 박미영<sup>1</sup> · 표현미<sup>1</sup> · 위성환<sup>1</sup> · 남이현<sup>2</sup> · 이승윤<sup>3</sup> · 구복경<sup>1\*</sup>  
농림축산검역본부 구제역진단과<sup>1</sup>, 충남동물위생시험소<sup>2</sup>, 한별팜텍<sup>3</sup>

### Application of cotton rope to detect foot-and-mouth disease virus in the pigs of farms in which nonstructural protein (NSP) antibody were detected in 2016

Byeong-Suk Ha<sup>1</sup>, Taeseong Kim<sup>1</sup>, Jin-Woo Lee<sup>1</sup>, Hyun-Ji Lee<sup>1</sup>, Sumelee Lee<sup>1</sup>, Hye-Jin Park<sup>1</sup>,  
Jin-Ju Nah<sup>1</sup>, Soyoon Ryoo<sup>1</sup>, Moon-Kyun Shin<sup>1</sup>, Jae-Won Byun<sup>1</sup>, Mi-Young Park<sup>1</sup>,  
Hyun-Mi Pyo<sup>1</sup>, Sung-Hwan Wee<sup>1</sup>, Yi-Hyun Nam<sup>2</sup>, Seung-Yoon Lee<sup>3</sup>, Bok-Kyung Ku<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Foot and Mouth Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea  
<sup>2</sup>Chungnam Veterinary Research Institute, Hongseong 32280, Korea  
<sup>3</sup>HanByol Farm Tech, Pocheon 12251, Korea

(Received 11 December 2018; revised 26 December 2018; accepted 26 December 2018)

#### Abstract

The objective of this study was to assess the possibility of detecting Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) from the herd-based oral fluids specimens collected by the cotton ropes from pig farms that were found as FMDV nonstructural protein (NSP) antibodies positive. The cotton ropes were applied to detect FMDV in the selected pig farms which NSP antibodies were continuously detected in 2016, including the one pig farm which FMDV antigen were detected at the specimens from the pigsty environment. As the result, FMDV antigen were not detected in the oral fluid specimens collected by the cotton ropes. Theoretically, to detect FMDV antigen from the pigs with NSP antibodies has very low possibility because FMDV antigen disappeared at the time when NSP antibodies were produced by FMDV. Therefore, in order to detect FMDV antigen from the oral fluids using the cotton rope, it would be more effective to be applied to target the FMDV infected pigs rather than the NSP antibodies positive pigs. The collected oral fluids using cotton rope could be useful test specimens to monitor high-density pig populations for FMDV infection. Then, oral fluids sampling using cotton rope will be used for the efficient FMDV surveillance to detect FMDV antigen.

**Key words :** FMD, NSP Antibodies, Cotten Rope, Pig

## 서 론

국내에서는 2000년 첫 발생 이후 올해까지 총 10번의 구제역이 발생하여 우리나라 축산업에 막대한 피

해를 주고 있다. 2010~11년 구제역 발생 이후 모든 우제류에 대해 백신접종을 실시하는 것으로 구제역 방역정책을 전환하였지만 2014년 12월부터 2015년 4월까지 총 185건의 구제역이 발생하였으며 그 이후 매년 지속적으로 구제역이 발생하고 있다. 현재 우리나라는 백신정책과 함께 발생농장에 대해서 임상증

\*Corresponding author: Bok-Kyung Ku, Tel. +82-54-912-0774,  
Fax. +82-54-912-0888, E-mail. [kubk@korea.kr](mailto:kubk@korea.kr)

상을 보이는 개체의 부분적 살처분 정책을 병용하여 구제역 방역에 철저를 기하고 있다. 그러나 임상증상 개체에 대한 부분적 살처분 정책에서 가장 중요한 것은 임상증상을 보이는 개체를 신속하게 찾아내는 것이다. 그러나 아주 어두운 돈사나 고밀도 양돈장 등과 같은 사육환경에서는 구제역 발생시 각 개체에 대한 임상증상을 찾기가 쉽지 않다. 또한 면봉으로 개체별 항원시료를 채취하기 위해서는 많은 노동력과 시간이 소모되며 시료채취 과정에서 동물들이 받는 스트레스도 상당하다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 외국의 경우에는 2010년 무렵부터 구강분비액을 전염병 조기진단에 사용하려는 연구가 본격화되어 미국 등에서 돼지생식기호흡기증후군(PRRS) 진단에 로프법이 활용되었고 최근 구제역진단 분야도 독일 (Mouchantat 등, 2014b)과 호주(Vosloo 등, 2015) 등에서 연구자들의 보고가 있다. 현재 국내에서도 현장에서 사용할 수 있는 로프 키트가 판매되고 있으며 일부 가축전염병의 진단과 방역에 적용할 목적으로 로프법이 도입되어 활용되고 있으나 구제역 진단 및 방역을 위해 활용된 사례는 없다. 따라서 본 연구에서는 한돈협회 등과 협력하여 충남 홍성 및 보령지역의 지속적으로 NSP항체 검출 농가들을 중심으로 로프법을 이용한 구제역 바이러스 항원을 찾기 위한 능동적 예찰을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 공시축 및 공시재료

로프구강액을 채취하기 위하여 2017년 충남 보령 및 홍성지역의 돼지농가 중에서 지속적으로 구제역 NSP항체가 검출된 돼지농가(각각 1농가)와 그 주변 농가를 포함하여 총 11개 농가를 선정하였다. 선정된 농가를 대상으로 사육단계별(후보돈, 이유직후 자돈,

육성 전출전 자돈, 비육 전출전 육성돈 및 출하전 비육돈)로 각각 1개씩 농가별 총 5개 순면 로프(Cotton Rope)를 돼지의 어깨 높이에 달아놓고 1시간 이후 수거하여 로프로부터 구강액을 수집하였으며(Fig. 1) 동일 농장에 대해 3개월 간격으로 2회 채취하였다. 로프구강액 뿐만 아니라 돈사별로 돈사바닥과 사료통 등 환경검사를 위한 시료도 채취하였다. 1차 시기에는 11개 농가에서 수거된 44개의 로프구강액과 환경시료 225개 포함한 269개 항원검사용 시료를 채취하였다. 혈청검사를 위하여 농가별 10~30두 규모로 총 250두 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 실험에 공시하였다. 2차 시기에는 48개의 로프구강액과 환경시료 167개를 포함하여 총 215개 항원검사 시료를 채취하였다. 혈액은 농가별 11~30두 규모로 총 240두에서 채취하였다. 또한 충남지역에서 구제역 NSP 항체가 지속적으로 검출되는 작은 규모의 2농가를 재선정한 후 전돈사의 전돈방에 순면로프를 적용하여 구제역 항원검사를 실시하였다. 구제역 잠복기 14일 기준을 감안하여 2주 간격으로 3회 채취된 총 225개의 로프구강액을 항원검출 실험에 공시하였다.

### 구제역 항원검사

채취된 로프구강액 및 환경시료는 원심분리(3000 rpm, 10분)하여 상층액을 사용하였다. 자동화 추출장비(MagNa Pure96, Roche)를 이용하여 상층액 100  $\mu$ L로부터 RNA를 추출하였으며 사용하기 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 구제역 항원 검출을 위하여 FMDV의 3D gene을 검출할 수 있는 Accupower<sup>®</sup> FMDV real-time RT-PCR Mastermix Kit (Bioneer, Korea) 이용하였다. CFX96 Touch<sup>™</sup> real-time PCR Detection System (Bio-rad, USA)을 사용하여 검사하였으며 Ct value가 40이하인 경우 양성으로 판정하였다.



Fig. 1. Suspending a cotton rope in a pig pen for 1hr and collected by squeezing the rope.

## 구제역 NSP 항체 검사

구제역 감염지표인 NSP (Nonstructural Protein)항체를 조사하기 위해 PrioCHECK<sup>®</sup> FMDV ELISA kit (Prionics, Netherlands)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행한 후 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도로 Percentage Inhibition (PI) 수치를 계산하고 이 수치가 50 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

## 결 과

### 충남 보령 및 홍성지역 11개 농가 1차로 수거된 샘플의 항원 및 항체 검사결과

1차 11개 농가에서 채취한 로프구강액 44개와 환경시료 225개에 대한 항원검사(총 269개)를 민감도 높은 real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR)로 실시하였고 항체검사는 총 250두에 대해 구제역발생의 지표로 사용되고 있는 비구조단백질(NSP)항체를 조사하는 ELISA를 실시하였다. 그 결과, NSP항체가 연속적으로 3회 검출된 충남 홍성소재 6번 농장과 2회 반복해서 검출된 10번 농장의 돼지 30두에서 1두 및 25두에서 5두가 NSP항체가 각각 검출되었다. 그러나 구제역발생의 지표로 사용되고 있는 NSP항체가 검출되었음에도 불구하고 민감도 높은 rRT-PCR에서 구제역 유전자는 검출되지 않았다(Table 1).

### 충남 보령 및 홍성지역 11개 농가 2차로 수거된 샘플의 항원 및 항체 검사결과

11개 농가를 현지 상황에 맞게 3개월 이내로 2차 방문하여 1차와 동일한 방법으로 시료 총 215개를 채취하였다. 로프구강액 44개와 환경시료 167개에 대한 항원검사(rRT-PCR)를 실시하였고 항체검사는 총 240두에 대해 NSP ELISA를 실시하였다(Table 2). 그 결과, NSP항체가 2회에 걸쳐 지속적으로 검출된 충남 보령의 1번 농장에서 30두 중 2두에서 NSP항체가 검출되었다. 그리고 1차에서 NSP 항체가 검출되었던 홍성의 6번 및 10번 농장에서는 2차에서는 NSP항체 검출되지 않았다. 또한 1차 채취 시료와 마찬가지로 로프구강액과 환경시료에 대한 항원검사에서 모두 음성을 나타내었다.

### NSP 지속적 검출되는 규모 적은 2농가(보령·홍성) 2주간격 연속적 3회 항원검사결과

11개 충남지역 농가 결과에서 5개 돈방을 선택해서 2회에 걸쳐 항원검사를 실시하였지만 NSP항체가 검출된 농장을 포함해서 모두 음성을 나타내었다. 따라서 항원검출 가능성을 높이기 위해 시료채취 범위를 농장전체로 늘려 검사하였다. NSP 항체가 지속적으로 검출되는 농가 중 규모가 작은 2농가를 선정하여 전돈사 및 전돈방에 채취하였으며 총 3회에 걸쳐 225개의 로프구강액에서 구제역항원검사를 실시하였다(Table 3). 3회에 걸쳐 샘플 채취한 225개 로프구강

**Table 1.** Results of 1<sup>st</sup> Samples collected from 11 farms in Chungnam area

Farms	Frequency of NSP Ab detection	Region	No. of samples			Results	
			Rope	Environment	Serum	No. of Positive/No. of Samples	
						NSP ELISA	rRT-PCR
1	2 Times	Chungnam Boryeong	5	24	30	0/30	0/29
2	2 Times	Chungnam Boryeong	5	20	20	0/20	0/25
3	-	Chungnam Hongsung	4	16	20	0/20	0/20
4	2 Times	Chungnam Hongsung	3	16	20	0/20	0/19
5	-	Chungnam Hongsung	2	14	15	0/15	0/16
6	3 Times	Chungnam Hongsung	3	26	30	1/30	0/29
7	2 Times	Chungnam Hongsung	5	24	25	0/25	0/29
8	-	Chungnam Hongsung	5	24	30	0/30	0/29
9	2 Times	Chungnam Hongsung	5	25	25	0/25	0/30
10	2 Times	Chungnam Hongsung	5	26	25	5/25	0/31
11	-	Chungnam Hongsung	2	10	10	0/10	0/12
Total			44	225	250	6/250	0/269

**Table 2.** Results of 2<sup>nd</sup> Samples collected from 11 farms in Chungnam area

Farms	Frequency of NSP Ab detection	Region	No. of samples			Results	
			Rope	Environment	Serum	No. of Positive/No. of Samples	
						NSP ELISA	rRT-PCR
1	2 Times	Chungnam Boryeong	5	35	30	2/30	0/40
2	2 Times	Chungnam Boryeong	4	4	20	0/20	0/8
3	-	Chungnam Hongsung	4	20	20	0/20	0/24
4	2 Times	Chungnam Hongsung	3	-	20	0/20	0/3
5	-	Chungnam Hongsung	5	-	15	0/15	0/5
6	3 Times	Chungnam Hongsung	5	21	25	0/25	0/26
7	2 Times	Chungnam Hongsung	5	26	25	0/25	0/31
8	-	Chungnam Hongsung	5	7	24	0/24	0/12
9	2 Times	Chungnam Hongsung	5	26	25	0/25	0/31
10	2 Times	Chungnam Hongsung	5	26	25	0/25	0/31
11	-	Chungnam Hongsung	2	2	11	0/11	0/4
Total			48	167	240	2/240	0/215

**Table 3.** Results of Samples collected from 2 farms in Chungnam area

Farms	Region	No. of Positive result (rRT-PCR)/ No. of Rope		
		1st	2nd	3rd
		A <sup>a</sup>	Chungnam Boryeong	0/39
B <sup>b</sup>	Chungnam Hongsung	0/23	0/22	0/29
Total	2 Regions	0/62	0/96	0/67

FMDV NSP antibody is continuously detected in these<sup>a,b</sup> small scales. Three consecutive tests were performed at intervals of 2 weeks. <sup>c</sup>Oral fluid samples were collected twice.

액 모두에서 민감도 높은 rRT-PCR을 적용해서 진단 하였으며 구제역 유전자는 검출되지 않았다.

## 고 찰

본 연구에서는 바이러스 순환가능성이 높은 농가를 선정하기 위하여 과거에 NSP 항체 및 환경시료에서 구제역 항원이 동시에 검출되었던 농가와 NSP항체가 반복 검출되고 있는 농가를 포함시켰다. 충남지역의 11농가를 선정하여 3개월 간격으로 2회 실험을 하였으며 항원 검출가능성을 높이기 위해 NSP항체가 지속적으로 검출되는 규모가 작은 농가 2농가를 재선정하여 전문사의 전문방에 순면로프를 설치하여 2주간격으로 3회 반복하여 민감도 높은 구제역 유전자 검사를 실시하였다. 그 결과 모든 농장에서 구제역 유전자는 검출되지 않았다. 그 이유는 구제역에

감염되어 NSP항체가 생성되는 시기는 주로 구제역 항원이 점차사라지는 시점으로서 NSP항체가 검출된 개체들의 타액으로부터 구제역 항원을 찾는 것이 쉽지 않기 때문이다(Oem 등, 2008).

외국의 경우 순면로프를 이용한 구제역에 대한 연구결과를 살펴보면 농장현장에 적용실험을 한 것이 아니라 구제역 바이러스 공격집중된 돼지에서의 그 효율성을 평가한 것이다. 그 결과는 구제역 바이러스 종류 및 백신접종 유무에 따라 면봉으로 각 개체마다 타액을 채취하는 방법과 그룹별로 순면로프를 이용하여 구강액을 모아서 실험하는 검사와는 약간의 민감도 차이가 있었다. 백신 접종을 하지 않은 멧돼지에서는 개체별 타액과 로프구강액의 검사결과, 초기에는 차이가 없었으나 21일째에는 로프구강액보다 개체별 타액에서 항원검출 확인되어 백신접종을 하지않은 경우에는 바이러스 배출 함량이 비교적 높아 개체별 타액에서 항원검출 효율이 더 좋은 것으로 설명되었다(Mouchantat 등, 2014b). 반면에 백신접종을 한 경우에는 개체별 타액보다 로프구강액의 그룹별 검사에서 민감도가 더 높거나 효율이 더 좋은 것으로 나타났다. 구제역 혈청형 A형의 유전자형 SEA 97인 바이러스를 접종하고 Malaysia 97백신으로 면역된 개체에서 2~14 DPC (days post-challenge) 동안 샘플을 채취하여 비교하였다. 그 결과 개별 타액시료에서는 3, 7 DPC째에서만 양성인 반면에 순면로프 구강액에서는 11 및 13 DPC째를 제외하고는 모두 양성으로 관찰되었다(Vosloo 등, 2015). 본 연구진이 국내발생

구제역 바이러스를 공격집중하여 로프를 적용한 경우에도 비슷한 결과가 도출된바 있다.

구제역 외에 다른 질병의 항원검출에도 순면로프 구강액 채취법이 활용되었다. 최근에 중국에서 문제가 되고 있는 아프리카돼지콜레라(African swine fever)바이러스를 돼지콜레라(Classical swine fever)와 구제역과 함께 동시에 찾아내기 위한 방법으로 순면로프 구강액을 채취하여 실험하였다(Grau 등, 2015). 아프리카돼지콜레라 접종된 돼지에서는 임상증상이 나타나기 2~3일전에 로프 구강액에서 항원 검출이 확인되었고 돼지콜레라 접종된 돼지의 경우에는 임상증상과 동시에 접종 5일째에 항원이 검출되었다. 또한 구제역의 경우에는 임상증상이 나타나기 전 바이러스 접종 1일째에 구제역 항원이 검출되어 순면로프가 외래성 질병을 한번에 검사하기에 아주 효과적인 것으로 설명되고 있다. 돼지콜레라 바이러스를 8개월령 멧돼지 2두에 감염시켜 감염되지 않은 대조군 멧돼지 5두와 동거시켜 살펴 본 결과 개체별 타액에서는 10일째, 순면 로프액에서는 12~13일째에 바이러스 항원이 검출되어 항원검출 시기가 더 연장되는 것을 알 수 있었다(Mouchantat 등, 2014a). 또한, Pepin 등(2015) 및 Ramirez 등(2012) 실험에서 PRRS 감염된 개체의 실험결과에서도 개체보다는 순면로프 구강액에서 항원 검출량이 더 많고 오래 지속되는 것을 관찰할 수 있었다. 그 외에도 자돈에서 Influenza A 바이러스 감염과 관련해서 개체별 비즙 채취보다는 순면 로프로 채취한 비즙에서 더 높은 항원 농도와 더 오랫동안의 기간 동안 바이러스 항원 검출이 가능함을 제시하였다(Goodell 등, 2013).

이와 같이 순면 로프를 활용하여 바이러스 종류와 백신접종 유무에 따라 약간의 차이가 있지만 면봉으로 개체의 타액을 채취하는 것보다 로프를 이용하면 더 많은 타액을 모을 수 있기 때문에 민감도가 다소 높은 것으로 설명하고 있다(Vosloo 등, 2015). 또한 임상증상이 있는 돼지는 로프에 대한 관심이 덜하거나 로프를 물지 않을 수도 있음에도 불구하고 로프를 이용한 시료채취는 동물에게 스트레스를 덜 주고 많은 양의 타액을 얻을 수 있는 좋은 방법으로 추천을 하고 있다(Vosloo 등, 2015).

## 결 론

구제역 바이러스 순환가능성이 높은 NSP 항체검출

농가들을 선정하여 2회에 걸쳐 로프구강액 92개와 환경시료 392개를 포함하는 총 484개 항원시료를 채취하여 민감도 높은 rRT-PCR법을 적용하였으나 구제역 유전자는 검출되지 않았다. 또한 NSP항체가 지속적으로 검출되는 규모가 작은 농가(2농가)를 재선정한 후 전돈사의 전돈방에 순면 로프를 설치하여 14일간격으로 3회 반복하여 채취한 구강액 225개에 대한 구제역 유전자도 검사결과도 모두 음성을 나타내었다. 따라서 로프구강액에서 항원을 검출하기 위한 목적으로는 NSP항체 검출농가에 적용하기보다는 구제역 발생시에 바이러스가 배출되는 시기에 구제역 감염농장에 적용하게 되면 효과가 클 것으로 여겨진다. 구제역 방역실시요령에는 구제역 발생시 시·군의 첫 발생농가는 전 두수 살처분하지만 이후 발생농가에서는 임상증상을 나타내는 개체에 대해서만 살처분 하도록 되어있다. 농장 내 어두운 돈사환경이나 돼지들이 밀집 사육되고 있는 농장의 경우에는 육안으로 임상증상 돼지를 모두 발견하기는 어려울 것으로 여겨진다. 이처럼 구제역 임상증상 관찰이 쉽지 않은 농가에서 구제역이 발생하였을 경우 순면 로프를 설치하여 발생농장 내의 구제역 항원을 적극적으로 찾는다면 구제역 조기근절과 방역에 크게 도움이 될 것이다.

## 감사의 글

본 논문은 농림축산검역본부 연구사업(세부과제명: 무증상 감염축 조기색출을 위한 항원 모니터링 방안 연구, 세부과제번호: B-1543082-2016-18-01)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## REFERENCES

- Goodell CK, Prickett J, Kittawornrat A, Zhou F, Rauh R, Nelson W, O'Connell C, Burrell A, Wanga C, Yoon K, Zimmerman J.J. 2013. Probability of detecting influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 in individual pig nasal swabs and pen-based oral fluid specimens over time. *Vet Microbiol* 166: 450-460.
- Grau FR, Schroeder ME, Mulhern EL, McIntosh MT, Bounpheng MA. 2015. Detection of African swine fever, classical swine fever, and foot-and-mouth disease viruses in swine oral fluids by multiplex reverse transcription real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diag Invest* 27:

- 140-149.
- Mouchantat S, Globig A, Böhle W, Petrov A, Strebelow HG, Mettenleiter TC, Depner K. 2014a. Novel rope-based sampling of classical swine fever shedding in a group of wild boar showing low contagiousity upon experimental infection with a classical swine fever field strain of genotype 2.3. *Vet Microbiol*. 70: 425-429.
- Mouchantat S, Haas B, Böhle W, Globig A, Lange E, Mettenleiter TC, Depner K. 2014b. Proof of principle: non-invasive sampling for early detection of foot-and-mouth disease virus infection in wild boar using a rope-in-a-bait sampling technique. *Vet Microbiol* 172: 329-333.
- Oem JK, Yeh MT, McKenna TS, Hayes JR, Rieder E, Giuffre C, Robida JM, Lee KN, Cho IS, Fang X, Joo YS, Park JH. 2008. Pathogenic characteristics of the Korean 2002 isolate of foot and mouth disease virus serotype O in pigs and cattle. *J Comp Path* 138: 204-214.
- Pepin B. J, Kittawornrat A, Liu F, Gauger P.C, Harmon K, Abate S, Main R, Garton C, Hargrove J, Rademacher C, Ramirez A, Zimmerman J. 2015. Comparison of Specimens for Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection in Boar Studs. *Transbound Emerg Dis* 62: 295-304.
- Ramirez A, Wang C, Prickett JR, Pogranichniy R, Yoon K, Main R, Johnson JK, Rademacher C, Hoogland M, Hoffmann P, Kurtz A, Kurtz E, Zimmerman J. 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 104: 292-300.
- Vosloo W, Morris J, Davis A, Giles M, Wang J, Nguyen HT, Kim PV, Quach NV, Le PT, Nguyen PH, Dang H, Tran HX, Vu PP, Hung VV, Le QT, Tran TM, Mai TM, Le QT, Singanallur NB. 2015. Collection of Oral Fluids Using Cotton Ropes as a Sampling Method to Detect Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in Pigs. *Transbound Emerg Dis* 62: e71-75.