

2016년에서 2018년에 국내 말 인플루엔자 백신 접종 후 항체 양성률

조민수^{1,†} · 이주연^{1,†} · 이상규² · 송재영¹ · 이지현¹ · 현방훈¹ · 조수동¹ · 우인옥^{1,*}

¹농림축산검역본부

²한국마사회

Antibody responses after vaccination against equine influenza in Korea in 2016-2018

Min-Su Cho^{1,†}, Ju-Yeon Lee^{1,†}, Sang Kyu Lee², Jae Young Song¹, Jienny Lee¹, Bang-Hun Hyun¹,
Soo-Dong Cho¹, In-Ohk Ouh^{1,*}

¹Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

²Korea Racing Authority, Gwacheon 13822, Korea

Abstract: Equine influenza (EI) is the main cause of respiratory illness in equines across the globe and is caused by equine influenza A virus (EIV-A), which has impacted the equine industry internationally because of the marginal mortality and high morbidity. In the present study, the immune responses after equine influenza vaccination were evaluated in 4,144 horses in Korea using the hemagglutination inhibition (HI) assay. The equine influenza virus (EIV), A/equine/South Africa/4/03 (H3N8), was used as the antigen in the HI assay. The mean seropositive rates were 89.2% (97.4% in 2016, 77.6% in 2017, and 92.4% in 2018). This paper highlights the advances in understanding the effects of vaccines and control strategies for mitigating the emerging menace by EIV.

Key words: horse, equine influenza virus (EIV), hemagglutination inhibition (HI), antibody

서론

말 인플루엔자는 말에서 호흡기 질환이며, Orthomyxoviridea 계통의 A형 인플루엔자 바이러스에 속하는 말 인플루엔자 바이러스에 의해 발생한다[1]. 말 인플루엔자 바이러스는 Hemagglutinin (HA)와 Neuraminidase (NA) 외 피 당 단백질의 항원 성질에 기초하여 2개의 다른 아형으로 분류되며 위치와 연도에 따라 명명된다[2]. 1956년 동유럽에서 처음 발견된 후 백신으로 사용된 H7N7 아형(A/equine/Prague/1/1956 prototype 22 strain)을 세계동물보건기구(OIE)는 더 이상 말 인플루엔자 백신으로 사용되지 않는다고 규정하였다[3]. H3N8 EIV(A/equine/Miami/1/1963 prototype strain)의 말 인플루엔자 바이러스 (EIV)는 미국에서 1963년에 처음으로 보고되었다[4]. 유전자 분류형으로 H3N8 subtype은 항원성에 따라 European 계열(A/equine/suffolk/89)과 American 계열(A/equine/Newmarket/1/93)로 구분하고 있으며, American 계열은 Kentucky, Florida, Argentina 계열로 세분화되어 발생하고 있다. H3N8 subtype의 American 계열 중에서 Florida 계열의 말 인플루엔자 바이러스는 다시 clade 1, 2로 나뉘어지며 clade 1이 전 세계적으로 유행하고 있으며, 아시아 지역에서도 Florida clade 1 계열이 주로 유행하는 것으로 보고되었다[5-7]. 한국에서는 2013년 국내 사육 중인 말에서 각 항원성(A/equine/South Africa/4/03와 A/equine/Wildeshausen/1/08)에 따라서 91.7%와 93.6% 항체가 양성률이 보고되었다[8].

말 인플루엔자 바이러스에 대한 국내 백신 접종은 1974년도에 한국마사회(KRA)의 주도하에 처음으로 이루어져 현재까지 이어지고 있다. 이전에는 H3N8 subtype과 H7N7 subtype 두 종류의 바이러스에 대해서 백신 접종이 이루어져왔으나 1999년도에 OIE/WHO 회의에서 H7N7 subtype의 멸종을 선포하면서 말 인플루엔자 바이러스의 H7N7 subtype의 백신 접종 중지를 권

*Corresponding author

In-Ohk Ouh

Animal and Plant Quarantine Agency,
Gimcheon 39660, Korea

Tel: +82-54-912-0802

Fax: +82-54-912-0812

E-mail: dvmoio@korea.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

ORCID:

Min-Su Cho

https://orcid.org/0000-0003-0499-8480

Ju-yeon Lee

https://orcid.org/0000-0001-6390-8268

Sang Kyu Lee

https://orcid.org/0000-0002-8117-914X

Jae young Song

https://orcid.org/0000-0001-6070-3785

Jienny Lee

https://orcid.org/0000-0001-5192-8800

Bang-hun Hyun

https://orcid.org/0000-0002-3429-3425

Soo-dong Cho

https://orcid.org/0000-0002-9899-8328

In-Ohk Ouh

https://orcid.org/0000-0001-9382-2924

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Received: February 20, 2019

Revised: August 8, 2019

Accepted: August 12, 2019

고하여 최근에는 H3N8 subtype에 대해서만 백신 접종이 이루어지고 있다. 국내에서 사용되고 있는 말 인플루엔자 바이러스의 백신은 (주)메리알 코리아의 프로텍플루(Proteqflu)를 사용하고 있으며, 원료약품은 인플루엔자 A/eq/Ohio/03 (H3N8) 재조합 canarypox virus와 인플루엔자 A/eq/Richmond/1/07 (H3N8) 재조합 canarypox virus 혼합백신이다. 각각 항원 함량은 5.3 log₁₀ FAID₅₀ (Fluorescent assay infectious dose 50%)의 농도로 사용하며 말 1두당 1 mL씩 귀 뒤의 목부분에 근육주사 한다.

최근 2016년에서 2018년 까지 국내 말 인플루엔자 항체조사 연구보고는 없는 실정이다. 따라서 전국적으로 국내 말의 인플루엔자 항체여부를 조사 및 분석하여, 말 인플루엔자에 대한 방역 관리를 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

말 검사 대상

말 인플루엔자 항체 조사에 이용하기 위하여 한국마사회에서 2016년 1,380두, 2017년 1,362두 그리고 2018년 1,402두 총 4,144두의 혈액을 각각 채취하여 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다(Table 1).

혈구응집능

96 well U-bottom plate에 모든 well에 50 µL의 PBS를 분주한다. 1번째 well에 시료 50 µL를 넣고 2번 well부터 11번 well까지 2진 희석하였다. 0.5%로 희석한 닭적혈구를 50 µL씩 모든 well에 분주하고 잘 섞어준 다음 상온에서 1 시간 반응시킨다.

혈구응집억제 반응

말 인플루엔자에 대한 항체검사는 OIE 매뉴얼에 따라 혈구응집억제반응시험법(HI, hemagglutination inhibition)으로 실시하였다[9]. 이 시험법에 사용하는 항원으로는 A/equine/South Africa/4/03 (H3N8) (Florida clade I)을 사용하였다. 말 인플루엔자 바이러스는 10일령의 부화란에 접종하여 37°C에서 3일 동안 배양한 뒤 바이러스의 혈구응집반응을 확인하여 사용하였다.

혈청은 56°C에서 30분간 반응하여 비동화한 뒤 50% 닭 혈구 20 µL를 첨가하여 20분간 상온에서 섞어준다. 4,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 HI에 사용한다.

HI는 96 well microtiter U-bottom plate에 PBS 25 µL를

분주한다. 1번, 2번 well에 혈청 25 µL를 넣고, 2번 well부터 11번 well까지 25 µL씩 2진 희석하여 1번, 12번 well을 각각 혈청, 혈구 대조군으로 남겨두었다. 4 HA unit으로 조정된 바이러스 용액을 2번에서 11번 well까지 25 µL씩 분주하고 잘 섞어준 다음 상온에서 1시간 반응시켰다. 1시간 뒤 0.5%로 희석한 닭적혈구를 50 µL씩 모든 well에 분주하고 잘 섞어준 다음 상온에서 1시간 반응시킨다.

결 과

연도별 항체 양성률

2016년에는 총 1,380두에서 양성두수가 1,344두수로 양성률이 97.4%이고, 2017년에는 총 1,362두에서 양성두수가 1,057두로 양성률이 77.6%이며, 2018년에는 총 1,402두에서 1,295두가 양성두수이고 92.4% 양성률을 확인하였다(Table 1).

말 유형별

말의 용도에 따라 분류하여 항체 양성률을 분석한 결과, 2016년에는 씨암말, 씨수말은 100% 항체 양성률을 보이며, 기타, 승용마, 경주마, 육성마 순으로 항체 양성률이 높게 나타났다. 또한 2018년에는 기타, 승용마, 경주마, 씨암말, 씨수말, 육성마 순으로 항체 양성률이 높았다. 2017년을 제외하고는 육성마에서 항체 양성률이 가장 낮게 나타났다(Table 2).

연령별 항체 양성률

말 연령별로는 2016년에는 10세 이상, 6-10세, 미상, 3-5세, 2세, 1세 이하 순이고, 2017년에는 10세 이상, 6-10세, 1세 이하, 3-5세, 2세로, 2018년에는 6-10세, 10세 이상, 3-5세, 2세, 1세 이하 순으로 항체 양성률이 높았다(Table 3).

지역별 항체 양성률 및 항체역가

전국 시도별로 2016년에는 총 1,380의 말 혈청을 확보하여 말 인플루엔자 바이러스 항체 양성률을 조사한 결과 충청남도, 전라남도와 경상북도에서는 100% 항체 양성률을 확인 되었고, 경기도, 강원도, 제주도, 경상남도, 충청북도, 전라북도 순으로 항체 양성률이 높게 조사되었다. 2017년에는 총 1,362두 말 혈청을 확보하여 말 인플루엔자 바이러스 항체 양성률 조사한 결과, 충청남도, 전라남도, 충청북도, 전라북도, 경상북도, 강원도, 경기도, 경상남도 순으로 양성률이 높게 조사되었다. 그리고 2018년에는 총 1,402두의 말

Table 1. The antibody positive rate to equine influenza virus H3N8 in 2016–2018

Year	No. of horse	No. of positive horse	Antibody positive rate (%)
2016	1,380	1,344	97.4
2017	1,362	1,057	77.6
2018	1,402	1,295	92.4
Total	4,144	3,696	89.2

Table 2. The antibody positive rate to equine influenza virus in horse types

Year	Horse type	No. tested	A/EQ/South Africa/4/03 antigen	
			No. positive	Positive rate (%)
2016	Racehorse	519	503	96.9
	Riding horse	484	476	98.3
	Yearling and two-year-old in training	61	50	82.0
	Broodmare	235	235	100
	Stallion	11	11	100
	Unknown	70	69	98.6
	Total	1,380	1,344	97.4
2017	Racehorse	360	198	55.0
	Riding horse	627	562	89.6
	Yearling and two-year-old in training	73	58	79.5
	Broodmare	232	187	80.6
	Stallion	18	17	94.4
	Unknown	52	35	67.3
	Total	1,362	1,057	77.6
2018	Racehorse	334	310	92.8
	Riding horse	698	668	95.7
	Yearling and two-year-old in training	72	43	59.7
	Broodmare	257	236	91.8
	Stallion	16	14	87.5
	Unknown	25	24	96.0
	Total	1,402	1,295	92.4

Table 3. Antibody responses in the hemagglutination inhibition test in different age groups

Year	Horse age	No. tested	A/EQ/South Africa/4/03 antigen	
			No. positive	Positive rate (%)
2016	0–1	16	13	81.3
	2	77	65	84.4
	3–5	566	548	96.8
	6–10	330	329	99.7
	> 10	360	359	99.7
	unknown	31	30	96.8
	Total	1,380	1,344	97.4
2017	0–1	51	38	74.5
	2	92	53	57.6
	3–5	452	290	64.2
	6–10	376	330	87.8
	> 10	391	346	88.5
	Total	1,362	1,057	77.6
2018	0–1	58	30	51.7
	2	49	42	85.7
	3–5	457	426	93.2
	6–10	425	406	95.5
	> 10	413	391	94.7
	Total	1,402	1,295	92.4

Table 4. Antibody responses in the hemagglutination inhibition test in regional differences

Year	Region	No. tested	A/EQ/South Africa/4/03 antigen	
			No. positive	Positive rate (%)
2016	Gangwon-do	48	47	97.9
	Gyeonggi-do	482	473	98.1
	Chungcheongnam-do	39	39	100
	Chungcheongbuk-do	27	26	96.3
	Jeollanam-do	39	39	100
	Jeollabuk-do	66	59	89.4
	Gyeongsangnam-do	171	166	97.1
	Gyeongsangbuk-do	76	76	100
	Jeju	430	418	97.2
	Unknown	2	1	50
	Total	1,380	1,344	97.4
2017	Gangwon-do	48	41	85.4
	Gyeonggi-do	459	328	71.5
	Chungcheongnam-do	38	37	97.4
	Chungcheongbuk-do	28	26	92.9
	Jeollanam-do	40	38	95
	Jeollabuk-do	70	63	90
	Gyeongsangnam-do	150	104	69.3
	Gyeongsangbuk-do	64	57	89.1
	Unknown	465	363	78.4
Total	1,362	1,057	77.6	
2018	Gangwon-do	48	45	93.8
	Gyeonggi-do	521	494	94.8
	Chungcheongnam-do	38	35	92.1
	Chungcheongbuk-do	28	26	92.9
	Jeollanam-do	40	39	97.5
	Jeollabuk-do	67	66	98.5
	Gyeongsangnam-do	139	134	96.4
	Gyeongsangbuk-do	66	63	95.5
	Jeju	455	393	86.4
Total	1,402	1,295	92.4	

혈청을 확보하여 전라북도, 전라남도, 경상남도, 경상북도, 경기도, 강원도, 충청북도, 충청남도, 제주도 순으로 항체 양성률이 높게 조사되었다(Table 4).

고 찰

2016년 한국에서 사육한 말의 총 마리수는 27,676마리이다[10]. 본 연구에서는 국내 전체 지역에서, 2016년에서 2018년 까지 매년 연도별로 말에 혈청을 수집하여 말 인플루엔자 항체조사를 실시하였다.

국내에서 사용하고 있는 말 인플루엔자 백신은 (주)메리알 코리아에서 판매되고 있는 프로텍플루 백신으로 접종 프로그램은 기초백신에 경우 5-6 개월령의 건강한 말에 초회 접종한 4-6주에 재접종한다. 재백신의 경우는 기초백신 5개월

후에 접종하고 그 이후부터 매년 보강 접종한다. 그리고 감염의 우려가 높은 경우 또는 초유접취가 불충분한 경우 본 백신의 기본 프로그램 보다 1개월 전인 4 개월령 부터 기초 백신을 할 수 있다. 일반적으로 말의 인플루엔자 바이러스의 백신 접종은 말의 연령이 약 2세 즈음에 1차 접종을 한 다음 1개월 뒤 2차 접종, 5개월 뒤 3차 접종을 하고, 이후 약 6개월 간격으로 지속적인 백신 접종이 이루어지고 있다[11]. 말 인플루엔자 바이러스의 백신 접종은 2세 이후에 첫 접종이 이루어지기 때문에 3세 이상의 말에서는 지속적인 백신 접종으로 인해 항체 양성을 높은 수치를 보이고 있다.

국내 지역별로는 항체가 조사에서 항체가 양성률이 해마다 차이가 있었다. 앞으로도 계속 전국적으로 말 인플루엔자 백신에 대한 항체가 조사는 필요하다고 여겨진다.

국내에서 사육되고 있는 경주용 말의 대부분이 말 인플루

엔자에 대한 백신을 매년 정기적으로 접종하므로 높은 항체 양성률은 백신접종에 의한 것으로 판단된다. 2세 이하의 육성마에서 항체 양성률이 상대적으로 낮아서 어린 말들에 대해 정확한 백신접종 프로그램 준수가 필요할 것으로 사료 된다.

감사의 글

이 연구는 농림축산검역본부 (N-1543083-2016-20) 지원으로 이루어졌습니다.

References

1. Timoney PJ. Equine influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1996;19:205-211.
2. Paillot R. A systematic review of recent advances in equine influenza vaccination. *Vaccines (Basel)* 2014;2:797-831.
3. Equine Influenza (Infection with Equine Influenza Virus). OIE, Paris, 2018. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.07_EQ_INF.
4. Waddell GH, Teigland MB, Sigel MM. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J Am Vet Med Assoc* 1963;143:587-590.
5. Bryant NA, Rash AS, Russell CA, Ross J, Cooke A, Bowman S, MacRae S, Lewis NS, Paillot R, Zanoni R, Meier H, Griffiths LA, Daly JM, Tiwari A, Chambers TM, Newton JR, Elton DM. Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Vet Microbiol* 2009;138:41-52.
6. Gildea S, Quinlivan M, Arkins S, Cullinane A. The molecular epidemiology of equine influenza in Ireland from 2007–2010 and its international significance. *Equine Vet J* 2012;44:387-392.
7. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:152-179.
8. Kim EJ, Kim BH, Yang S, Choi EJ, Shin YJ, Song JY, Shin YK. Antibody responses after vaccination against equine influenza in the Republic of Korea in 2013. *J Vet Med Sci* 2015;77:1517-1521.
9. Daly JM, Lai AC, Binns MM, Chambers TM, Barrandeguy M, Mumford JA. Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J Gen Virol* 1996;77:661-671.
10. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Report of “A Fact Finding Survey of Horse Industry in South Korea during 2016. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Sejong, 2017.
11. Elton D, Bryant N. Facing the threat of equine influenza. *Equine Vet J* 2011;43:250-258.