

(옆면)

(앞면)

317009-3

농생명산업기술개발사업 3차 년도 최종보고서(건고딕 13p)

발간등록번호

11-1543000-003141-01

(건고딕31p)

오리주요질병에 대한 신속 현장진단법 및 모니터링 기술개발 최종보고서

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

2020.07.10.

(건고딕15p)

주관연구기관 / (주) 애니벳
협동연구기관 / 전북대학교

(건고딕 15.5p)

2020

(건고딕13p)

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

(건고딕 20p)

(건고딕 17p)

<제 출 문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “오리주요질병에 대한 신속 현장진단법 및 모니터링 기술 개발”(개발기간 : 2017. 04. ~ 2019. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020 . 07 . 10

주관연구기관명 : (주) 애니벳 (주후돈)
협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (조재영)



주관연구책임자 : 주후돈
협동연구책임자 : 강민
협동연구책임자 : 조정곤

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	317009-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.04.21. ~ 2019.12.31	단 계 구 분	1 / 1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	오리주요질병에 대한 신속 현장진단법 및 모니터링 기술 개발			
연구책임자	주후돈	해당단계 참여연구원 수	총: 16명 내부: 8명 외부: 8명	해당단계 연구개발비	정부: 1,100,000천원 민간: 370,000천원 계: 1,470,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 16명 내부: 8명 외부: 8명	총 연구개발비	정부: 1,100,000천원 민간: 370,000천원 계: 1,470,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주) 애니벳			참여기업명 (주) 애니벳	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	SCI 6건	출원 3건									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) | 보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>주요 오리질병인 오리바이러스성간염, 오리바이러스성장염, 오리리레텔라감염증의 병원에 신속현장진단법과 항체검사법을 개발을 통하여 오리 주요 3종 질병에 대한 스마트 지능형 진단 및 모니터링 플랫폼을 확립하고자 함</p> <ul style="list-style-type: none"> - 병원체의 현장검사를 위한 형광 기반의 고감도 현장진단기 개발 - 자동화된 검사가 가능한 항체 검사 카트리치의 개발 - 농장별 허드별 시료뱅크 구축 및 진단기술 표준화 (표준 진단법 또는 표준품 제작기술) - 현장실증시험 				
<p>연구개발성과</p>	<p>오리바이러스성 간염을 비롯 3종 주요 질병의 진단용 항원 항체 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - DHAV-1 VP1, DHAV-3 VP1, DEV UL51 재조합 항원 단백질 발현 및 정제 최적화 완료 - DHAV-1특이항체 8종, DHAV-3 특이항체 10종, DEV 특이항체 10종 개발 <p>병원체 고감도 항원검사를 위한 현장진단기 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시분할 복합광학계 시험품, 시제품 개발 및 오리감염검사용 소프트웨어 플로우차트 설계 - Eu-TRF 고감도광학계를 장착한 동물용 진단기 시제품을 개발하고 성능을 평가 및 야외검사를 대비한 카트리치 온도 유닛을 설계하여 성능 검증. - 고감도 형광물질인 Europium 입자 기반 항체 conjugation 최적화 - DHAV-1, DHAV-3, DEV에 대한 Eu-고감도 항원진단 카트리치를 설계하여 최적화하였음. 아울러 시험품, 시제품 제작 완료하였음. <p>백신항체 검사를 위한 자동검사 시스템 구축 및 카트리치 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 오리감염검사용 소프트웨어 플로우차트 설계 및 소프트웨어 최적화 완료 - 웹 기반 검사기기 결과전송 분석, 조회 기능 개발 - 바이러스 및 박테리아 항원을 이용한 DHAV-1,-3, DEV, Riemerella IgG ELISA 최적화 - 동물용 자동검사 시스템 검역본부 등록 완료 <p>오리 3종 질병 항원, 항체검사를 위한 생물학적 원료 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - VP1, VP0, VP3, 3D 유전자의 특성 규명 - DHAV-1, DHAV-3, DEV, Riemerella 유전자 검사법 및 생물학적 검사법 확립 - 오리간염의 항원 및 항혈청 시료 패널 확보 <p>항원검사 표준개발 및 진단기 유효성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 야생오리에서 Riemerella 균 분리동정 및 확보 - DHAV, DEV, Riemerella에대한 표준 항체 검사법 확립 <p>고감도 항원검사용 휴대형 진단기 유효성 평가 및 기존 진단법과의 상관성 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고감도 항원 휴대용 진단기 및 DHAV-1, DHAV-3, DEV, AI 카트리치 성능 평가 <p>오리 항체검사용 ELISA 유효성 평가 및 기존 진단법과의 상관성 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - DEV 항체검사용 ELISA 유효성 평가 <p>진단기술 현장검증을 위한 로드맵 작성 및 인프라 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 테스트-베드 농장 정보 수집 및 질병발생 상황분석 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>본 연구는 산업동물진단 체계를 변화시킬 수 있는 진단기기 플랫폼 구축을 목표로 고감도 병원체 항원 탐지를 현장에서 검사 가능한 진단기기인 TRIAS-Vet과 실험실에서 자동화된 항체검사가 가능한 AFIAS-Vet 두가지 진단기기 플랫폼을 완성하였음. 현재 동물진단은 주로 육안으로 검사하는 Rapid test와 ELISA 기반의 실험실 검사를 사용하고 있으나, 의료영역에서는 기기 기반의 검사로 빠르게 검사환경이 변화하고 있음.</p> <p>본 과제를 통하여 구축된 동물용 현장진단기기 시스템은 산업동물 진단에서 혁신적인 변화를 유도할 수 있는 플랫폼으로, 현재의 랩서비스 중심의 진단을 진단기기 중심의 농장현장 검사시스템으로 변화를 줌으로써 질병 발생시 빠른 진단 및 선제적인 대처가 가능한 국가적인 시스템 구축 가능함,</p> <p>자동화 항체 진단 모니터링 시스템의 확립을 통하여 질병발생 및 확산이전에 국가적인 주요질병 모니터링 및 방역시스템 구축이 가능한 제품을 개발하였음.</p> <p>본 과제를 통하여 구축된 시스템 및 노하우를 이용하여 오리관련 질병뿐만이 아니라 국가적인 전방위적인 관리가 필요한 양돈질병 등 다양항 감염질병군에 대하여 토탈 관리 시스템 구축 가능할 것으로 판단됨.</p> <p>본사에서 구축한 동물진단 온라인 플랫폼은 초기단계이지만, 본 플랫폼의 추가적인 개발을 통하여 범국가 감염진단 데이터베이스의 구축 및 관리가 가능함.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>오리바이러스성간염</p>	<p>오리바이러스성장염</p>	<p>오리리레텔라감염증</p>	<p>현장검사</p>	<p>모니터링</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Duck Virus Hepatitis</p>	<p>Duck Virus Enteritis</p>	<p>Duck Riemerella infection</p>	<p>POCT</p>	<p>Monitoring</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	14
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	130
4. 연구결과의 활용 계획 등	136

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

<본문작성 양식>

1장. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

주요 오리질병인 오리바이러스성간염, 오리바이러스성장염, 오리리레텔라감염증의 병원에 신속 현장진단법과 항체검사법을 개발을 통하여 오리 주요 3종 질병에 대한 스마트 지능형 진단 및 모니터링 플랫폼을 확립하고자 함

1-2. 연구개발의 필요성

가. 오리산업과 질병발생 현황

(1) 국내 오리 산업은 국내 소비자들의 오리고기 소비량이 증가됨에 따라 90년대 중반 이후부터 영세 사육형태에서 대규모 전업 사육형태로 빠르게 변화하였고, 오리 생산액도 증가되면서 농림생산액 부분 7대 산업으로 급성장 하였음.

(2) 2015년 기준으로 오리 사육수수는 9,772천수, 사육가구는 722가구, 가구당 사육수수는 13,534수에 달함(통계청, 2015. 12.)

* 2,000마리 이상 사육가구 대상 전수 조사

<국내 오리 생산현황>

연도	사육수수(수)	사육가구	가구당 사육수수(수)
2013	10,898,806	866	12,585
2014	7,539,388	605	12,462
2015	9,771,532	722	13,534

(통계청, 2015. 12.)

(3) 2014년 총 생산액은 1조 575억원으로 2013년 (1조 57억원) 대비 5.15% 증가(518억원) 하였음. 오리 사육수수 증가와 함께 사료 곡물 값 인상 등 생산비 증대에 따라 총생산액 규모는 지속적으로 증가할 것으로 판단됨

<농림업생산액 중 오리 품목 비중>
원,%)

(단위 : 10억 원,%)

구분	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년
오리 총생산액(A)	1,232.3	1,305.9	1,396.6	1,045.1	1,005.7	1,057.5
농업 총생산액(B)	41,364.3	41,677.4	41,358.2	44,300.3	44,608.8	44,916.8
축산 총생산액(C)	16,484	17,471.4	14,990.9	16,022.5	16,232.8	18,781.9
A/B	3.0	3.1	3.4	2.4	2.3	2.4
A/C	7.5	7.5	9.3	6.5	6.2	5.6

(농림축산식품부, 2015)

(4) 국내 오리산업의 규모에 비해 생산시설 및 제반 농장운영시스템은 아직 낙후한 상황이며, 전염성 질병으로 인한 오리의 집단 폐사로 사육농가의 엄청난 경제적 피해가 발생되고 있

음

(5) 특히 국내 오리 산업에서 가장 피해가 큰 질병으로는 집단 누적 폐사율이 높은 오리바이러스성간염을 비롯한 오리바이러스성장염, 오리패혈증 등을 들 수 있음

(6) 주요 오리질병중 오리바이러스성장염은 아직까지 국내에 보고된 바가 없고, 오리바이러스성간염과 오리살모넬라감염증, 오리리메렐라감염증은 꾸준히 발생하고 있으며, 최근 고병원성 조류인플루엔자가 발생함에 따라 경제적, 사회적으로 큰 문제를 야기하고 있음

(7) 오리바이러스성간염(duck virus hepatitis)은 제2종 가축법정전염병으로서, 주로 3주령 이하의 어린 오리에서 발생되며 병의 경과가 빠르고 폐사율도 높은 질병임(난계대전과는 인정되지 않음)

(8) 병원체는 피코르나바이러스(Picornaviridae)과에 속하는 오리간염바이러스(DHV-1, duck hepatitis A virus; DHAV)이며, 혈청형 1, 2, 3형 중 국내에서는 1형과 3형이 발생하고 있으며, 질병의 빠른 경과로 폐사가 나타나기 전까지는 질병 감염여부를 인지하지 못하는 경우가 많고, 주요 병변은 간의 점상·반상 출혈소견과 신장의 혈관울혈이 나타나고 후궁반장의 증상을 보이며 폐사함

(9) 국내에는 1985년에 DHV-1이 전남지역에서 처음 분리된 이후, 현재까지 지속적으로 오리바이러스성간염이 발생되고 있으며, 2000년대 초·중반 농림축산검역본부에서 분리한 47건 중 46건이 변이주인 3형인 것으로 나타남(Duck's Science, 2009)

(10) 오리리메렐라감염증(오리패혈증, Riemerellosis)은 오리 및 거위 등 물새류의 세균성 전염병으로 주로 1~8주령의 오리에서 발생하여 5~70%의 폐사, 신경증상 및 체중저하를 유발하는 소모성 질병으로, 국내 육용오리농장에서는 폐사 및 증체율저하로 인해 경제적 피해를 일으키고 있으며, 종오리에서는 만성적인 관절염 및 수란관염을 유발하여 수정율 및 산란율을 감소시킴

(11) 3~5주령에 감수성이 가장 높아 사육후기 오리의 패혈증으로 인한 폐사뿐만 아니라 심한 체중 저하를 일으키며, 종오리에 감염 시 농장내 순환감염되면서 관절염, 수란관염 등의 지속적인 피해를 야기함

(12) 전 세계적으로 21종 이상의 혈청형이 존재하고 있으며, 상호간 교차방어능이 낮은 것으로 알려져 있음

(13) 국내에서는 1993년에 전남 강진의 육용오리농장에서 최초로 발생이 보고되었으며 최근 까지도 꾸준히 발생하고 있음

나. 주요 오리질병의 진단 및 관리기술

(1) 오리질병 3종 질병의 항원검사를 위해서는 표준검사법인 부화란이나 세포접종에 대한 바이러스 분리를 표준으로 선택하고 있으나 현실적으로는 진단에 적용하는 것이 불가능함.

(2) 최근에는 주로 PCR 이나 RT-PCR이 사용되나, 이 검사법은 시료를 채취한 후 실험실로 이송하여 검사해야 하고, 검사시간이 1-2일이 소요되어 현장검사를 통한 신속한 방역조치에 한계가 있음.

(3) 항체검사법으로는 바이러스 질환에는 중화항체시험법이나 ELISA 가 가능하지만 중화시험법은 세포주와 부화란이 요구되고 고도의 훈련이 필요하므로 일선에서는 검사에 사용하기 어렵고, ELISA의 경우 제품화 되어 있지 못한 실정임. 일부 수입제품이 있으나 매우 고가임.

(4) 또한 3종 오리질병의 경우, 인플루엔자 감염과 감별검사 해야하는 측면을 고려하면, 신속한 현장진단과 쉬운 항체검사를 통하여 모니터링 할 수 있는 진단법과 제품 개발이 시급한 실

정입.

(5) 현장 방역기관, 대규모 농장의 업무 상황을 고려하였을 때 병원체 검사는 현장에서 신속한 검사가 가능한 Rapid test가 적절하지만, Rapid test는 결과를 눈으로 판독해야 하고 검사결과를 디지털화된 데이터로 저장에 어려운 문제점이 있음. 또한 항체검사를 위한 ELISA는 가장 흔히 사용하는 방법이나 모두 수동으로 검사하여 결과를 분석하여야 하므로 역시 신속한 검사가 어렵고 인력이 많이 소요되는 문제점이 있음.

(6) 따라서, 오리의 이들 주요 3종 질환에 대해 효과적인 관리와 모니터링을 위한 플랫폼 구축이 필요한데, 이를 개발함에 있어 현장의 문제를 해결하기 위해서는 우선 숙달되지 않은 적은 인력으로 쉽게 수행이 가능한 기술이 되어야 함. 항원 검사는 현장에서 직접 검사가능하면서, 고감도 검출이 가능하고, 결과를 쉽게 전송가능하여야 하며, 항체검사의 경우 수동으로 검사하는 과정을 탈피하여 자동으로 쉽게 검사할 수 있는 도구를 개발하여 플랫폼을 구축하면 세계에서 가장 쉽고, 뛰어난 방역시스템을 운영할 수 있을 것임.

<표, 그림: 3종 오리질병의 병원체 진단법>

질 병	병원체	분 리	항원검출	유전자검출
오리바이러스성간염 (Duck Virus Hepatitis, DVH)	Duck Hepatitis Virus (DHAV) Type 1 (DHAV-1) Type II (DHAV-2) Type III (DHAV-3)	Tissue samples Primary cell culture Ducklings(1-7 days) Duck embryos (10-14 days)	Virus neutralization (after isolation)	Tissue samples RT-PCR (3D) realtime RT-PCR LAMP
오리바이러스성장염 (Duck Virus Enteritis, DVE)	Duck Virus Enteritis Virus (DVEV)	Tissue samples Cell culture Ducklings(1 day) Duck embryos (9-14 days)	Virus neutralization (after isolation)	Tissue samples PCR realtime PCR LAMP
오리리메렐라감염증 (Riemerella anatipestifer infection)	Riemerella anatipestifer	Tissue samples Culture	Gel diffusion precipitin test (GDPT)	Tissue samples PCR

<표, 그림. 3종 오리질병의 항체 모니터링 검사 방법 비교>

질 병	병원체	항체검출	혈청학적 검사	Remark
오리바이러스성간염 (Duck Virus Hepatitis, DVH)	Duck Hepatitis Virus Type 1 (DHAV-1) Type II (DHAV-2) Type III (DHAV-3)	Serum neutralization with DEK, DEL cell	ELISA (Core, S-Core)	Vaccine
오리바이러스성장염 (Duck Virus Enteritis, DVE)	Duck Virus Enteritis Virus (DVEV)	Serum neutralization (Cell adapted DEV)	ELISA (UL-30, UL-55, gB1)	Vaccine
오리리메렐라감염증 (Riemerella anatipestifer infection)	Riemerella anatipestifer	Latex agglutination	ELISA	Infection

다. 진단검사 기술의 문제점 및 해결방안

(1) 최근 의료진단의 경향을 보면 눈으로 판독하는 Rapid 제품이 점차 사라지는 추세이며, 고감도 기기를 통하여 판독하고 결과를 분석하는 디지털 진단기기화 하는 경향을 보이고 있음.

(2) 아울러 최근의 의료용 진단기기는 사람에 의한 검사결과 차이를 제거하고, 인건비와 훈련비용을 절감하기 위해 자동화의 경향을 나타내고 있으며, 현장진단의 경우에도 자동화 기기

가 많이 출시되고 있음.

(3) 현재까지 동물 진단은 의료진단과 달리 병원체 검사는 병원체 분리, PCR 등 실험실 중심의 시약들이 주류를 이루어 왔고, Rapid test로 육안으로 판독하는 시약이 아직 주류를 보이고 있으나, 이에 대한 정확도, 민간도 문제나 검사 비효율성은 이미 의료시장에서 증명되었음.

(4) 또한 항체검사는 대량시료 처리를 위해 ELISA와 같은 고도로 훈련된 전문가만이 사용가능한 진단시약을 중심으로 개발되어 왔으나, 최근의 진단시장 경향은 수동으로 검사하는 시약에서의 재현성, 정확도 문제와 고도의 훈련시간 등 높은 비용을 줄이기 위해 자동화 검사기술로 급격히 전환되고 있다는 것을 감안하면, 축산 산업과 이를 지원하는 방역기관에서도 향후 축종별 효율적인 진단플랫폼에 대한 고민이 필요하다 판단되며, 혁신적인 기술의 과감한 도입을 통하여 고효율의 진단플랫폼에 대한 개발이 신속히 추진될 필요가 있음.

1-3. 연구개발 범위

가. 연구개발 대상 및 기술제품의 개요

(1) 3종 주요 질환에 대한 항원, 항체 검사 원료개발

(가) 고민감도, 특이도 진단법 개발을 위해 타겟이 되는 유전자 부위에 대한 선별과 우수한 품질의 생물유전자원 확보가 중요함. 이를 위해 이미 확보하고 있는 질병별 국제 표준주, 국내 유행 병원체 등의 생물유전자원 뱅크를 활용하여 다양한 유전자 정보를 확보 및 기존의 선행 연구 결과들을 다각도로 분석함으로써 국내 상황에 적합한 검출 타겟을 선정하고, 유전자원을 선별, 제작함. 또한 개발단계의 시제품 유효성 검증을 위해 오리대상 공격접종을 통해 일령별, 검체 유형별 다양한 시료 패널을 확보하여 공시하고자 함. 이를 통해 신규 진단법의 현장 실효성을 최대한 높일 수 있음

(2) 고감도 현장검사용 항원 진단기기 및 카트리지 개발

(가) 고감도 시분할 기술(High sensitivity time-resolved technology): Lateral flow immunoassay (LFIA) 카트리치에서 반응한 란탄계 화합물이 탐침된 형광 나노입자의 형광을 UV-LED 및 포토다이오드를 이용하여 시분할 알고리즘으로 탐지, 축적하고, 마이크로프로세스로 형광량을 계산하여 형광의 양을 정량적으로 출력할 수 있는 기술임. 시분할 검사기술은 Pulse generate, photon couer 등 대형의 검출기기로 검출한 후 컴퓨터로 계산하기 때문에 대형의 검출기기로 검출이 가능하지만, 주관기관에서는 이를 소형의 LED광과 포토디텍트를 사용하고 간단한 마이크로프로세스로 계산하여 디지털화된 검사결과를 출력할 수 있는 소형 진단기기 기술을 보유하고 있음.

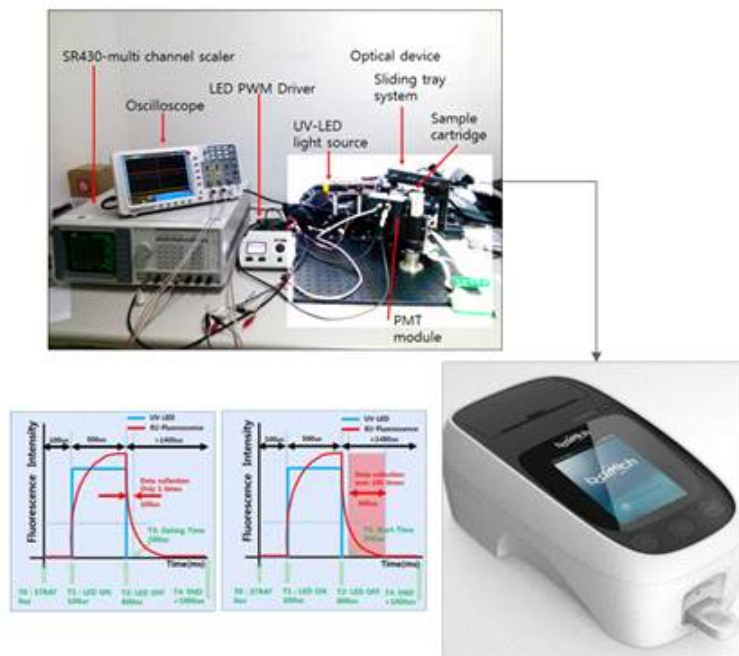
(나) 정량검사용 Lateral flow immunoasaay (qLFIA): 임신진단 시약과 같은 Rapid kit은 LFIA 원리를 사용하고, 금나노입자를 사용하여 육안으로 검사할 수 있는 면역검사 카트리치임. 주관기관에서는 동일한 형태의 카트리치를 사용하지만 형광이나 형광이 합침된 나노입자를 사용하고, 광학기와 마이크로프로세스를 사용하여 이를 정량할 수 있는 알고리즘 기술을 보유하고 있음. 형광과 시분할 검사기술을 사용하는 경우 금나노입자를 사용한 제품에 비해 100-1,000배 이상 높은 검출감도를 확보할 수 있으며, 육안으로 판독하는 정성검사보다 정확한 검사결과를 도출할 수 있으며, 디지털화된 결과가 출력되므로 결과의 저장, 분석, 송출이 가능하다는 장점이 있음.

(다) 카트리지 개발 및 제조기술 (Lateral flow cartridge manufacturing technology): 주관기관은 동물용 의료기기로서 개, 고양이의 혈액 진단용 제품으로 cCRP 등 5종 정량검사 카트리

치를 연간 20만개 이상 생산이 가능한 양산전용 자동설비를 구축하고 있으며, 모회사인 바디텍 메드는 연간 5천만개의 카트리치 자동생산이 가능한 설비를 구축운영하고 있어, 국내 최고 수준의 진단용 카트리치 생산을 위한 최적화 기술, 생산장비 구축기술을 이미 확보하고 있음.

(라) 진단기기 개발 제조기술(Device certification): 진단기기는 실험실 기기와 달리, 시료의 검사결과에 대한 정확도, 재현성을 유지할 수 있는 시스템이 장착되어야 함. 이를 위해서는 EMI, EMC 등 전기안전 인증과 성능검증이 수반되어야 하며, 검사결과 확보를 위한 QC, Validation을 위한 프로세스가 포함되어 있어야 함. 주관기관은 동물용 의료기기인 Vet Chroma에 대한 국내 허가를 보유하고 있으며, 주관기관의 모회사인 국내 최대 면역진단 의료기기 기업인 바디텍메드(주)는 5종의 진단기기 국내 인증, 식약처 허가, CE 인증, 중국식약처 허가, 미국 FDA 허가를 취득하여 진단기기로서의 정확도와 안정성을 담보할 수 있는 개발 및 제조기술을 보유하고 있음.

(마) 고감도 현장검사용 형광면역진단기 (POCT qLFIA Device): 주관기관에서는 오리 병원체를 유전자 검사 수준의 검출감도를 가지는 고감도 병원체 검사제품을 개발하기 위해, 주관기관이 보유한 qLFIA기술을 사용하여 농장현장, 방역현장에서 사용이 가능한 동물용 현장검사용 진단기기와 3종 질환에 대한 카트리치를 개발하고자 하였음. 진단기기는 기존의 진단방법을 벗어나 15분 이내 고감도 검출이 가능하며, 축산 산업현장에 사용이 가능한 스마트 데이터 연동 시스템이 탑재된 소프트웨어를 장착하여 지능형 스마트 진단기기를 개발하고자 함.



<고감도 휴대형 시분할형광면역 진단기 개발 개요>

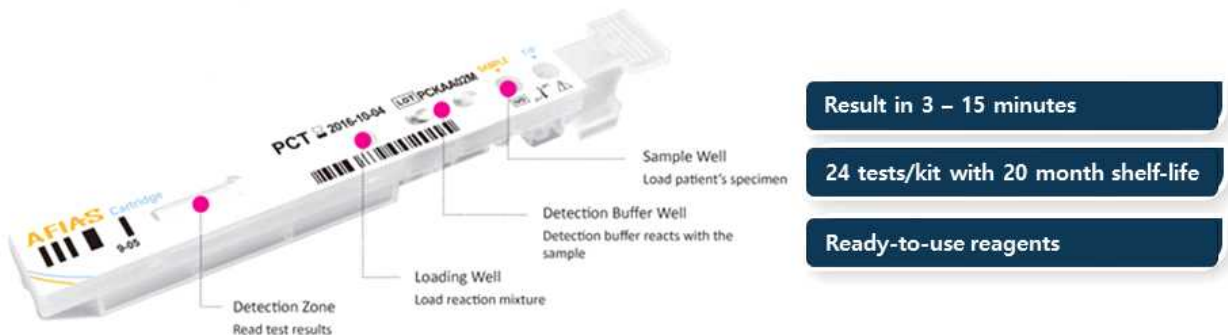
(3) 신속 지능형 항체 모니터링 검사를 위한 자동형 항체검사 카트리치 개발

(가) 자동진단기기(Automated cartridge device): 수동검사 시약에서는 고도로 훈련된 전문가가 요구되고, 재현성, 정확도 문제가 빈번하게 발생되므로 이를 극복하기 위한 자동검사 알고리즘이 장착된 자동검사 기기와 자동검사용 카트리치 기술을 의미함. 저비용의 자동검사를 위해서는 독립적인 시약들이 모두 포함된 카트리치형의 자동화가 관리가 용이하고 신속한 검사와 저렴한 비용의 구현이 가능함.

(나) 오리질병 항체 모니터링용 자동진단시스템 구축: 주관기관에서는 AFIAS라는 qLFIA를 자동으로 수행할 수 있는 플랫폼을 이미 보유하고 있음. 따라서 오리 질병의 항체검사를 위하여 진단기기 소프트웨어를 개발하고, 카트리치 최적화를 통하여 신속하게 3종 오리 질환에 대한 항체검사를 자동으로 수행할 수 있는 플랫폼 구축이 가능함. 이 시스템은 오리질병 뿐만 아니라 다양한 산업동물 질병에서 응용이 가능한 자동면역진단 플랫폼으로 발전될 수 있음.



<AFIAS 기반 자동항체검사 플랫폼 개발 개요>



<AFIAS 기반 자동항체검사 카트리치 검사 원리>

(4) 신규 진단기술 유효성 검증 및 적용법 확립

(가) 신규 진단기술 유효성 검증 : 가능한 다양한 혈청형, 유전자형 병원체에 대해 유효성 검증을 실시함. 실험실내에서 인공적으로 확보한 검사 시료 뿐 아닌 다양한 야외시료에 대해 시료 유형별(조직유제, 분변, 스왑, 혈청, 난황항체 등)로 지속적인 테스트 및 피드백을 통해 현장 활용에 최적화된 진단기술을 개발 할 수 있음

(나) 기존 진단법과의 상관성 규명 : 기존의 표준진단법 및 주로 활용된 진단법과의 상호 연관성 분석을 통해 기술력 우위를 평가하는데 용이하고 현재까지 축적된 질병관리 노하우의 활용이 가능하게 하며, 본 기술을 국제적으로 활용하는데 한계를 최소화 할 수 있음

(다) 방역기관 대상 현장검증 : 진단결과의 우수성은 진단기기의 정확도 뿐 아니라 검사자

의 숙련도의 영향이 매우 크며, 추후 개발기술의 활용 성패는 진단 정확도, 재현성, 사용 용이성, 경제성 등 기술력 이외의 요인들에 의해서도 결정되는 만큼 실제 오리농장 질병관리를 담당하는 방역기관 5개소 이상을 대상으로 기술교육을 실시하고, 진단기술의 현장검증을 진행함

(5) 신규 진단기술을 활용한 모니터링 체계 확립

(가) 신규 진단기술을 이용하여 최소한의 검사로 농장 질병을 예찰 및 관리 할 수 있는 모니터링 체계를 확립하여 현장에 공급함으로써 질병진단의 당초 목적을 달성하고, 신규 개발기술의 활용도를 높일 수 있음. 또한 현재 방역당국에서 시행중인 ‘가금농가 질병관리 지원사업’의 모니터링 모델 중 하나로 활용 가능함

(나) 오리 사육단계별 검사대상, 주기, 시료수, 시료종류 등을 설정함으로써 모니터링 체계를 확립하고 현장 검증을 통해 실효성 평가함

나. 연구개발 전략

(1) 고감도 항원검사 현장진단기 및 항체 자동검사 카트리지 개발 추진

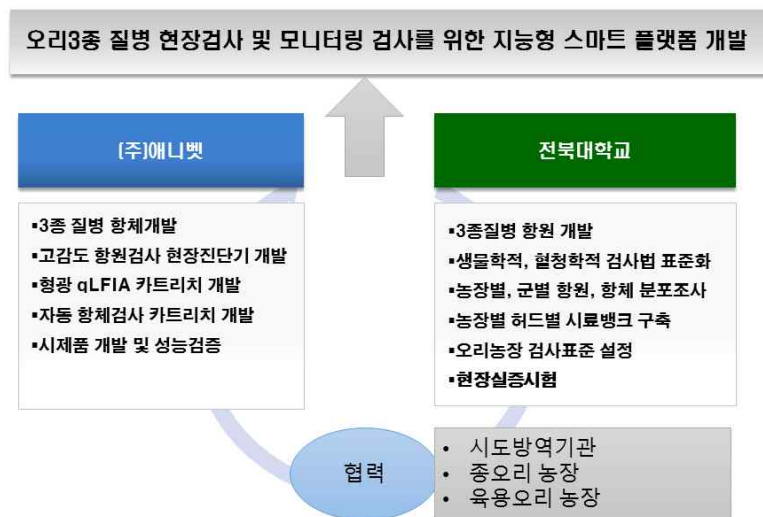
(가) 애니벳(주관기관)은 현장진단기, 카트리지 최적화 및 개발과 검증을 담당

(나) 전북대학교(협동기관)는 병원체 항원개발을 담당하여 이를 주관기관 산업체에 제공하며 또한 생물학적 혈청학적 기준시험법 수립하여 농장별 허드별 항원, 항체 분포조사 및 시료뱅크의 구축을 담당함. 구축된 시료는 이후 주관기관이 개발한 진단시스템의 평가에 사용함.

(2) 현장실증 시험을 위하여 종오리, 육용오리 농장과 MOU 체결 및 지방 방역기관과 협력

(가) 협동기관에서는 국내 시험이 가능한 농장과 협력체계를 구축하여 분포조사 및 시료를 확보

(나) 지방방역기관과 오리농가에서 개발될 오리질병 진단 카트리지를 통해 확보된 결과 모니터링



2장. 연구수행 내용 및 결과

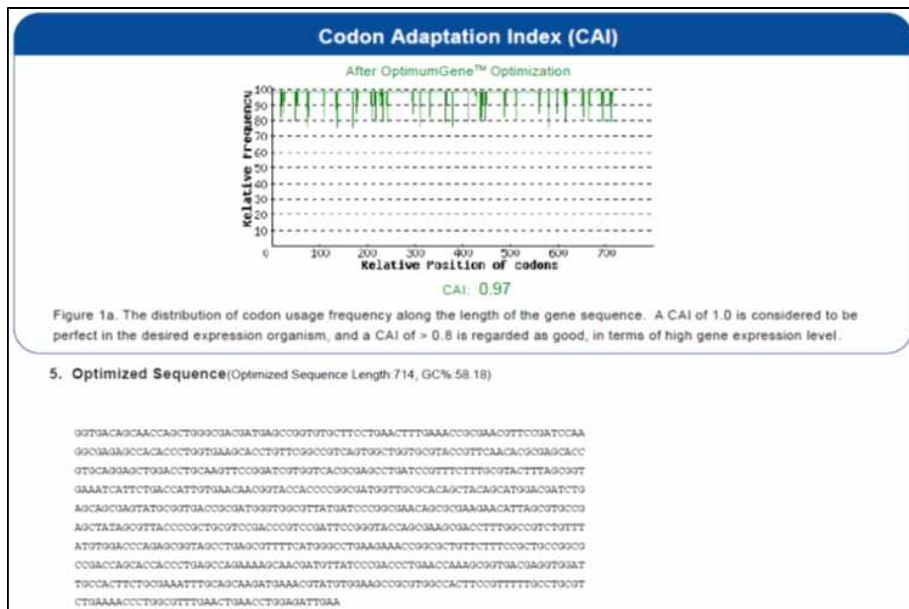
제1절 고감도 항원항체검사용 현장기기 및 카트리지 개발

1. 병원체 검사를 위한 3종 병원체 재조합 항원 개발

본 연구과제에서 도출하고자 하는 진단키트 개발을 위하여 각 오리 감염원의 특성을 보유하고 epitope로써의 기능을 성실히 수행할 수 있는 재조합 항원의 개발이 선행되어야 함. 이를 위하여, 하기의 단계를 거쳐서 실제 항원과 유사한 특이성을 가질 수 있는 재조합 항원 개발을 진행하였음. 1. 문헌조사에 의한 항원 candidate 조사, 2. 다양한 변이형을 감안할 수 있는 common sequence의 분석, 3. 유전자 재조합 기술을 이용한 Cloning, Sub-cloning, 단백질 발현, 단백질 분리 정제 과정을 진행함. 본사의 체계적인 항원 개발기술을 이용하여 3종의 오리 특이 재조합 유전자 항원 개발을 완료하였음.

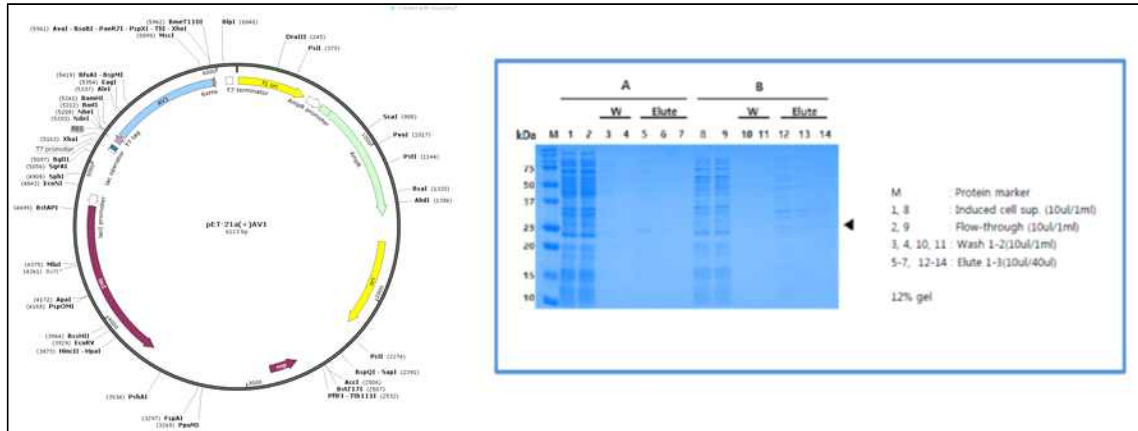
가. DHAV1 VP1 유전자 재조합 항원 개발

(1) 문헌 및 선행조사를 통하여 확인된 DHAV1의 단백질 구성중 우수한 항원성을 보일 것으로 예상되는 VP1 재조합 단백질 개발을 위하여 현재 보고된 바이러스 strain의 유전정보 비교 및 박테리아 기반의 단백질 발현 최적화를 위하여 codon optimization을 진행하였음.



<DHAV1 VP1 codon optimization>

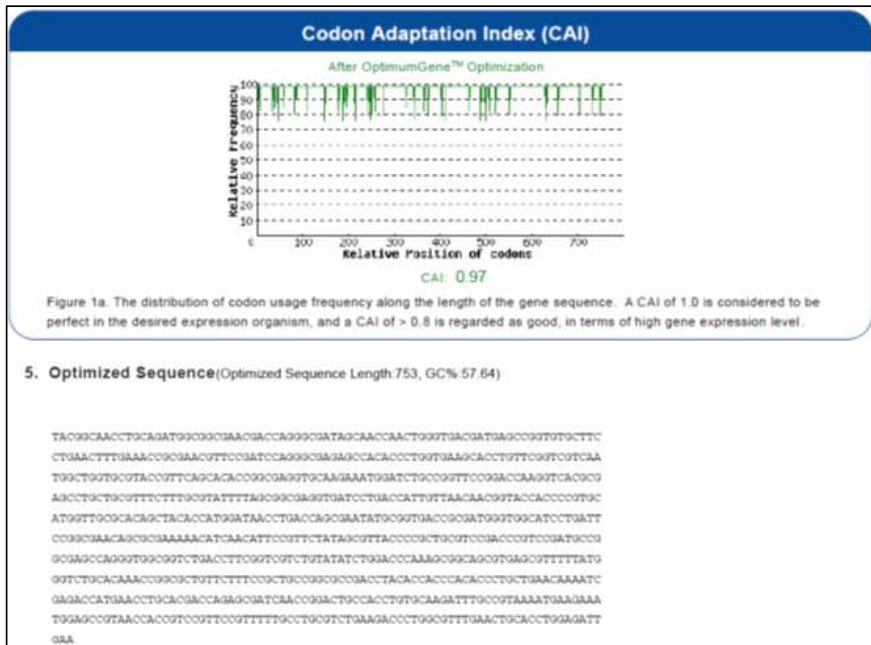
(2) optimization 된 gene coding sequence를 이용하여 재조합 단백질 발현을 위한 gene cloning 및 발현 최적화를 시도하였음. 단백질의 항원성 유지 및 발현 최적화를 위하여 수용성 단백질 생산 효율을 증가시키기 위한 TrxA tagging 단백질 개발을 추가적으로 진행하였음. 최종적으로 His-tagged-VP1 단백질을 수용성 fraction으로 발현하여 순수 단백질 정제 최적화를 완료하였음.



<DHAV1-VP1 유전자 발현 벡터 제작 및 단백질 정제 최적화>

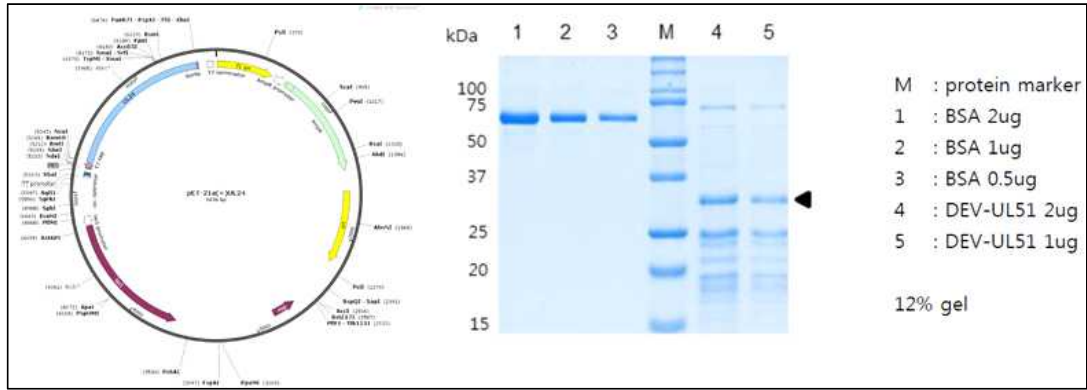
나. DHAV3 VP1 유전자 재조합 항원 개발

(1) DHAV3 VP1 재조합 단백질 개발을 위하여 현재 보고된 바이러스 strain의 유전정보비교 및 박테리아 기반의 단백질 발현 최적화를 위하여 codon optimization을 진행하였음.



<DHAV3 VP1 codon optimization>

(2) optimization 된 gene coding sequence를 이용하여 재조합 단백질 발현을 위한 gene cloning 및 발현 최적화를 시도하였음. 단백질의 항원성 유지 및 발현 최적화를 위하여 수용성 단백질 생산 효율을 증가시키기 위한 TrxA tagging 단백질 개발을 추가적으로 진행하였음. 최종적으로 DHAV3 His-tagged-VP1 단백질을 수용성 fraction으로 발현하여 순수 단백질 정제 최적화를 완료하였음.



<DEV-UL51 유전자 발현 벡터 제작 및 단백질 정제 최적화>

2. 병원체 항원검사를 위한 3종 병원체 항체개발 및 유효성 평가

병원체 항원검사를 위한 3종 병원체 특이적인 항체를 개발하기 위하여 mouse hybridoma를 이용한 mouse monoclonal 항체개발 system을 사용하여 마우스 면역 및 면역검사, 1차 클론선발, Isotyping, 2차 클론선발, 마우스 복수 접종 및 생산, 유효성 평가, 항체쌍 선정 (ELISA base, LFA base)을 실시하였음. 본 연구개발 과정을 통하여 총 28건의 유효 항체 clone을 개발 하였으며, 최종적으로 6종의 항체를 본 과제의 산업화를 위하여 본사의 양산 시스템을 통하여 대량 생산 및 validation, verification 진행하였음.

가. DHAV-1 특이항체 개발 및 유효성 평가

(1) DHAV1 마우스 면역 및 면역검사

(가) 고감도 항원검사용 현장진단기 개발을 위하여 제품개발에서 사용될 항체 개발을 진행하였음. 병원체 특이 항체 개발을 위하여 실험용 마우스의 복강에 분리된 바이러스를 면역하여 항체 생성여부를 ELISA를 이용하여 확인하였음. 면역 검사 결과, 면역원 DHAV purified virus에 대하여 마우스가 충분히 면역이 되었음을 확인하였으며 세포융합이 가능한 것을 확인하였음.

구 분	Normal	Mouse 1	Mouse 2
Plate	DHAV purified virus		
dilution			
1/100	0.23	3.97	3.84
1/200	0.19	3.94	3.86
1/400	0.11	3.86	3.94
1/800	0.09	3.94	3.77
1/1,600	0.07	3.79	3.77
1/3,200	0.07	3.71	3.57
1/6,400	0.06	3.51	3.17
1/12,800	0.07	3.35	2.43

<DHAV1 면역 및 면역검사 결과>

(2) DHAV 선발클론 Isotyping 및 최종클론 선발

(가) 항원특이항체 개발을 위하여 하이브리도마세포주를 이용한 세포융합을 실시하였음. 융합된 세포주를 이용한 1차 스크린, 2차 스크린을 통하여 29개의 유효 클론을 선정하였음. 선정된 항체를 대상으로 DHAV1 특이 반응성을 보이는 단일클론 항체의 Isotyping을 실시하였음. 선정된 29개 클론의 단클론항체를 생산하여 반응성과 Isotyping을 검사한 결과 대조항원인 Ecoli, DEV에는 반응성이 없으며, DHAV1에 특이적으로 반응을 나타내면서 IgG class인 항체를

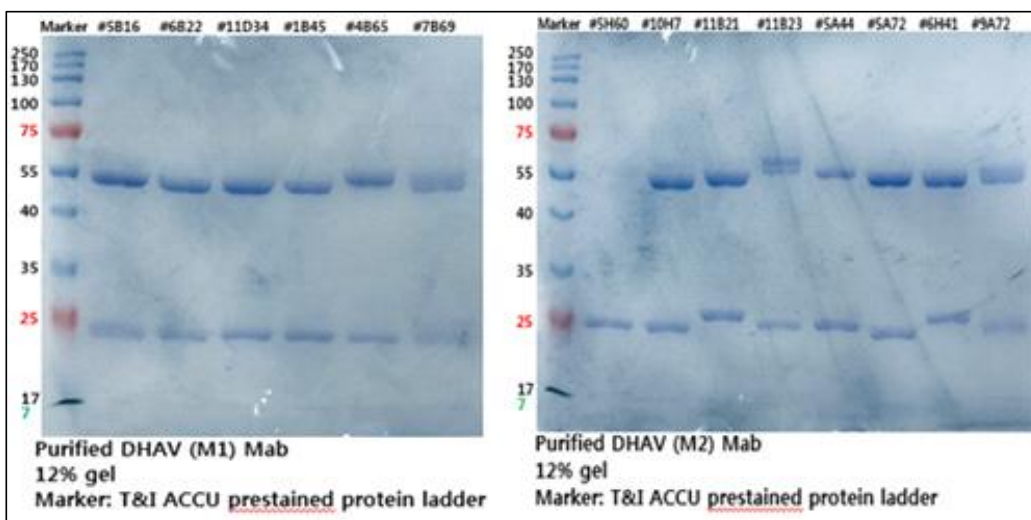
위주로 14종의 항체를 선발하였음.

No.	Clone Name	SCREEN RESULTS (ELISA)			ISOTYOING
		E.Coli	DEV purified virus	DHAV purified virus	
1	4E6	0.06	0.17	0.34	IgG1, kappa
2	5B9	0.09	0.27	2.58	IgG1, kappa
3	5B16	0.09	0.30	2.74	IgG1, kappa
4	6B22	0.07	0.17	1.77	IgG1, kappa
5	6B30	0.05	0.38	0.77	IgM, kappa
6	8E32	0.06	0.21	0.35	IgG1, kappa
7	11D34	0.05	0.16	2.05	IgG1, kappa
8	11D36	0.04	0.05	0.27	IgM, kappa
9	1B45	0.05	0.15	2.01	IgG1, kappa
10	4B65	0.06	0.26	2.26	IgG1, kappa
11	7B69	0.06	0.40	2.13	IgG1, kappa
12	7B74	0.06	2.93	3.35	IgG1, kappa
13	11F2	0.06	0.51	0.68	IgM, kappa
14	11F3	0.06	2.57	0.65	IgM, kappa
15	1-5H45	0.07	0.11	1.74	IgM, kappa
16	1-5H60	0.08	0.14	2.04	IgG1, kappa
17	1-5H64	0.09	0.14	2.00	IgM, kappa
18	10H93	0.09	0.13	2.37	IgM, kappa
19	10H7	0.08	0.13	2.41	IgG1, kappa
20	10H8	0.08	0.10	1.42	IgM, kappa
21	11B14	0.07	0.08	0.89	IgG1, kappa
22	11B21	0.08	0.09	0.99	IgG1, kappa
23	11B23	0.18	0.21	0.90	IgG2b, kappa
24	5A44	0.33	0.42	2.18	IgG1, kappa
25	5A72	0.15	0.16	1.16	IgG1, kappa
26	6H24	0.55	0.67	2.50	IgG1, kappa
27	6H41	0.59	0.56	2.53	IgG1, kappa
28	9A66	0.20	0.33	0.60	IgM, kappa
29	9A72	0.07	0.10	0.88	IgG1, lambda

<DHAV-1 단클론항체 클론의 선정 및 검증 결과>

(3) 항체의 생산 및 유효성평가 (DHAV1)

(가) 선발된 항체를 생성할 수 있는 하이브리도마를 14종의 세포주를 마우스 복수 접종을 실시하였으며, 일련의 생산과정을 통하여 정제된 항체를 연구개발에 사용할 수 있는 농도로 제작 하였으며, SDS-PAGE 기법을 이용하여 정제된 단백질의 순도를 확인하였음. 본 연구에서 원하는 항체만 순수하게 정제된 것을 확인할 수 있음.



<DHAV-1 정제항체의 SDS-PAGE를 통한 purity 검사>

(나) 생산된 14개의 단클론항체는 ELISA 항체역가 검사를 실시하여 항원제품 개발에 사용될 항체의 항원 특이도와 반응성을 확인하였음. 대조 항원으로 BSA 및 DEV 항원을 사용하여 검사한 결과 2개 클론은 일부 비특이 반응을 나타내었고 12종의 항체는 높은 반응성을 확인할 수 있었음.

Plate		BSA													
Clone No.		5B16	6B22	11D84	1B45	4B65	7B99	5H60	10H7	11B21	11B23	5A44	5A72	6H41	9A72
Conc. (µg/ml)															
1000		0.54	0.67	1.05	0.59	0.52	2.58	0.35	0.15	0.12	0.64	0.23	0.19	0.33	0.28
500		0.31	0.39	0.49	0.28	0.27	1.16	0.21	0.12	0.11	0.30	0.15	0.13	0.29	0.16
250		0.21	0.25	0.31	0.19	0.18	0.69	0.15	0.07	0.11	0.20	0.12	0.11	0.15	0.14
125		0.15	0.18	0.20	0.14	0.14	0.39	0.13	0.10	0.10	0.16	0.11	0.12	0.17	0.11
62.5		0.14	0.15	0.15	0.12	0.12	0.24	0.11	0.11	0.10	0.13	0.11	0.11	0.13	0.11
31.25		0.12	0.15	0.13	0.11	0.11	0.18	0.11	0.10	0.10	0.12	0.11	0.11	0.13	0.11
15.625		0.12	0.14	0.13	0.11	0.12	0.14	0.12	0.08	0.11	0.11	0.12	0.11	0.13	0.12
Blank		0.12	0.14	0.12	0.13	0.12	0.13	0.13	0.13	0.12	0.12	0.12	0.13	0.10	0.12

Plate		DEV purified virus													
Clone No.		5B16	6B22	11D84	1B45	4B65	7B99	5H60	10H7	11B21	11B23	5A44	5A72	6H41	9A72
Conc. (µg/ml)															
1000		0.16	0.15	0.16	0.17	0.22	0.69	0.15	0.11	0.13	1.13	0.22	0.14	0.23	0.30
500		0.12	0.11	0.12	0.13	0.15	0.48	0.11	0.09	0.11	0.57	0.20	0.10	0.16	0.21
250		0.10	0.09	0.10	0.10	0.12	0.29	0.09	0.08	0.09	0.34	0.12	0.09	0.13	0.14
125		0.16	0.07	0.10	0.09	0.09	0.19	0.08	0.07	0.07	0.21	0.10	0.08	0.11	0.09
62.5		0.08	0.06	0.08	0.08	0.08	0.13	0.07	0.07	0.07	0.15	0.09	0.07	0.11	0.10
31.25		0.08	0.06	0.07	0.08	0.07	0.10	0.07	0.06	0.07	0.10	0.09	0.07	0.09	0.11
15.625		0.09	0.06	0.07	0.07	0.08	0.09	0.07	0.07	0.06	0.10	0.08	0.07	0.10	0.12
Blank		0.09	0.06	0.05	0.05	0.07	0.08	0.06	0.06	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.12

Plate		DHAV purified virus													
Clone No.		5B16	6B22	11D84	1B45	4B65	7B99	5H60	10H7	11B21	11B23	5A44	5A72	6H41	9A72
Conc. (µg/ml)															
1000		0.63	1.59	2.38	2.05	1.76	0.35	2.40	2.63	1.11	1.48	2.59	1.47	2.71	0.29
500		0.34	1.39	2.01	1.75	1.24	0.20	2.05	2.18	0.84	0.96	2.23	1.20	2.62	0.16
250		0.24	1.31	1.86	1.56	0.86	0.12	1.71	1.87	0.72	0.74	2.02	1.00	2.31	0.11
125		0.17	1.26	1.84	1.60	0.57	0.08	1.38	1.65	0.76	0.53	1.88	1.01	2.11	0.08
62.5		0.13	1.16	1.53	1.24	0.36	0.07	0.87	1.09	0.61	0.40	1.85	0.78	1.99	0.07
31.25		0.09	0.98	1.23	0.99	0.21	0.06	0.53	0.72	0.57	0.31	1.71	0.62	1.67	0.07
15.625		0.08	0.78	1.05	0.86	0.15	0.06	0.35	0.47	0.44	0.24	1.63	0.47	1.25	0.07
Blank		0.06	0.08	0.07	0.07	0.07	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07

<DHAV 단클론항체 14개 클론의 항체역가 및 특이도 검사 결과>

(4) DHAV1 항체쌍 선정 (ELISA pair test)

(가) Indirect ELISA를 이용하여 선정한 항체를 기반으로, sandwich ELISA 기법을 이용하여 항체쌍 선정을 실시하였으며, Pair test 결과 BSA, DEV purified virus에 반응성이 없으면서 DHAV purified virus에 반응성이 있는 pair에서 capture/detector로 가능성이 있는 항체 8개 클론을 선발하였음.

1. BSA (1µg/ml)													
detector (1µg/ml)	capture (2µg/ml)	1 (#5B16)	2 (#6B22)	3 (#11D34)	4 (#1B45)	5 (#4B65)	6 (#5H60)	7 (#10H7)	8 (#11B21)	9 (#11B23)	10 (#5A44)	11 (#5A72)	12 (#6H41)
	2 (#6B22)		0.21	0.10	0.09	0.11	0.13	0.31	0.10	0.09	1.16	0.56	1.13
3 (#11D34)		0.74	0.14	0.13	0.22	0.25	1.05	0.15	0.16	3.07	1.31	1.82	0.46
4 (#1B45)		0.85	0.18	0.19	0.23	0.24	0.62	0.17	0.19	2.65	0.86	1.23	0.32
5 (#4B65)		0.78	0.12	0.09	0.14	0.15	0.33	0.10	0.09	1.55	0.66	1.24	0.15
7 (#10H7)		0.15	0.08	0.06	0.06	0.08	0.09	0.06	0.06	0.29	0.15	0.22	0.07
8 (#11B21)		0.14	0.06	0.06	0.06	0.06	0.08	0.05	0.06	0.29	0.12	0.22	0.08
10 (#5A44)		0.19	0.08	0.07	0.08	0.09	0.13	0.08	0.06	0.48	0.19	0.45	0.07
11 (#5A72)		0.08	0.06	0.06	0.07	0.09	0.07	0.06	0.07	0.19	0.14	0.11	0.10
12 (#6H41)		0.21	0.11	0.10	0.11	0.13	0.25	0.10	0.08	1.18	0.51	1.06	0.14

2. DEV (1ug/ml)												
capture (2ug/ml) detector (1ug/ml)												
	1 (#5B16)	2 (#6B22)	3 (#11D34)	4 (#1B45)	5 (#4B65)	6 (#5H60)	7 (#10H7)	8 (#11B21)	9 (#11B23)	10 (#5A44)	11 (#5A72)	12 (#6H41)
2 (#6B22)	0.20	0.10	0.11	0.14	0.12	0.33	0.11	0.09	1.06	0.64	1.11	0.23
3 (#11D34)	0.68	0.20	0.14	0.38	0.29	1.11	0.26	0.16	2.81	1.62	1.83	0.68
4 (#1B45)	0.48	0.20	0.18	0.30	0.26	0.64	0.22	0.18	2.42	0.94	1.25	0.50
5 (#4B65)	0.34	0.11	0.10	0.16	0.13	0.33	0.11	0.09	1.39	0.67	1.27	0.22
7 (#10H7)	0.09	0.07	0.07	0.08	0.07	0.10	0.06	0.05	0.25	0.17	0.22	0.09
8 (#11B21)	0.09	0.06	0.06	0.08	0.06	0.08	0.06	0.06	0.27	0.12	0.22	0.09
10 (#5A44)	0.13	0.09	0.08	0.09	0.08	0.13	0.09	0.06	0.37	0.18	0.43	0.12
11 (#5A72)	0.08	0.06	0.06	0.07	0.08	0.07	0.06	0.07	0.15	0.09	0.13	0.09
12 (#6H41)	0.22	0.10	0.08	0.10	0.10	0.22	0.10	0.07	0.95	0.44	0.87	0.12

3. DHAV (1ug/ml)												
capture (2ug/ml) detector (1ug/ml)												
	1 (#5B16)	2 (#6B22)	3 (#11D34)	4 (#1B45)	5 (#4B65)	6 (#5H60)	7 (#10H7)	8 (#11B21)	9 (#11B23)	10 (#5A44)	11 (#5A72)	12 (#6H41)
2 (#6B22)	0.60	0.92	1.72	1.63	0.85	1.21	1.53	1.07	1.38	2.23	2.12	1.78
3 (#11D34)	1.25	2.34	1.66	2.27	1.58	2.50	2.77	1.73	2.98	3.26	2.88	3.12
4 (#1B45)	0.98	1.89	1.22	1.84	1.17	1.65	2.09	1.48	2.45	2.89	2.35	2.76
5 (#4B65)	0.38	0.30	0.32	0.38	0.17	0.42	0.28	0.25	1.33	0.81	1.40	0.59
7 (#10H7)	0.39	1.33	1.64	1.69	0.67	0.79	0.59	0.97	0.51	1.95	1.32	1.72
8 (#11B21)	0.48	0.82	0.87	0.80	0.36	0.39	0.69	0.38	0.68	1.03	0.77	0.88
10 (#5A44)	0.32	0.90	0.96	1.08	0.52	0.63	1.05	0.65	0.58	0.40	1.19	1.13
11 (#5A72)	0.17	0.40	0.40	0.36	0.26	0.25	0.38	0.28	0.22	0.47	0.34	0.42
12 (#6H41)	0.37	0.59	0.48	0.45	0.31	0.40	0.50	0.30	1.07	0.94	1.25	0.34

<DHAV-1 단클론항체의 Pair test 검사결과>

(나) ELISA Pair test를 통해 선정된 항체는 아래와 같음.

Capture Ab	No.	clone no.	detect or Ab	No.	clone no.
	1	6B22		1	6B22
	2	11D34		2	11D34
	3	1B45		3	1B45
	4	10H7		4	10H7
	5	11B21		5	11B21
	6	5A44		6	5A44
	7	5A72		7	5A72
	8	6H41		8	6H41

<ELISA Pair test 결과 선정된 항체클론>

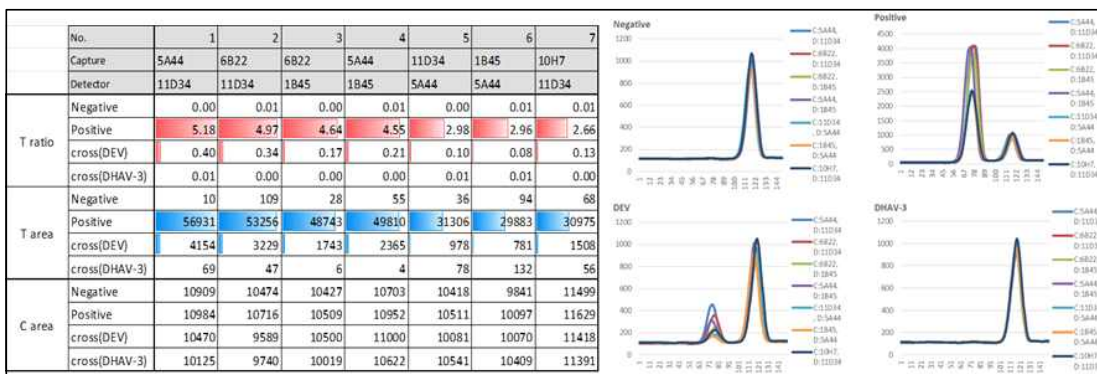
(5) 카트리지 기반의 항체쌍 선정

(가) ELISA Pair test 결과에 따라 Capture 8종, Detector 8종에 대하여 EU형광 기반 Lateral flow immunoassay (LFIA)에서 최적의 검출민감도와 Singnal-to-noise를 나타내는 Pair를 선정하고자 하였음. (64가지 조합)

Tarea	Sample	Capture								
		6822	11D34	1845	10H7	11B21	5A44	5A72	6H41	
Detector	6822	Negative	15	68	44	9	2	63	7	7
		Positive	2269	25608	27013	6639	3296	22349	3616	7844
		DEV	120	1334	1205	199	37	668	161	438
		DHAV-3	4	103	35	5	4	10	99	0
	11D34	Negative	109	51	12	68	7	10	57	6
		Positive	53256	5724	6411	30975	5144	56931	16782	17456
		DEV	3229	22	162	1508	16	4154	555	1152
		DHAV-3	47	67	71	56	22	69	23	16
	1845	Negative	28	56	34	10	1	55	23	15
		Positive	48743	4882	4520	23629	4007	49810	12886	13372
		DEV	1743	33	106	808	8	2365	354	644
		DHAV-3	6	104	12	5	7	4	25	2
	10H7	Negative	3	8	80	21	30	26	93	34
		Positive	6020	21793	20380	389	488	14747	989	2648
		DEV	139	791	542	1	10	231	152	107
		DHAV-3	4	88	68	64	58	25	9	24
	11B21	Negative	33	22	47	12	54	24	20	5
		Positive	838	1043	1357	426	875	1395	285	811
		DEV	13	49	39	21	20	10	13	8
		DHAV-3	1	6	76	3	9	17	72	56
	5A44	Negative	33	36	94	8	1	42	118	13
		Positive	19037	31306	29883	12791	3130	5290	3727	9746
		DEV	348	978	781	186	4	70	154	185
		DHAV-3	19	78	132	72	2	30	115	39
5A72	Negative	51	7	86	6	59	184	56	10	
	Positive	1652	5532	5201	975	267	2685	306	824	
	DEV	61	286	169	52	40	168	58	34	
	DHAV-3	16	29	51	54	49	23	118	71	
6H41	Negative	15	107	1	36	16	16	125	9	
	Positive	2947	6100	5091	2038	572	5779	739	495	
	DEV	161	510	360	79	12	188	113	1	
	DHAV-3	18	99	23	8	13	88	5	55	

<DHAV-1 단클론항체의 EU LFIA에서의 Pair 선정검사 결과>

(나) DHAV-1 항체쌍 테스트 결과를 기반으로 낮은 비특이성을 보이며, 강한 신호를 보여주는 항체쌍 선정 기준을 통하여 선정. 본 기준으로 선정한 결과 Capture 4종, Detector 3종을 선정할 수 있었음. 가장 반응성이 좋은 항체쌍을 DHAV1 카트리지를 개발에 사용하였음. 오른쪽 결과는 왼쪽 수치를 계산하기 위한 실제 형광신호이며, 1차 선정된 항체쌍에 대한 카트리지를 반응성을 확인하였고, Noise 신호, 용액의 Flow 이상 여부를 확인하고 검증하였음.



<DHAV-1 선정 항체쌍의 카트리치에서의 형광진단기 판독결과>

나. DHAV-3 특이항체 개발 및 유효성 평가

(1) DHAV-3 마우스 면역 및 면역검사

(가) 고감도 항원검사용 현장진단기 개발을 위하여 제품개발에서 사용될 항체 개발을 진행하였음. 병원체 특이 항체 개발을 위하여 실험용 마우스의 복강에 분리된 바이러스를 면역하여 항체 생성여부를 ELISA를 이용하여 확인하였음. 면역 검사 결과, 면역원 DHAV-3 purified virus에 대하여 마우스가 충분히 면역이 되었음을 확인하였으며 세포융합이 가능한 것을 확인하였음.

구 분	Normal	Mouse 1
Plate	DHAV type 3 purified virus	
dilution		
1/100	0.39	3.68
1/200	0.29	3.64
1/400	0.21	3.65
1/800	0.15	3.50
1/1,600	0.12	3.24
1/3,200	0.10	2.90
1/6,400	0.09	2.16
1/12,800	0.08	1.50

<DHAV-3 면역 및 면역검사 결과>

(2) DHAV-3 선발클론 Isotyping 및 최종클론 선발

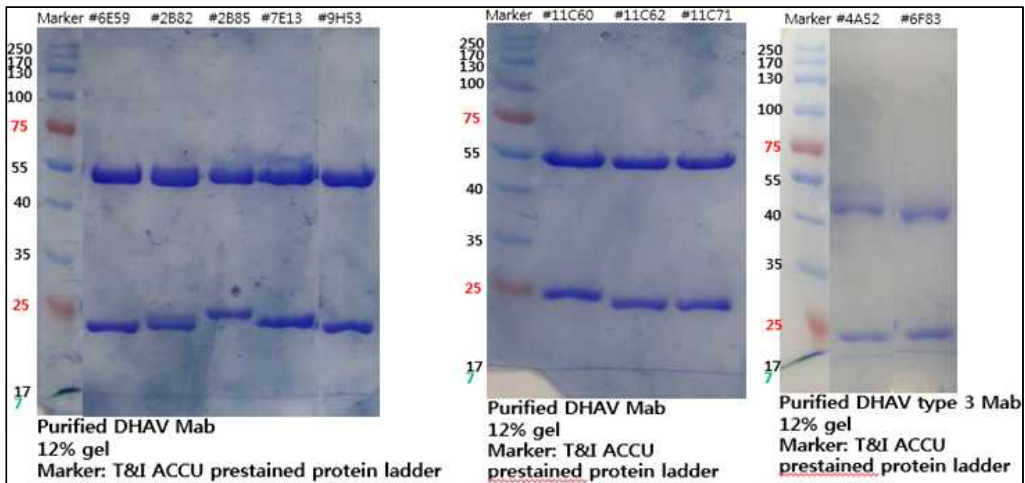
(가)항원특이항체 개발을 위하여 하이브리도마세포주를 이용한 세포융합을 실시하였음. 융합된 세포주를 이용한 1차 스크린, 2차 스크린을 통하여 28개의 유효 클론을 선정하였음. 선정된 항체를 대상으로 DHAV-3 특이 반응성을 보이는 단일클론 항체의 Isotyping을 실시하였음. 선정된 28개 클론의 단클론항체를 생산하여 반응성과 Isotyping을 검사한 결과 대조항원인 Ecoli, DEV에는 반응성이 없으며, DHAV-3에 특이적으로 반응을 나타내면서 IgG class인 항체를 위주로 10종의 항체를 선발하였음.

No.	Clone no.	Isotype	Conc. (mg/ml)	Volume (ml)	Total (mg)	Yield (mg/ml)
1	6E59	IgG2a, kappa	2.25	10	22.50	6.43
2	2B82	IgG2a, kappa	1.71	14	23.94	4.35
3	2B85	IgG2a, lambda	4.48	9.5	42.56	5.32
4	7E13	IgG2b, kappa	1.95	9.5	18.53	3.71
5	9H53	IgG3, kappa	1.89	15	28.35	6.3
6	11C60	IgG3, kappa	1.73	13	22.49	4.5
7	11C62	IgG1, kappa	3.27	10	32.70	5.95
8	11C71	IgG1, kappa	2.29	10	22.9	5.73
9	4A52	IgG2b, kappa	2.77	10	27.7	5.54
10	6F83	IgG3, kappa	1.58	1	1.58	0.29

<DHAV-3 단클론항체 클론의 선정 및 검증 결과>

(3) 항체의 생산 및 유효성평가 (DHAV-3)

(가) 선발된 항체를 생성할 수 있는 하이브리도마를 10종의 세포주를 마우스 복수 접종을 실시하였으며, 일련의 생산과정을 통하여 정제된 항체를 연구개발에 사용할 수 있는 농도로 제작 하였으며, SDS-PAGE 기법을 이용하여 정제된 단백질의 순도를 확인하였음. 본 연구에서 원하는 항체만 순수하게 정제된 것을 확인할 수 있음.



<DHAV-3 정제항체의 SDS-PAGE를 통한 purity 검사>

(나) 생산된 10개의 단클론항체는 ELISA 항체역가 검사를 실시하여 항원제품 개발에 사용될 항체의 항원 특이도와 반응성을 확인하였음. 대조 항원으로 BSA 및 DEV 항원을 사용하여 검사한 결과 10종의 항체에서 높은 반응성을 확인할 수 있었음.

Ab (ng/ml)	DEV									
	6E59	2B82	2B85	7E13	9H53	11C60	11C62	11C71	4A52	6F83
1000	0.13	0.30	0.26	0.42	0.28	0.29	0.14	0.13	0.74	0.28
500	0.08	0.15	0.12	0.28	0.18	0.19	0.10	0.19	0.47	0.20
250	0.06	0.16	0.09	0.14	0.14	0.13	0.09	0.19	0.26	0.12
125	0.06	0.08	0.07	0.10	0.14	0.11	0.08	0.09	0.17	0.12
62.5	0.05	0.06	0.05	0.08	0.08	0.09	0.09	0.08	0.15	0.09
31.25	0.05	0.09	0.07	0.07	0.08	0.11	0.11	0.16	0.12	0.07
15.625	0.07	0.26	0.06	0.07	0.08	0.14	0.09	0.14	0.11	0.09
0	0.09	0.08	0.09	0.10	0.09	0.10	0.10	0.12	0.18	0.12

Ab (ng/ml)	DHAV 1									
	6E59	2B82	2B85	7E13	9H53	11C60	11C62	11C71	4A59	6F83
1000	0.10	0.17	0.16	0.22	0.11	0.16	0.08	0.23	0.49	0.14
500	0.07	0.07	0.08	0.14	0.07	0.09	0.07	0.11	0.27	0.09
250	0.05	0.06	0.06	0.09	0.06	0.08	0.06	0.08	0.17	0.07
125	0.04	0.05	0.05	0.06	0.08	0.08	0.06	0.10	0.12	0.07
62.5	0.05	0.05	0.05	0.06	0.07	0.07	0.06	0.09	0.10	0.06
31.25	0.05	0.05	0.08	0.05	0.06	0.08	0.09	0.08	0.08	0.05
15.625	0.06	0.05	0.06	0.05	0.09	0.09	0.07	0.09	0.07	0.07
0	0.07	0.08	0.07	0.08	0.10	0.08	0.10	0.10	0.07	0.08

Ab (ng/ml)	DHAV 3									
	6E59	2B82	2B85	7E13	9H53	11C60	11C62	11C71	4A59	6F83
1000	2.60	1.18	0.53	2.45	1.84	1.39	1.46	1.55	2.83	1.80
500	2.78	1.44	0.54	2.38	2.44	1.44	1.93	2.04	2.64	1.54
250	2.47	1.41	0.55	2.05	2.07	1.16	2.10	2.62	2.38	1.33
125	1.97	1.12	0.51	1.42	1.66	0.88	1.62	2.60	2.02	1.04
62.5	1.47	0.84	0.50	0.90	1.07	0.57	1.27	2.09	1.66	0.70
31.25	1.13	0.64	0.51	0.58	0.70	0.36	0.87	1.51	1.27	0.48
15.625	0.70	0.45	0.52	0.39	0.44	0.27	0.57	0.89	0.91	0.31
0	0.06	0.16	0.07	0.07	0.08	0.07	0.23	0.10	0.07	0.06

<DHAV-3 단클론항체 10개 클론의 항체역가 및 특이도 검사 결과>

(4) 카트리지 기반의 항체쌍 선정

(가) ELISA Pair test 결과에 따라 Capture 10종, Detector 10종에 대하여 EU형광 기반 Lateral flow immunoassay (LFIA)에서 최적의 검출민감도와 Singnal-to-noise를 나타내는 Pair를 선정하고자 하였음. (100가지 조합) DHAV-3 항체쌍 테스트 결과를 기반으로 낮은 비특이도를 보이며, 강한 신호를 보여주는 항체쌍 선정 기준을 통하여 선정 진행. 본 기준으로 선정한 결과 Capture 4종, Detector 1종을 선정할 수 있었음. 가장 반응성이 좋은 항체쌍을 DHAV-3 카트리지 개발에 사용하였음.

(가) 항원 진단제품에 사용하시 위한 DEV virus 병원체 특이 항체 개발을 위하여 실험용 마우스의 복강에 면역하여 항체 생성여부를 ELISA를 이용하여 확인하였음. 면역 검사 결과, 면역원 DEV purified virus에 대하여 마우스가 충분히 면역이 되었음을 확인하였으며 세포융합이 가능한 것을 확인하였음.

구 분	Normal	Mouse 1	Mouse 2
Plate	DEV purified virus		
dilution			
1/100	0.12	3.68	3.47
1/200	0.09	3.68	2.97
1/400	0.07	3.54	2.81
1/800	0.07	3.22	2.18
1/1,600	0.06	2.88	1.66
1/3,200	0.06	2.51	1.22
1/6,400	0.06	1.72	0.83
1/12,800	0.07	1.27	0.50

<DEV 면역 및 면역검사 결과>

(2) DEV 선발클론 Isotyping 및 최종클론 선발

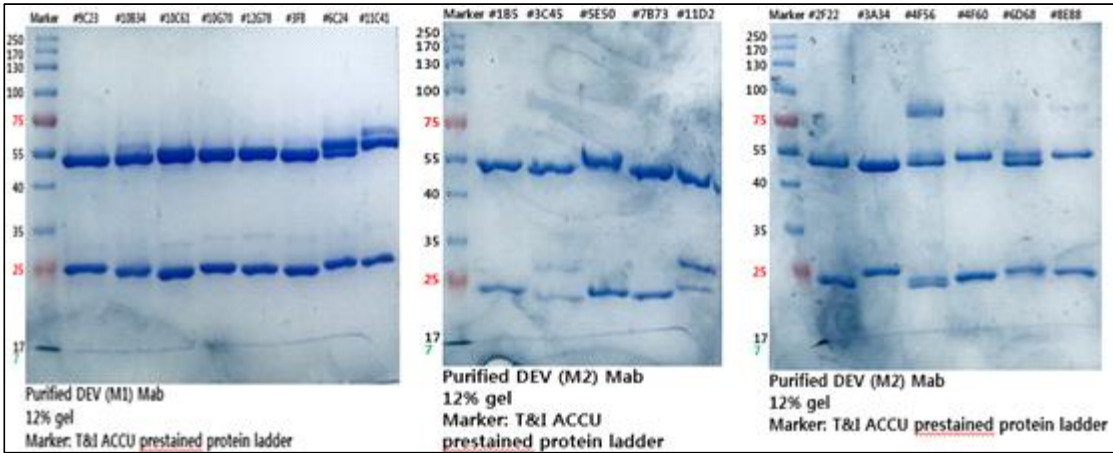
(가) DEV 특이 단일클론 항체 개발 및 생산을 위하여 하이브리도마 세포주를 이용한 세포융합을 실시하였음. 세포융합이 이루어진 세포주를 이용하여 1차 스크린, 2차 스크린을 통하여 41개의 유효 클론을 선정하였음. 선정된 항체를 대상으로 DEV 특이 반응성을 보이는 단일클론 항체의 Isotyping을 실시하였음. 선정된 41개 클론의 단클론항체를 생산하여 반응성과 Isotyping을 검사한 결과 대조항원인 Ecoli, DHAV1에는 반응성이 없으며, DEV에 특이적으로 반응을 나타내면서 IgG class인 항체를 위주로 19종의 항체를 선발하였음.

No.	Clone Name	SCREEN RESULTS (ELISA)			ISOTYOING
		E.Coli	DHAV purified virus	DEV purified virus	
1	8A3	0.10	0.43	1.94	IgM, kappa
2	8A10	0.07	0.35	1.85	IgM, kappa
3	9C23	0.07	0.18	0.95	IgG1, kappa
4	9C25	0.07	0.19	0.82	IgG1, kappa
5	10B34	0.05	0.13	0.55	IgG1, kappa
6	10B35	0.05	0.16	0.76	IgG1, kappa
7	10C47	0.09	0.11	1.14	IgG2a, kappa
8	10C61	0.06	0.07	0.82	IgG2a, kappa
9	10G65	0.07	0.14	0.48	IgM, kappa
10	10G70	0.06	0.14	0.50	IgG1, kappa
11	12G78	0.06	0.14	0.44	IgG1, kappa
12	12G88	0.06	0.21	0.51	IgG1, kappa
13	3F8	0.07	0.89	2.88	IgG1, kappa
14	3F16	0.06	0.56	2.10	IgG1, kappa
15	6C24	0.06	0.20	0.50	IgG1, kappa
16	6C27	0.05	0.22	0.68	IgG1, kappa
17	9E38	0.05	0.55	2.62	IgM, kappa
18	9E39	0.06	0.45	1.76	IgM, kappa
19	11C41	0.08	0.35	1.21	IgG2b, kappa
20	11C44	0.05	0.22	0.77	IgG2b, kappa
21	1B5	0.07	0.40	1.82	IgG1, kappa
22	1B14	0.07	0.75	2.86	IgM, kappa
23	1B22	0.05	0.19	1.91	IgG1, kappa
24	3C25	0.06	0.42	1.49	IgM, kappa
25	3C45	0.07	0.26	0.87	IgG1, kappa
26	5E50	0.06	0.38	1.71	IgG1, kappa
27	5E62	0.06	0.17	0.58	IgG1, kappa
28	7B73	0.07	0.24	0.48	IgG1, kappa
29	7B82	0.07	1.53	0.11	IgM, kappa
30	11D2	0.14	0.61	1.86	IgG1, kappa
31	11D3	0.06	0.66	2.74	IgM, kappa
32	2F22	0.05	0.69	1.67	IgG1, kappa
33	2F24	0.09	0.67	2.91	IgG1, kappa
34	3A31	0.05	0.26	0.61	IgG1, kappa
35	3A34	0.05	0.29	1.91	IgG1, kappa
36	4F56	0.06	0.35	0.92	IgG1, kappa
37	4F60	0.04	0.39	1.70	IgG2a, kappa
38	6D68	0.08	0.45	1.53	IgG1, kappa
39	6D73	0.07	0.29	0.80	IgG1, kappa
40	8E88	0.06	0.30	0.80	IgG1, kappa
41	8E94	0.06	0.75	1.60	IgG1, kappa

<DEV 단클론항체의 클론 선발 결과>

(3) 복수생산 및 항체 정제 (DEV)

(가) DEV virus에 반응성을 보이는 순도 높은 항체를 대량으로 생산하기 위하여, 선발된 항체를 생성할 수 있는 하이브리도마 19종의 세포주를 마우스 복수 접종 및 생산과정을 통하여 순수 정제된 항체를 연구개발에 사용할 수 있는 농도로 제작 하였으며, SDS-PAGE 기법을 이용하여 정제된 단백질의 순도를 확인하였음. 본 연구진이 원하는 항체가 순수하게 분리되었음을 확인할 수 있음.



<DEV 단클론항체의 SDS-PAGE에서의 purity 검사결과>

(나) 생산된 19개의 단클론항체는 ELISA 항체역가 검사를 실시하여 항원제품 개발에 사용될 항체의 항원 특이도와 반응성을 확인하였음. 대조항원으로 BSA 및 DHAV 항원을 사용하여 검사한 결과 2개 클론은 일부 비특이 반응을 나타내었고 17종의 항체는 높은 반응성을 확인할 수 있었음.

Plate		BSA									
Clone No.		9C23	10B34	10C61	10G70	12G78	3F8	6C24	11C41	1B5	3C45
Conc. (ng/ml)	1000	0.15	0.14	0.21	0.12	0.07	0.14	0.11	0.21	0.55	0.43
	500	0.11	0.10	0.13	0.08	0.06	0.10	0.08	0.14	0.26	0.23
	250	0.08	0.08	0.08	0.07	0.05	0.07	0.06	0.10	0.18	0.16
	125	0.09	0.08	0.07	0.06	0.05	0.06	0.05	0.07	0.15	0.13
	62.5	0.08	0.07	0.07	0.06	0.05	0.06	0.05	0.07	0.12	0.11
	31.25	0.08	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.11	0.11
	15.625	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.08	0.11	0.11
	Blank	0.08	0.07	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.07	0.12	0.12

Plate		BSA								
Clone No.		5E50	7B73	11D2	2F22	3A34	4F56	4F60	6D68	8E88
Conc. (ng/ml)	1000	0.28	1.68	0.30	1.50	0.48	0.26	0.71	1.28	1.28
	500	0.18	0.78	0.18	0.67	0.21	0.16	0.37	0.64	0.68
	250	0.13	0.43	0.14	0.37	0.15	0.13	0.23	0.35	0.36
	125	0.11	0.25	0.11	0.23	0.12	0.11	0.15	0.23	0.24
	62.5	0.10	0.18	0.10	0.16	0.11	0.10	0.13	0.15	0.16
	31.25	0.10	0.14	0.10	0.13	0.11	0.10	0.11	0.13	0.14
	15.625	0.11	0.12	0.10	0.12	0.11	0.11	0.11	0.12	0.14
	Blank	0.12	0.11	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11	0.11	0.12

Plate		DHAV purified virus									
Clone No.		9C23	10B34	10C61	10G70	12G78	3F8	6C24	11C41	1B5	3C45
Conc. (ng/ml)	1000	0.33	0.26	0.17	0.23	0.16	1.00	0.12	0.27	0.41	0.33
	500	0.24	0.20	0.10	0.17	0.13	0.94	0.07	0.15	0.40	0.24
	250	0.31	0.17	0.08	0.15	0.11	0.88	0.06	0.11	0.34	0.19
	125	0.19	0.16	0.07	0.11	0.10	0.78	0.05	0.07	0.34	0.16
	62.5	0.18	0.14	0.07	0.11	0.09	0.73	0.05	0.07	0.29	0.10
	31.25	0.18	0.13	0.06	0.09	0.08	0.66	0.05	0.06	0.23	0.08
	15.625	0.15	0.12	0.06	0.09	0.08	0.57	0.05	0.08	0.20	0.07
	Blank	0.09	0.08	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07	0.08	0.08	0.07

Plate		DHAV purified virus								
Clone No. Conc.(ng/ml)	5E50	7B73	11D2	2F22	3A34	4F56	4F60	6D68	8E88	
	1000	0.28	0.24	0.44	0.91	0.24	0.23	0.43	0.38	1.81
500	0.24	0.18	0.35	0.72	0.21	0.15	0.28	0.22	1.08	
250	0.19	0.15	0.26	0.58	0.17	0.11	0.18	0.15	0.67	
125	0.14	0.13	0.38	0.45	0.16	0.08	0.12	0.10	0.41	
62.5	0.10	0.11	0.13	0.30	0.12	0.07	0.09	0.08	0.24	
31.25	0.09	0.10	0.10	0.20	0.10	0.07	0.07	0.07	0.15	
15.625	0.08	0.09	0.08	0.14	0.09	0.07	0.07	0.07	0.11	
Blank	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.06	

Plate		DEV purified virus								
Clone No. Conc.(ng/ml)	9C23	10B34	10C61	10G70	12G78	3F8	6C24	11C41	1B5	3C45
	1000	0.83	0.66	0.93	0.75	0.34	2.57	0.16	0.62	1.84
500	0.72	0.63	0.86	0.58	0.29	2.64	0.13	0.50	1.70	0.66
250	0.82	0.56	0.80	0.54	0.29	2.58	0.11	0.45	1.51	0.49
125	0.67	0.47	0.68	0.39	0.29	2.37	0.07	0.39	1.43	0.36
62.5	0.62	0.44	0.71	0.35	0.24	2.21	0.08	0.36	1.21	0.24
31.25	0.55	0.32	0.59	0.29	0.18	1.97	0.06	0.32	1.08	0.16
15.625	0.54	0.24	0.53	0.20	0.15	1.49	0.06	0.24	0.90	0.12
Blank	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.09	0.07

Plate		DEV purified virus								
Clone No. Conc.(ng/ml)	5E50	7B73	11D2	2F22	3A34	4F56	4F60	6D68	8E88	
	1000	0.98	0.46	1.23	1.57	1.79	0.44	1.01	0.92	1.22
500	0.86	0.38	1.19	1.40	1.62	0.32	0.77	0.73	0.87	
250	0.69	0.31	0.94	1.12	1.41	0.22	0.56	0.46	0.60	
125	0.53	0.27	0.63	0.86	1.25	0.17	0.36	0.29	0.40	
62.5	0.35	0.23	0.41	0.61	0.90	0.10	0.22	0.18	0.22	
31.25	0.23	0.18	0.27	0.40	0.80	0.09	0.14	0.13	0.15	
15.625	0.16	0.16	0.18	0.28	0.61	0.09	0.11	0.10	0.11	
Blank	0.06	0.09	0.07	0.09	0.07	0.10	0.08	0.08	0.08	

<DEV 단클론항체의 ELISA 항체역가 및 특이성 검사결과>

(4) DEV 항체쌍 선정 (ELISA pair test)

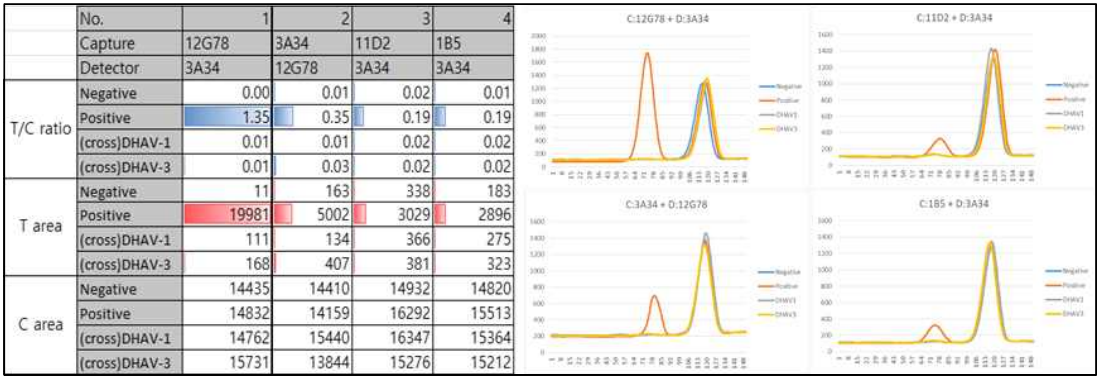
(가) sandwich ELISA 기법을 이용하여 purified DEV virus에 반응하는 항체쌍 선정을 실시하였으며, Pair test 결과 BSA, DHAV purified virus에 반응성이 없으면서 DEV purified virus에 반응성이 있는 pair에서 capture/detector로 가능성이 있는 항체 13클론 선발하였음.

1. BSA (µg/ml)	Capture (µg/ml)																
	1 (A9C23)	2 (A10B34)	3 (A10C61)	4 (A10G70)	5 (A12G78)	6 (A3F8)	7 (A11C41)	8 (A1B5)	9 (A1C45)	10 (A2F50)	11 (A11D2)	12 (A2F22)	13 (A1A34)	14 (A1F56)	15 (A1F60)	16 (A6D68)	17 (A8E88)
1 (A9C23)	0.08	0.07	0.09	0.09	0.08	0.10	0.09	0.08	0.13	0.07	0.16	0.11	0.12	0.20	0.15	0.16	0.11
2 (A10B34)	0.09	0.06	0.07	0.08	0.08	0.09	0.08	0.07	0.10	0.06	0.15	0.12	0.11	0.14	0.10	0.14	0.09
3 (A10C61)	0.07	0.05	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.05	0.08	0.06	0.07	0.07	0.11	0.07	0.08	0.08	0.06
4 (A10G70)	0.07	0.06	0.07	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.11	0.06	0.13	0.10	0.11	0.14	0.10	0.16	0.09
5 (A12G78)	0.07	0.05	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.05	0.09	0.06	0.10	0.07	0.10	0.11	0.09	0.11	0.08
6 (A3F8)	0.09	0.07	0.08	0.09	0.11	0.11	0.07	0.08	0.12	0.07	0.14	0.11	0.14	0.14	0.22	0.18	0.13
7 (A11C41)	0.09	0.08	0.13	0.10	0.09	0.12	0.10	0.07	0.14	0.08	0.21	0.16	0.15	0.20	0.08	0.17	0.08
8 (A1B5)	0.09	0.08	0.10	0.11	0.11	0.15	0.11	0.08	0.17	0.09	0.29	0.16	0.14	0.20	0.17	0.25	0.14
9 (A1C45)	0.09	0.08	0.09	0.13	0.12	0.13	0.11	0.08	0.26	0.09	0.22	0.17	0.16	0.46	0.10	0.16	0.17
10 (A2F50)	0.08	0.07	0.07	0.11	0.10	0.10	0.08	0.07	0.14	0.08	0.19	0.15	0.15	0.25	0.14	0.16	0.09
11 (A11D2)	0.11	0.11	0.85	1.52	0.35	1.42	0.61	0.19	1.24	0.86	3.43	1.26	0.61	3.80	3.83	3.65	3.45
12 (A2F22)	0.13	0.09	0.12	0.12	0.12	0.17	0.22	0.09	0.21	0.11	0.56	0.33	0.39	0.59	0.27	0.52	0.18
13 (A1A34)	1.66	0.59	0.13	0.52	0.73	1.32	0.16	0.06	1.80	1.14	1.80	1.66	0.10	1.41	0.14	1.94	0.16
14 (A1F56)	0.42	0.15	0.09	0.30	0.13	0.61	0.12	0.22	0.85	0.16	1.23	0.10	0.24	0.78	0.13	1.06	0.16
15 (A1F60)	1.40	0.40	0.17	1.08	0.45	1.57	0.22	0.82	2.03	1.15	3.44	1.82	0.79	1.74	0.18	2.46	0.38

T area	Sample	Capture										
		9C23	10G70	12G78	3F8	1B5	5E50	11D2	2F22	3A34	4F60	
Detector	9C23	Negative	45	51	41	279	64	25	229	19	20	8381
		Positive	179	155	15	1789	693	138	297	487	497	8366
		DHAV-1	55	50	58	518	180	67	236	162	102	6506
		DHAV-3	65	63	11	881	204	130	289	148	268	7970
	10G70	Negative	0	5	9	191	144	81	136	210	0	14206
		Positive	73	102	180	722	479	9	203	239	656	11324
		DHAV-1	4	59	44	271	103	127	98	129	37	16328
		DHAV-3	7	36	110	358	192	17	200	152	68	19823
	12G78	Negative	48	62	98	1145	21	106	381	166	163	10005
		Positive	208	230	147	2484	685	231	397	583	5002	5616
		DHAV-1	24	242	39	1633	286	135	548	357	134	6831
		DHAV-3	114	55	80	2313	282	22	751	241	407	9532
	3F8	Negative	12	12	7	5887	141	97	150	123	19	7911
		Positive	282	593	453	6972	807	151	205	560	495	8203
		DHAV-1	104	204	198	5729	288	122	208	173	189	6884
		DHAV-3	140	256	166	6061	251	108	135	193	233	8546
	1B5	Negative	76	46	18	313	204	66	97	139	16	17119
		Positive	490	528	313	2582	888	135	183	497	1398	17913
		DHAV-1	43	16	82	647	284	72	109	163	133	18667
		DHAV-3	51	137	109	727	259	103	156	156	137	19727
	5E50	Negative	89	12	2	256	196	194	209	176	90	66326
		Positive	129	230	85	790	331	82	209	200	79	48303
		DHAV-1	6	26	94	248	163	138	162	101	20	42127
		DHAV-3	91	150	13	276	5	75	169	38	81	41968
	11D2	Negative	10	53	138	221	95	107	130	104	71	56914
		Positive	57	132	115	536	184	155	192	140	114	48418
		DHAV-1	71	101	62	263	5	21	208	180	107	45649
		DHAV-3	46	67	20	335	125	127	134	133	106	39861
	2F22	Negative	162	51	13	516	99	246	406	278	176	58095
		Positive	399	606	494	3427	958	253	408	588	700	56124
		DHAV-1	235	206	220	830	271	205	279	346	241	55174
		DHAV-3	126	185	154	939	248	101	422	286	193	41820
	3A34	Negative	126	120	11	520	183	109	338	293	1504	15817
		Positive	1268	423	19981	2725	2896	399	3029	860	1043	27857
		DHAV-1	130	104	111	757	275	102	366	271	1028	13420
		DHAV-3	256	215	168	985	323	158	381	254	1004	13410
	4F60	Negative	65022	65041	71345	68964	70132	71580	72080	72321	72308	772
		Positive	68982	69906	68920	71826	68020	70597	72355	72818	74212	817
		DHAV-1	70174	68384	69228	72017	70420	73293	70991	72090	72137	759
		DHAV-3	57598	68151	68151	71437	70593	73799	75254	75833	72455	797

<Eu-LFIA 검사에서 DEV 항원키트 항체쌍 선정 결과>

(나) DEV purified virus를 이용한 항체쌍 테스트 결과를 기반으로 1차 선정된 항체쌍을 순위별로 나열한 결과임. 1번 항체쌍을 제외하고는 반응성을 보이긴 하지만 항원과의 민감도가 떨어지므로 이후의 연구는 1번 항체쌍을 위주로 연구가 진행되었음. 오른쪽 결과는 왼쪽 수치를 계산하기 위한 실제 형광신호이며, 1차 선정된 항체쌍에 대한 카트리지 반응성을 확인하였고, Noise 신호, 용액의 Flow 이상 여부를 확인하고 검증하였음.



<Eu-LFIA에서 DEV 항체 Pair의 형광신호 및 Flow 검사결과>

3. 고감도 시분할형광 검사용 휴대용 현장진단기 시제품 및 소프트웨어 개발

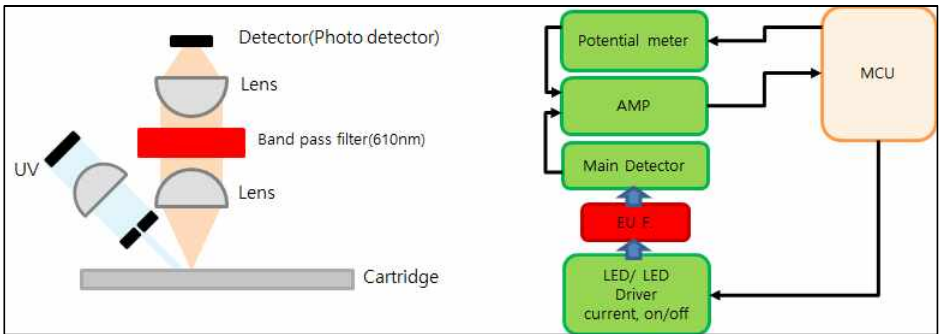
가. 소형 시분할형광 광학계의 구성 및 최적화

(1) 시험품의 TRF광학계 설계 및 최적화

(가) 동물질병의 검사에 최적화된 고감도 TRF 광학계를 설계하기 위해서는 측정에 필요한 여러 Component들의 최적화과정이 필요함. 이에 따라 주관기관에서는 고감도의 TRF 측정이 가능한 광학계를 설계하고 이의 최적화를 추진하고자 하였음.

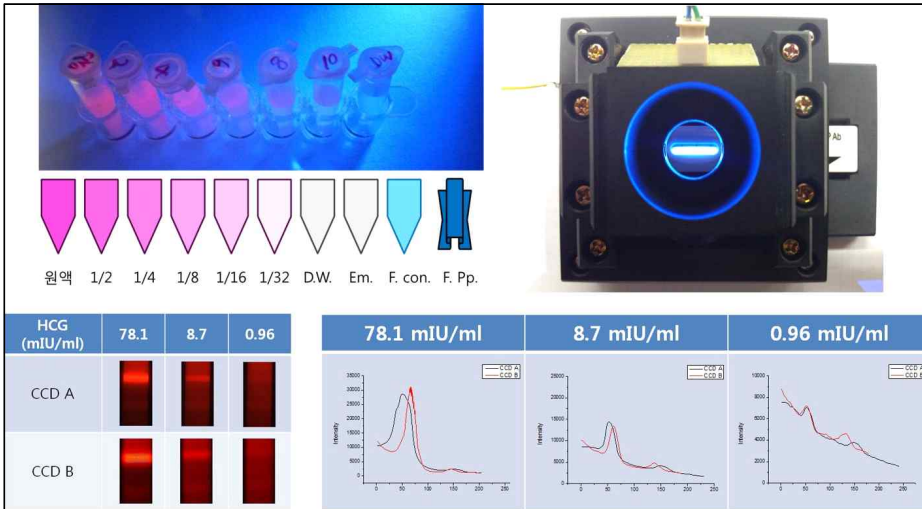
(나) 실험실 장비의 TRF는 통상 UV파장의 램프와 고가의 PMT를 기반으로 개발되어 있으나, 많은 전원이 필요하고, 대용량의 신호로 PC 수준의 처리장치가 필요하게 되어 대형화가 수반되므로, 본 과제에서는 저전력으로 구동가능한 UV-LED와 감도는 낮으나 소형화에 적합한 Silicon PD (photodiode)를 사용하여 광학계를 설계하였음.

(다) UV-LED와 선정된 PD Sensor를 이용한 광학모듈은 2개의 렌즈와 1개의 Band-pass filter로 구성된 감지부와 UV-LED 광원이 사면으로 배치된 광구조물을 설계하여 사용하였음.



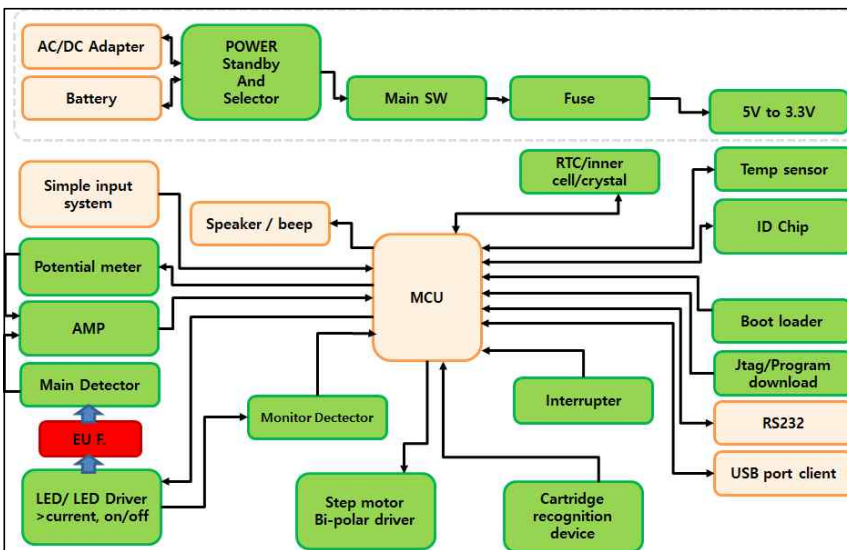
<UV-LED 기반의 광학계 설계 개념도>

(라) UV-LED 광원을 사용하고 Photodetector를 장착한 시험용 광학계를 구성하고 유러피움 형광의 시분할(Eu-Time Resolved Fluorescence, Eu-TRF) 반응을 감지하는 알고리즘을 장착하였음. 우선 UV-LED광원에서 나타나는 카트리치의 형광 그래픽 이미지의 정량화 알고리즘 설계를 진행하였음. Europium-bead를 serial dilution 및 sample을 혼합한 면역반응을 통해 광학계를 통해 프로세싱된 이미지를 정량화하는 알고리즘을 설계 반영하였음.



<설계된 광학계 mock-up 및 정량 알고리즘 반영 결과>

(마) 광학계의 검증을 위해서는 구동회로들이 필요하므로, TRF 형광면역판독기의 UV-LED의 콘트롤과 광학신호처리, 시분할 알고리즘을 처리하기 위한 제어보드의 block diagram을 설계하였음, 아래 그림은 최종적으로 설계가 완료된 block diagram임.



<시분할 형광판독기의 블록 다이어그램>

(바) 고감도 TRF 판독방법의 최적화

① TRF판독에 필요한 광원드라이버와 MCS (Multi- channel scaler)의 기능을 시제품에서 구현하였음.

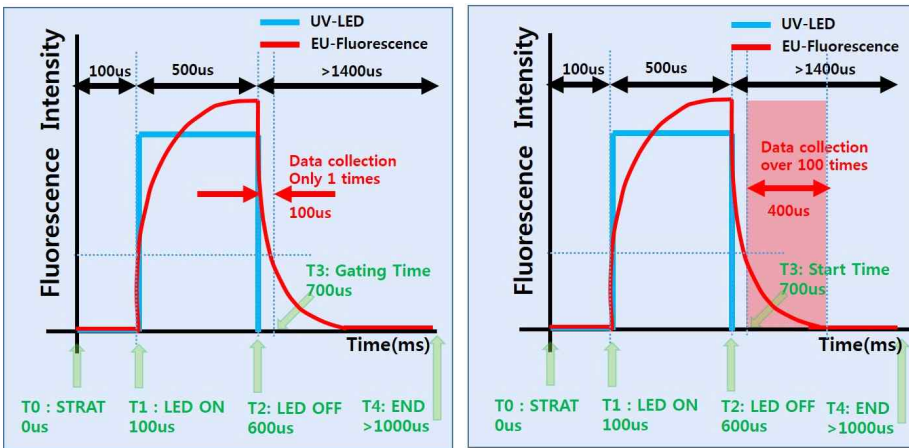
② MCS 기능은 16-bit 마이컴과 내장 ADC를 이용하여 형광을 측정시, 마이컴의 동작 클럭을 기준으로 매 시각, 정확한 시점에서 ADC의 동작을 제어하였고, ADC로부터 변환된 데이터는 시간적으로 Binding하여 마이컴의 레지스터에 저장하는 방식으로 최적화를 실시하였음.

③제작된 시험품에서 TRF분석을 위한 소프트웨어를 설계를 최적화 하였음.

④카트리치의 형광신호는 LED구동을 종료한 후 100us에서부터 400us동안 100회의 신호를

획득하여 TRF 분석을 시도하였음.

⑤ 알고리즘의 성능 검증을 위해 10-10,000pg까지 4개 농도의 Eu 형광이 고정된 카트리지를 사용하여 측정된 결과, 높은 형광신호의 탐지가 가능함을 확인하였음.



<시험품의 TRF 판독 동작 알고리즘 모식도>

(사) TRF 광학계를 장착한 시험품의 제작

① 최적화된 TRF 형광광학계를 사용하여 동물용 TRF 현장진단기의 시험품을 제작하였음.

Component	Specification
Light source	N사 UV-LED
Lens	mold lens
Filter	N/A
Dichroic mirror	O사 Filter
Main detector	T사 detector
Feed back detector	K사 detector

<동물 바이러스 검사용 소형 시분할 형광광학계 시험품 구성>





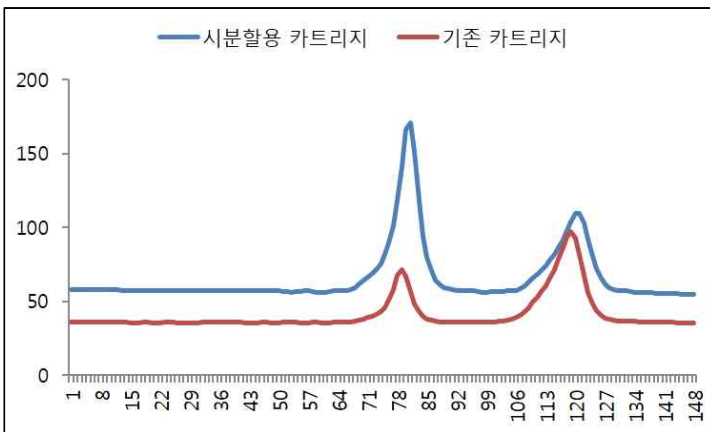
<고감도 TRF 현장진단기 시험품 도면 및 제품>

(아) 고감도 TRF 광학계 시험품의 성능검증

① 최적화된 TRF 형광판독기 시험품에서 카트리지를 사용하여 검출감도를 비교 검증한 결과 형광신호가 최소 8배 이상 증가하여 고감도로 형광을 검출할 수 있음을 확인하였음.

Test area 형광감도 (T area size/gain)		
	TRF 카트리지	Non-TRF 카트리지
run 1	1751	186
run 2	1775	194
run 3	1743	197
run 4	1733	200
AV	1751	194

<TRF 시험품에서 LFIA 형광 카트리치의 형광감도 측정결과>



<LFIA 카트리치에서 TRF 고감도 형광신호 측정 결과>

(2) 시험품의 기구물 및 소프트웨어 개발

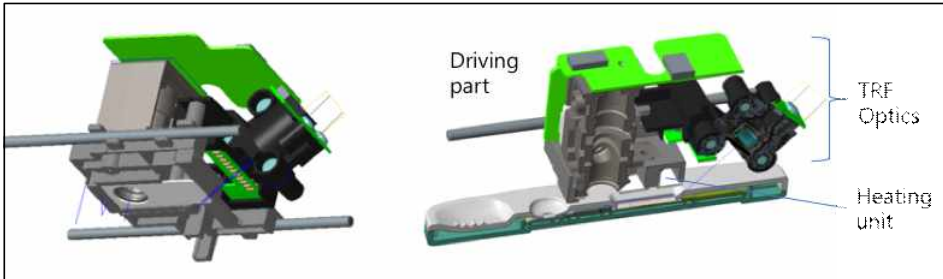
(가) 온도조절을 위한 기구물의 개발

① 통상의 형광면역진단기의 사용환경 온도는 20-30도에서 사용이 가능하지만, 동물용 현장검사 제품의 경우 야외에서 사용되는 경우를 고려하면 적용 온도범위가 5-30도로 최대한 야

외 환경 조건이 충족되어야 함.

② 이를 충족시키기 위하여 진단기 내부에 카트리치 히팅 기구물을 설계하고 이를 최적화하고자 하였음.

③ 카트리치 항온유지를 위하여 가온이 가능한 알루미늄 히터를 설계하고 카트리치의 반응부가 위치하는 영역에 장착할 수 있도록 기구물을 개발하였음.

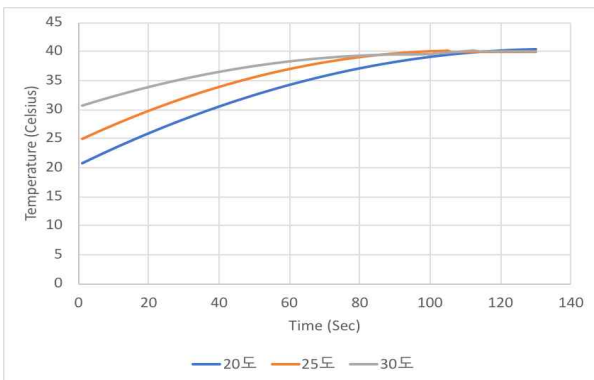


<카트리치 히팅 기구물 설계 - 그림도면>

(나) 카트리치 히팅 기구물의 온도성능 측정 결과

① 카트리치 히팅 기구물을 시험품에 적용하여 목표온도를 40도로 설정한 후 환경온도 20도에서 30도의 환경에서 카트리치 반응부의 온도를 측정하였음.

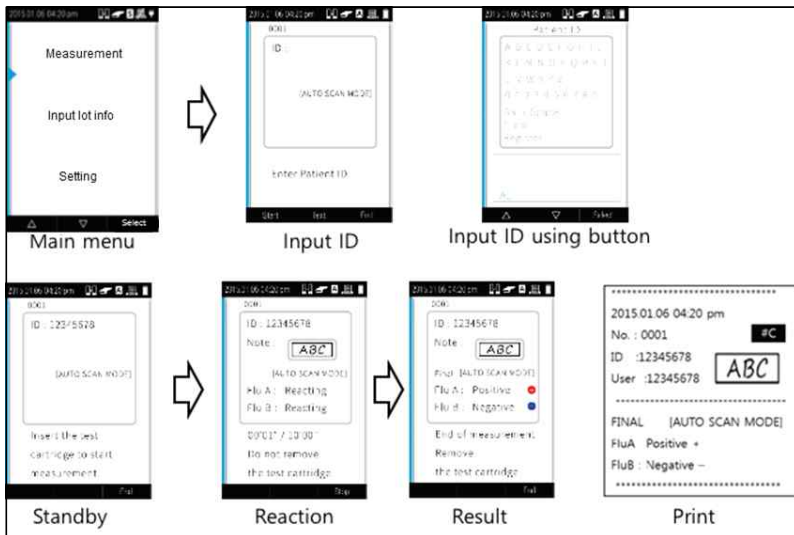
② 20-30도 환경온도에서 카트리치는 2분후 목표온도에 도달할 수 있음을 확인하여, 적용가능성을 확보하였음. 향후 사용가능 온도를 설정하기 위한 규격검증을 실시할 예정임.



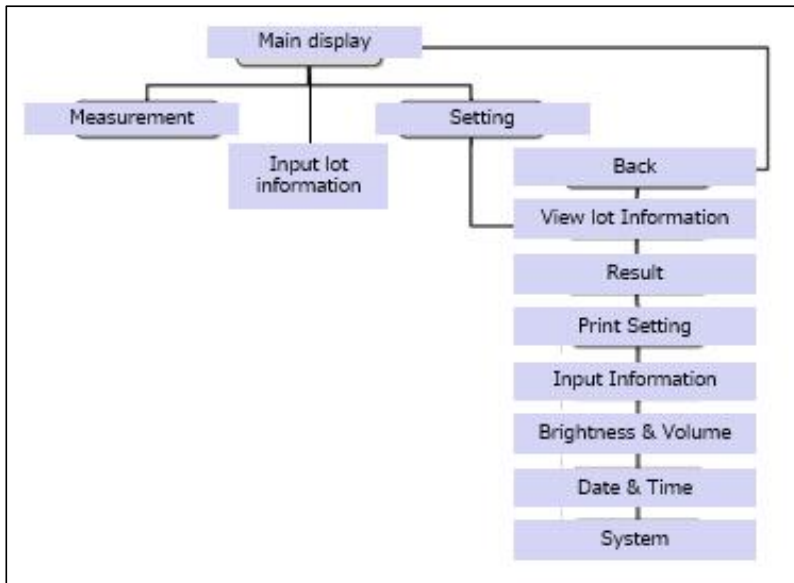
<환경온도별 진단기 반응부의 온도 측정결과>

(다) 소프트웨어 개발 및 최적화

① 동물용 카트리치 검사를 위한 소프트웨어를 개발하고 시험품에서 테스트하였음.



<검사과정 설계 및 Software GUI 구성결과>

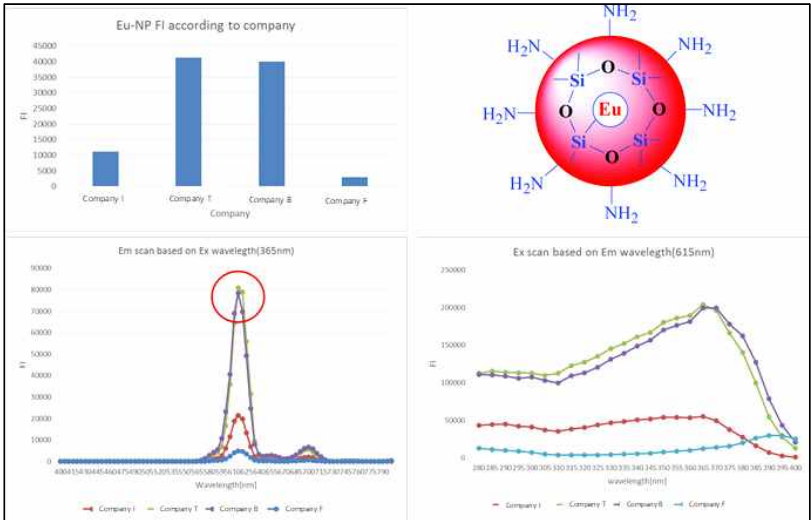


<Software Menu 구성결과>

(3) 고감도 현장검사기 최적화 및 검증

(가) 고감도 현장검사기의 형광감도 최적화

① 본사의 기기설계팀에서 개발 및 동물용 개선작업을 진행한 고감도 광학계 시스템의 최적의 형광파트너를 선정하여, 제품의 성능극대화를 진행 하고자 하였음. 상용으로 접근이 가능하며, 그 구조적인 특징이 상이한 다양한 종류의 europium nanoparticles을 검증하였음. 본사의 TRF 광학계를 이용하여 365nm의 excitation , 615nm emission 기준으로 각각의 europium nanoparticles을 검증하여 최적의 형광물질을 선정하였음.



<최적의 TRF 형광물질 선정>

제품명	TRIAS-Vet	SNAPshot
제품 이미지		
제조사	ANIVET	IDEXX
무게	0.66Kg	4.25kg
검사방법	FIA	Gold N/P opticalscan
TRF	○	X
battery	○	X
휴대성	○	X

<본사 개발 TRIAS-Vet 의 성능비교표>


(나) 고감도 현장검증기 성능검증


① 본사에서 구현한 광학기술과, 카트리지 개발 기술을 이용하여 본 과제에서 실질적으로 진행하고자하는 조류의 감염을 측정하기 위하여, 오리진단키트개발에 필요한 원료물질을 개발하는 동시에 influenza A 측정이 가능한 제품을 상용 항체 원료를 이용하여 개발 진행하였음. 본 상용항체를 이용한 influenza A 진단키트 시제품을 이용하여 고감도 현장검증기의 실증실험을 진행하고자 하였음. influenza A 시제품의 성능검증을 위하여 다양한 표준물질을 이용한 검출감도검증을 진행하였음.


인플루엔자 바이러스	농도 (HA titer)	최소검출농도 (LoD) 측정					
		10 ⁸ 희석농도	10 ⁷ 희석농도	10 ⁶ 희석농도	10 ⁵ 희석농도	10 ⁴ 희석농도	10 ³ 희석농도
H1N1 A/duck/Totton/723/80	256	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)
H2N3 A/duck/Hokkaido/17/01	256	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)	음성(-)
H3N8 A/duck/Mongolia/4/08	128	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)	음성(-)
H4N6 A/duck/Czech/55	512	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)	음성(-)
H5N2 A/duck/Pennsylvania/30218/84	128	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)	음성(-)
H6N2 A/turkey/Massachusetts/3740/85	64	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)	음성(-)	음성(-)
H7N7 A/seal/Massachusetts/1/80	512	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)	음성(-)	음성(-)
H8N4 A/turkey/Ontario/6118/88	128	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)	음성(-)	음성(-)
H9N2 A/turkey/Wisconsin/66	512	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)
H10N7 A/chicken/Germany/N/49	2048	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)	음성(-)
H11N6 A/duck/England/1/56	128	양성(+)	양성(+)	양성(+)	양성(+)	음성(-)	음성(-)

<influenza 표준물질을 이용한 influenza A 시제품의 성능검증>

② 상용원료 및 최적 형광물질을 이용한 influenza A 시제품 성능검증을 진행하였음. 본 검증을 위하여 B사의 AIV 키트와 함께 H3N2 표준바이러스 물질을 이용하여 비교 성능 검증을 진행하였음. 본 연구에서 개발된 본사의 influenza A 진단키트가 B사 제품 대비 32배 우수한 검출 성능을 보임.







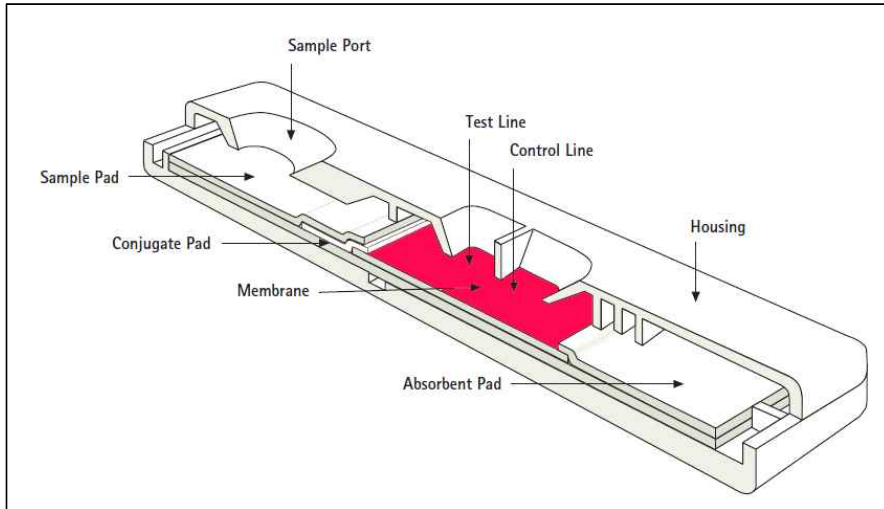
No.	calibrator 농도 (ng/ml)	희석비율	결과			
			B사	TRIAS-Vet		
				Ratio	COI	result
1	1000	1	+	12.66	18.62	+
2	500	1/2	w+	8.32	12.24	+
3	250	1/4	-	5.08	7.47	+
4	125	1/8	-	2.94	4.32	+
5	62.5	1/16	-	1.84	2.71	+
6	31.25	1/32	-	1.17	1.72	+
7	15.63	1/64	-	0.81	1.19	w+
8	7.81	1/128	-	0.42	0.62	-
9	3.91	1/256	-	0.26	0.38	-
10	0	DB	-	0.39	0.57	-

<influenza A 시제품의 B사 제품과의 비교성능검증>

4. 항원검사용 제품의 개발 설계

가. 카트리지 모식도

(1) 항원검사제품의 카트리지 모식도



(가) Sample pad: 분석물이 함유된 시료를 적하하는 장소임.

(나) Conjugation pad: Europium nanoparticles 이 결합된 항체가 시료속의 분석물과 면역반응을 하면서 membrane으로 방출되는 장소임.

(다) Test line: 진단항체가 고정되어 있는 선을 의미함.

(라) Control line: 대조 항체가 고정되어 있는 선을 의미함.

(마) Absorbent pad: 모세관 작용에 의하여 membrane 을 이동해온 시료를 물리적으로 흡수하고, 미반응 물질을 제거하기 위한 장소임.

나. 구성품 내역

(1) 카트리지: 카트리지는 시료 적하를 위한 검체용 패드, 검사결과가 나타나는 탐지선이 고정되어 있는 멤브레인, 검체용 패드와 탐지선 멤브레인을 거쳐 흘러온 시료를 흡수하여 일정한 흐름을 유지시키는 흡수용 패드로 구성되어있음. 카트리지에 시료를 처리하게 되면 분석물과 항원-항체가 복합체를 형성하면서 스트립의 전개면을 따라 이동하게 되고, 이때 멤브레인에 축적된 탐지항체의 형광의 양에 따라 값을 정량할 수 있게 됨.

(2) 추출버퍼 (extraction buffer): Extraction buffer tube는 기기에서 정해진 양만큼 분변을 채취 할 수 있는 도구임.



<extraction buffer>

(3) Lot chip: 아이템명, Lot명 등의 간단한 정보가 저장되어 있으며 제품을 인식하고 기기에서 측정된 형광의 세기를 표시하고자 하는 마커에 맞는 단위로 변환하여 측정값을 나타내는 기능을 함.

5. DHAV-1 항원 검사용 카트리지 최적화 및 시험품, 시제품 개발

가. 시험품 제작

(1) 1차적으로 선정된 DHAV-1 특이 항체 원료물질을 이용하여, 항체농도, 버퍼 조성, 반응시간, 반응 volume 최적화 및 기초 평가를 통하여 확립된 조건을 기반으로 연구소에서 시험품을 제작하였음.

나. 시험품 성능검증

(1) 표준물질과 spiked 검체의 제작

(가) DHAV-1 표준물질

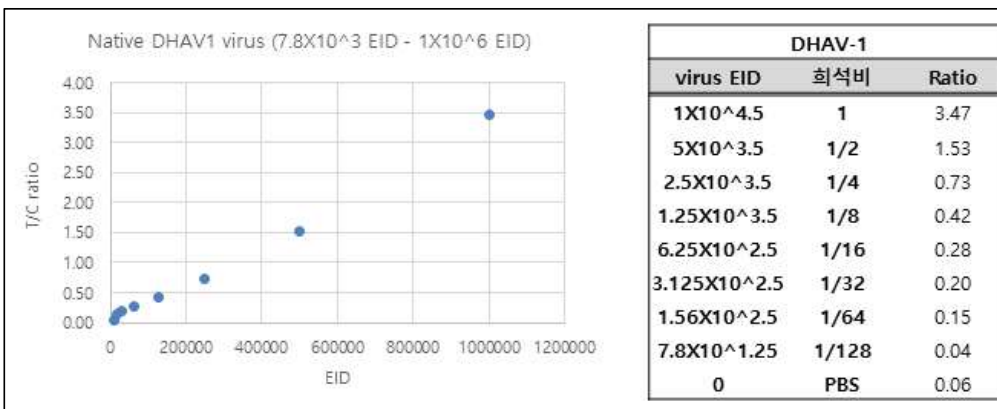
① 본과제의 협동연구기관인 전북대로부터 제공받은 $10^{4.5}$ ELD50/ml 의 DHAV-1 바이러스 배양액을 serial dilution하여 각 농도별 바이러스 물질을 표준물질로 사용하였음.

(나) spiked 검체의 제작

① 음성오리분변 일정량을 채취 후 미세저울을 이용하여 무게를 측정함. 측정된 무게에 따라서 분변 비율이 9, 희석된 DHAV-1 표준물질 비율이 1되도록 섞어준 후 나무막대를 이용하여 균질하게 섞이도록 잘 섞어줌. 검체 채취도구를 이용하여 spiked 검체를 채취 후 연구에 사용함.

(2) 검출한계 및 hook effect 검토

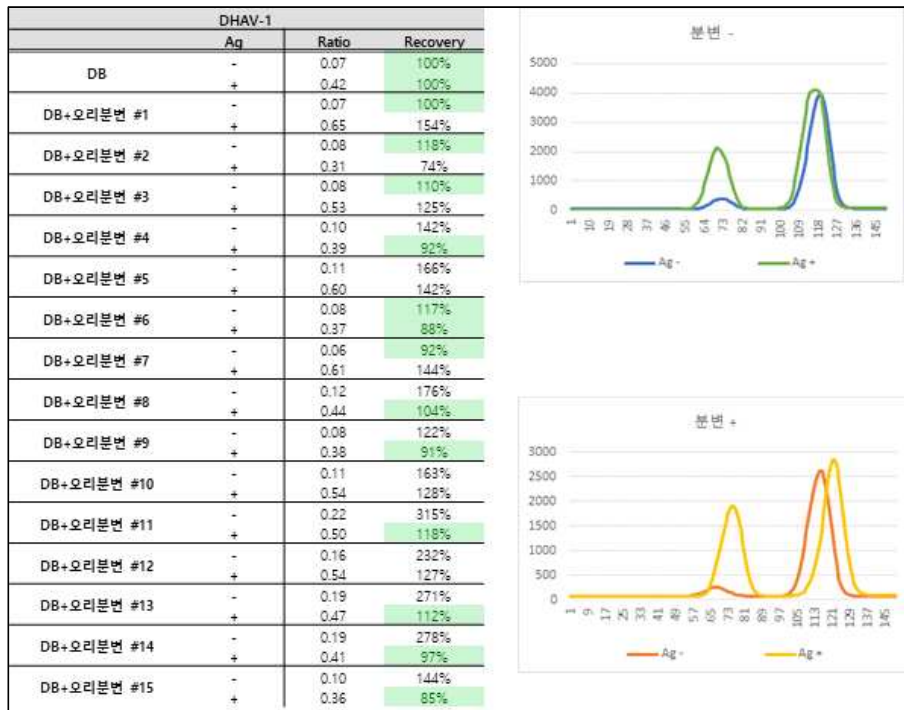
(가) 현재 개발된 제품의 성능을 검토하고자 하였으며, 그중하나인 검출한계 및 hook effect 검토 결과임. DHAV-1 virus를 serial dilution 하여 측정 가능한 검출 한계를 확인 하였으며, $3 \times 10^{2.5}$ EID까지 바이러스 측정이 가능할 것으로 사료됨. 고농도 표준물질에서는 $1 \times 10^{4.5}$ 까지 hook effect가 발생하지 않음을 확인하였음.



<검출한계 및 hook effect 검토>

(3) spiked 검체에서의 반응성

(가) 본 연구진이 개발하고 있는 제품은 사용자가 손쉽게 검체채취 및 결과를 확인할 수 있는 제품이며, 이를 위하여 오리에서 접근하기 쉬운 분변을 이용하여 감염여부를 측정하는 제품을 만들고자 함. 따라서 실제 필드에서는 분변에서 항원을 측정해야 하므로, 분변 존재 하에서의 항원-항체 반응성을 확인하고자 하였음. 총 15가지의 음성분변에 저농도 ($6 \times 10^{2.5}$) DHAV-1 바이러스를 spiking하여 반응성을 확인한 결과 분변이 없는 상황과 비교하여 74-154%의 회수율을 보임을 확인하였음.



<DHAV-1 Ag 시험품을 이용한 spiked 검체에서의 반응성 검증>

(4) 항원 안정성 테스트 (상온)

(가) DHAV-1 제품의 개발 및 생산에 사용하게될 저,중,고농도의 표준물질의 상온 안정성을 검토 하였음. 일반적으로 제품 생산과정에서 나타날 수 있는 16시간 이내에서의 항원 안정성은 변화 없음.

		DHAV-1 Native Ag						
	Time	-	30 min	60 min	90 min	120 min	16 hrs	
ratio	-	0.38	0.36	0.41	0.40	0.43	0.39	
	1/16	0.69	0.71	0.67	0.70	0.62	0.60	
	1/4	1.37	1.24	1.46	1.30	1.20	1.18	
	1	3.20	3.07	2.92	2.88	2.79	2.74	
Recovery	-	100%	95%	108%	105%	113%	103%	
	1/16	100%	103%	97%	101%	90%	87%	
	1/4	100%	91%	107%	95%	88%	86%	
	1	100%	96%	91%	90%	87%	86%	

<DHAV-1 Ag 표준물질 상온 안정성>

다. 시제품 제작

(1) 검증이 된 시험품 제작 조건을 이용하여, 규격설정, 공정규격검토, 양산성 검토, 생산라인을 이용한 제작 및 검증을 거쳐서 DHAV-1 Ag 시제품을 생산하였음.



- 구성품
 - 카트리지 10개
 - 희석액튜브 10개
 - Dropping cap 10개
 - Lot chip 1개
 - 사용설명서 1장

<DHAV-1 Ag 시제품 제작>

라. 시제품 성능검증

(1) 검출감도 확인

(가) $1 \times 10^{4.5}$ EID의 DHAV-1 표준물질을 계단희석하여 생산라인을 거쳐서 제작된 시제품의 검출감도를 확인하고자 하였음. DHAV-1 Ag 제품은 EID $3 \times 10^{2.45}$ 까지 측정이 가능함. 본 농도를 최저검출농도 calibrator 인 calibrator2로 설정함.

DHAV-1 요막강액 stock (EID $1 \times 10^{4.45}$)					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	32.25	31.23	38.86	34.12	12%
DHAV-1 요막강액 stock (EID $2.5 \times 10^{3.45}$) - 1/4 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	18.42	18.29	12.37	16.36	21%
DHAV-1 요막강액 stock (EID $6.25 \times 10^{2.45}$) - 1/8 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	3.80	3.47	3.21	3.49	8%
DHAV-1 요막강액 stock (EID $3 \times 10^{2.45}$) - 1/16 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	1.91	1.77	1.55	1.74	10%
DHAV-1 요막강액 stock (EID $1.56 \times 10^{1.45}$) - 1/32 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	0.84	0.71	0.62	0.72	15%
DHAV-1 요막강액 stock (EID $3.91 \times 10^{0.45}$) - 1/128 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	0.20	0.16	0.17	0.18	12%
DHAV-1 요막강액 stock (EID $0.98 \times 10^{0.45}$) - 1/512 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	0.04	0.11	0.01	0.05	97%
Negative					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	0.01	0.00	0.17	0.06	155%

<DHAV-1 Ag 시제품 검출감도 검토>

(2) 시제품 calibration

(가) 제작된 시제품을 이용하여 음성, 저농도, 중농도 calibrator를 이용하여 calibration 진행하였음. 음성과 저농도 calibrator를 이용하여 검출가능 한계를 1이라는 수치로 제시하여 바이러스가 많고/적음을 보여주는 수치인 COI값으로 변환하였음.

													Calibrator	
													1	-
													2	6.25X10 ⁴
													3	2.5X10 ⁵
ratio														
sample	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	AV	CV (%)	SD	
Cal. 1	0.052	0.040	0.032	0.048	0.021	0.031	0.016	0.040	0.023	0.023	0.031	28%	0.009	
	0.037	0.042	0.031	0.022	0.025	0.029	0.030	0.036	0.042	0.025				
	0.033	0.029	0.039	0.029	0.028	0.025	0.023	0.019	0.029	0.038				
Cal. 2	0.402	0.412	0.383	0.402	0.310	0.325	0.379	0.391	0.579	0.342	0.393	19%	0.074	
Cal. 3	1.161	0.917	0.820	0.734	0.820	0.963	0.931	0.903	0.799	1.089	0.914	15%	0.133	
COI														
sample	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	AV			
Cal. 1	0.17	0.14	0.11	0.16	0.07	0.10	0.06	0.14	0.08	0.08	0.11			
	0.13	0.14	0.10	0.07	0.08	0.10	0.10	0.12	0.14	0.09				
	0.11	0.10	0.13	0.10	0.09	0.08	0.08	0.06	0.10	0.13				
Cal. 2	1.36	1.39	1.30	1.36	1.05	1.10	1.28	1.32	1.96	1.16	1.33			
Cal. 3	3.92	3.10	2.77	2.48	2.77	3.25	3.15	3.05	2.70	3.68	3.09			

<DHAV-1 Ag 시제품 calibration>

(3) 분석적 민감도

(가) DHAV-1 Ag kit 시제품의 검출 가능 능력을 확인하기 위하여 분석적 민감도인 LoB, LoD를 측정하였음. CLSI EP17-A에 제시된 수식을 이용하여 LoB, LoD를 산출한다. DHAV-1 Ag kit 제품의 LoB는 0.136 COI이며, LoD는 0.441 COI로 산출되었음.

DHAV-1 LOB											
test number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Value(COI)	0.01	0.07	0.04	0.04	0.03	0.08	0.01	0.07	0.04	0.05	
test number	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Value(COI)	0.06	0.05	0.05	0.04	0.37	0.05	0.03	0.07	0.00	0.01	
test number	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Value(COI)	0.04	0.03	0.00	0.12	0.04	0.01	0.05	0.02	0.12	0.02	
test number	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
Value(COI)	0.00	0.07	0.04	0.04	0.02	0.06	0.06	0.09	0.05	0.07	
test number	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
Value(COI)	0.00	0.00	0.05	0.00	0.05	0.12	0.07	0.01	0.10	0.01	
test number	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
Value(COI)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	
Average	0.05					SD	0.0520				
(n=60)						(n=60)					

LOB (COI) 0.136

<DHAV-1 Ag 시제품의 LoB 측정>

Vet chroma DHAV-1 Ag 저농도 (Cal.2) 측정 결과 (LoD)												
측정횟수	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average	CV
Value (COI)	1.37	1.72	1.34	1.48	1.04	1.10	1.24	1.01	1.01	1.06	1.48	14%
측정횟수	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Average	CV
Value (COI)	1.16	1.31	1.40	1.18	1.28	1.38	1.29	1.46	1.04	1.47	1.29	10%
측정횟수	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	Average	CV
Value (COI)	1.11	1.10	1.19	1.48	1.07	1.41	1.01	1.06	1.28	1.07	1.13	4%
평균	1.238					표준편차	0.1854					
(n=30)						(n=30)						

LOB (COI) 0.136

LOD (COI) 0.441

<DHAV-1 Ag kit 시제품의 LoD 측정>

(4) 분석적 특이도

(가) DHAV-1 Ag 제품의 교차반응을 평가하고자 하였음. DHAV-1 이 감염된 오리에서 동시 감염될 확률이 높은 Salmonella, Pasteurella, Riemerella, E.Coli를 이용하여 교차반응 여부를 확인하였음.

Sample	-	DHAV-1 Ag	Salmonella	pasteurella	Riemerella	E.coli
CFU or EID		1X10 ^{4.45} EID	1X10 ⁷ CFU	1X10 ⁷ CFU	1X10 ⁷ CFU	1X10 ⁷ CFU
ratio	0.02	8.82	0.00	0.06	0.03	0.03
T area	86	56516	12	155	114	114
C area	4408	6408	2526	2634	3809	3809
COI	0.07	29.83	0.02	0.20	0.10	0.10

<DHAV-1 Ag 시제품의 교차반응 검증>

(5) 정확도 테스트

(가) 시약의 시험자간, 그리고 장소에 따른 DHAV-1 Ag 시약의 정확도 (정밀도)를 측정하였음. 본 테스트를 통하여 시험자간, 검사장소간 정확도 평가에서 동일한 성능을 보였음. 따라서 DHAV-1 Ag 시제품은 시험자간, 검사장소에 상관없이 100%의 음/양성 정확도를 가진다.

Person 1	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.05	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.01	11.8
2	1.18	1.07	1.48	1.27	1.4	1.28	0.16	12.9	
3	3.57	3.12	3.23	3.55	3.41	3.38	0.20	5.8	

Person 2	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.06	0.07	0.06	0.07	0.06	0.06	0.01	8.6
2	1.17	1.05	1.19	1.06	1.3	1.15	0.10	8.9	
3	4.15	3.74	4.09	4.08	3.2	3.85	0.40	10.3	

Person 3	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.04	0.05	0.06	0.08	0.05	0.06	0.02	27.1
2	1.39	1.05	1.19	1.23	1.38	1.25	0.14	11.4	
3	3.84	4.15	3.21	3.21	3.93	3.67	0.43	11.8	

Total (Between-person)	Calibrator	person1	person2	person3	AVG	SD	CV(%)
	1	0.06	0.06	0.06	0.06	0.00	6.7
2	1.28	1.15	1.25	1.23	0.07	5.3	
3	3.38	3.85	3.67	3.63	0.24	6.6	

<DHAV-1 Ag 시제품의 between-person 정확도>

Lab 1	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.08	0.04	0.07	0.04	0.07	0.06	0.02	31.2
2	1.02	1.34	1.44	1.47	1.43	1.34	0.19	13.8	
3	3.35	4.15	3.31	3.15	3.15	3.42	0.42	12.2	

Lab 2	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.03	0.07	0.04	0.06	0.08	0.06	0.02	37.0
2	1.07	1.47	1.39	1.3	1.07	1.26	0.18	14.6	
3	3.37	3.86	3.82	3.54	4	3.72	0.26	6.9	

Lab 3	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.00	9.3
2	1.17	1.09	1.33	1.3	1.36	1.25	0.12	9.2	
3	4.09	2.98	2.96	3.89	3.33	3.45	0.52	15.1	

Total (Between-site)	Calibrator	Lab1	Lab2	Lab3	AVG	SD	CV(%)
	1	0.06	0.06	0.05	0.05	0.01	11.2
2	1.34	1.26	1.25	1.28	0.05	3.8	
3	3.42	3.72	3.45	3.53	0.16	4.6	

<DHAV-1 Ag 시제품의 between-site 정확도>

6. DHAV-3 항원 검사용 카트리리지 최적화 및 시험품, 시제품 개발

가. 시험품 제작

(1) 1차적으로 선정된 DHAV-3 특이 항체 원료물질을 이용하여, 항체농도, 버퍼 조성, 반응시간, 반응 volume 최적화 및 기초 평가를 통하여 확립된 조건을 기반으로 연구소에서 시험품을 제작하였음.

나. 시험품 성능검증

(1) 표준물질과 spiked 검체의 제작

(가) DHAV-3 표준물질

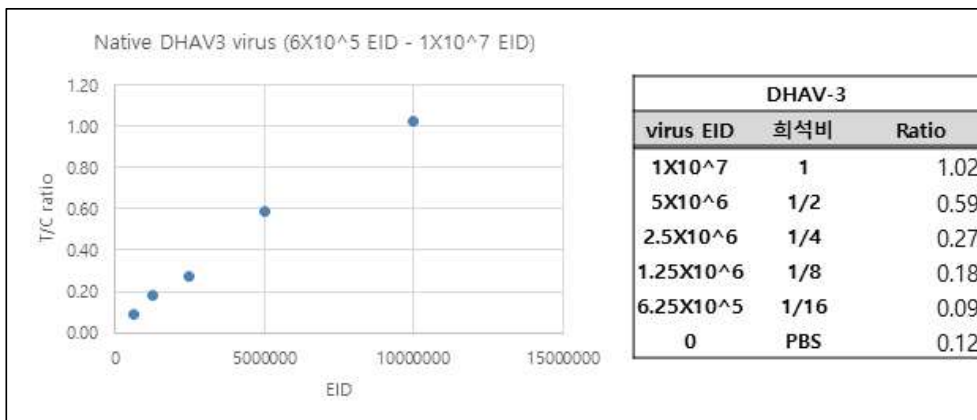
① 본과제의 협동연구기관인 전북대로부터 제공받은 10^7 EID50/ml 의 DHAV-3 바이러스 배양액을 serial dilution하여 각 농도별 바이러스 물질을 표준물질로 사용하였음.

(나) spiked 검체의 제작

① 음성오리분변 일정량을 채취 후 미세저울을 이용하여 무게를 측정함. 측정한 무게에 따라서 분변 비율이 9, 희석된 DHAV-3 표준물질 비율이 1되도록 섞어준 후 나무막대를 이용하여 균질하게 섞이도록 잘 섞어줌. 검체 채취도구를 이용하여 spiked 검체를 채취 후 연구에 사용함.

(2) 검출한계 검토

(가) 현재 개발된 제품의 성능을 검토하고자 하였으며, 그중 하나인 검출한계 및 hook effect 검토 결과임. DHAV-3 virus를 serial dilution 하여 측정 가능한 검출 한계를 확인하였으며, 2.5×10^6 EID 까지 바이러스 측정이 가능할 것으로 사료됨.

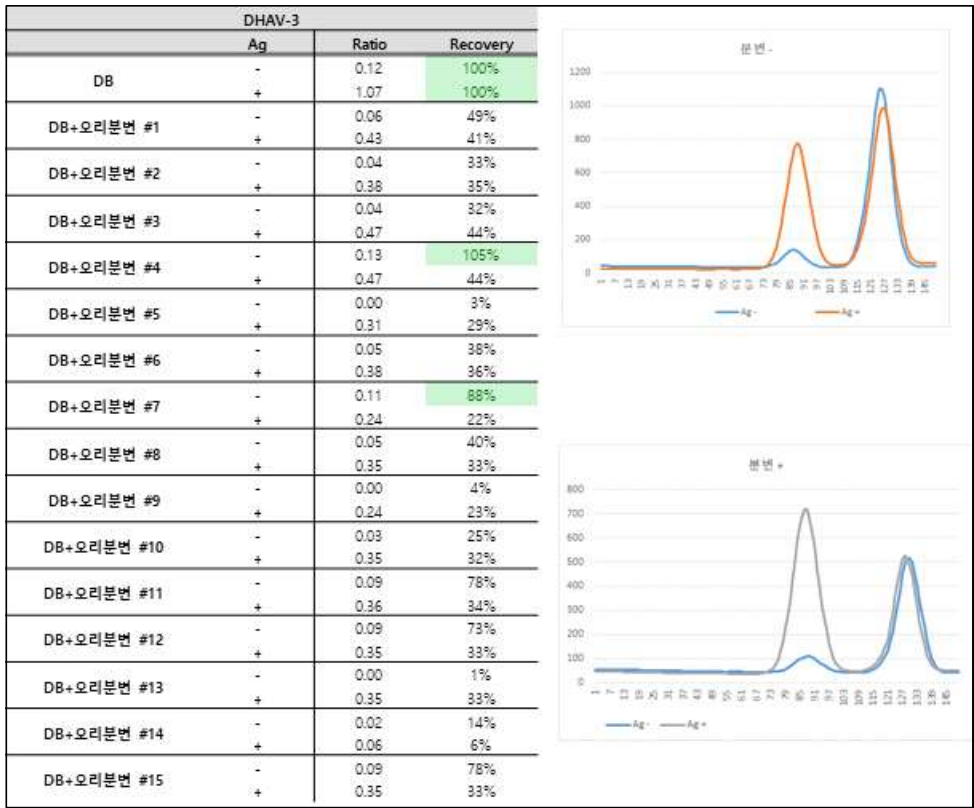


<검출한계 검토>

(3) spiked 검체에서의 반응성

(가) 본 연구진이 개발하고 있는 제품은 사용자가 손쉽게 검체채취 및 결과를 확인할 수 있는 제품이며, 이를 위하여 오리에서 접근하기 쉬운 분변을 이용하여 감염여부를 측정하는 제품을 만들고자 함. 따라서 실제 필드에서는 분변에서 항원을 측정해야 하므로, 분변 존재 하에서의 항원-항체 반응성을 확인하고자 하였음. 총 15가지의 음성분변에 저농도 (2.5×10^6) DHAV-3 바이러스를 spiking하여 반응성을 확인한 결과 분변이 없는 상황과 비교하여 평균

32%의 회수율을 보임을 확인하였음. 분변에 의한 강한 영향을 받으나, 인위적인 조건이므로 실 검체 검증이 필요함.



<DHAV-3 Ag 시험품을 이용한 spiked 검체에서의 반응성 검증>

(4) 항원 안정성 테스트 (상온)

(가) DHAV-3 제품의 개발 및 생산에 사용하게될 저,중,고농도의 표준물질의 상온 안정성을 검토 하였음. 일반적으로 제품 생산과정에서 나타날 수 있는 16시간 이내에서의 항원 안정성은 변화 없음.

DHAV-3 Native Ag							
	Time	-	30 min	60 min	90 min	120 min	16 hrs
ratio	-	0.08	0.09	0.07	0.08	0.09	0.09
	1/8	0.24	0.25	0.24	0.21	0.19	0.21
	1/4	0.41	0.37	0.39	0.36	0.35	0.38
	1	1.17	1.11	1.15	1.17	1.15	1.00
Recovery	-	100%	125%	93%	106%	120%	113%
	1/8	100%	103%	100%	87%	81%	87%
	1/4	100%	90%	96%	87%	85%	92%
	1	100%	95%	98%	100%	99%	86%

<DHAV-3 Ag 표준물질 상온 안정성>

다. 시제품 제작

(1) 검증이 된 시험품 제작 조건을 이용하여, 규격설정, 공정규격검토, 양산성 검토, 생산라인을 이용한 제작 및 검증을 거쳐서 DHAV-3 Ag 시제품을 생산하였음.



- 구성품
- 카트리지 10개
- 희석액튜브 10개
- Dropping cap 10개
- Lot chip 1개
- 사용설명서 1장

<DHAV-3 Ag 시제품 제작>

라. 시제품 성능검증

(1) 검출감도 확인

(가) $1 \times 10^{7.2}$ EID의 DHAV-3 표준물질을 계단희석하여 생산라인을 거쳐서 제작된 시제품의 검출감도를 확인하고자 하였음. DHAV-3 Ag 제품은 EID $2.5 \times 10^{6.2}$ 까지 측정이 가능함. 본 농도를 최저검출농도 calibrator 인 calibrator2로 설정함.

DHAV-3 요막강액 stock (EID $1 \times 10^{7.2}$)					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	4.88	5.13	4.80	4.94	3%
DHAV-3 요막강액 stock (EID $2.5 \times 10^{6.2}$) - 1/4 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	2.18	1.24	1.35	1.59	32%
DHAV-3 요막강액 stock (EID $6.25 \times 10^{5.2}$) - 1/8 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	0.52	0.58	0.63	0.58	10%
DHAV-3 요막강액 stock (EID $1.56 \times 10^{4.2}$) - 1/32 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	0.54	0.61	0.57	0.57	6%
DHAV-3 요막강액 stock (EID $3.91 \times 10^{3.2}$) - 1/128 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	0.42	0.52	0.53	0.49	12%
Negative					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	0.41	0.40	0.41	0.41	1%

<DHAV-3 Ag 시제품 검출감도 검토>

(2) 시제품 calibration

(가) 제작된 시제품을 이용하여 음성, 저농도, 중농도 calibrator를 이용하여 calibration 진행하였음. 음성과 저농도 calibrator를 이용하여 검출가능 한계를 1이라는 수치로 제시하여 바이러스가 많고/적음을 보여주는 수치인 COI값으로 변환하였음.

Calibrator	
1	-
2	2.5X10 ⁶
3	5X10 ⁶

ratio													
sample	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	AV	CV (%)	SD
Cal. 1	0.072	0.062	0.060	0.090	0.080	0.107	0.057	0.081	0.070	0.103	0.076	32%	0.024
	0.059	0.134	0.097	0.132	0.055	0.056	0.070	0.066	0.082	0.041			
	0.060	0.061	0.089	0.103	0.050	0.033	0.069	0.098	0.067	0.062			
Cal. 2	0.32	0.34	0.32	0.31	0.33	0.31	0.28	0.29	0.24	0.32	0.308	9%	0.029
Cal. 3	0.79	1.04	0.56	1.17	0.98	1.01	0.95	0.63	1.26	0.74	0.914	25%	0.227

COI													
sample	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	AV		
Cal. 1	0.30	0.26	0.25	0.38	0.34	0.45	0.24	0.34	0.30	0.43	0.32		
	0.25	0.56	0.41	0.56	0.23	0.24	0.30	0.28	0.35	0.17			
	0.25	0.26	0.37	0.43	0.21	0.14	0.29	0.41	0.28	0.26			
Cal. 2	1.35	1.44	1.35	1.32	1.41	1.32	1.19	1.24	1.02	1.35	1.30		
Cal. 3	3.33	4.40	2.38	4.95	4.15	4.25	4.02	2.66	5.30	3.12	3.86		

DHAV-3 Ag 시제품 calibration

(3) 분석적 민감도

(가) DHAV-3 Ag kit 시제품의 검출 가능 능력을 확인하기 위하여 분석적 민감도인 LoB, LoD를 측정하였음. CLSI EP17-A에 제시된 수식을 이용하여 LoB, LoD를 산출한다. DHAV-3 Ag kit 제품의 LoB는 0.492 COI이며, LoD는 0.875 COI로 산출되었음.

DHAV-3 LOB											
test number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Value(COI)	0.35	0.47	0.37	0.46	0.34	0.52	0.43	0.36	0.36	0.34	
test number	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Value(COI)	0.30	0.38	0.37	0.33	0.41	0.31	0.29	0.48	0.37	0.30	
test number	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Value(COI)	0.41	0.31	0.36	0.29	0.37	0.42	0.30	0.27	0.34	0.44	
test number	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
Value(COI)	0.35	0.28	0.52	0.43	0.30	0.33	0.37	0.36	0.56	0.30	
test number	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
Value(COI)	0.32	0.33	0.42	0.16	0.52	0.31	0.36	0.47	0.55	0.31	
test number	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
Value(COI)	0.32	0.39	0.31	0.30	0.26	0.29	0.40	0.31	0.38	0.30	
Average	0.36					SD	0.0775				
(n=60)						(n=60)					

LOB (ratio)	0.117
LOB (COI)	0.492

DHAV-3 Ag 시제품의 LoB 측정

Vet chroma DHAV-3 Ag 저농도 (Cal.2) 측정 결과												
측정횟수	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average	CV
Value (COI)	1.60	1.11	1.39	1.34	1.03	1.78	1.11	1.34	1.06	1.24	1.36	18%
측정횟수	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Average	CV
Value (COI)	1.66	1.65	1.56	1.36	0.99	1.59	1.38	1.35	1.40	1.49	1.62	3%
측정횟수	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	Average	CV
Value (COI)	0.89	1.11	1.04	1.16	1.36	1.33	1.16	1.19	0.91	1.19	1.01	11%
평균	1.291					표준편차	0.2330					
(n=30)						(n=30)						

LOB (COI)	0.492
LOD (COI)	0.875

DHAV-3 Ag kit 시제품의 LoD 측정

(4) 분석적 특이도

(가) DHAV-3 Ag 제품의 교차반응을 평가하고자 하였음. DHAV-3 가 감염된 오리에서 동시

감염될 확률이 높은 Salmonella, Pasteurella, Riemerella, E.Coli를 이용하여 교차반응 여부를 확인하였음.

Sample	-	DHAV-3 Ag	Samonella	pasteurella	Riemerella	E.coli
CFU or EID		1X 10 ^{7.2} EID	1X10 ⁷ CFU	1X10 ⁷ CFU	1X10 ⁷ CFU	1X10 ⁷ CFU
ratio	0.07	0.84	0.06	0.08	0.09	0.08
T area	134	2871	285	355	380	367
C area	1983	3417	4824	4400	4468	4733
COI	0.40	4.93	0.35	0.47	0.50	0.45

<DHAV-3 Ag 시제품의 교차반응 검증>

(5) 정확도 테스트

(가) 시약의 시험자간, 그리고 장소에 따른 DHAV-3 Ag 시약의 정확도 (정밀도)를 측정하였음. 본 테스트를 통하여 시험자간, 검사장소간 정확도 평가에서 동일한 성능을 보였음. 따라서 DHAV-3 Ag 시제품은 시험자간, 검사장소에 상관없이 100%의 음/양성 정확도를 가진다.

Person 1	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.14	0.29	0.48	0.43	0.29	0.33	0.13	41.1
	2	1.08	1.17	1.1	1.05	1.3	1.14	0.10	8.7
	3	3.11	3.8	3.36	3.31	3.09	3.33	0.29	8.6

Person 2	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.46	0.46	0.25	0.37	0.39	0.39	0.09	22.3
	2	1.2	1.21	1.08	1.34	1.52	1.27	0.17	13.2
	3	3.42	4.06	3.52	3.08	4.35	3.69	0.51	13.9

Person 3	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.16	0.23	0.14	0.24	0.2	0.19	0.04	22.3
	2	1.3	1.1	1.16	1.24	1.53	1.27	0.17	13.1
	3	3.01	4.02	3.86	4.25	3.46	3.72	0.49	13.2

Total (Between-person)	Calibrator	person1	person2	person3	AVG	SD	CV(%)
	1	0.33	0.39	0.19	0.30	0.10	32.5
	2	1.14	1.27	1.27	1.23	0.07	6.0
	3	3.33	3.69	3.72	3.58	0.21	6.0

<DHAV-3 Ag 시제품의 between-person 정확도>

Lab 1	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.19	0.2	0.22	0.2	0.18	0.20	0.01	7.5
	2	1.16	1.49	1.35	1.41	1.36	1.35	0.12	9.0
	3	4.28	3.69	4.21	3	4.17	3.87	0.54	13.9

Lab 2	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.17	0.36	0.46	0.21	0.15	0.27	0.13	49.8
	2	1.05	1.38	1.45	1.42	1.47	1.35	0.17	12.8
	3	3.34	2.97	3.17	3.73	3.03	3.25	0.30	9.4

Lab 3	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.34	0.14	0.48	0.21	0.3	0.29	0.13	44.2
	2	1.2	1.43	1.44	1.49	1.05	1.32	0.19	14.3
	3	4.28	3.13	3.86	3.52	3.94	3.75	0.44	11.7

Total (Between-site)	Calibrator	Lab1	Lab2	Lab3	AVG	SD	CV(%)
	1	0.20	0.27	0.29	0.25	0.05	19.7
	2	1.35	1.35	1.32	1.34	0.02	1.4
	3	3.87	3.25	3.75	3.62	0.33	9.1

<DHAV-3 Ag 시제품의 between-site 정확도>

7. DEV 항원 검사용 카트리지 최적화 및 시험품, 시제품 개발

가. 시험품 제작

(1) 1차적으로 선정된 DEV 특이 항체 원료물질을 이용하여, 항체농도, 버퍼 조성, 반응시간, 반응 volume 최적화 및 기초 평가를 통하여 확립된 조건을 기반으로 연구소에서 시험품을 제작하였음.

나. 시험품 성능검증

(1) 표준물질과 spiked 검체의 제작

(가) DEV 표준물질

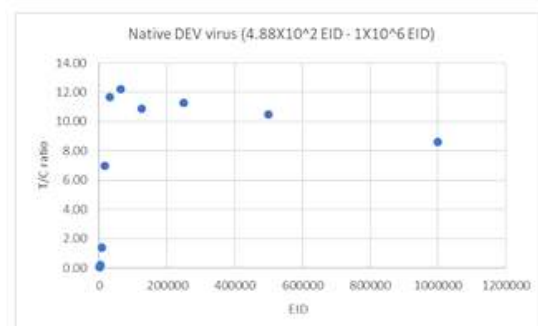
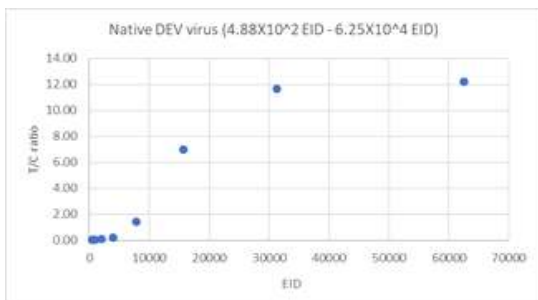
① 본과제의 협동연구기관인 전북대로부터 제공받은 10^6 EID₅₀/ml 의 DEV 바이러스 배양액을 serial dilution하여 각 농도별 바이러스 물질을 표준물질로 사용하였음.

(나) spiked 검체의 제작

① 음성오리분변 일정량을 채취 후 미세저울을 이용하여 무게를 측정함. 측정된 무게에 따라서 분변 비율이 9, 희석된 DEV 표준물질 비율이 1되도록 섞어준 후 나무막대를 이용하여 균질하게 섞이도록 잘 섞어줌. 검체 채취도구를 이용하여 spiked 검체를 채취 후 연구에 사용함.

(2) 검출한계 및 hook effect 검토

(가) 현재 개발된 제품의 성능을 검토하고자 하였으며, 그중 하나인 검출한계 및 hook effect 검토 결과임. DEV virus를 serial dilution 하여 측정 가능한 검출 한계를 확인하였으며, 9.7×10^2 EID까지 바이러스 측정이 가능할 것으로 사료됨. 고농도 표준물질에서는 5×10^5 이상의 항원이 존재할 경우 hook effect 발생함. 하지만 음성으로 떨어지지 않으며 음/양성 구분에는 영향을 주지 않음.



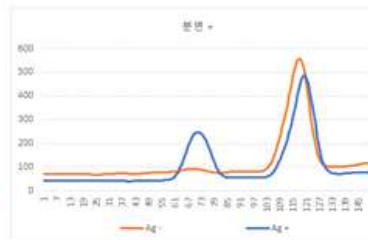
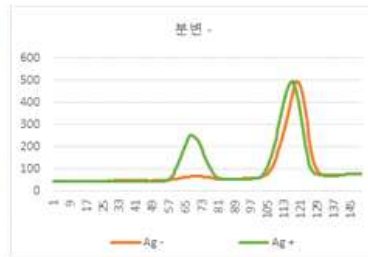
DEV		
virus EID	희석비	Ratio
1×10^6	1	8.62
5×10^5	1/2	10.49
2.5×10^5	1/4	11.29
1.25×10^5	1/8	10.88
6.25×10^4	1/16	12.21
3.125×10^4	1/32	11.66
1.56×10^4	1/64	6.97
7.8×10^3	1/128	1.41
3.9×10^3	1/256	0.19
1.95×10^3	1/512	0.07
9.76×10^2	1/1024	0.04
4.88×10^2	1/2048	0.03
0	PBS	0.02

<검출한계 및 hook effect 검토>

(3) spiked 검체에서의 반응성

(가) 본 연구진이 개발하고 있는 제품은 사용자가 손쉽게 검체채취 및 결과를 확인할 수 있는 제품이며, 이를 위하여 오리에서 접근하기 쉬운 분변을 이용하여 감염여부를 측정하는 제품을 만들고자 함. 따라서 실제 필드에서는 분변에서 항원을 측정해야 하므로, 분변 존재 하에서의 항원-항체 반응성을 확인하고자 하였음. 총 15가지의 음성분변에 저농도 (9.7×10^2) DEV 바이러스를 spiking하여 반응성을 확인한 결과 분변이 없는 상황과 비교하여 43-86%의 회수율을 보임을 확인하였음.

DEV			
	Ag	Ratio	Recovery
DB	-	0.03	100%
	+	4.64	100%
DB+오리분변 #1	-	0.05	173%
	+	3.52	76%
DB+오리분변 #2	-	0.06	186%
	+	3.37	73%
DB+오리분변 #3	-	0.05	156%
	+	3.89	84%
DB+오리분변 #4	-	0.06	178%
	+	3.38	73%
DB+오리분변 #5	-	0.05	173%
	+	3.67	79%
DB+오리분변 #6	-	0.05	167%
	+	3.94	85%
DB+오리분변 #7	-	0.06	199%
	+	3.74	81%
DB+오리분변 #8	-	0.05	148%
	+	3.98	86%
DB+오리분변 #9	-	0.01	38%
	+	2.76	59%
DB+오리분변 #10	-	0.01	29%
	+	3.25	70%
DB+오리분변 #11	-	0.04	126%
	+	3.69	80%
DB+오리분변 #12	-	0.05	157%
	+	3.54	76%
DB+오리분변 #13	-	0.03	101%
	+	3.07	66%
DB+오리분변 #14	-	0.06	178%
	+	2.01	43%
DB+오리분변 #15	-	0.05	157%
	+	3.39	73%



<DEV Ag 시험품을 이용한 spiked 검체에서의 반응성 검증>

(4) 항원 안정성 테스트 (상온)

(가) DEV 제품의 개발 및 생산에 사용하게 될 저,중,고농도의 표준물질의 상온 안정성을 검토 하였음. 일반적으로 제품 생산과정에서 나타날 수 있는 16시간 이내에서의 항원 안정성은 변화 없음.

DEV Native Ag							
	Time	-	30 min	60 min	90 min	120 min	16 hrs
ratio	-	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03
	1/240	0.21	0.19	0.24	0.18	0.20	0.17
	1/120	1.68	1.83	1.81	1.75	1.48	1.57
	1	9.18	10.03	8.72	8.86	10.11	10.54
Recovery	-	100%	90%	113%	120%	83%	103%
	1/240	100%	90%	114%	86%	95%	81%
	1/120	100%	109%	108%	104%	88%	93%
	1	100%	109%	95%	97%	110%	115%

<DEV Ag 표준물질 상온 안정성>

다. 시제품 제작

(1) 검증이 된 시험품 제작 조건을 이용하여, 규격설정, 공정규격검토, 양산성 검토, 생산라인을 이용한 제작 및 검증을 거쳐서 DEV Ag 시제품을 생산하였음.



- 구성품
 - 카트리지 10개
 - 희석액튜브 10개
 - Dropping cap 10개
 - Lot chip 1개
 - 사용설명서 1장

<DEV Ag 시제품 제작>

라. 시제품 성능검증

(1) 검출감도 확인

(가) 1×10^6 EID의 DEV 표준물질을 계단희석하여 생산라인을 거쳐서 제작된 시제품의 검출감도를 확인하고자 하였음. DEV Ag 제품은 9.78×10^2 까지 측정이 가능함. 본 농도를 최저검출농도 calibrator 인 calibrator2로 설정함.

DEV 장노막액 stock (EID 1×10^6)					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	79.94	66.42	74.44	73.60	9%
DEV 장노막액 stock (EID 2.5×10^5) - 1/4 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	105.91	115.82	119.12	113.61	6%
DEV 장노막액 stock (EID 6.25×10^4) - 1/8 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	122.86	129.30	121.44	124.53	3%
DEV 장노막액 stock (EID 1.56×10^4) - 1/32 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	101.63	93.14	70.61	88.46	18%
DEV 장노막액 stock (EID 3.91×10^3) - 1/128 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	23.31	32.28	19.84	25.14	26%
DEV 장노막액 stock (EID 9.78×10^2) - 1/512 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	1.67	1.85	2.37	1.96	24%
DEV 장노막액 stock (EID 2.45×10^2) - 1/2048 희석					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	1.11	0.50	0.77	0.79	26%
Negative					
측정횟수	1	2	3	Average	CV
Value (COI)	0.46	0.29	0.46	0.40	24%

<DEV Ag 시제품 검출감도 검토>

(2) 시제품 calibration

(가) 제작된 시제품을 이용하여 음성, 저농도, 중농도 calibrator를 이용하여 calibration 진행하였음. 음성과 저농도 calibrator를 이용하여 검출가능 한계를 1이라는 수치로 제시하여 바이러스가 많고/적음을 보여주는 수치인 COI값으로 변환하였음.

												Calibrator	
												1	-
												2	1X10 ^{^3}
												3	4X10 ^{^3}
ratio													
sample	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	AV	CV (%)	SD
Cal. 1	0.037	0.042	0.036	0.044	0.042	0.040	0.050	0.042	0.041	0.041	0.041	16%	0.007
	0.061	0.034	0.037	0.046	0.043	0.035	0.041	0.043	0.033	0.040			
	0.036	0.046	0.039	0.036	0.034	0.055	0.033	0.046	0.050	0.032			
Cal. 2	0.13	0.13	0.12	0.14	0.15	0.21	0.16	0.14	0.21	0.17	0.156	19%	0.030
Cal. 3	2.80	1.98	1.69	2.07	1.64	1.72	2.20	1.80	1.49	2.17	1.957	19%	0.380
COI													
sample	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	AV		
Cal. 1	0.33	0.37	0.32	0.39	0.37	0.36	0.45	0.38	0.36	0.36	0.37		
	0.54	0.30	0.33	0.41	0.39	0.31	0.37	0.39	0.30	0.36			
	0.33	0.41	0.34	0.32	0.31	0.49	0.29	0.41	0.44	0.29			
Cal. 2	1.20	1.16	1.08	1.25	1.34	1.83	1.39	1.28	1.88	1.51	1.39		
Cal. 3	24.97	17.69	15.03	18.47	14.65	15.31	19.62	16.05	13.31	19.38	17.45		

<DEV Ag 시제품 calibration>

(3) 분석적 민감도

(가) DEV Ag kit 시제품의 검출 가능 능력을 확인하기 위하여 분석적 민감도인 LoB, LoD를 측정하였음. CLSI EP17-A에 제시된 수식을 이용하여 LoB, LoD를 산출한다. DEV Ag kit 제품의 LoB는 0.548 COI이며, LoD는 0.875 COI로 산출되었음.

DEV LOB											
test number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Value(COI)	0.36	0.51	0.30	0.33	0.35	0.17	0.53	0.43	0.48	0.35	
test number	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Value(COI)	0.35	0.42	0.38	0.33	0.16	0.18	0.33	0.37	0.65	0.38	
test number	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Value(COI)	0.04	0.34	0.17	0.48	0.41	0.41	0.33	0.33	0.30	0.42	
test number	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
Value(COI)	0.36	0.04	0.38	0.39	0.05	0.47	0.44	0.03	0.41	0.44	
test number	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
Value(COI)	0.49	0.13	0.27	0.47	0.22	0.37	0.37	0.38	0.32	0.31	
test number	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
Value(COI)	0.29	0.35	0.56	0.25	0.30	0.28	0.42	0.22	0.36	0.32	
Average	0.34				SD			0.1272			
(n=60)					(n=60)						

LOB (ratio)	0.079
LOB (COI)	0.548

<DEV Ag 시제품의 LoB 측정>

Vet chroma DEV Ag 저농도 (Cal.2) 측정 결과												
측정횟수	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average	CV
Value (COI)	1.01	1.06	1.28	1.34	0.97	1.00	1.04	0.88	0.95	1.32	1.12	13%
측정횟수	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Average	CV
Value (COI)	1.09	1.15	1.11	0.96	1.28	1.11	1.08	1.31	1.71	1.38	1.12	3%
측정횟수	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	Average	CV
Value (COI)	1.11	0.93	0.92	0.95	0.93	0.92	1.53	1.29	1.15	1.13	0.99	11%
평균 (n=30)	1.130					표준편차 (n=30)	0.1986					

LOB (COI)	0.548
LOD (COI)	0.875

<DEV Ag kit 시제품의 LoD 측정>

(4) 분석적 특이도

(가) DEV Ag 제품의 교차반응을 평가하고자 하였음. DEV 이 감염된 오리에서 동시 감염될 확률이 높은 Salmonella, Pasteurella, Riemerella, E.Coli를 이용하여 교차반응 여부를 확인하였음.

Sample	-	DEV Ag	Samonella	pasteurella	Riemerella	E.coli
		1X10 ⁶ EID	1X10 ⁷ CFU	1X10 ⁷ CFU	1X10 ⁷ CFU	1X10 ⁷ CFU
ratio	0.04	5.86	0.04	0.05	0.05	0.04
T area	155	16982	136	319	269	181
C area	3773	2900	3082	6232	5181	4055
COI	0.48	68.46	0.52	0.60	0.61	0.52
Results		Pos	Neg	Neg	Neg	Neg

<DEV Ag 시제품의 교차반응 검증>

(5) 정확도 테스트

(가) 시약의 시험자간, 그리고 장소에 따른 DEV Ag 시약의 정확도 (정밀도)를 측정하였음. 본 테스트를 통하여 시험자간, 검사장소간 정확도 평가에서 동일한 성능을 보였음. 따라서 DEV Ag 시제품은 시험자간, 검사장소에 상관없이 100%의 음/양성 정확도를 가진다.

Person 1	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.12	0.35	0.47	0.2	0.47	0.32	0.16	49.2
2	1.29	1.33	1.43	1.55	1.51	1.42	0.11	7.9	
3	20.84	18	19.69	18.38	18.17	19.02	1.22	6.4	

Person 2	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.24	0.31	0.4	0.15	0.14	0.25	0.11	44.3
2	1.68	1.3	1.13	1.42	1.55	1.42	0.21	15.1	
3	18.69	16.12	15.33	15.3	15.75	16.24	1.41	8.7	

Person 3	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.43	0.24	0.18	0.36	0.12	0.27	0.13	48.0
2	1.18	1.3	1.6	1.4	1.49	1.39	0.16	11.7	
3	15.59	19.11	20.13	19.15	20.03	18.80	1.86	9.9	

Total (Between-person)	Calibrator	person1	person2	person3	AVG	SD	CV(%)
	1	0.32	0.25	0.27	0.28	0.04	13.8
2	1.42	1.42	1.39	1.41	0.01	1.0	
3	19.02	16.24	18.80	18.02	1.55	8.6	

<DEV Ag 시제품의 between-person 정확도>

Lab 1	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.41	0.45	0.21	0.12	0.24	0.29	0.14	48.7
	2	1.2	1.23	1.43	1.45	1.6	1.38	0.17	12.0
	3	14.75	20.71	15.15	15.66	20.44	17.34	2.97	17.1

Lab 2	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.14	0.37	0.12	0.27	0.23	0.23	0.10	45.0
	2	1.26	1.36	1.63	1.61	1.45	1.46	0.16	10.9
	3	15.81	19.68	17.93	15.16	15.55	16.83	1.92	11.4

Lab 3	Calibrator	#1	#2	#3	#4	#5	AVG	SD	CV(%)
	1	0.27	0.28	0.33	0.34	0.14	0.27	0.08	29.3
	2	1.12	1.47	1.36	1.65	1.57	1.43	0.21	14.4
	3	18.48	15.88	16.63	16.53	18	17.10	1.09	6.4

Total (Between-site)	Calibrator	Lab1	Lab2	Lab3	AVG	SD	CV(%)
	1	0.29	0.23	0.27	0.26	0.03	12.0
	2	1.38	1.46	1.43	1.43	0.04	2.8
	3	17.34	16.83	17.10	17.09	0.26	1.5

<DEV Ag 시제품의 between-site 정확도>

마. DEV Ag kit 성능 개선

(1) 시제품 제작 및 검증이후에 가능성이 낮긴하지만 혼입 및 교차반응 가능성이 있는 오리란의 AC fluid에 의하여 비특이 발생됨을 확인하였음. 본 비특이는 poly BSA 계열의 blocker를 이용하여 성능개선이 가능함을 확인하였음. 본 조건 최적화를 통하여 개선된 시제품 제작이 가능함.

오리혈청	ratio	T area	C area	sample	ratio	T area	C area
negative 1	0.06	245	4247	AC fluid 1	3.66	18836	5141
negative 2	0.04	161	4167	AC fluid 2	7.22	44212	6123
negative 3	0.03	118	3621	AC fluid 3	4.21	20042	4764
negative 4	0.05	282	5433	AC fluid 4	1.89	10242	5427
negative 5	0.05	210	4182	AC fluid 5	4.12	27057	6565
negative 6	0.05	209	3902	AC fluid 6	2.78	12319	4427
negative 7	0.04	199	4561	AC fluid 7	6.48	41933	6475
negative 8	0.05	255	5652	AC fluid 8	5.82	35383	6077
negative 9	0.05	202	4325	AC fluid 9	6.26	51485	8219
negative 10	0.06	342	5620	AC fluid 10	5.30	22736	4292
				PBS	0.03	127	4334

<오리 혈청 및 AC fluid 비특이 확인>

	PBS	AC fluid 2	AC fluid 7	AC fluid 9	sample	blocker	ratio	AV T area	C area	ratio	recovery T area	C area
-	0.03	7.44	7.17	7.17	-	-	2.22	10767	5081	100%	100%	100%
NaCl 150mM	0.05	9.44	8.39	8.13	AC fluid 6	Poly BSA	0.86	3413	3893	39%	32%	77%
NaCl 300mM	0.08	8.02	6.64	8.76		Anti-A	2.67	15935	5933	120%	148%	117%
ratio	0.15	5.81	4.61	7.21	DEV_purify	-	7.63	42728	5600	100%	100%	100%
3% goat serum	0.12	7.58	6.66	8.02		Poly BSA	5.33	22621	4245	70%	53%	76%
0.5mg/ml mouse IgG	0.03	7.91	6.97	7.61		Anti-A	6.04	35981	5907	79%	84%	105%
poly BSA 1%	0.08	2.74	2.91	4.13	DHAV-1_purify	-	0.25	1392	5697	100%	100%	100%
						Poly BSA	0.42	1666	3944	172%	120%	69%
						Anti-A	0.24	1039	4474	95%	75%	79%
					DHAV-3_purify	-	0.35	1614	4654	100%	100%	100%
						Poly BSA	0.42	2421	5804	118%	150%	125%
						Anti-A	0.18	1042	5692	52%	65%	122%

<제품 개선을 위한 blocker 조성 최적화>

8. 항체검사용 자동화 카트리지 소프트웨어 및 플랫폼 구축

가. 항체검사용 자동화기기 소프트웨어 구축

(1) 오리감염검사용 소프트웨어 플로우 차트 설계

(가) 수동검사시스템에서 나타날 수 있는 재현성, 정확도 문제를 극복하기 위하여 주관기관이 보유하고 있는 AFIAS라는 qLFIA 시스템을 이용하여 동물질병의 검사에 최적화된 진단시스템 구축을 진행하였음. 이를 위하여 동물용 신규 소프트웨어 개발을 위한 플로우 차트 구축을

진행하였음.

(나) 간편화를 위주로 한 자동화기기 소프트웨어 개발을 진행하여 자동화 면역진단기기의 특징을 최대화 한 개발을 진행하였음. 이를 구현하기 위하여 다음의 내용을 기반으로 소프트웨어 개발을 진행하였음.

- ① 동물용 기기에 맞추어 user interference 최소화 진행
- ② 동물용 카트리지 측정을 위한 구동 시나리오 수정 및 최적화 작업 진행
- ③ 온라인 플랫폼 구축을 위한 네트워크 통신 기능 구현



<software 플로우차트 및 화면 구성>

나. 동물진단용 온라인 플랫폼

(1) 가금류 질병 모니터링을 위하여 본 과제를 통하여 온라인 플랫폼을 구축하고자 하였으며, 이를 구현하기 위하여 기기 직접 측정 또는 웹페이지 또는 모바일 장치에서 내려진 테스트 요청에 대하여 기기에서 테스트를 진행하고 측정 결과를 서버로 전송하는 시스템을 구현하였음.

(2) 측정된 결과는 사용자가 웹페이지 또는 모바일 장치에 쉽게 확인이 가능하며, 검색이 가능하도록 인터넷 기반의 서비스를 구현하였음.



9. DHAV-1 항체검사용 ELISA 개발 및 최적화

가. DHAV-1 ELISA 반응 최적화

(1) 본 과제를 통하여 도출된 DHAV-1-VP1 재조합 단백질과, 전북대로부터 제공 받은 native DHAV1 항원을 이용하여 ELISA 조건 최적화 진행하였음. 본 과제를 통하여 오리 ELISA 원료물질 선정, capture 농도 최적화, detector 농도 최적화, 검체 희석비 최적화, 버퍼 최적화 과정을 통하여 DHAV-1 Ab ELISA 조건을 최적화 하였음.

나. DHAV-1 ELISA 시험품이용 실검체 검증

(1) 최적화된 DHAV-1 Ab ELISA를 시험품 단계에서 실검체 성능검증 진행하였음. 협동기관인 전북대로부터 받은 10개의 음성, 10개의 양성 검체를 이용하여 검증 진행하였음.

cap.	DHAV1 native Ag (요막강액 정제) 1ug/ml										
det.	A-duck IgG (KPL) 100ng/ml										
sample	- serum										Blank
	neg 1	neg 2	neg 3	neg 4	neg 5	neg 6	neg 7	neg 8	neg 9	neg 10	PBST
1/100	0.65	0.50	0.39	0.34	0.34	1.02	0.73	0.40	0.51	0.57	0.05
1/200	0.24	0.19	0.17	0.15	0.14	0.39	0.31	0.19	0.19	0.21	
1/400	0.14	0.11	0.14	0.08	0.09	0.26	0.19	0.12	0.11	0.14	
1/800	0.12	0.09	0.13	0.07	0.07	0.22	0.12	0.08	0.08	0.13	
1/1600	0.08	0.07	0.06	0.06	0.06	0.10	0.09	0.07	0.07	0.09	
1/3200	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	
1/6400	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	
	+ serum										
	DHAV1 pos1	DHAV1 pos2	DHAV1 pos3	DHAV1 pos4	DHAV1 pos5	DHAV1 pos6	DHAV1 pos7	DHAV1 pos8	DHAV1 pos9	DHAV1 pos10	
1/100	2.93	2.53	2.32	2.26	2.35	2.53	2.78	2.47	2.73	2.67	
1/200	1.70	1.24	1.21	1.20	1.31	1.46	1.61	1.35	1.63	1.58	
1/400	1.04	0.86	0.78	0.72	0.84	0.83	0.90	0.83	0.96	0.95	
1/800	0.74	0.52	0.46	0.46	0.54	0.67	0.66	0.56	0.66	0.71	
1/1600	0.43	0.34	0.29	0.27	0.32	0.37	0.35	0.31	0.33	0.39	
1/3200	0.27	0.19	0.16	0.16	0.22	0.24	0.24	0.20	0.23	0.26	
1/6400	0.11	0.08	0.08	0.08	0.10	0.10	0.10	0.09	0.09	0.10	

<DHAV1 Ab ELISA 신규 검체 반응성 테스트, OD value>

P/N ratio (neg 4 기준)										
	DHAV1 pos1	DHAV1 pos2	DHAV1 pos3	DHAV1 pos4	DHAV1 pos5	DHAV1 pos6	DHAV1 pos7	DHAV1 pos8	DHAV1 pos9	DHAV1 pos10
1/100	8.5	7.3	6.7	6.6	6.8	7.3	8.1	7.2	7.9	7.7
1/200	11.3	8.3	8.1	8.0	8.7	9.7	10.7	9.0	10.8	10.5
1/400	13.0	10.8	9.8	9.0	10.5	10.4	11.3	10.4	12.0	11.9
1/800	10.9	7.6	6.8	6.8	8.0	9.9	9.8	8.2	9.7	10.4
1/1600	7.2	5.7	4.8	4.5	5.3	6.2	5.8	5.2	5.5	6.5
1/3200	5.0	3.4	3.0	2.9	4.1	4.3	4.4	3.7	4.1	4.7
1/6400	2.2	1.6	1.5	1.5	1.9	1.9	2.0	1.7	1.8	2.0

<DHAV1 Ab ELISA 신규 검체 반응성 테스트, P/N ratio>

10. DHAV-3 항체검사용 ELISA 개발 및 최적화

가. DHAV-3 ELISA 반응 최적화

(1) 본 과제를 통하여 도출된 DHAV-3-VP1 재조합 단백질과, 전북대로부터 제공 받은 native DHAV-3 항원을 이용하여 ELISA 조건 최적화 진행하였음. 본 과제를 통하여 오리 ELISA 원료물질 선정, capture 농도 최적화, detector 농도 최적화, 검체 희석비 최적화, 버퍼 최적화 과정을 통하여 DHAV-3 Ab ELISA 조건을 최적화 하였음.

나. DHAV-3 ELISA 시험품이용 실검체 검증

(1) 최적화된 DHAV-3 Ab ELISA를 시험품 단계에서 실검체 성능검증 진행하였음. 협동기관

인 전북대로부터 받은 10개의 음성, 10개의 양성 검체를 이용하여 검증 진행하였음.

cap.	DHAV3 native Ag (요막강액 정제) 1ug/ml										
det.	A-duck IgG (KPL) 100ng/ml										
sample	- serum										Blank
	neg 1	neg 2	neg 3	neg 4	neg 5	neg 6	neg 7	neg 8	neg 9	neg 10	PBST
1/100	0.85	0.68	0.83	0.42	0.45	1.02	0.98	0.54	0.50	0.63	0.05
1/200	0.33	0.24	0.19	0.16	0.17	0.40	0.40	0.21	0.21	0.25	
1/400	0.13	0.11	0.09	0.08	0.08	0.15	0.16	0.09	0.10	0.10	
1/800	0.08	0.07	0.06	0.07	0.06	0.08	0.08	0.06	0.06	0.08	
1/1600	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.06	
1/3200	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
1/6400	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
	+ serum										
	DHAV3 pos1	DHAV3 pos2	DHAV3 pos3	DHAV3 pos4	DHAV3 pos5	DHAV3 pos6	DHAV3 pos7	DHAV3 pos8	DHAV3 pos9	DHAV3 pos10	
1/100	2.48	1.57	1.04	2.30	2.45	2.36	3.06	2.77	2.84	2.98	
1/200	1.24	0.60	0.82	0.99	1.14	1.03	1.72	1.40	1.52	1.53	
1/400	0.67	0.36	0.52	0.54	0.68	0.57	0.94	0.71	0.82	0.85	
1/800	0.45	0.22	0.31	0.36	0.41	0.35	0.67	0.48	0.55	0.53	
1/1600	0.16	0.10	0.13	0.13	0.15	0.13	0.23	0.17	0.19	0.18	
1/3200	0.08	0.06	0.07	0.07	0.08	0.07	0.10	0.08	0.09	0.08	
1/6400	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	

cap.	DHAV3 recomb Ag (soluble) 0.5ug/ml										
det.	A-duck IgG (KPL) 100ng/ml										
sample	- serum										Blank
	neg 1	neg 2	neg 3	neg 4	neg 5	neg 6	neg 7	neg 8	neg 9	neg 10	PBST
1/100	0.98	0.74	0.83	0.47	0.56	1.21	1.14	0.49	0.68	0.80	0.05
1/200	0.36	0.28	0.22	0.18	0.19	0.44	0.48	0.18	0.25	0.29	
1/400	0.14	0.11	0.09	0.07	0.08	0.16	0.18	0.09	0.10	0.11	
1/800	0.07	0.06	0.06	0.05	0.05	0.08	0.09	0.05	0.05	0.06	
1/1600	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	
1/3200	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	
1/6400	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
	+ serum										
	DHAV3 pos1	DHAV3 pos2	DHAV3 pos3	DHAV3 pos4	DHAV3 pos5	DHAV3 pos6	DHAV3 pos7	DHAV3 pos8	DHAV3 pos9	DHAV3 pos10	
1/100	2.50	1.56	0.95	2.22	2.48	2.34	3.11	2.76	2.86	2.98	
1/200	1.20	0.61	0.91	1.03	1.11	0.98	1.82	1.31	1.48	1.54	
1/400	0.62	0.43	0.55	0.59	0.62	0.57	0.95	0.74	0.78	0.83	
1/800	0.43	0.22	0.31	0.36	0.41	0.35	0.68	0.46	0.54	0.58	
1/1600	0.15	0.10	0.12	0.13	0.14	0.12	0.23	0.15	0.18	0.17	
1/3200	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.09	0.07	0.08	0.08	
1/6400	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	

<DHAV3 Ab ELISA 신규 검체 반응성 테스트, OD value>

P/N ratio (neg 4 기준)											
	DHAV3 pos1	DHAV3 pos2	DHAV3 pos3	DHAV3 pos4	DHAV3 pos5	DHAV3 pos6	DHAV3 pos7	DHAV3 pos8	DHAV3 pos9	DHAV3 pos10	
1/100	5.9	3.8	2.5	5.5	5.9	5.6	7.3	6.6	6.8	7.1	
1/200	7.6	3.7	5.0	6.1	7.0	6.3	10.6	8.6	9.4	9.4	
1/400	8.3	4.4	6.4	6.7	8.4	7.0	11.6	8.7	10.1	10.5	
1/800	6.4	3.2	4.4	5.1	5.8	5.0	9.6	6.8	7.9	7.6	
1/1600	3.0	1.8	2.5	2.4	2.7	2.5	4.2	3.1	3.5	3.3	
1/3200	1.6	1.3	1.4	1.4	1.5	1.4	2.1	1.6	1.8	1.6	
1/6400	1.1	1.1	1.0	1.0	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	

P/N ratio (neg 4 기준)											
	DHAV3 pos1	DHAV3 pos2	DHAV3 pos3	DHAV3 pos4	DHAV3 pos5	DHAV3 pos6	DHAV3 pos7	DHAV3 pos8	DHAV3 pos9	DHAV3 pos10	
1/100	5.3	3.3	2.0	4.7	5.2	4.9	6.6	5.8	6.0	6.3	
1/200	6.7	3.4	5.1	5.8	6.3	5.5	10.3	7.4	8.3	8.6	
1/400	8.9	6.1	7.9	8.4	8.9	8.1	13.6	10.6	11.1	11.9	
1/800	8.0	4.2	5.9	6.7	7.6	6.5	12.7	8.6	10.1	10.8	
1/1600	3.3	2.1	2.5	2.7	3.0	2.6	5.0	3.4	4.0	3.7	
1/3200	1.6	1.3	1.4	1.4	1.5	1.5	2.0	1.6	1.8	1.7	
1/6400	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	

<DHAV3 Ab ELISA 신규 검체 반응성 테스트, P/N ratio>

11. DEV 항체검사용 ELISA 개발 및 최적화

가. DEV ELISA 반응 최적화

(1) 본 과제를 통하여 도출된 DEV-UL51 재조합 단백질과, 전북대로부터 제공 받은 native DEV 항원을 이용하여 ELISA 조건 최적화 진행하였음. 본 과제를 통하여 오리 ELISA 원료물질 선정, capture 농도 최적화, detector 농도 최적화, 검체 희석비 최적화, 버퍼 최적화 과정을 통하여 DEV Ab ELISA 조건을 최적화 하였음.

나. DEV ELISA 시험품이용 실검체 검증

(1) 최적화된 DEV Ab ELISA를 시험품 단계에서 실검체 성능검증 진행하였음. 협동기관인 전북대로부터 받은 10개의 음성, 10개의 양성 검체를 이용하여 검증 진행하였음.

DEV native Ag (장노박막 증제) 1ug/ml											
A-duck IgG (KPL) 100ng/ml											
cap. det.	- serum										Blank PBST
sample	neg 1	neg 2	neg 3	neg 4	neg 5	neg 6	neg 7	neg 8	neg 9	neg 10	
1/100	0.80	0.62	0.45	0.37	0.42	1.16	0.98	0.47	0.56	0.64	0.05
1/200	0.28	0.21	0.15	0.13	0.15	0.37	0.33	0.17	0.21	0.23	
1/400	0.15	0.12	0.10	0.09	0.09	0.17	0.16	0.11	0.13	0.11	
1/800	0.10	0.09	0.07	0.07	0.08	0.13	0.15	0.08	0.09	0.10	
1/1600	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	
1/3200	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
1/6400	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
+ serum											
DEV pos1	DEV pos2	DEV pos3	DEV pos4	DEV pos5	DEV pos6	DEV pos7	DEV pos8	DEV pos9	DEV pos10		
1/100	3.05	3.24	3.10	3.32	3.55	3.12	2.88	3.41	3.26	2.89	
1/200	1.77	2.14	1.93	2.38	3.10	1.70	1.43	2.58	2.22	1.45	
1/400	1.16	1.37	1.24	1.87	2.74	1.13	1.09	1.47	1.33	1.08	
1/800	0.65	0.81	0.67	0.91	1.72	0.59	0.48	1.21	0.86	0.47	
1/1600	0.41	0.53	0.56	0.75	1.28	0.46	0.29	0.97	0.69	0.33	
1/3200	0.20	0.25	0.22	0.30	0.61	0.18	0.17	0.39	0.28	0.16	
1/6400	0.09	0.10	0.09	0.11	0.20	0.08	0.10	0.14	0.10	0.07	

DEV recomb Ag (soluble) 0.5ug/ml											
A-duck IgG (KPL) 100ng/ml											
cap. det.	- serum										Blank PBST
sample	neg 1	neg 2	neg 3	neg 4	neg 5	neg 6	neg 7	neg 8	neg 9	neg 10	
1/100	0.76	0.66	0.47	0.40	0.45	1.26	1.04	0.50	0.62	0.71	0.06
1/200	0.30	0.23	0.16	0.16	0.15	0.42	0.38	0.17	0.22	0.26	
1/400	0.10	0.09	0.07	0.07	0.08	0.14	0.15	0.08	0.09	0.11	
1/800	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	
1/1600	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
1/3200	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
1/6400	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
+ serum											
DEV pos1	DEV pos2	DEV pos3	DEV pos4	DEV pos5	DEV pos6	DEV pos7	DEV pos8	DEV pos9	DEV pos10		
1/100	3.15	3.43	2.96	3.43	3.67	3.18	2.93	3.51	3.32	2.96	
1/200	1.80	2.25	1.95	2.42	3.17	1.78	1.46	2.65	2.30	1.51	
1/400	1.21	1.53	1.29	1.67	2.38	1.09	0.92	1.74	1.52	1.16	
1/800	0.63	0.85	0.69	0.93	1.80	0.58	0.47	1.24	0.88	0.48	
1/1600	0.20	0.27	0.22	0.30	0.64	0.19	0.16	0.41	0.28	0.16	
1/3200	0.11	0.13	0.12	0.16	0.42	0.13	0.11	0.22	0.15	0.10	
1/6400	0.09	0.10	0.09	0.12	0.22	0.09	0.10	0.15	0.11	0.08	

<DEV Ab ELISA 검체 반응성 테스트, OD value>

Native Ag P/N ratio (neg 4 기준)										
	DEV pos1	DEV pos2	DEV pos3	DEV pos4	DEV pos5	DEV pos6	DEV pos7	DEV pos8	DEV pos9	DEV pos10
1/100	8.2	8.7	8.3	8.9	9.6	8.4	7.7	9.2	8.8	7.8
1/200	13.7	16.6	15.0	18.5	24.1	13.2	11.1	20.1	17.3	11.2
1/400	12.9	15.2	13.8	20.8	30.4	12.6	12.1	16.3	14.8	12.0
1/800	9.0	11.3	9.3	12.6	23.9	8.2	6.6	16.7	11.9	6.5
1/1600	8.0	10.3	10.9	14.6	25.0	9.0	5.7	18.9	13.5	6.4
1/3200	4.2	5.3	4.7	6.3	12.8	3.8	3.6	8.2	5.8	3.4
1/6400	1.9	2.1	1.9	2.4	4.4	1.8	2.2	3.0	2.3	1.6

Recombinant P/N ratio (neg 4 기준)										
	DEV pos1	DEV pos2	DEV pos3	DEV pos4	DEV pos5	DEV pos6	DEV pos7	DEV pos8	DEV pos9	DEV pos10
1/100	7.9	8.6	7.4	8.6	9.2	8.0	7.3	8.8	8.3	7.4
1/200	11.0	13.6	11.9	14.7	19.2	10.8	8.9	16.1	14.0	9.1
1/400	18.2	23.0	19.4	25.1	35.7	16.4	13.8	26.1	22.8	17.4
1/800	12.2	16.4	13.3	17.9	34.7	11.2	9.0	23.9	17.0	9.2
1/1600	4.3	5.6	4.6	6.3	13.3	3.9	3.4	8.6	5.9	3.4
1/3200	2.4	2.8	2.6	3.5	9.1	2.8	2.4	4.8	3.2	2.2
1/6400	1.9	2.2	1.9	2.5	4.8	1.9	2.2	3.2	2.3	1.6

<DEV Ab ELISA 검체 반응성 테스트, P/N ratio>

다. 시제품 제작

(1) 검증이 된 시험품 제작 조건을 이용하여, 규격설정, 공정규격검토, 양산성 검토, 생산라인을 이용한 제작 및 검증을 거쳐서 DEV IgG ELISA 시제품을 생산하였음.



- 구성품
 - Microplate 1개
 - Positive control 1개
 - Negative control 1개
 - Wash solution (10X) 2개
 - Tracer antibody 1개
 - Enzyme conjugate 1개
 - TMB substrate 1개
 - Stop solution 1개
 - Plate cover seal 1장
 - 사용설명서 1장

<DEV IgG ELISA 시제품 제작>

라. 시제품 성능검증

(1) Cut-off 설정

(가) 음/양성 control 물질과 음성 실험체 의 결과를 이용하여 본제품의 cut-off는 음성검체의 +3SD인 S/P ratio 0.42로 설정하였음.

① S/P ratio = (검체의 OD value - Negative control OD value)/(Positive control OD - Negative control OD value)

Negative, Positive control (OD Value)

cap.	DEPKA01VA.1 microplate			
det.	A-duck IgG (KPL) 50ng/ml			
sample	negative control, positive control			
	#1	#2	#3	평균(AV)
negative cont.	0.05	0.05	0.06	0.06
positive cont.	1.09	1.11	1.21	1.14

<음성/양성 control>

Duck serum panel

Negative serum (OD value)

cap.	DEPKA01VA.1 microplate; DEV native Ag (장노락역 정제) 1ug/ml					
det.	A-duck IgG (KPL) 50ng/ml					
sample	Duck serum 1/400 희석					
negative serum	neg 1	neg 2	neg 3	neg 4	neg 5	neg 6
	0.10	0.07	0.07	0.07	0.07	0.10
	neg 7	neg 8	neg 9	neg 10	Rockland	mybiosource
	0.08	0.08	0.08	0.08	0.45	0.35

Duck serum panel

Negative serum (S/P ratio)

cap.	DEPKA01VA.1 microplate; DEV native Ag (장노락역 정제) 1ug/ml					
det.	A-duck IgG (KPL) 50ng/ml					
sample	Duck serum 1/400 희석					
negative serum	neg 1	neg 2	neg 3	neg 4	neg 5	neg 6
	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01	0.04
	neg 7	neg 8	neg 9	neg 10	Rockland	mybiosource
	0.02	0.02	0.02	0.02	0.36	0.27

<음성 검체 12개의 OD value>

(2) 분석적 민감도 (LoB)

(가) DEV IgG ELISA 시제품의 검출 가능 능력을 확인하기 위하여 분석적 민감도인 LoB를 측정하였음. CLSI EP17-A에 제시된 수식을 이용하여 LoB 산출한다. DEV IgG ELISA 제품의 LoB는 0.02 S/P ratio로 산출되었음.

LOB (Limit of blank)

cap.	DEPKA01VA.1 microplate ; DEV native Ag (장노막액 정제) 1ug/ml											
det.	A-duck IgG (KPL) 50ng/ml											
sample	PBST (0.1% Tween20 in 1 x PBS)											
#1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
#2	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
#3	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01
#4	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01
#5	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.00
	평균(AV)			0.01	표준편차(SD)			0.005	LOB			0.02

<DEV IgG ELISA의 LoB 검증>

(3) 재현성

(가) DEV IgG ELISA 제품의 재현성을 검증하고자 저/중/고 농도의 표준물질에서의 S/P ratio 산출 및 CV를 확인하였음. 본 시제품의 재현성은 8% 이내로 확인되었음.

DEV IgG positive serum ; 저중고 농도

cap.	DEPKA01VA.1 microplate ; DEV native Ag (장노막액 정제) 1ug/ml											
det.	A-duck IgG (KPL) 50ng/ml											
sample	DEV IgG positive serum 저중고 1/400 희석											
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	평균(AV)	CV %
저 (DEV pos 7)	0.48	0.43	0.43	0.40	0.43	0.47	0.42	0.45	0.43	0.44	0.44	5.4
중 (DEV pos 4)	0.73	0.73	0.68	0.66	0.68	0.72	0.79	0.74	0.80	0.80	0.73	7.1
고 (DEV pos 5)	0.93	0.79	0.77	0.74	0.75	0.76	0.74	0.83	0.77	0.75	0.78	7.3

<DEV IgG ELISA 제품의 재현성 검증>

(4) DEV seroconversion panel 검증

(가) 현재 설정한 cut-off 검증 및 실검체에서의 반응성을 검토하고자 본테스트를 실시하였음. vaccination 후 2주령, 4주령, 6주령의 오리 혈청을 이용하여 테스트 진행하였으며, 2주령부터 현재 설정한 Cut-off의 양성을 보임.본사의 ELISA와 VN titer 결과는 비슷한 양상을 보임.

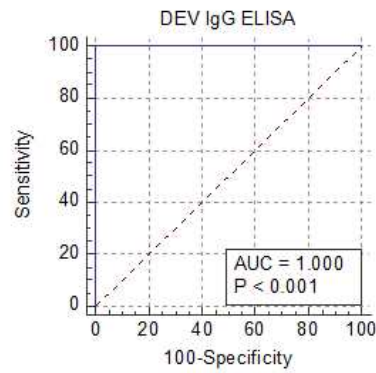
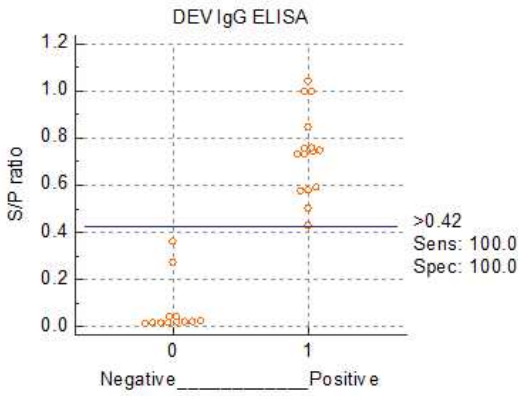
Duck seroconversion serum (S/P ratio)

cap.	DEPKA01VA.1 microplate ; DEV native Ag (장노막액 정제) 1ug/ml														
det.	A-duck IgG (KPL) 50ng/ml														
sample	Duck serum 1/400 희석														
	2 WPV			평균(AV)	VN title	4 WPV			평균(AV)	VN title	6 WPV			평균(AV)	VN title
DEV	#1	#2	#3			#1	#2	#3			#1	#2	#3		
Duck 1	0.67	0.65	0.65	0.66	5	1.67	1.69	1.69	1.69	7	2.02	1.97	1.98	1.99	9
Duck 2	0.44	0.45	0.45	0.45	5	1.67	1.66	1.65	1.66	9	1.81	1.82	1.84	1.83	9
Duck 3	0.97	0.93	0.91	0.94	0	1.59	1.62	1.60	1.60	7	1.69	1.67	1.69	1.68	7
Duck 4	0.57	0.56	0.57	0.56	5	1.67	1.69	1.66	1.67	10	1.86	1.89	1.95	1.90	10
Duck 5	0.61	0.56	0.55	0.57	5	1.45	1.46	1.41	1.44	10	1.64	1.63	1.50	1.59	10
Duck 6	0.40	0.39	0.38	0.39	6	1.43	1.44	1.37	1.42	9	1.49	1.42	1.38	1.43	9
Duck 7	0.51	0.51	0.50	0.51	6	1.60	1.62	1.56	1.60	9	1.67	1.61	1.66	1.65	9
Duck 8	0.44	0.46	0.44	0.45	5	1.54	1.50	1.52	1.52	9	1.83	1.81	1.78	1.81	9

<DEV ELISA 시제품을 이용한 seroconversion panel test>

(5) DEV 실검체 검증

(가) 27개의 DEV감염 오리 실검체를 이용하여 임상적 민감도/특이도 검증. 본 검체를 이용한 테스트에서 민감도 100%, 특이도 100% 도출됨.



<DEV IgG ELISA 임상적 민감도/특이도>

12. Riemerella 항체검사용 ELISA 개발 및 최적화

가. Riemerella IgG ELISA 반응 최적화

(1) 전북대로부터 제공 받은 native Riemerella 항원을 이용하여 ELISA 조건 최적화 진행하였음. 본 과제를 통하여 오리 ELISA 원료물질 선정, capture 농도 최적화, detector 농도 최적화, 검체 희석비 최적화, 버퍼 최적화 과정을 통하여 Riemerella Ab ELISA 조건을 최적화 하였음.

나. DEV ELISA 시험품이용 실검체 검증

(1) 최적화된 DEV Ab ELISA를 시험품 단계에서 실검체 성능검증 진행하였음. 협동기관인 전북대로부터 받은 2개의 음성, 6개의 양성 검체를 이용하여 검증 진행하였음.

det.	A-duck IgG (KPL) 50ng/ml					P/N ratio			
cap.	MAT RA Type 1 Ag (boiling)					2ug/ml			
cap conc.	2ug/ml					2ug/ml			
	Neg 4	Neg RA	C-1	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	
1/100	0.29	0.19	0.65	0.78	1.24	3.4	4.1	6.5	
1/200	0.20	0.14	0.49	0.57	0.94	3.6	4.2	7.0	
1/400	0.15	0.10	0.39	0.42	0.70	3.7	4.1	6.8	
1/800	0.11	0.09	0.32	0.32	0.50	3.5	3.5	5.5	
1/1600	0.10	0.08	0.22	0.28	0.37	2.7	3.5	4.7	
1/3200	0.09	0.08	0.17	0.18	0.25	2.3	2.3	3.3	
1/6400	0.07	0.08	0.13	0.14	0.21	1.6	1.7	2.5	
PBST	0.08								

<Riemerella Ab ELISA Type 1검체 반응성 테스트, OD value and P/N ratio>

det.	A-duck IgG (KPL) 50ng/ml					P/N ratio			
cap.	MAT RA Type 7 Ag (boiling)					2ug/ml			
cap conc.	2ug/ml					2ug/ml			
	Neg 4	Neg RA	C-1	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	
1/100	0.29	0.22	0.73	0.85	1.45	3.3	3.9	6.7	
1/200	0.18	0.13	0.51	0.60	0.99	3.9	4.5	7.4	
1/400	0.14	0.10	0.38	0.43	0.69	3.9	4.4	7.2	
1/800	0.11	0.09	0.28	0.29	0.50	3.2	3.3	5.7	
1/1600	0.12	0.07	0.20	0.26	0.37	3.1	4.0	5.6	
1/3200	0.13	0.06	0.16	0.19	0.26	2.6	3.1	4.2	
1/6400	0.13	0.06	0.12	0.13	0.19	2.1	2.2	3.2	
PBST	0.10								

<Riemerella Ab ELISA Type 7검체 반응성 테스트, OD value and P/N ratio>

제2절 오리질병 진단기술 적용법 확립 및 모니터링 기술 구축

1. 오리 3종 질병 항원, 항체검사를 위한 생물학적 원료 개발

가. 3종 병원체 항원 library 구축 및 특성 규명

(1) 오리간염 바이러스의 항원 분리동정

(가) 시료채취 및 종란접종

4주령이하의 어린오리에서 오리간염으로 의심되는 오리의 간을 채취하여, Anti-PBS를 이용하여 20% 유제를 실시하였다. 3000rpm에 10분간 1차 원심분리 후 상층액을 취하고, 다시 13,000rpm에 10분간 2차 원심분리하여 상층액을 확보하였다. 상층액을 9일령 SPF chicken egg의 요막강(allantoic cavity)내에 0.2ml씩 접종하였다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 개체는 폐기하고, 3-5일간 배양 후 AC액을 수확하였다.

(나) 검출방법

RNA추출은 Viral Gene-spin RNA extraction kit[Intron]를 이용하고, 추출한 RNA로 real-time RT-PCR을 실시하여 오리간염 바이러스를 검출하였다. 양성으로 확인된 시료는 -70°C에 보관하였다.

(2) 오리간염 바이러스의 항원배양

(가) 접종방법

배양할 바이러스의 역가에 따라 단계희석 후, 9일령 SPF chicken egg의 요막강 내에 0.2ml씩 접종하였다. 접종 후 24시간 이내의 폐사는 폐기하고, 3-5일간 배양하였다. 1일 3회 검란을 실시하여 폐사개체를 4°C에 chilling한 후 AC액을 수확하였다.

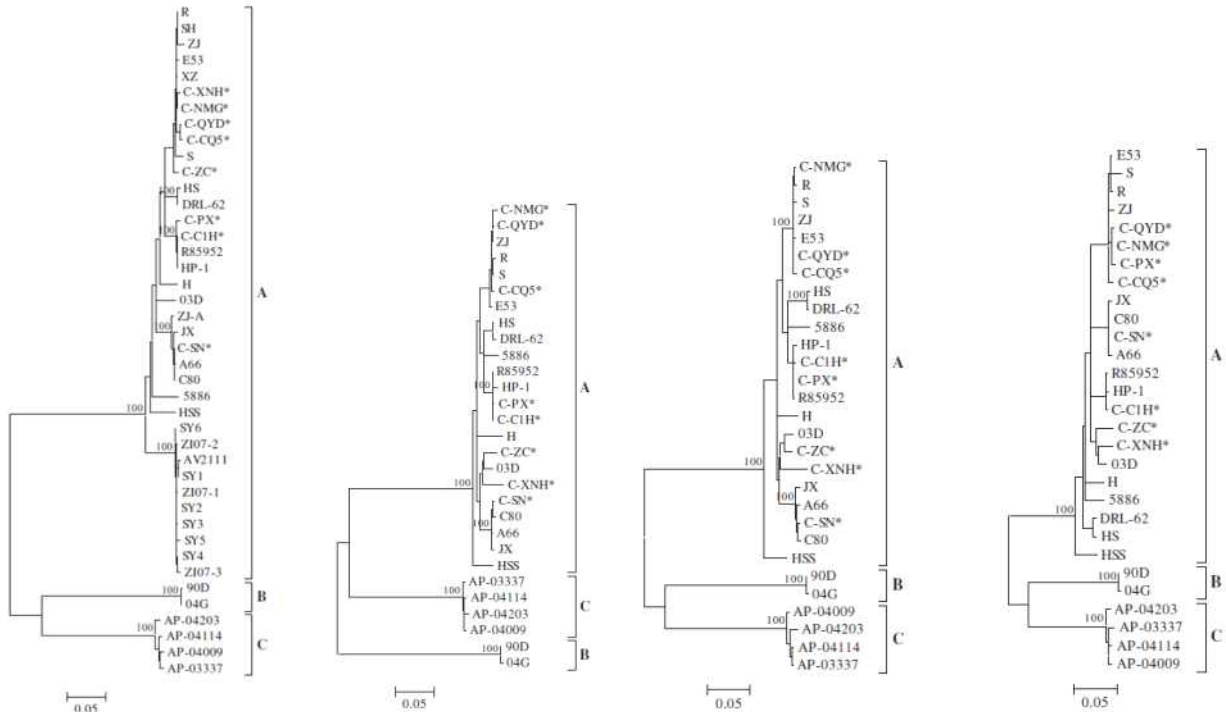
(나) 역가측정

AC액을 13,000rpm에서 10분 동안 원심분리한 후, 상층액을 10진 희석하였다. 희석단계별로 종란 5개씩 0.2ml를 접종하고 5일간 배양하였다. 1일 2회 검란을 실시하여 폐사개체의 수를 확인하고, 계태아를 취하여 태아위축, 전신수종 및 출혈, 간괴사 등의 병변을 확인하였다. 5일간의 희석 단계별 폐사수를 합하여, Karber's methods 계산법으로 ELD역가를 산정하였다.

(3) 오리간염 1형과 3형 병원체 유전자 특성분석

(가) phylogenetic tree분석 [Virus Genes, China, 2008]

오리간염 병원체의 유전자정보는 ATCC, 국내분리주, 국외분리주를 포함하여 42개 유전자정보를 이용하였으며, 여기에는 1형, 3형의 대표주로 선정된 DRL-62와 AP-04203도 함께 분석하였다. VP1, VP0, VP3, 3D gene으로 오리간염 1, 2, 3형 사이의 유전자서열 연관성을 phylogenetic tree로 분석하였다.



[VP0영역 분석결과] [VP3영역 분석결과] [VP1영역 분석결과] [3D영역 분석결과]

phylogenetic tree의 A는 오리간염 1형, B는 오리간염 2형, C는 오리간염 3형의 병원체들로 구분되었다. VP1, VP0, VP3, 3D gene의 네 개 유전자영역으로 genotyping이 가능한 결과를 확인하여, 동형간의 유사성과 이형간의 차이가 큰 특성을 확인하였다. 오리간염 1형과 3형의 대표항원으로 선정한 1형 DRL-62와 3형 AP-04203 역시 동형간 유사성과 이형간의 차이를 확인하여 대표주로서 적절성을 판단하였다.

(나) 상동성 분석 [Virus Genes, China, 2008]

오리간염 병원체의 유전자정보는 ATCC, 국내분리주, 국외분리주를 포함하여 42개 유전자정보를 이용하였으며, 여기에는 1형, 3형의 대표주로 선정한 DRL-62와 AP-04203도 함께 분석하였다.

Comparison	VP1		VP0		VP3		3D	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
Within genotype A	90-100	92-100	94-99	96-100	92-100	95-100	91-100	96-100
Within genotype B	99	99	99	99	99	99	99	100
Within genotype C	97-99	99	98-99	99-100	98-99	99-100	98-99	100
Between genotypes A and B	66-68	69-71	67-68	75-77	69-71	77-78	78-80	88-90
Between genotypes A and C	67-71	74-77	71-72	78-80	70-72	78-80	78-81	89-92
Between genotypes B and C	71-72	77-78	69-70	76	73-74	82-83	81-82	95

오리간염 유전자들간의 3D영역 및 구조단백질 영역의 nucleotide 및 amino acid의 상동성을 분석한 결과, 구조단백질인 VP1, VP0, VP3영역에서 다른 혈청형(유전자형)간에 높은 차이를 확인하였다.

나. 3종 병원체의 유전자 검사법 및 생물학적 검사법 확립

(1) 오리간염 진단법

(가) 오리간염 항원진단 : 일반 PCR 진단법 확립

① 장기유제

바이러스 검출 주요장기인 간(비장, 신장)을 채취하여 anti-PBS로 20% 유제를 실시하였다. 3000rpm에 10분간 1차 원심분리 후 상층액을 취하고, 다시 13,000rpm에 10분간 2차 원심분리 하여 상층액을 확보하였다.

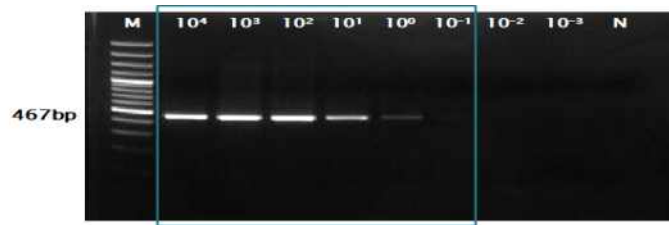
② RNA추출 및 RT

RNA는 Viral Gene-spin RNA extraction kit[Intron]에 의해 추출하고, RT를 실시하였다. 샘플 별로 RNA 10ul씩 분주 후, 각각에 Random primer를 1ul씩 첨가하고 70℃에 5분간 반응시켰다. 반응종료 후 Ice에 5분간 정지하였다. Master mix를 제조하고, 각각 9ul씩 첨가 후 25℃에 5분, 42℃에 1시간 반응시켰다. 70℃에 15분 반응시켜 RTase를 불활화시킨 후, 최종산물인 cDNA를 확보하여 PCR진단에 사용하였다.

③ 오리간염은 RNA 바이러스로서 RT-PCR을 실시하며, 1형과 3형을 검출하는 3D영역의 공통밴드 RT-PCR, 1형과 3형의 공통밴드와 함께 1형 특이밴드 및 3형 특이밴드를 동시에 확인할 수 있는 multiplex RT-PCR, 그리고 1형과 3형 각각에 대해 2회 PCR을 실시하여 검출하는 nested PCR의 세 가지 PCR 진단법을 확립하였다.

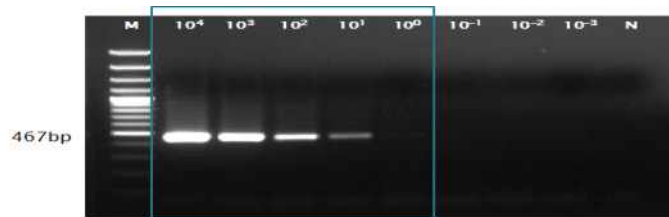
NO.	PCR	Type	Target gene	Size	Reference		
1	Common RT-PCR	DHAV-1 & DHAV-3	3D	RNA dependent RNA polymerase	467	Development of One-Step Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction to Detect Duck Hepatitis Virus Type 1 [Avian diseases, Korea, 2007]	
2	Multiplex RT-PCR	DHAV-1 & DHAV-3	3D	RNA dependent RNA polymerase	467	Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and recent Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction [Avian Pathology, Korea, 2008]	
		DHAV-1 typing	VP0	Structural protein	229		
		DHAV-3 typing	5'UR	ORF	311		
3	Nested PCR	DHAV-1	VP1	Structural protein	1st	755	The prevalence of duck hepatitis A virus types 1 and 3 on Korean duck farms [Archives of Virology, Korea, 2014]
					2nd	339	
		DHAV-3	VP1	Structural protein	1st	737	
					2nd	352	

④ Common RT-PCR진단법의 민감도 검사 : 1형 평가



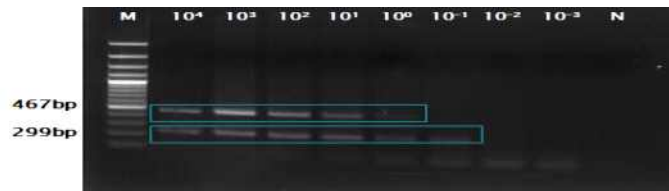
오리간염바이러스 1형 DRL-62-CE3($10^{4.0}$ ELD₅₀/0.2ml)를 시료로 오리간염 공통밴드 PCR을 실시하였다. 검사시료를 7단계로 10진 희석하여 민감도를 확인한 결과 10^{-1} ELD₅₀/0.2ml까지 검출이 가능함을 확인하였다.

⑤ Common RT-PCR진단법의 민감도 검사 : 3형 평가



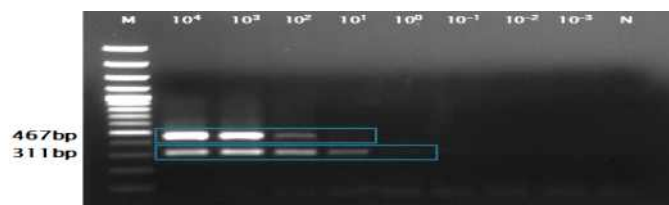
오리간염바이러스 3형 AP-04203-CE4($10^{4.0}$ ELD₅₀/0.2ml)를 시료로 오리간염 공통밴드 PCR을 실시하였다. 검사시료를 7단계로 10진 희석하여 민감도를 확인한 결과 10^0 ELD₅₀/0.2ml까지 검출이 가능함을 확인하였다.

⑥ Multiplex RT-PCR진단법의 민감도 검사 : 1형 평가



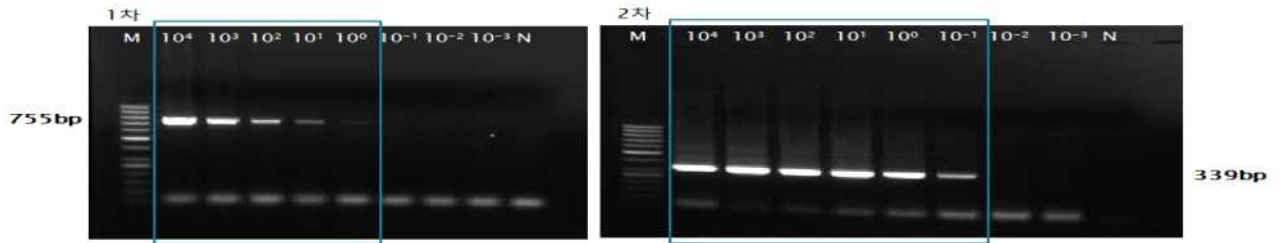
오리간염바이러스 1형 DRL-62-CE3($10^{4.0}$ ELD₅₀/0.2ml)를 시료로 오리간염 multiplex PCR을 실시하였다. 검사시료를 7단계로 10진 희석하여 민감도를 확인한 결과 공통밴드(467bp)는 10^0 , 1형 특이밴드(299bp)는 10^{-1} ELD₅₀/0.2ml까지 검출이 가능함을 확인하였다.

⑦ Multiplex RT-PCR진단법의 민감도 검사 : 3형 평가



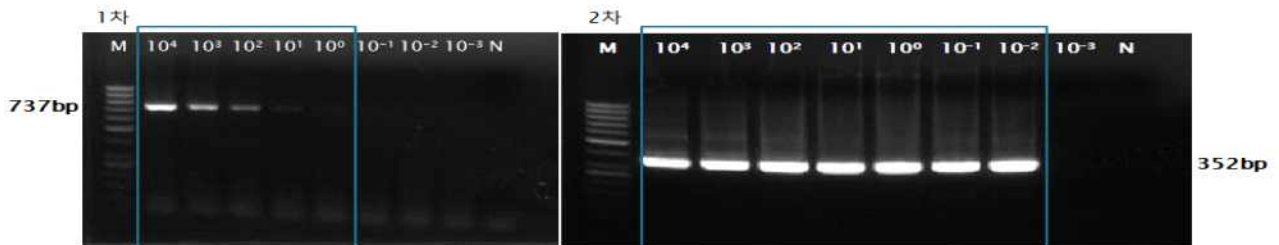
오리간염바이러스 3형 AP-04203-CE4($10^{4.0}$ ELD₅₀/0.2ml)를 시료로 오리간염 multiplex PCR을 실시하였다. 검사시료를 7단계로 10진 희석하여 민감도를 확인한 결과 공통밴드(467bp)는 10^1 , 3형 특이밴드(311bp)는 10^0 ELD₅₀/0.2ml까지 검출이 가능함을 확인하였다.

⑧ Nested RT-PCR진단법의 민감도 검사 : 1형 평가



오리간염바이러스 1형 DRL-62-CE3($10^{4.0}$ ELD₅₀/0.2ml)를 시료로 오리간염 nested RT-PCR을 실시하였다. 검사시료를 7단계로 10진 희석하여 민감도를 확인한 결과 1차 PCR결과 10^0 , 2차 PCR결과 10^{-1} ELD₅₀/0.2ml까지 검출이 가능함을 확인하였다.

⑨ Nested RT-PCR진단법의 민감도 검사 : 3형 평가



오리간염바이러스 3형 AP-04203-CE4($10^{4.0}$ ELD₅₀/0.2ml)를 시료로 오리간염 nested RT-PCR을 실시하였다. 검사시료를 7단계로 10진 희석하여 민감도를 확인한 결과 1차 PCR결과 10^0 , 2차 PCR결과 10^{-2} ELD₅₀/0.2ml까지 검출이 가능함을 확인하였다.

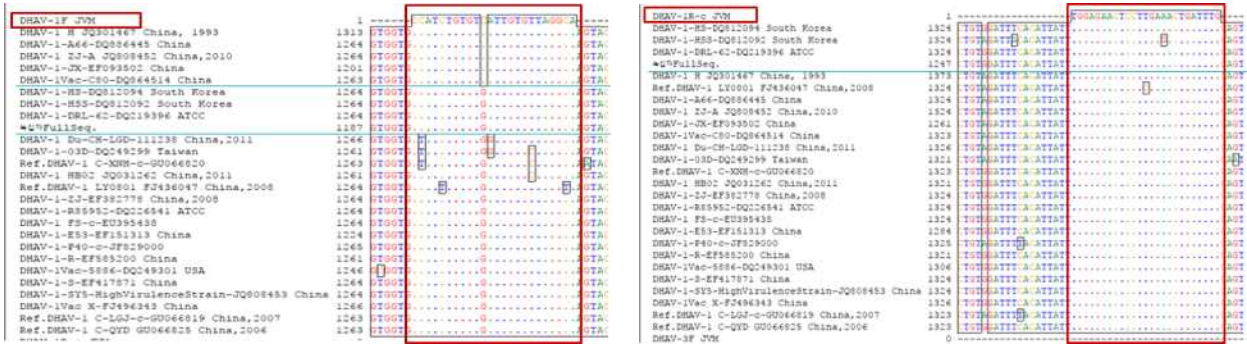
(나) 오리간염 real-time RT-PCR 신규 셋팅

① 오리간염 real-time RT-PCR 문헌정보

NO.	Type	Primer region	Reference
1	DHAV-1	3D	Development and application of a one-step real-time Taqman RT-PCR assay for detection of Duck hepatitis virus type 1 [Journal of Virological Methods, China, 2008]
2	DHAV-1	3D	Molecular Characterization and SYBR Green I-Based Quantitative PCR for Duck Hepatitis Virus Type 1 [Agricultural Sciences in China, China, 2008]
3	DHAV-1	3D	Cytokine gene expression in the livers of ducklings infected with duck hepatitis virus-1 JX strain [Poultry Science, China, 2012]
4	DHAV-3	2C	Development of a Real-Time Quantitative PCR for Detecting Duck Hepatitis A Virus Genotype C [Journal of Virological Methods, China, 2016]
5	DHAV-1 & 3 Duplex	DHAV-1 : VP0 DHAV-3 : VP3	A one-step duplex rRT-PCR assay for the simultaneous detection of duck hepatitis A virus genotypes 1 and 3 [Journal of Virological Methods, China, 2016]
6	DHAV-1 & 3 Duplex	DHAV-1 : 3D DHAV-3 : 3A, 3B	Circulation and in vivo distribution of duck hepatitis A virus types 1 and 3 in infected ducklings [Arch Virology, China, 2016]

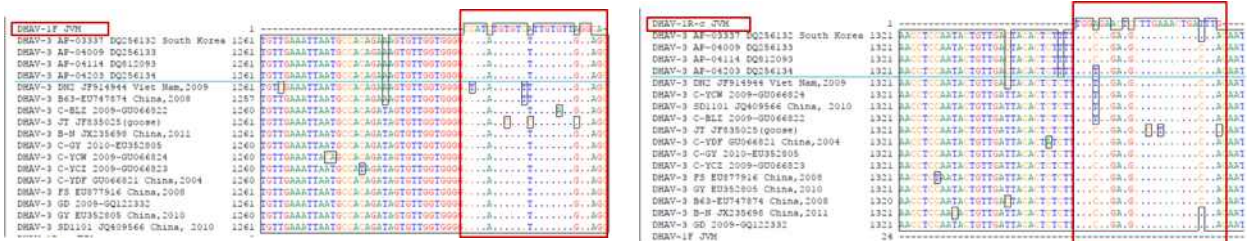
오리간염 real-time RT-PCR의 문헌정보를 조사하였고, 4개의 단일형 PCR과 2개의 duplex PCR을 확인하였다. 1형과 3형을 동시에 검출하는 duplex PCR을 우선적으로 평가하였다. 1형과 3형 오리간염바이러스는 ATCC, 국외분리주, 국내분리주 및 국내백신주를 이용하여 논문에서 제시한 primer와의 align분석을 실시하였다.

㉞ [Journal of Virological Methods, China, 2016] primer의 align분석결과



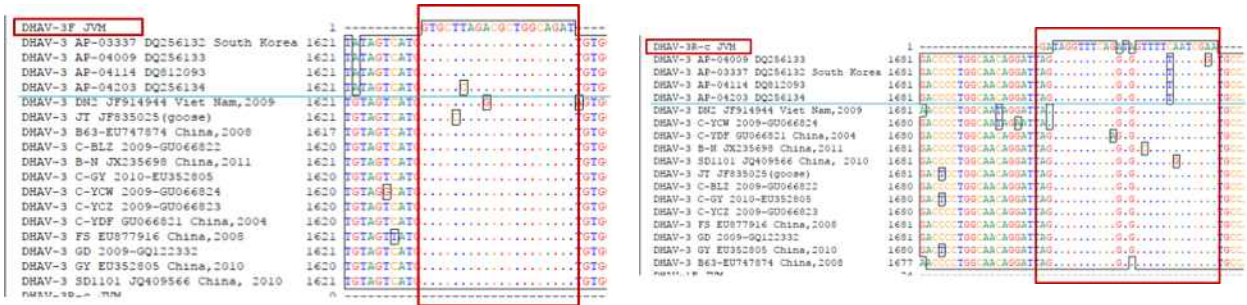
[DHAV-1F primer와 1형 유전자의 align결과] [DHAV-1R primer와 1형 유전자의 align결과]

1형 primer과 1형 유전자의 align분석결과는 위와 같다.



[DHAV-1F primer와 3형 유전자의 align결과] [DHAV-1R primer와 3형 유전자의 align결과]

1형 primer와 3형 유전자의 align분석결과는 위와 같다.

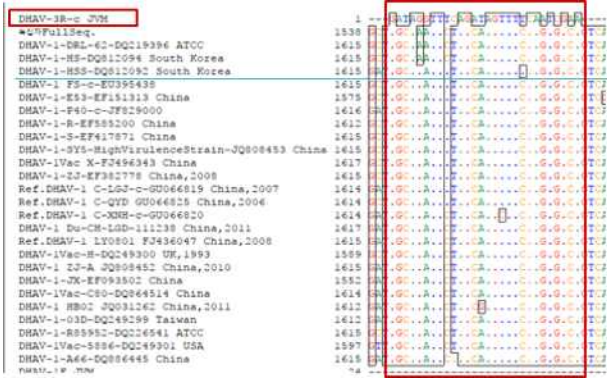


[DHAV-3F primer와 3형 유전자의 align결과] [DHAV-3R primer와 3형 유전자의 align결과]

3형 primer와 3형 유전자의 align분석결과는 위와 같다.

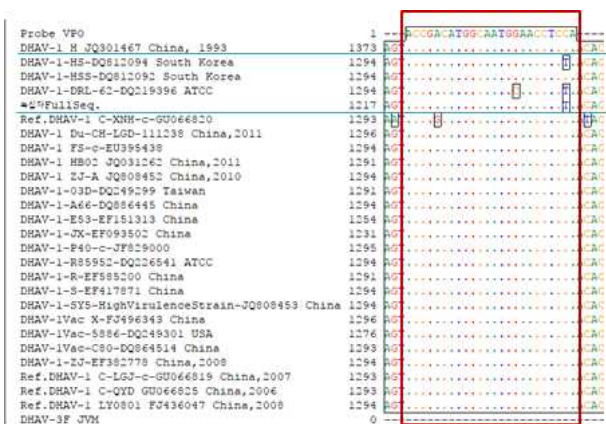


[DHAV-3F primer와 1형 유전자의 align결과]

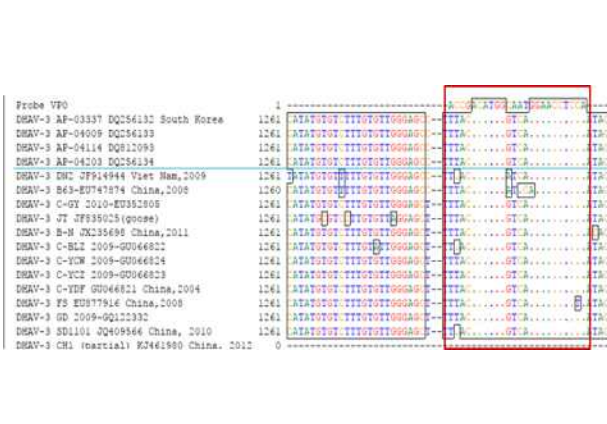


[DHAV-3R primer와 1형 유전자의 align결과]

3형 primer와 1형 유전자의 align분석결과는 위와 같다.

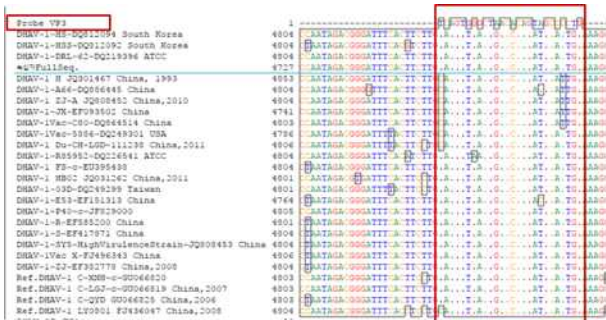


[VP0 probe와 1형 유전자의 align결과]

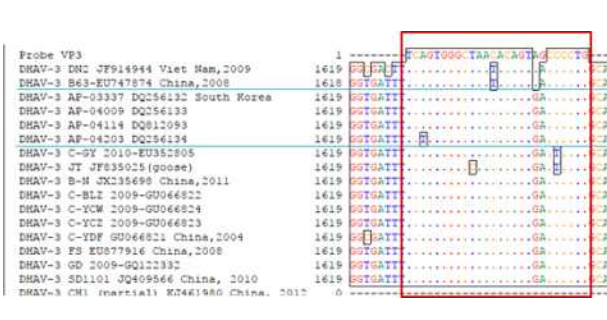


[VP0 probe와 3형 유전자의 align결과]

1형 VP0 probe와 1, 3형 유전자의 align분석결과는 위와 같다.



[VP3 probe와 1형 유전자의 align결과]



[VP3 probe와 3형 유전자의 align결과]

3형 VP3 probe와 1, 3형 유전자의 align분석결과는 위와 같다.

⊕ align분석결과 [Journal of Virological Methods, China, 2016]의 선정 및 부분 수정 제작

Type	Reference genes	Reference
DHAV-1 & 3 Duplex	DHAV-1(H)	JQ301467
	DHAV-3(FS)	EU877916
		A one-step duplex rRT-PCR assay for the simultaneous detection of duck hepatitis A virus genotypes 1 and 3 [Journal of Virological Methods, China, 2016]

분석결과, 동형간에 높은 상동성을 보이고 교차반응의 가능성이 낮을 것으로 판단되는 [Journal of Virological Methods, China, 2016] 논문의 primer를 선정하였다. 논문에 제시된 DHAV-3R primer의 경우 분석에 사용된 바이러스의 유전자 대부분과 불일치율을 보이는 일부 유전자를 수정하여, 논문에 제시된 DHAV-3R-1과 align분석을 통해 수정하여 제작한 DHAV-3R-2의 두 개 primer를 이용해 선별시험을 실시하였다. DHAV-3의 VP3 probe의 경우도 논문에 제시된 primer를 align한 결과 불일치 부분을 수정하여 primer를 제작하였다.

㉔ Primer 구성

Primer type		Label		Sequence
1형	F	DHAV-1F	-	CCATCTGTGTCATTGTGTTAGGCA
	R	DHAV-1R	-	CAAATCAGTTTCAAGGAGTTCTCCA
3형	F	DHAV-3F	-	GTGCTTAGACGCTGGCAGAT
	R-1	DHAV-3R-1	-	TTCGATTGAAAACCACTGAAACCTACT
	R-2	DHAV-3R-2	부분수정 제작	TTCGATTGAAAACCACTGAAACCTACT
Probe-1형	VP0	DHAV-1-VP0-probe	-	ACCGACATGGCAATGGAACCTCCA
Probe-3형	VP3	DHAV-3-VP3-probe-m	부분수정 제작	TCAGTGGGCTAACACAGTGACCCCTG

1형과 3형을 동시에 검출하는 duplex real-time RT-PCR로서, 6쌍의 프라이머를 사용하며 형광채널은 1형 HEX채널과 3형 FAM채널로 구성되어 있다.

㉕ 일반 PCR 시험방법으로 검증시험

□ 시험조건

[온도조건]

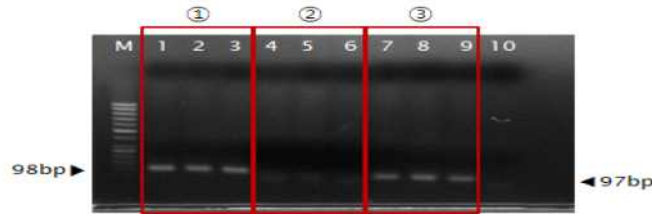
Step	℃	Time	Cycle
Pre-denaturation	94	5min	1
Anealing	54	30sec	40
Extension	72	20sec	
Denaturation	94	20sec	
Post-elongation	72	5min	1

[Master mix 조성]

PCR mix	ul
10X eTaq buffer	2
2mM dNTP	1.5
F	1
R	1
eTaq	0.5
cDNA	5
D.W.	9
Total	20

□ 시험결과 1

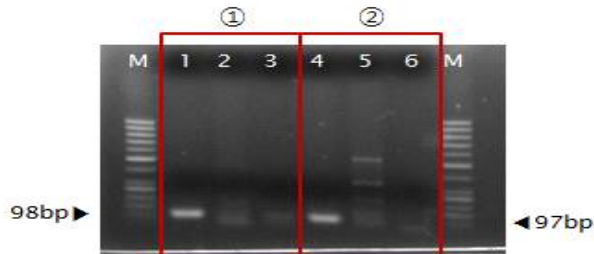
본 시험의 목적은 3형의 R-1과 R-2 primer의 선별시험이다.



① DHAV-1F&R, ② DHAV-3F&R-1, ③ DHAV-3F&R-2 primer로 시험을 실시하였다. 1형(DRL-62-CE4)과 3형(AP-04203-CE3)의 병원성주가 각각 동형의 primer에 검출되었고, DHAV-3R primer의 경우 ③번에서 3형의 검출을 확인하여 부분수정 제작한 DHAV-3R-2 primer로 선정하여, 추후 시험에서는 DHAV-3R primer로 정하여 검증시험을 실시하였다.

□ 시험결과 2

본 시험의 목적은 1형과 3형의 교차시험이다.

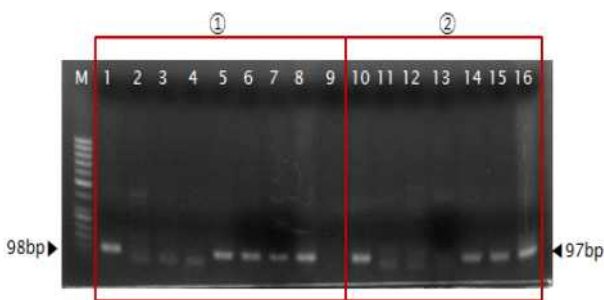


샘플정보 및 결과	
1. DRL-62-CE4 (+)	4. AP-04203-CE3 (+)
2. AP-04203-CE3	5. DRL-62-CE4
3. DHAV-1F&R-1 PCR-N	6. DHAV-3F&R-2 PCR-N

① DHAV-1F&R, ② DHAV-3F&R primer로 시험을 실시하였다. 1형(DRL-62-CE4)과 3형(AP-04203-CE3)의 병원성주가 각각 동형의 primer에 검출되었고, 교차반응이 없음을 확인하였다.

□ 시험결과 3

본 시험의 목적은 샘플별 검출 및 백신주 교차시험이다.



샘플정보 및 결과	
1. DRL-62-CE4 (+)	10. AP-04203-CE3 (+)
2. 3형 백신주 20dose/0.2ml	11. 3형 백신주 20dose/0.2ml
3. 3형 백신주 2dose/0.2ml	12. 3형 백신주 2dose/0.2ml
4. 3형 백신주 0.2dose/0.2ml	13. 3형 백신주 0.2dose/0.2ml
5. 1형 백신주-간유제 (+)	14. 3형 백신주-간유제 (+)
6. 1형 백신주-신장유제 (+)	15. 3형 백신주-신장유제 (+)
7. 1형 야외주-간유제 (+)	16. 3형 야외주-간유제 (+)
8. 1형 야외주-신장유제 (+)	
9. 1형 PCR-N	

① DHAV-1F&R, ② DHAV-3F&R primer로 시험을 실시하였다. 1형(DRL-62-CE4)과 3형(AP-04203-CE3)의 병원성주와 유제시료가 각각 동형의 primer에 검출되는 결과를 확인하였고, 1, 3형 백신주는 교차반응이 일어나지 않음을 확인하였다. 1, 3형 백신주도 동형의 primer에 각각 검출되는 결과를 확인하였다(Data not shown).

② real-time RT-PCR시험

㉠-1. 시험조건 1

[온도조건 및 샘플종류]

Step	℃	Time	Cycle
reverse transcription	42	5min	1
inactivation of the RT enzyme	95	10sec	
denaturation	95	5sec	45
annealing	60	15sec	

샘플종류	
1형	병원성주 10 ⁵ ELD ₅₀ /0.2ml 백신주 10 ⁴ ELD ₅₀ /0.2ml
3형	백신주 유제-Li, Kid 병원성주 유제-Li

[Master mix 조성]

PCR mix	ul
qRT-PCR Master mix	10
DHAV-1F&R	8pmol/ul 1 (총 6)
DHAV-3F&R	
DHAV-1-VP0	
DHAV-3VP3	
DTT(20mM)	1
RT/Rnase block	1
Template(cRNA)	2
Total	20

㉠-2. 시험결과 1

본 시험의 목적은 1형과 3형의 샘플 종류별 검출 확인시험이다. 시험결과, 1형과 3형의 샘플 종류별로 각각 동형의 primer에 검출되는 결과는 확인하였고, 다양한 샘플 종류들에서 모두 교차반응이 일어나지 않음을 확인하였다.

㉡-1. 시험조건 2

[온도조건 및 샘플종류]

Step	℃	Time	Cycle
reverse transcription	42	5min	1
inactivation of the RT enzyme	95	10sec	
denaturation	95	5sec	45
annealing	70	15sec	
	67.3		
	64.1		
	60.3		
	57.2		
54			

[Master mix 조성]

PCR mix	ul
qRT-PCR Master mix	10
DHAV-1F&R	8pmol/ul 1 (총 6)
DHAV-3F&R	
DHAV-1-VP0	
DHAV-3VP3	
DTT(20mM)	1
RT/Rnase block	1
Template(cRNA)	2
Total	20

㉡-2. 시험결과 2

본 시험의 목적은 anealing온도의 설정을 위해 Gradient real-time RT-PCR 시험이다. 1형과 3형의 병원성주를 시험한 결과, 1형은 HEX채널에서, 3형은 FAM채널에서 각각 검출되었고, 교차반응은 확인되지 않았다. Gradient 온도 중 60.3℃에 가장 유효한 검출결과를 확인하여, 60℃를 anealing온도로 설정하였다.

㉔-1. 시험조건 3

[온도조건 및 샘플종류]

Step	℃	Time	Cycle
reverse transcription	42	5min	1
inactivation of the RT enzyme	95	10sec	
denaturation	95	5sec	45
annealing	60	15sec	
샘플종류			샘플수
1형	[150325] DRL-62-CE4	10 ⁵ (원액), 10 ⁴ , 10 ³ ,	5
3형	[150801] AP-04203-CE3	10 ² , 10 ¹	

[Master mix 조성]

PCR mix	ul
qRT-PCR Master mix	10
DHAV-1F&R	8pmol/ul 1 (총 6)
DHAV-3F&R	
DHAV-1-VP0	
DHAV-3VP3	
DTT(20mM)	1
RT/Rnase block	1
Template(cRNA)	2
Total	20

㉔-2. 시험결과 3

본 시험의 목적은 민감도 시험이며, 1형과 3형 병원성주 10⁵ ELD₅₀/0.2ml을 각각 10진 희석하여 원액부터 10⁻² ELD₅₀/0.2ml까지 시험을 수행하였다. 시험결과, 3형 FAM채널에서 3형 병원성주가 1형 HEX채널에서 1형 병원성주가 각각 10⁰ ELD₅₀/0.2ml까지 검출되는 결과를 확인하였고, 교차반응은 확인되지 않았다.

㉔-1. 시험조건 4

[온도조건 및 샘플종류]

Step	℃	Time	Cycle
reverse transcription	42	5min	1
inactivation of the RT enzyme	95	10sec	
denaturation	95	5sec	45
annealing	60	15sec	
샘플종류			
혼합백신	*백신후 2, 4 dpv 장기채취		
3형백신	*Liver, Kidney, Spleen, Heart 유제		
1형백신			

[Master mix 조성]

PCR mix	ul
qRT-PCR Master mix	10
DHAV-1F&R	8pmol/ul 1 (총 6)
DHAV-3F&R	
DHAV-1-VP0	
DHAV-3VP3	
DTT(20mM)	1
RT/Rnase block	1
Template(cRNA)	2
Total	20

㉔-2. 시험결과 4

본 시험의 목적은 백신 후 장기별 증식능 평가의 장기유제 시험이며, 시험결과, 3형 FAM채널은 혼합백신과 3형 백신 유제에서 1형 HEX채널은 혼합백신과 1형 백신 유제에서 검출되었고, 교차반응은 확인되지 않았다. 장기에서 백신주의 검출은 낮은 양상을 보였다. 각 백신별로 4dpv보다 2dpv에 약간 높은 검출결과를 보였고, 장기들 중에서는 kidney에서 백신주의 비교적 높은 검출결과를 확인하였다.

(2) 오리리메렐라감염증의 진단

(가) 오리리메렐라 항원진단 - PCR 진단법 확립

① 시료준비

liver, brain 시료 채취를 위해 복막(두개골)을 남겨두고 스킨만 제거하여 10% 요오드로 소독하였다. 멸균된 가위와 포셉으로 복막(두개골)을 제거한 후, 간(뇌)에서 일부 조직을 채취하여 blood agar에 직접 도말하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 36-48시간 동안 배양하였다. colony를 바로 딸 수 있는 경우 격자배양으로 옮기고, 균이 뭉쳐있는 경우 plate별로 pooling 하였다. 양성샘플을 PBS에 10진 희석하여 10⁻⁶, 10⁻⁷을 blood agar에 도말하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 36-48시간 동안 배양하였다.

② PCR 검사

단일 colony 검사의 경우, blood agar의 균을 멸균된 이쑤시개나 yellow tip으로 긁어서 EP tube(1xPBS 또는 DW 100ul)에 풀어주었다. pooling 검사의 경우, 각 plate의 균을 멸균된 면봉으로 긁어서 plate별로 EP tube(1xPBS 1ml)에 풀어주었다. 균을 균일하게 풀어주고 plate별로 100ul씩 취하여 새로운 EP tube에 분주하고, 100°C에서 15분간 boiling 하였다. ice에 5분간 정지 후, 4°C, 13,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 EP tube에 옮겨 PCR 반응에 이용하였다.

[온도조건]

Step	°C	Time	Cycle
Pre-denaturation	94	5min	1
Denaturation	94	30sec	30
Annealing	60.4	30sec	
Extension	72	1min	
Post-elongation	72	10min	1

[Master mix 조성]

10X PCR buffer	5
2mM dNTP	3
F	1
R	1
eTaq	0.5
DNA (pooling:100ng. 단일 colony:100-500ng)	1
D.W.	38.5
Total	50

(나) 오리리메렐라 항체진단 - MAT(Micro Agglutination Test) 검사법 확립

① MAT용 항원 제조 및 항원역가 시험

Blood agar plate에 배양된 *Riemerella anatipestifer* 1형(RA T1), 7형(RA T7)의 단독집락을 선정하여 Tryptic soy broth 30ml에 접종하고 37°C, CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다 (OD : 0.8-1.0). 배양액을 3000rpm에 30분 원심분리하였다. 상층액은 버리고 pellet은 10ml PBS로 풀어준 뒤 다시 3000rpm, 30min 원심분리하였다(2회 반복). 균 pellet을 4ml PBS로 부유시킨 후 1.5ml tube에 1ml씩 소분하였다. 100°C에서 30분 이상 boiling한 후 boiling한 혼탁액을 그대로 항원으로 사용하였다. 제조한 항원 50 μl를 96-well Microplate(U-shape)에 PBS로 2진 희석한 후 하룻밤동안 37°C, CO₂ incubator에서 정지시켰다. Microplate를 40도 정도 기울여 바닥에 떨어진 항원량을 관찰하여 MAT를 실시하기에 적당한량의 항원 희석배수를 선택하여 기록하였다(MAT를 실시하기에 적당한 항원의 농도는 위 시험에서 응집되지 않을 경우 흘러내리는 것이 쉽게 관찰되는 것을 선택하였다.).

② 항혈청 제조

접종균주는 RA T1, RA T7을 blood agar plate에 접종하여 37°C, CO₂ incubator 에서 36시간 배양 후 7ml TSB에 단일콜로니를 접종하여 15시간 배양하였다(OD : 0.4, CFU : 1x10⁹/mL). 균 배양액 1ml에 formalin 3ul(0.3% Formalin)의 비율로 혼합하여 균을 고정하였다. adjuvant(ISA760VG[회사: SEPPIC, 상품명: MONTANIDETM ISA 760 VG])와 균의 비율을 2:1로 하여, 6-7주령 닭에 1형, 7형을 1.5ml씩 근육접종하였다(0.7ml 대퇴부 + 0.7ml 가슴근육). 1차접종 3주차에 2차접종, 2차접종 2주차에 3차접종 한 다음, 3차접종 2주 후에 심장 채혈하여 혈청을 확보하였다.

③ 시험방법

Microplate(U-shape 96well plate)에 혈청번호 및 희석배수를 기입하고, 1xPBS를 모든 well에 50 μl 분주하였다. 표준혈청(Nega, Posi)을 A1, B1 well에 50 μl씩 분주하고, 검사하고자 하는 혈청 sample혈청을 C1 well부터 순서대로 50 μl씩 분주하였다. 50 μl multipipette으로 1열부터 12열까지 2진 희석하였다. IMAT 희석된 항원을 50 μl씩 모든 well에 분주하였다(2⁴MAT는 16배 희석하여 IMAT사용하였다.). Microplate의 well에 들어있는 내용물을 잘 혼합시킨 후, plate를 랩등으로 봉하여 37°C, CO₂ incubator에서 24시간 반응시켰다. Plate를 실온에서 꺼내어 밝고 편평한 장소에서 아래에 흑지를 깔고, 그 위에 plate를 놓고 충분한 밝기에서 응집을 관찰하였다.



(3) 오리장염의 진단법


(가) 오리장염 항원진단 : PCR 진단법 확립

[온도조건]

Step	℃	Time	Cycle
Pre-denaturation	94	5min	1
Denaturation	94	30sec	35
Annealing	55	30sec	
Extension	72	30sec	
Post-elongation	72	10min	1

[Master mix 조성]

10X PCR buffer	5
2mM dNTP	3
F (5pmol)	2
R (5pmol)	2
eTaq	0.5
DNA (pooling:100ng. 단일 colony:100-500ng)	5
D.W.	32.5
Total	50

No.	Primer	Nucleotide (5' -3')	Targetgene	Size	표준주	특이 유전자 증폭사진
1	DEV-DF	GAAGGCGGGTATGTAATGTA	UL35~UL36 (Polymerase)	446bp	Holland	
	DEV-DR	CAAGGCTCTATTCGGTAATG				

표준주 Holland주를 이용하여 PCR 진단법을 구축하였다.

다. 병원체 동물 시험접종 및 시료 패널 확보

(1) 오리간염 항혈청 확보

(가) 오리간염 1형 백신접종 후 경과일령별 항체평가지험

8일령 오리 4수(T- 1 - T- 4)에 1형 오리간염백신을 근육접종하고 백신 후 3-35일까지 7회 동안 혈청을 확보하여 VN test를 실시하였다. VN test결과 7일째부터 28승 이상, 10일째부터 210승 이상의 높은 항체가를 확인하였다.

ducks	Day post vaccination / Antibody titer (log ₂)						
	3	5	7	10	14	21	35
T-1	6	5	10	11	11	11	11
T-2	6	8	10	11	11	10	11
T-3	5	5	7	10	10	10	11
T-4	5	6	8	10	11	10	11
Average	5.5	6	8.7	10.5	10.7	10.2	11

(나) 오리간염 1형과 3형의 SPF chicken 항혈청 확보

3주령의 SPF chicken 5수씩 10수에 1형 백신 $10^{5.5}$ ELD₅₀/0.2ml과 3형 병원성주 AP-04203-CE2 $10^{4.4}$ ELD₅₀/0.2ml을 근육과 음수로 1ml씩 총 2ml접종하고, 이후 1주일 간격으로 2회 추가백신을 실시하였다. 3회 백신 2주 후부터 5회 동안 매주 혈청을 확보하였고, 1형 혈청을 VN test로 검사한 결과 2^{10} 내외의 높은 항체가를 확인하였다.

Sampling No.	Age	dpi	접종	Negative	DHAV-1		DHAV-3
				Volume	Volume	Titer(log ₂)	Volume
-	3w	0dpi	○	-	-	-	-
-	4w	9dpi	○	-	-	-	-
-	5w	16dpi	○	-	-	-	-
1	7w	29dpi	-	10	22	10	22.5
2		31dpi	-	10	27	9	17
3		33dpi	-	19	28	10	20
4	8w	36dpi	-	17	44	10	44
5		39dpi	-	-	52	ND	-

(다) 오리간염 1형과 3형의 항혈청 확보

① 오리간염 1형 항혈청

No.	시료종류	weeks post inoculation	일령 (W)	혈청형	평균역가(log ₂)	정보
1	Farm duck antiserum	5	5	DHAV-1	8	종오리 백신 항혈청
2		12	12		7	
3		18	18		8	
4		24	24		8	
5	Progeny duck serum	-	1d		7	후대병아리 모체이행항체
6		-	5d		6	
7		-	1		6	
8		-	10d		5	
9		-	2		5	
10	duck antiserum-1	2	4		ND	오리항혈청확보시험-1차
11		3	5		ND	
12		4	6		ND	
13		5	7		ND	
14		6	8		ND	
15	duck antiserum-2	5	7		ND	오리항혈청확보시험-2차
16		6	8		ND	
17		7	9		ND	
18		8	10		ND	
19		11	13		ND	
20	SPF chicken antiserum	4	7		10	SPF chicken 항혈청확보시험
21		5	8		10	

1형 오리간염의 항혈청은 종오리농장에 백신을 실시한 후 확보한 모체의 항혈청과 모체이행 항체를 전달받은 후대병아리의 항혈청을 확보하였다. 모체의 항체가는 평균 2^8 을 확인했고, 후

대병아리의 경우 일령에 따라 2⁵-2⁷의 항체가를 확인하였다. 오리에서 1형 오리간염 항혈청 확보를 위해, 1형 백신 10-20dose를 근육 및 피하로 3회(5-7일 간격) 접종하고, 이 후 1주일 간격으로 혈청을 확보하였다.

② 오리간염 3형 항혈청

오리에서 3형 오리간염 항혈청 확보를 위해, 3형 야외주 AP-04203-CE4 10^{3.5-4.5} ELD₅₀/0.2ml을 근육 및 피하로 3회(5-7일 간격) 접종하고, 이 후 1주일 간격으로 혈청을 확보하였다.

No.	시료종류	weeks post Inoculation	일령 (W)	혈청형	평균역가(log ₂)	정보
1	duck antiserum-1	2	4	DHAV-3	ND	오리항혈청확보시험-1차
2		3	5		ND	
3		4	6		ND	
4		5	7		ND	
5		6	8		ND	
6	duck antiserum-2	5	6		ND	오리항혈청확보시험-2차
7		6	7		ND	
8		10	10		ND	
9		15	15		ND	
11	SPF chicken antiserum	4	7		ND	SPF chicken 항혈청확보시험
12		5	8		ND	

(2) 오리간염 항원 확보

(가) 오리간염 1형 항원 확보현황

No.	샘플명	시료종류	혈청형	정보
1	DRL-62	SPF CE 배양	DHAV-1	2011, KVCC 분양
2	DHV-HS			
3	DHV-HSS			
4	D14-MR-056	야외주 · 간유제		2014 발생
5	D15-MR-038			2015 발생
6	D14-JW-052			2014 발생
7	D16-ETC-010			2016 발생

1형 대표주인 DRL-62와 국내분리주 DHV-HS, DHV-HSS를 KVCC 분양으로 확보하였다. 2014-2016년 육용오리농장에서 오리간염 의심증상을 보이는 폐사 오리의 간을 유제하여, PCR을 실시한 결과 1형 오리간염 야외주를 확보하였다.

(나) 오리간염 3형 항원 확보현황

No.	샘플명	시료종류	혈청형	정보
1	AP-03337	SPF CE 배양	DHAV-3	2012, KVCC 분양
2	AP-04009			
3	AP-04114			
4	AP-04203			
5	D11-JW-018	야외주 · 간유제		2011 발생
6	D13-BS-004			2013 발생
7	D14-ETC-020			2014 발생
8	D14-JW-068			2014 발생
9	D16-ETC-011			2016 발생
10	D16-ETC-021			2016 발생

3형 국내분리주 AP-03337, AP-04009, AP-04114, AP-04203을 KVCC 분양으로 확보하였다. 2011-2016년 육용오리농장에서 폐사한 오리의 간을 유제하여, PCR 검사를 실시한 결과 오리간염 3형 야외주를 확보하였다.

2. 항원검사 표준개발 및 진단기 유효성 평가

가. 농장별 허드별 항원 분포조사 및 시료뱅크 구축

(1) 오리 리메렐라균 항원 확보

오리농장 및 야생오리류로부터 리메렐라균 250여종을 분리동정하여 혈청형, 병원성, 주요 유전자 보유유무 등의 균 고유 특성을 분석하여 분류하였다.

나. 표준 항체 검사법 확립

(1) 오리간염바이러스 항체검사법 확립

(가) 준비사항

- ① Virus와 희석용 PBS
- ② Serum free DEL medium, 2% FBS DEL medium
- ③ Positive control serum, Negative control serum

(나) Serum&Virus 준비

- ① Positive/Negative control serum 및 검사할 serum을 2-fold 희석한다.
(양성 유무 판단의 경우 1/16로 희석 후 2-fold 희석한다.)
- ② Virus : DRL-62-DE2-CE1-DEL6 (10^5 TCID₅₀/50ul)를 10^{-3} 희석하여 사용한다(Final 역가 10^2 TCID₅₀/50ul).
- ㉠ Virus DEL 증식법은 다음과 같다. 먼저 DEL 70~80%일 때 접종하고(5×10^5 cell/ml 100dish), 원액을 접종한다(100dish : 1ml). CPE 80% 이상일 때 Harvest(6-7일 배양)한다.

(다) Cell 준비(Duck embryo liver cell culture)

Cell은 실험전날 primary DEL(5.0×10^5 cell/ml)을 well당 100ul로 분주하여 monolayer cell을 준비한다(well당 5.0×10^4 cell/100ul). DEL-1p를 사용한다.

① Media

TPB 1×	10%	10ml
MEM 10x	10%	10ml
Calf serum	8% (2%)	8ml
Antibiotic Antimycotic	1%	1ml
SB (7.5%)	0.5-1%	0.7ml
D.W.	up to 1L	100ml

② 16(~17)일령의 embryo를 사용하고, 2-3마리당 100dish (T25 flask) 1장 정도를 회수 할 수 있다.

③ Materials

- ㉠ Autoclaved : PBS, 100ml beaker, 부검도구, magnetic bar, 거즈 장착한 깔대기, 원심튜브
- ㉡ 시약 : RBC lysis buffer, 2.5% trypsin

④ Method

- ㉠ Ice에 cold PBS와 멸균된 100ml beaker를 꽂아둔다.
- ㉡ 37°C water bath에 Medium, Trypsin, FBS를 Warming 시킨다.
- ㉢ Cold PBS에 Antibiotics(1%)를 첨가하여 준비하고, 0.125% Trypsin-PBS를 만들어서 37°C 에 warming 시킨다(소화용액은 종란 1개당 Trypsin 소화용액 50ml 미만이 되게 준비한다.).
- ㉣ Egg의 기실부위를 알코올 및 화염소독 후 기실부를 제거하고 Embryo를 꺼내어 Petridish에 옮긴다.
- ㉤ Embryo에서 무균적으로 Liver를 채취하여 Cold PBS가 담긴 Petridish에 옮긴다.
 - 피부를 절개하고 흉곽 부위를 들어올리면 Liver가 노출된다. 털이 들어가지 않도록 도구를 바꿔주고 담낭이 터지면 오염되므로 주의한다.
- ㉥ Liver 표면의 결합조직 등을 제거한 후 Cold PBS가 담긴 새로운 Petridish에 옮긴다.
 - ㉦ 불순물을 다시 한 번 제거한 뒤 cold beaker에 붓고 가위를 이용하여 Chopping 한다.
- ㉧ Cold PBS를 100ml정도 beaker에 적당량 붓고 흔들어진 뒤 5분간 정치한 후 상층액을 버리는 방식으로 2회 washing 한다.
- ㉨ Washing이 끝난 조직에 0.125% Trypsin-PBS를 첨가한 후 교반기를 이용하여 교반한다.
 - 작용시간 및 수확(10개 egg까지 약 150ml사용)
 - 50-100ml 첨가하여 2분 반응 후 버린다.
 - 50ml 첨가하여 10분 반응 후 수확한다.
 - 50ml 첨가하여 7분 반응 후 수확한다.
 - CEF에 비해 cell이 손상받기 쉬우므로 Stirring 속도는 bar가 보일 정도로 유지하고 지속적으로 확인하여, 상층액이 우윳빛이 되면 중지한다(세포 소화가 잘되면 single cell이 고르게 형성되어 뿌옇게 현탁액이 되는 것을 의미한다).
- ㉩ 교반이 진행되는 동안 수확할 유리병을 Ice 위에 올리고 그 위에 거름망(거즈)이 부착된 깔대기를 꽂은 후, Warm CS를 세포 소화액 volume의 3%정도(3ml) 부어서 적셔 둔다(Trypsin 중화 과정).
- ㉪ 교반이 완료된 조직액을 거름망에 천천히 부은 후, 원심튜브로 옮겨 4°C, 1000rpm, 3min 원심분리한다.
- ㉫ 상층액을 버리고 Pellet을 Tapping 을 통해 완전히 풀어준 후 RBC lysis buffer를 종란당 3ml이 되도록 첨가하고 2-3분간 Ice에서 반응시킨다(과도하면 세포가 손상된다).
- ㉬ RBC의 Lysis 여부를 판단하고 배지 5ml를 첨가하여 lysis를 중지시키고, 4°C 1000rpm 3min 원심분리한다.

㉞ 적당한량의 배지에 풀어 cell counting한 후, 약 1×10^6 cells/ml로 맞춰서 dish나 Flask에 seeding 하고(cell 30mg에 배지 약100ml의 비율), 상층액을 버리고 1~2일 후 monolayer 형성을 확인한다.

(라) VN 실험조건

항목	조건
Test cell	DEL cells[5×10^4 cell/well (100ul/well)], DEL-1p
P-control virus	DRL-62-DE2-CE1-DEL6($10^{5.0}$ TCID ₅₀ /50ul)--- 10^{-3} 희석해 사용($10^{2.0}$ TCID ₅₀ /50ul)
P-control antiserum	DHAV-1 SFP antiserum(2^{10})--- $2^4 \sim 2^{10}$ 2-fold dilut. [sanyo-F]
N-serum-control	[131230]duck nega-serum --- $2^4 \sim 2^{10}$ 2-fold dilut. [sanyo-D]
N-medium- control	Medium 100ul
Test serum	2-fold dilut.[50uL]($2^4 \sim 2^{12}$); 샘플에 따라 조정
	Test serum :
Incubation time	5 days
Titer	CPE가 나타나지 않는 가장 높은 희석배수의 역수
Negative	less than $\log_2 = 4$

(마) VN 실험방법

- ① 앞에서 제시한 방법으로 DEL cell을 준비하여 96well에 5×10^5 cell/ml을 100ul(5×10^4 cell/well)씩 분주한다(DEL-1p).
- ② 다음날 96well의 monolayer cell 확인한다.
- ③ P-control antiserum과 N-serum-control을 2-fold 단계 희석하였다(No serum medium으로 희석한다).
 - P-control antiserum의 역가를 확인할 수 있는 단계까지 희석한다(2^{10} 인 경우 10단계).
- ④ 검사할 serum을 2-fold로 단계 희석하여 준비한다(No serum medium으로 희석).
 - 예상역가에 따라 희석 단계를 정한다.
- ⑤ 희석단계별로 serum 50ul와 p-control virus 50ul의 mixture 한다(2반복 : 120+120).
(③, ④번 동일)
- ⑥ 37°C 1h incubation 한다.
- ⑦ DEL monolayer를 PBS washing 후, 위의 mixture를 100ul씩 분주한다.
- ⑧ 37°C, 5% CO₂ 1h incubation 한다.
- ⑨ 털고, 2% DEL medium 100ul 분주한다.
- ⑩ 5 days incubation 후 CPE로 역가를 확인한다.

(바) 결과판정

24이하는 음성으로 판정하고, 25이상을 양성으로 판정하며, Titer는 25이상에서 CPE가 나타나지 않는 가장 높은 희석배수의 역수로 한다.

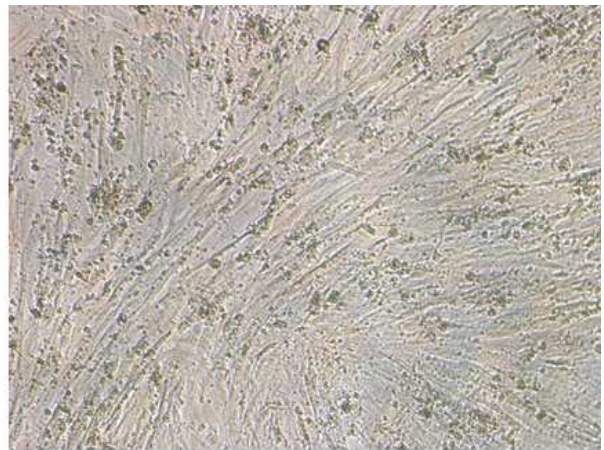
※ CPE의 특징설명 및 사진첨부

① Negative

㉞ 2dpi



x40



x100

㉞ 4dpi



x40

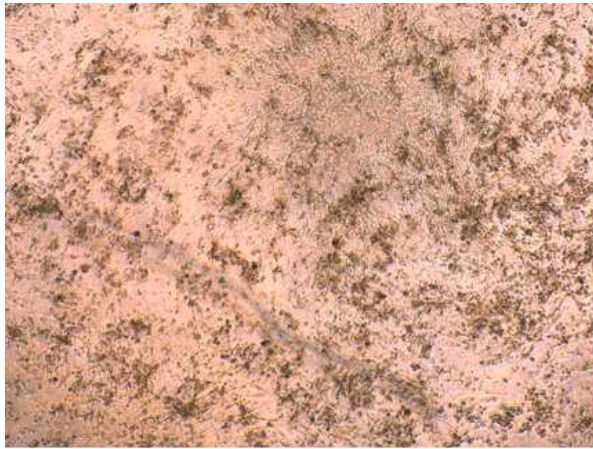


x100

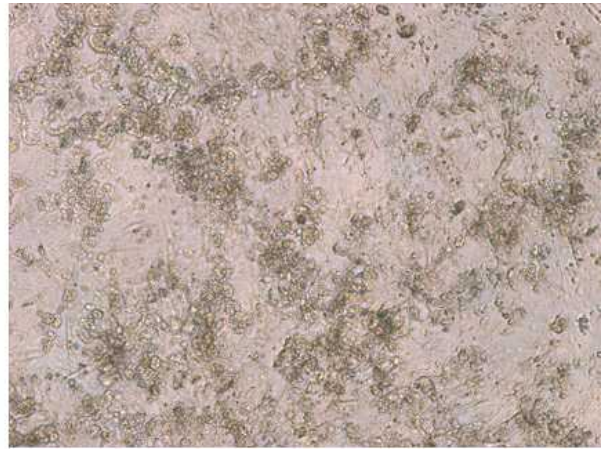
② P-control (CPE)

single cell이 많아져 뭉쳐보이는 양상을 확인할 수 있으며, 2dpi에 CPE가 나타나기 시작하고 (부분적 CPE확인), 3dpi에 확실한 진행을 확인할 수 있다. 아래 사진은 바이러스 농도를 100배 높게 사용한 결과로서, CPE의 진행이 매우 빠른 편이다.

㉗ 2dpi

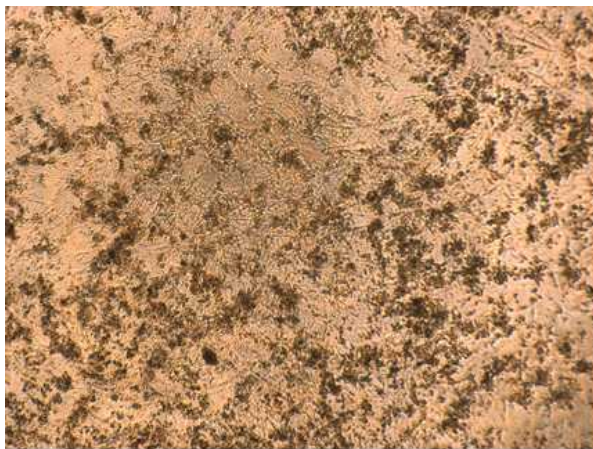


x40



x100

㉘ 4dpi



x40



x100

(2) 오리장염바이러스 항체검사법 확립

(가) 오리장염바이러스 혈청검사법 조사(1)

[관련 논문분석]

No.	Source	Title	Ref.
1	VN test	The incidence of neutralizing antibodies to duck plague virus in serums from domestic ducks and wild waterfowl in the United States of America. (CEF)	Proc 71st AnnuMeet US LivestSanitAssoc, (1967)
2		Duck viral enteritis: Microtiter plate isolation and neutralization test using the duck embryo fibroblast cell line. (DEF)	Avian disease (1974)
3		Three methods comparison of SNT, LAT and ELISA to detecting serum antibody against pseudorabies virus.	Fujian J. Anim. Husband. Vet. Med.(2006)

4	ELSIA	Development of an indirect-ELISA kit for detection of antibodies against duck plague virus. (virion)	Chin. Vet. Sci. 37, 690-694. (2007)
5		A thymidinekinase (TK) recombinant protein based ELISA for detecting antibodies to duck plague virus.	Viol. J. (2010)
6		Recombinant UL16 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of duck viral enteritis	Journal of Virological Methods, (2013)
7	Microtiter plate isolation	Duck viral enteritis: Microtiter plate isolation and neutralization test using the duck embryo fibroblast cell line.	Avian disease (1974)
8	Reverse passive hemagglutination test	Detection of duck plague virus by reverse passive hemagglutination test.	Avian disease(1984)
9	Dot ELISA and passive hemagglutination	Comparison of dotELISA passive haemagglutination test for the detection of antibodies to duckplague.	Indian Vet J. (2002)

① A thymidine kinase (TK) recombinant protein based ELISA for detecting antibodies to duck plague virus. (Virol. J., 2010)

㉞ Introduction

○ Serologic test in DEV

- DEV 의 혈청검사에서 gold standard는 Neutralization Test (NT) → time consuming.
- whole DPV virion 을 이용한 ELISA 도 개발되었다. → time, energy 요구된다.

○ Thymidine Kinase (TK) gene

- a high homology in the Alphaherpesviruses
- main virulence gene
- dispensable during the process of virus multiplication

○ The aim of this paper

- recombinant TK protein을 이용해서 ELISA를 개발하였다.

㉞ Materials and methods

○ Sera sample

- DPV-positive : 5 (inoculation of DPV Virulence Strain)
- DPV-negative : 35 (from ducks uninfected with DPV)
- suspected DPV-positive : 30 (suspected infectious DPV from clinical samples)
- specificity : DHBV, DHV, RA, E. coli, S. anatum.

○ Expression and purification of recombinant DPV TK protein

- The pET-32a(+)-Tk was transformed into E. coli BL21(DE3)
- the recombinant clones were selected on LB agar plates

- A single colony from the culture was inoculated into LB medium with ampicillin.
- Protein expression was induced at 37℃ by isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)
- The recombinant His-tagged protein were purified by nickel affinity
- The Western Blot assay 로 확인된다.

○ Procedures for the TK-ELISA

- The 96-Well Plates were coated with 100 μ l dilution of purified TK protein in sodium bicarbonate buffer (pH 9.6) \rightarrow 4℃ overnight.
- Antigen gradient dilution (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600)
- antisera gradient dilution (1:20, 1:40, 1:80, 1:160)
- washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20
- 100 μ l of blocking solution (1% BSA in PBST) for 60 min at 37℃ \rightarrow washed three times
- 100 μ l of positive and negative diluted sera respectively for 60 min at 37℃. \rightarrow washed three times
- anti-duck horseradish peroxidase secondary antibody (1:1000, 1:2000, 1:4000)
- incubated at 37℃ for 45 min. \rightarrow washed
- TMB) was added and incubation for 20min. at 37℃ \rightarrow stop sol. (H₂SO₄)
- Measure OD at 450 nm

○ The endpoint cut-off value

- The 30 duck-negative sera and the 0.01 M PBS was used for the blank control.
- Intra-day variability : 6 times on the same day
- Inter-day variability : 3 separate days
- The cut-off value : mean OD of duck-negative sera + 3 SDs

○ Analytical specificity and sensitivity of the TK-ELISA

- DHBV, DHV, R. A, E. coli, and S. anatum

○ Analytical repeatability and reproducibility of TK-ELISA

○ The coincidence rate among SNT, TK-ELISA and DPV-ELISA(virion)

○ Evaluation for the kinetics of antibody production using TK-ELISA and DPV-ELISA

- inoculating DPV subcutaneously with the attenuated live vaccine (20 ducks)
- days 0, 3, 5, 7 and week 2, 4, 6, 10, 14 after inocula

⊕ Results and discussion

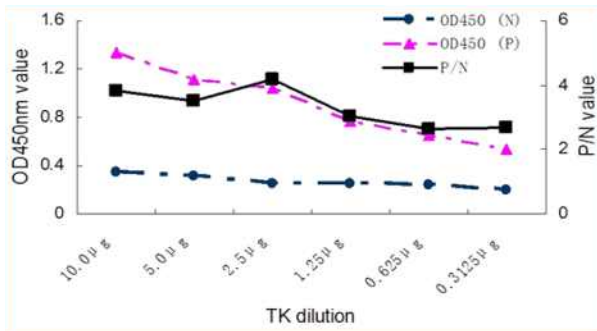


Figure 2 Serial dilution of antigens

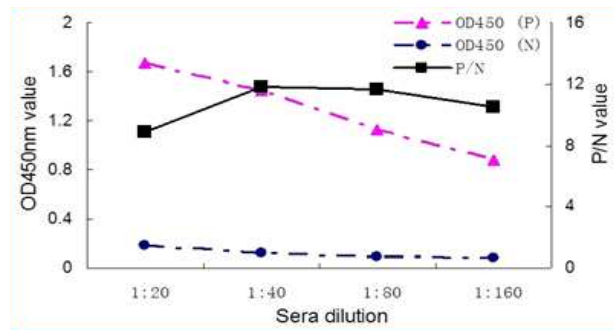


Figure 3 secondary antibody diluted to 1: 1000

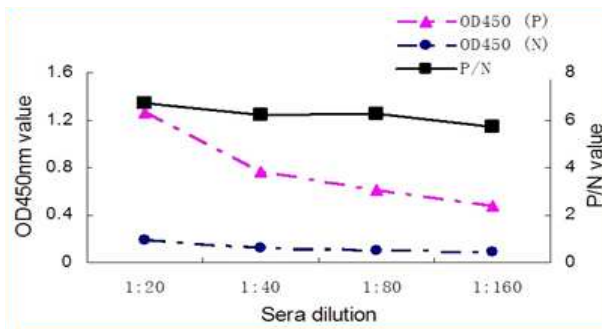


Figure 4 secondary antibody diluted to 1: 2000

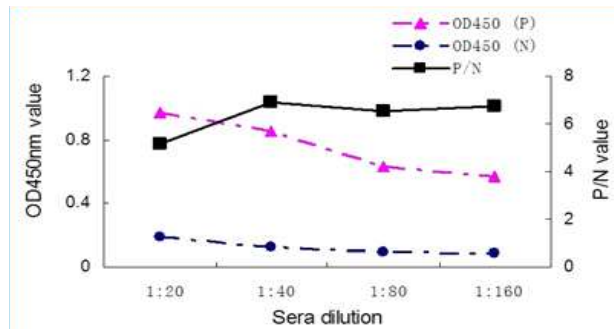


Figure 5 secondary antibody diluted to 1: 4000

2nd antibody	1st antibody		
	1:20	1:40	1:80
1:1000	1.1	1.5	1.45
1:2000	1.3	1.2	1.2
1:4000	0.8	1.0	0.9

- Optimization of ELISA Procedure
- 2.5 $\mu\text{g}/100\text{ ul}$ (1:200) (Fig. 2), 1:2000 and 1:80 (Fig. 4)
- The endpoint cut-off value
- Mean of duck-negative sera + 3 SDs
- $0.1211 + 3 \times 0.0409 = 0.2438$

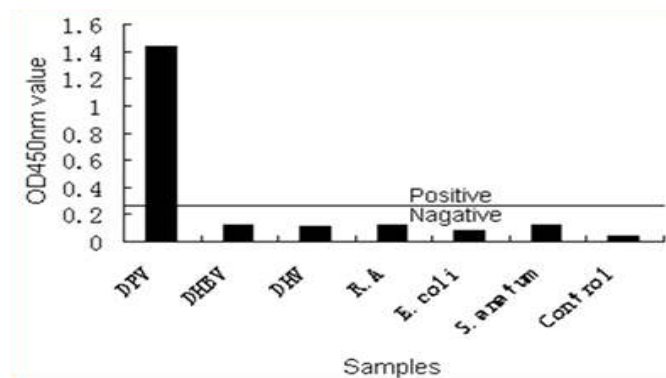


Figure 6 Analytical specificity of the TK-ELISA.

- DPV-positive sera : 1.398 and 1.432
- other samples : lower than 0.2438(cut off value)

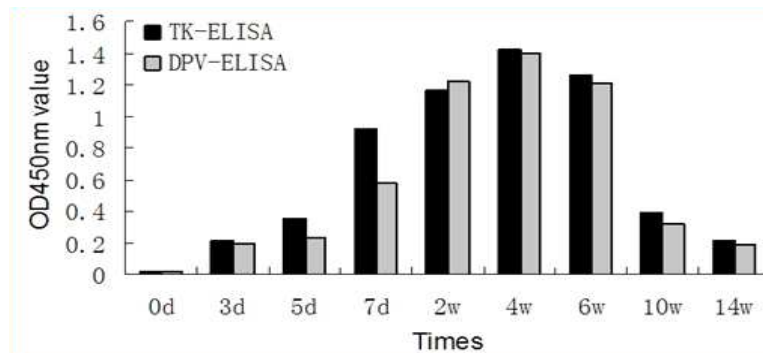


Figure 8 The kinetics of antibody production using TK-ELISA and DPV-ELISA

- TK-ELISA : 5day~4W(peak)
- DPV-ELISA : 7day~4W(peak)

Table 1: One positive serum sample with gradient dilution to evaluate the sensitivity of the TK-ELISA.

Dilution	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
OD450 nm	1.432	0.984	0.975	0.542	0.401	0.107	0.111
P or N	+	+	+	+	+	-	-

The sera-positive and sera-negative are marked with a plus (+) or a minus (-).

Table 2: The repeatability of the assay.

NO.	Number of replications						X	SD	C.V(%)
	1	2	3	4	5	6			
A	1.322	1.485	1.409	1.388	1.425	1.605	1.439	0.097	6.742
B	1.611	1.569	1.398	1.487	1.552	1.623	1.540	0.085	5.501
C	1.324	1.382	1.578	1.418	1.308	1.509	1.419	0.106	7.459

Table 3: The reproducibility of the assay.

Days	NO.			X	SD	C.V(%)
	A	B	C			
1	1.401	1.609	1.535	1.515	0.105	6.959
2	1.602	1.498	1.487	1.529	0.063	4.150
3	1.384	1.332	1.517	1.411	0.095	6.762

- the difference among 3 groups was not significant. low variability.

Table 4: The coincidence rate among SNT, TK-ELISA and DPV-ELISA for detection of antibodies to DPV.

TK-ELISA	SNT		DPV-ELISA		Total
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	22	5	24	3	27
Negative	0	3	0	3	3
Total	22	8	24	6	30

The coincidence rate was calculated by the formula: (no. of samples positive by both method + no. of samples negative by both methods)/ total no. samples × 100.

	TK-ELISA	SNT	DPV-ELISA
Positive rate	90% (27/30)	80% (24/30)	73.3% (22/30),
Coincidence rate (TK-ELISAwith)	-	83.33% (22+3/30)	90% (24+3/30)

- TK gene 은 gene-deleted vaccine의 target gene으로 쓰인다.
(Pseudorabies Virus, Bovine Herpesvirus)
- DPV에서 TK gene-deleted vaccine이 개발된다면 vaccine strain 과 wild-type DPV strain을 구별하는데 쓰일 수 있다.
- Optimal dilutions : antigen-2.5 ig/100 ul(1:200), 2nd antibody 1:2000.
- 백신 접종 후 antibody 생성을 보면 항체가 clear 하게 확인되는 것이 DPV-ELISA 보다 약 5일 빨랐다. 이는 TK gene 이 early genes 으로서 감염 후 이른 시기에 발현되어 immune recognition이 빠르기 때문일 수도 있다.
- In summary, the TK-ELISA manages to provide an new approach to screening and studying DPV, and this method could replace DPV-ELISA and SNT as an alternative, sometimes prove even more effective

② Recombinant UL16 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of duck viral enteritis. (Journal of Virological Methods, 2013)

㉠ Introduction

○ Serologic test in DEV

- whole DEV virion을 이용한 ELISA 개발되었다. → very difficult to purify
- recombinant thymidine kinase (TK) protein ELISA 개발되었다.

○ The aim of this paper

- serodiagnosis 를 위해 recombinant UL16 protein 을 이용한 an indirect ELISA (UL16-ELISA) method 를 개발하고자 한다.

Ⓞ Results and discussion

Table 1
The results of the repeatability assay for the UL16-ELISA.

Samples No.	Intra-assay			Inter-assay		
	Mean (X)	Standard deviation (SD)	Coefficients of variation (C.V%)	Mean (X)	Standard deviation (SD)	Coefficients of variation (C.V%)
A	1.276	0.0358	2.81	1.277	0.0337	1.64
B	1.239	0.0671	5.42	1.262	0.0417	3.30
C	1.331	0.0776	5.83	1.244	0.0740	5.95

Table 2
The determination of specificity for the newly developed UL16-ELISA.

Sera samples	DEV	DHBV	<i>S. anatum</i>	DSHDV	H5N1	DHV	RA	<i>E. coli</i>
OD value	0.962	0.147	0.170	0.243	0.201	0.112	0.154	0.146
Results	P	N	N	N	N	N	N	N

P, positive; the OD₄₅₀ value was higher than the cut-off value; N, negative, the OD₄₅₀ value was lower than the cut-off value.

Table 4
Relation between the results of the UL16-ELISA and the sera neutralization test.

UL16-ELISA	Sera neutralization test		
	Positives (+)	Negatives (-)	Total
Positives (+)	73	7	80
Negatives (-)	3	7	10
Total	76	14	90

- Optimization of ELISA Procedure
- 1.25 μ g/ml (1:80) and 1:160, 1:10,000.
- The endpoint cut-off value
- Mean of duck-negative sera + 3 SDs
- $0.442 + 3 \times 0.052 = 0.598$

[TK, UK16 조건 비교]

	TK	UL16	virion
antigen	2.5 μ g/100 μ l (1:200)	1.25 μ g/ml (1:80)	4.75 μ g/well
1st antibody	1:80	1:160	1 : 100
2nd antibody	1:2000 Horseradish peroxidase-labeled goat anti-duck IgG (KPL, Gaithersburg, USA)	1:10,000 Horseradish peroxidase-labeled goat anti-duck IgG (KPL, Gaithersburg, USA)	
cut-off value	mean OD of duck-negative sera + 3 SDs = 0.2438	mean OD of duck-negative sera + 3 SDs = 0.598	

㉔ Discussion

○ The UL16 protein

- viral structural proteins
- conserved throughout the herpesvirus family
- It plays an important role in viral DNA packaging, virion assembly, budding, and egress according to interaction with the C-capsid and other viral proteins

○ The UL16 protein

- DEV from different strains exhibited the same immunogenicity due to only a single antigenic type
- we believe that the recombinant UL16 antigen-based indirect ELISA for serological detection of DEV is theoretical and practical for epidemiological surveys and monitoring of antibody levels

(나) 오리장염바이러스 혈청검사법 조사 : 종합서적 및 OIE 시험서

No.	Source	Title	Ref.
1	Dis. Of poultry, 12 th	<p>- Increase in virus neutralization (VN) titers following convalescence from DVE will demonstrate progress of the disease within a flock.</p> <p>1. VN test(<i>CEF</i>) (Proc 71st Annu Meet US LivestSanit Assoc, 1967)</p> <p>- VN index</p> <p>① ≥ 1.75 이면 감염역가로 여김 ② 0-1.5 이면 노출된 적 없음</p> <p>- The use of chicken embryo-adapted virus in chicken eggs for VN studies is safer and more convenient than the use of field-strain viruses inoculated onto the CAM of duck eggs</p> <p>*The U.K. DVE vaccine strain was grown in CEF cells and gave good CPE within three days. (Veterinary Microbiology, 1999)</p>	<p>1. Proc 71st AnnuMeet US LivestSanitAssoc, (1967)</p> <p>2. Serologic procedures. In: Laboratory Manual for the Isolation, Identification and characterization of Avian Pathogens, 5th Edition (2008)</p> <p>2. ELISA</p> <p>3. Microtiter plate isolation</p> <p>4. Reverse passive emagglutination test</p> <p>5. Dot ELISA and passive HA</p>
2	OIE	<p>1. Immunological tests have little value in the diagnosis of acute infection.</p> <p>2. Butserum neutralisation tests in ovo and in vitro have been used to monitor exposure to the virus in wildfowl.</p> <p>3. The humoral response to natural infection with DVE virus is often low and antibodies may be short-lived (Docherty &Franson, 1992)</p> <p>4. it is assumed that cell-mediated immunity also plays a role in the infection(Richter &Horzinek, 1993).</p> <p>5. However, detection of neutralising antibodies to DVE virus in serum is possible.</p> <p>6. VN test using a constant-serum/varying-virus method may be performed in <i>chicken or duck embryos</i> by using embryo-adapted virus, or in cell cultures.</p> <p>7. For laboratories lacking duck embryos, serological diagnosis is possible by virus neutralisation, using a chicken embryo fibroblast adapted DVE strain and primary <i>chicken embryo fibroblasts(CEF)</i>.</p>	

(다) OIE 매뉴얼 시험법

No.	Source	Title	Ref.
1	OIE	<p><Manual></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cell : primary <i>MDEF or DEF</i> 2. 비동화된 50 μl serum을 96well plate에 serum-free MEM으로 2fold로 희석 3. 약 $10^{2.0}$ TCID₅₀/50 μl DVE virus(MEM) 각 well 에 첨가하여 37° C 에서 1 hr 반응 4. MEM(with 2 mM Lglutamine, 0.17% sodium bicarbonate, 10% FCS)에 suspension된 cell을 3×10^5 cells/ml로 준비 5. Cell을 100 μl 씩 각 well에 첨가 후 37° C, 5% CO₂에 최대 96 hr 동안 키움 6. Incubation동안 cell을 매일 관찰하고 마지막에는 10% formal-buffered saline으로 고정시킨 후 1% crystal violet으로 염색 후 현미경으로 관찰함 7. virus neutralising titer는 CPE가 나타나지 않는 최종 희석배수로 표현 8. 3 log₂ 미만은 보통 negative로 간주하며 8 또는 그 이상은 DVE virus에 노출된 적이 있다고 간주함 9. 많은 시료를 screening 하기 위한 간단한 실험으로는 serum : 1/10, virus : 100-200 TCID₅₀ 으로 실험가능 	1. OIE Terrestrial Manual (2016)

(라) VN test용 항원준비

① 바이러스 역가측정(1차)

㉠ cell : 1X10⁵/well(1차)

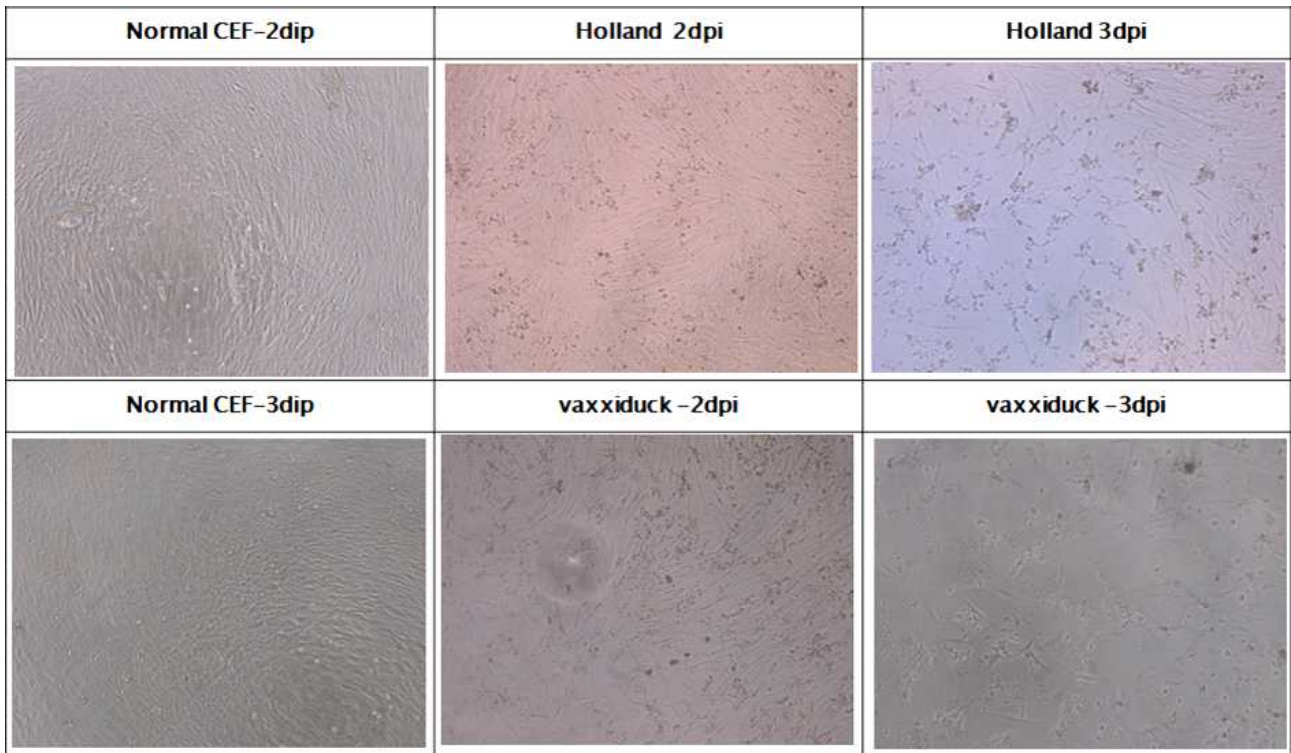
㉡ virus

○ Holland CCAM2, 0.1ml

○ Vaxxiduk CCAM1, 0.1ml

결과: CPE 발현 well수 / 접종 well수

Virus		10 ⁻¹	-2	-3	-4	-5	-6	Titer
Holland CCAM2	1DPI	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	10 ⁴ TCID ₅₀ /0.1ml
	2DPI	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	
	3DPI	4/4	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	
	4DPI	4/4	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	
Va0/40/4iduk CCAM1	1DPI	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	10 ^{5.5} TCID ₅₀ /0.1ml
	2DPI	4/4	2/4	2/4	0/4	0/4	0/4	
	3DPI	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	
	4DPI	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	



① 바이러스 역가측정 (2차)

㉞ cell : 8X10⁴/well (2차)

㉟ virus

○ Holland CCAM2, 0.1ml (freezing and thawing)

○ Vaxxiduk CCAM1, 0.1ml

Virus		10-1	-2	-3	-4	-5	-6	TCID ₅₀ /0.1ml
Holland CCAM2	1DPI	X	X	X	X	X	X	10 ² TCID ₅₀ /0.1ml
	2DPI	3/4	1/4	X	X	X	X	
	3DPI	4/4	2/4	X	X	X	X	
	4DPI	4/4	2/4	X	X	X	X	
Vaxxiduk CCAM1	1DPI	X	X	X	X	X	X	10 ⁴ TCID ₅₀ /0.1ml
	2DPI	3/4	2/4	1/4	X	X	X	
	3DPI	4/4	4/4	2/4	X	X	X	
	4DPI	4/4	4/4	2/4	X	X	X	

(마) DEV VN test

① 1차 시험

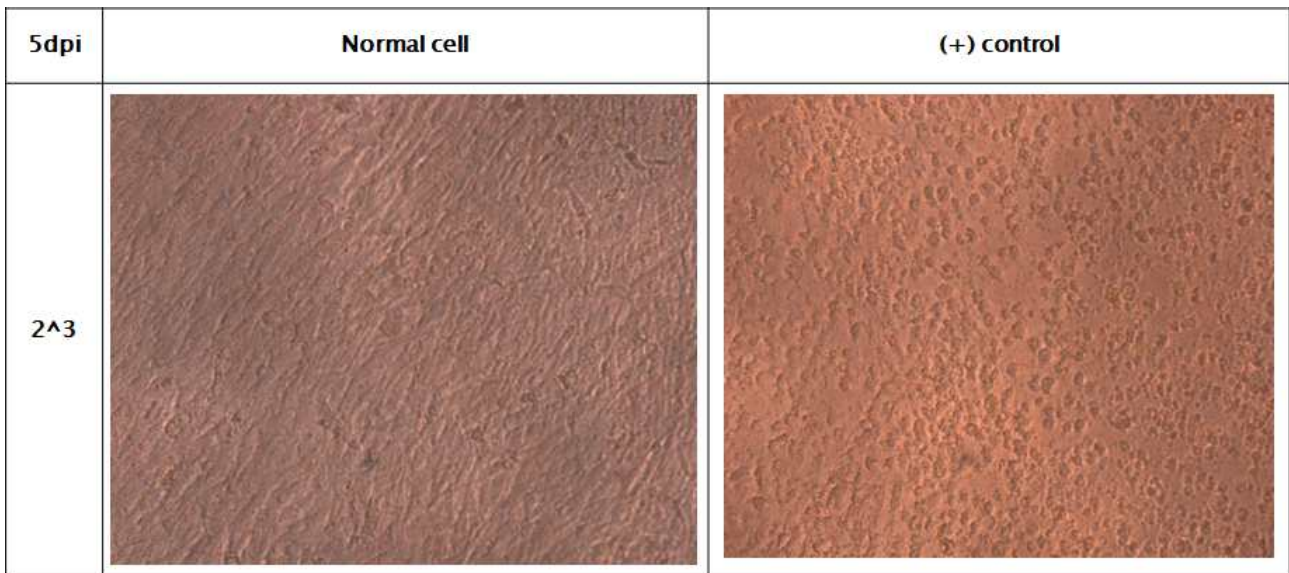
㉞ Protocol

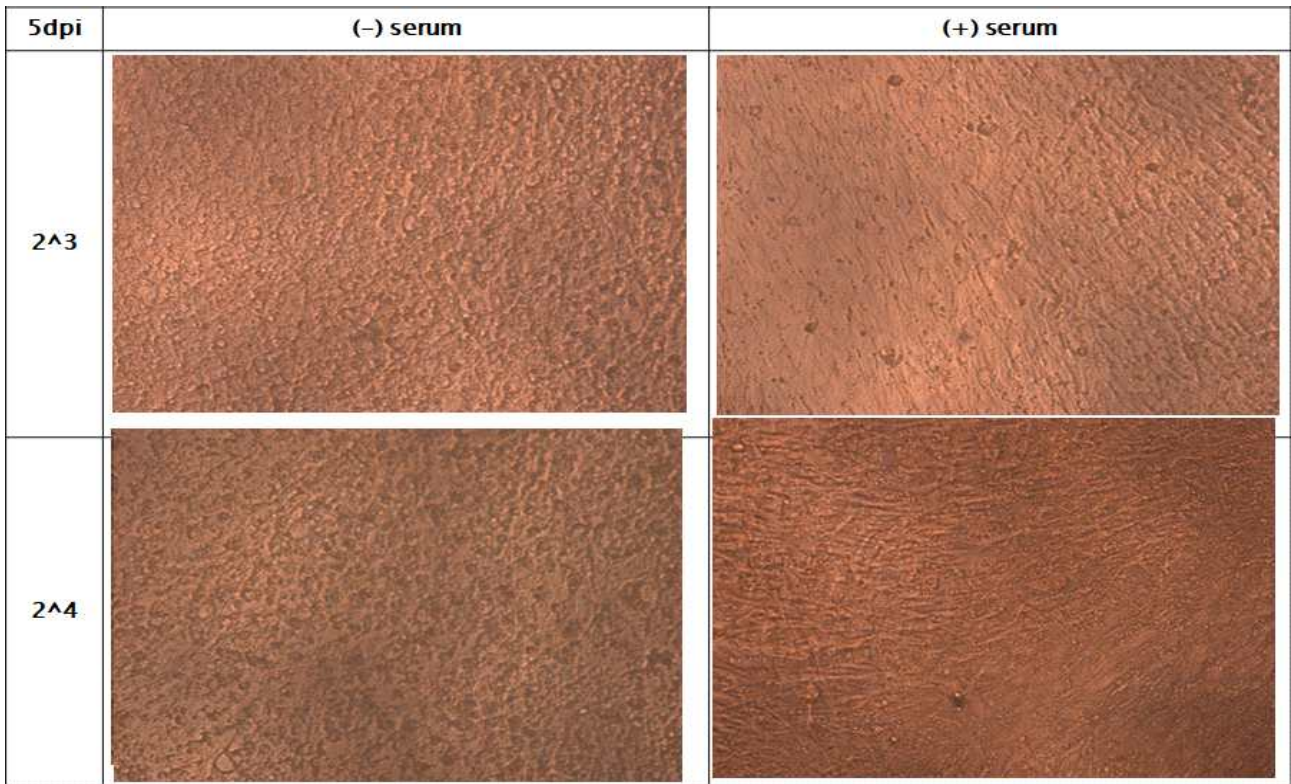
96 well plate 모든 well에 serum-free CEF 배지를 분주한다. 첫 번째 well에 비동화 된 50 μl serum을 넣고 2fold로 희석한다(21~28). 약 10^{2.0} TCID₅₀/50 μl DVE virus(MEM) 각 well에 첨가하여 37°C에서 1 hr 반응시킨다. Cell(primary CEF (9~10일령)을 5 × 10⁵ cells/ml로 준비한다 (5% CEF 배지). Cell을 100 ul 씩 각 well에 첨가 후 37°C, 5% CO₂에 최대 96 hr 동안 키운다. virus neutralising titer는 CPE가 나타나지 않는 최종 희석배수로 표현한다.

- cell : 1×10^5 /well
- virus(10배 희석)
 - Vaxxiduk CCAM1, 0.1ml
- Serum (21~28)
 - Positive: 33dpi duck
 - Negative: 26day duck

5dpi	2 ⁻¹	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
Positive control	O	O	O	O	O	O	O	O
	O	O	O	O	O	O	O	O
	O	O	O	O	O	O	O	O
	O	O	O	O	O	O	O	O
Positive serum	X	O	O	O	O	O	O	O
	X	O	O	O	O	O	O	O
	X	O	O	O	O	O	O	O
	X	O	O	O	O	O	O	O
Negative serum	O	O	O	O	O	O	O	O
	O	O	O	O	O	O	O	O
	O	O	O	O	O	O	O	O
Normal cell	X	X	X	X	X	X	X	X

CPE 양상과 Positive serum 역가를 볼 때 Virus 항원역가가 높았다(10배 희석 → 10, 50, 100 배 희석).





② 2차시험

- cell : 1X10⁵/well
- virus(10, 50, 100배 희석)
 - Vaxxiduk CCAM1, 0.1ml
- Serum (21~28)
 - Positive: 33dpi duck
 - Negative: 26day duck

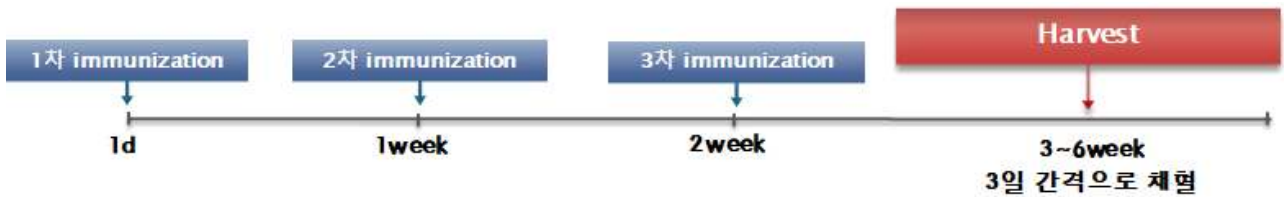
virus	10배								50배								100배							
5dpi	2 ₋₁	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	2 ₋₁	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	2 ₋₁	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
(+) control	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
(+) serum	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○	○	×	×	×	○	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	○	○	○	○	
(-) serum	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Normal	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		

(바) DEV 항혈청 제작(chicken)

① 실험계획

Strain	No. of chicken	Route	Dose	Virus 준비
Holland 3CCAM 2CEF, 2dpi	3	IM		① CEF에 바이러스 증식 ② 2500rpm 10min → 18,000rpm 2hr 30min ③ pellet을 resuspention후 0.2% formalin 처리 ④ 24hr. 37°C 에서 shaking ⑤ ISA70 오일과 1:1으로 섞어서 1ml(가슴, 다리) 접종

② 항혈청 제작 방법



(4) 오리리메렐라 항체검사법 확립(ELISA)

(가) 오리리메렐라(RA) protein coating

①-1. RA protein 제조방법

TSB 10ml에 순수분리 된 RA T1(S1) 또는 D10-기타-1(S2) 단일 colony를 접종하여 24시간 shaking incubator에서 배양한다(15ml conical tube 세 개를 준비하여 총 30ml을 키운다. OD: 0.8~1.0, CFU: 1x10¹⁰/mL). 3,000rpm, 10min centrifuge 후에 PBS 10ml에 washing 한다. conical tube 한 개당 1~2ml에 균을 풀어준다. Freezing and thawing 5회 실시한다. Ice bath에 꽂은 후 ultrasonication(기기매뉴얼 151118-서혜숙-sonicator 작동법 참고)을 15초 작동 15초 휴식으로 총 15분 동안 30 cycles을 실시한다(maximum amplitude). 13,000rpm, 10min centrifuge 실시하였다. 0.22 μm 로 filtering 후 BSA로 농도를 측정한다.

①전원을 켜다.



②Timer를 눌러 시간을 설정한다.



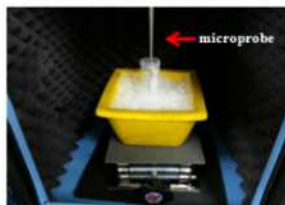
③Pulse를 눌러 on/off 시간을 설정한다.



④ AMP를 눌러 amplitude(bacteria인 경우 20-25%로 설정)를 설정한다.



⑤ Ice에 conical tube(시료)를 꽂은채 conical tube에 probe를 넣는다.



⑥문을 닫고 start를 눌러 시작한다.

⑦sonication이 끝나면 conical tube에 DW를 넣고 5-10초간 작동시켜 세척하고 김와이프로 조심히 닦는다.

①-2. Protein 농도측정 (BCA Protein assay kit 이용)

㉞ Diluted Albumin (BSA) Standards의 준비

다음 표와 같이 protein standards를 준비한다. 이 Kit 가 제공하는 2 mg/ml 농도의 Albumin Standard 1ml ampule은 아래 표의 protein standard를 준비하는데 충분한 양임을 알 수 있다. 아래 표의 Diluted Albumin (BSA) Standards를 준비한다. Standard test Tube와 Microplate Procedure를 위한 Dilution Scheme(Working Range = 20~2,000 µg/ml)

Vial	Volume of Diluent(DW)	Volume and Source of BSA	Final BSA Concentration
A	0	300 µl of Stock	2,000 µg/ml
B	125 µl	375 µl of Stock	1,500 µg/ml
C	325 µl	325 µl of Stock	1,000 µg/ml
D	175 µl	175 µl of vial B dilution	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl of vial C dilution	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl of vial E dilution	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl of vial F dilution	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl of vial G dilution	25 µg/ml
I	400 µl	0	0 µg/ml = Blank

㉟ BCA Working Reagent (WR)의 준비

필요한 WR의 total 양을 구하기 위해 다음 공식을 따른다.

(standards 수 + sample 수) x (실험 반복 횟수) x (sample 당 WR의 양a) = 필요한 WR의 total 양
 ※ a)sample 당 필요한 WR의 양은 Test-tube 방법에서는 2 ml, microplate 방법에서는 200 µl 이다.
 → standards 수 : 10 / sample 수 : 2 / 실험 반복 횟수 : 3 / sample 당 WR의 양a : 200 µl
 = WR의 total 양 : 7,200 µl

kit에 들어있는 BCA Reagent A 50 parts와 BCA Reagent B 1 parts를 mixing 하여 준비한다. 예를 들어, Reagent A를 50 ml 준비하면 Reagent B는 1 ml 준비한다.

※ WR는 RT에서 밀폐된 용기에 보관할 시, 수일간 stable 한다.

→ Total : 10ml → 10ml 200ml A:B (50:1)

㊱ Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8)

위 standard 준비과정에서 준비한 standard 25 µl와 농도를 구하고자 하는 sample (replicate 포함) 25 µl를 각각 microplate well로 옮긴다. 각 well 마다 WR 200 µl를 첨가하고 plate를 s haker에서 30 sec 간 잘 섞어준다. plate를 덮고, 37 °C, 30 min 동안 incubation 한다. RT에서 plate를 식힌다. 562 nm에서 흡광도를 측정한다(※ 이 방법은 540~590 nm 사이의 파장에서 흡 광도를 측정해도 무방하다.)

①-3. RA protein coating 방법

RA protein을 0.05M carbonate buffer에 100ng/50 μ l(well)이 되도록 희석하여 준비한다.

※ 100ng/50 μ l : 100배 희석 ex) 50 μ l(RA protein)+5ml(0.05M carbonate buffer)
*ex)1000 μ g/mL(RAT1: 140125): 500배 희석(10 μ l(RA protein)+5ml(0.05M carbonate buffer)
ex)200 μ g/mL(D10-기타-1: 160315): 100배 희석(50 μ l(RA protein)+5ml(0.05M carbonate buffer)

96well Plate에 50 μ l 분주 후 4 $^{\circ}$ C 에서 over night. 0.05% PBS-tween 20으로 300 μ l 분주하여 plate를 washing 3회 실시한다.

② Blocking

3% skim milk (in 0.05% PBS-tween 20)를 150 μ l 분주 후 실온에서 1시간 반응시킨다. 0.05% tween 20으로 300 μ l 분주하여 plate를 washing 3회 실시한다.

③ 1st antibody 준비

3% skim milk에 희석한 1st antibody(serum)를 100 μ l 분주 후 37 $^{\circ}$ C 에서 1시간 반응시킨다(※ 1st antibody 희석배수 : 2000배 희석 ex) 5 μ l : 10ml). 0.05% tween 20(부기 2)으로 300 μ l 분주하여 plate를 washing 3회 실시한다.

④ 2nd antibody 준비

2nd antibody(goat Anti-Duck IgG) 을 3% skim milk에 1000배 희석하여 준비한다. 희석한 2nd antibody를 100 μ l 분주 후 37 $^{\circ}$ C 에서 1시간 반응시킨다. 0.05% tween 20으로 300 μ l 분주하여 plate를 washing 3회 실시한다.

⑤ substrate(TMB+TMB buffer) 반응

TMB와 TMB buffer를 혼합한 후 즉시 plate에 100 μ l 분주 후 실온에서 10분 반응시킨다(※ TMB:TMB buffer=1:99(100배 희석)으로 혼합하고 반응 시 반드시 빛을 차단시킨다.).

⑤-1. TMP 제조방법

TMB 7.04g(80mg)을 DMSO 440ml(5ml)에 완전하게 녹인다. 증류수 220ml(2.5ml)과 DMSO 200ml(2.5ml)를 섞는다. 갈색 Bottle에 섞는다. Disposal pipette으로 호일로 씌운 1.5ml eppen tube에 1ml씩 분주한다.

⑤-2. TMB buffer(substrate buffer) 제조방법

증류수 40,000ml(160ml)에 sodium acetate 410.4g(1.64g)을 저울에 달아 용해시킨다. 2M Citric acid를 첨가하면서 pH4.5로 적정한다(powder 형태의 citric acid를 소량씩 첨가하면서 pH 적정해도 된다.). 증류수로 최종 50,000ml(200ml)를 맞춘다. 분주 직전 35% Hydrogen peroxide(H₂O₂) 14.3ml(28.6 μ l)을 넣고 잘 섞는다. 제조된 용액을 0.45 μ m filter로 여과하며 갈색 bottle에 담는다.

⑥ stop solution(4.5N H₂SO₄)를 25 μ l 분주한다.

⑥-1. stop solution(H₂SO₄) 제조방법

220.5ml H₂SO₄를 D.W 1L(final vol.)에 피펫으로 천천히 분주한다. 발열반응이므로 Ice에 병을 꽂아 놓고 분주한다.

⑦ ELISA reader(Perkin Elmer)로 450nm에서 흡광도를 측정한다.

⑧ 실험결과

㉔ 실험 1. Serotype 2 IgG ELISA

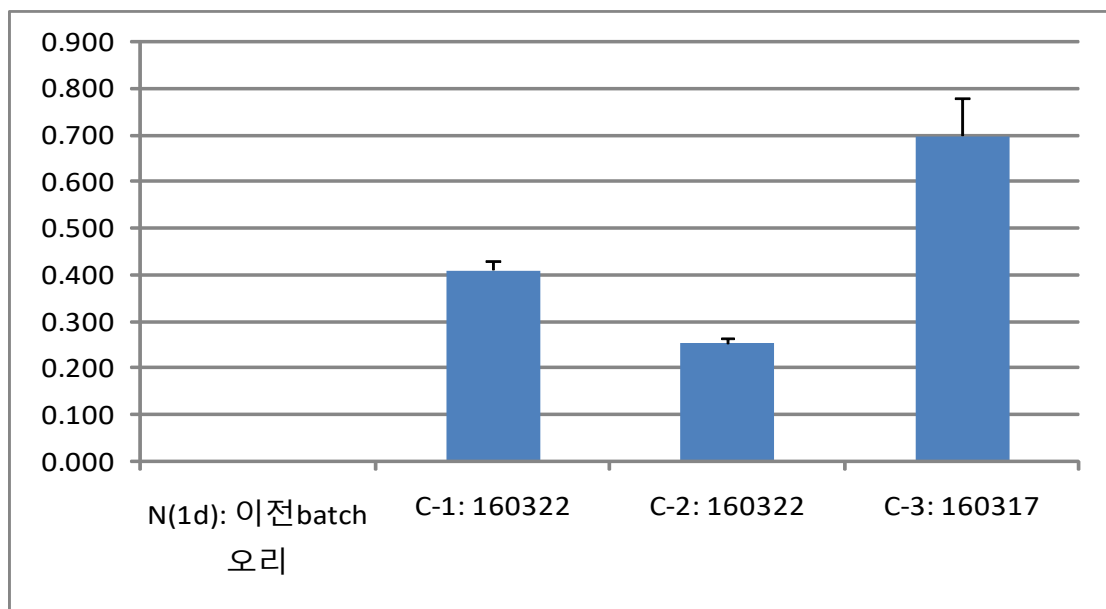
○ 항원: D10-기타-1 protein(serotype 2, whole, sonication)

○ 1차 항체

- Negative : N(1-day-old duck) : 1-day-old duck serum

- Positive: Duck 5-week-old serum

	OD-blank Mean	SD	MAT(2 ²)
N(1-day-old duck)	0.002	0.00063305	0
C-1: 160322	0.411	0.02060011	1
C-2: 160322	0.253	0.01323023	1
C-3: 160317	0.699	0.08165746	5



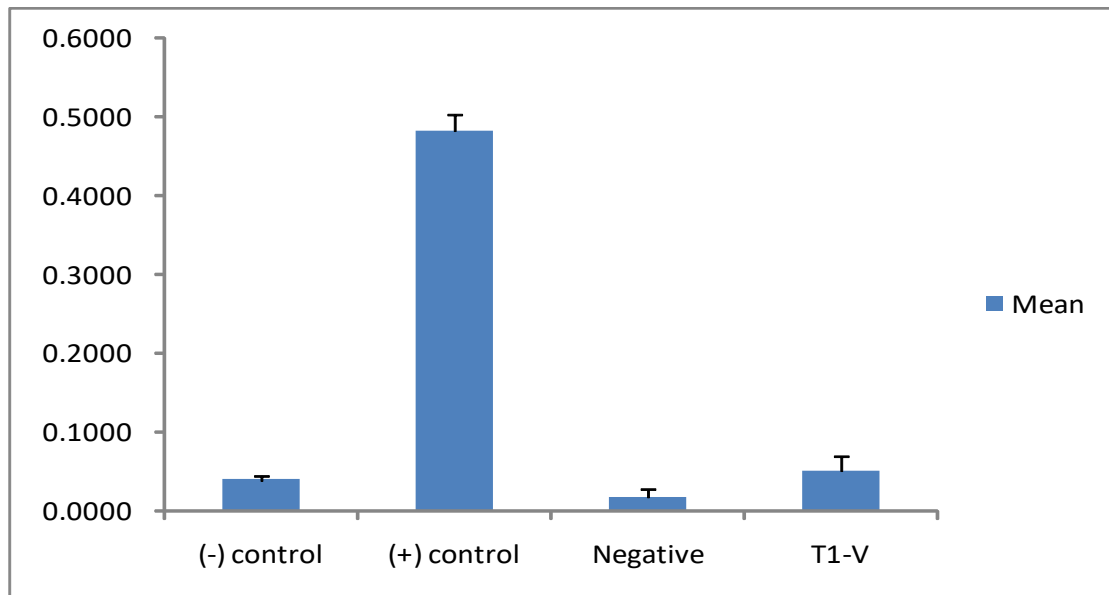
○ IgG ELISA (serotyp 2) 최종결론

오리에서는 백신 후 IgG 항체가 형성이 잘 안되어 ELISA로 방어 정도를 평가할 수 없다. 주령이 높아질 수록 Negative의 OD 값이 증가하기 때문에 vaccine 한 그룹과 구분이 안 된다. 단, vaccine을 하지 않은 1주령 이하의 어린 일령의 경우 낮은 OD값을 보인다. 주령에 따라 Negative의 OD 값이 증가하기 때문에 negative cut off를 산정할 수 없어 야외시료의 항체 유무를 판단하기 어렵다.

㉔ 실험 2. Serotype 1 IgG ELISA

- (-) control : Normal 5-week-old duck serum
- (+) control : 5-week-old (3-week-old IM RAT1 challenge, serotype 1) serum
- Negative : Normal 3-week-old duck serum
- T1-V : 3-week-old duck serum (1/7-day-old aerosol T1-V vaccine)

	Mean	SD
(-) control	0.0391	0.0050
(+) control	0.4834	0.0206
Negative	0.0172	0.01068
T1-V	0.0499	0.020395



○ IgG ELISA (serotyp 1) 최종결론

serotyp 2형과 마찬가지로 백신 후 IgG 항체가 형성이 잘 안되어 ELISA로 방어 정도를 평가할 수 없다. 주령이 높아질 수록 Negative의 OD 값이 증가하기 때문에 vaccine 한 그룹과 구분이 안 된다. 단, vaccine을 하지 않은 1주령 이하의 어린 일령의 경우 낮은 OD값을 보인다. 주령에 따라 Negative의 OD 값이 증가하기 때문에 negative cut off를 산정할 수 없어 야외시료의 항체 유무를 판단하기 어렵다.

㉔ IgG ELISA 최종평론

ELISA에서도 RA 항체 확인이 가능하나 오리의 주령이 증가할수록 negative 오리에서도 vaccine한 그룹과 동일하게 높은 OD값을 보여 3~4주령 이상부터는 ELISA로 항체를 측정하기 어렵다. 야외시료의 RA 항체검사도 마찬가지로 오리의 주령이 높아질수록 Negative의 OD 값이 증가하기 때문에 negative cut off를 산정할 수 없어 야외시료의 항체 유무를 판단하기 어렵다.

다. 시료뱅크 확보 (항혈청 제작 및 확보)

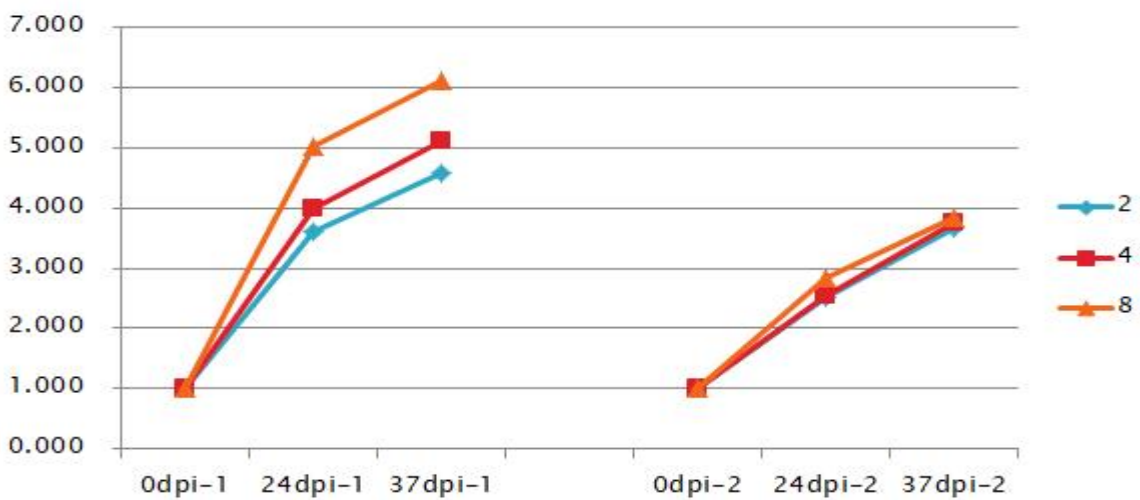
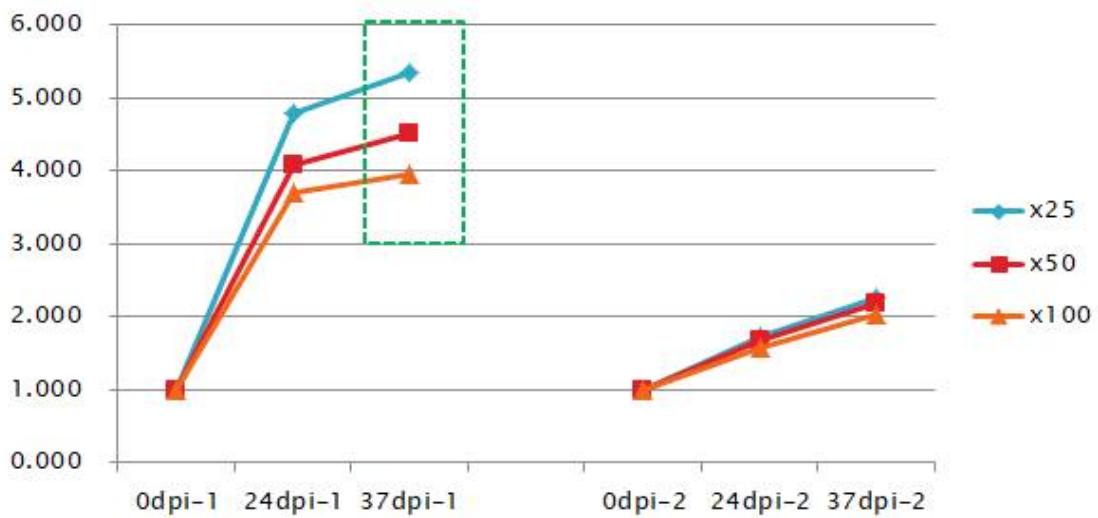
(1) 오리장염바이러스 항혈청 확보

(가) DEV 항혈청 제작 (chicken)

① ELISA 평가결과 (result = P/N)

Whole virus	x25	x50	x100
0dpi-1	1.000	1.000	1.000
24dpi-1	4.793	4.093	3.697
37dpi-1	5.344	4.524	3.949
0dpi-2	1.000	1.000	1.000
24dpi-2	1.732	1.677	1.585
37dpi-2	2.264	2.183	2.035

Protein	2	4	8
0dpi-1	1.000	1.000	1.000
24dpi-1	3.600	3.993	5.025
37dpi-1	4.583	5.119	6.113
0dpi-2	1.000	1.000	1.000
24dpi-2	2.505	2.548	2.832
37dpi-2	3.683	3.761	3.842



② DEV VN test 결과 (chicken serum)

㉞ cell : 1X105/well

㉞ virus (500, 1000배 희석)

○ Vaxxiduk CCAM1 111007

㉞ Serum (21~28)

○ Positive: 37dpi chicken

○ Negative: SPF duck

virus	10배								50배							
	(+) control	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	○
5dpi	2 ⁻¹	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	2 ⁻¹	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
(+) serum	-	-	-	-	○	○	○	○	-	-	-	○	○	○	○	○
	-	-	-	-	○	○	○	○	-	-	-	○	○	○	○	○
(-) serum	-	-	-	-	×	×	×	×	-	-	×	×	×	×	×	×
	-	-	-	-	×	×	×	×	-	-	-	×	×	×	×	×
Normal	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

(나) DEV 항혈청 확보현황

① 확보현황 (SPF chicken)

㉞ DEV-W

번호	Vol.(ml)	VN titer
1	6	640
2	2	640
3	4	640
4	5	640
5	6	ND
6	8	ND
7	10	ND
8	15	ND
9	14	ND
10	4	640(10x26)
Total	74	

㉞ DEV-B

번호	Vol.(ml)	VN titer
1	8	ND
2	4	ND
3	5	ND
Total	17	

ND : not done

② VN test (CEF)

㉠ cell : CEF 5X104/well

㉡ virus (500배 희석)

○ Vaxxiduk CCAM1 111007

㉢ Serum (1/10 희석 후 시작, 180 μ l serum free medium+20 μ l serum)

○ Positive: 140923(37dpi), 141015 SPF chicken

○ Negative: 0dpi SPF chicken

5dpi	2 ⁻¹	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12
(+) control	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
0dpi	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
37dpi	×	×	×	×	×	×	O	O	O	O	O	O
	×	×	×	×	×	×	×	O	O	O	O	O
59dpi	×	×	×	×	×	×	O	O	O	O	O	O
	×	×	×	×	×	×	O	O	O	O	O	O
Normal	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

③ VN test (DEF)

㉠ 1차 시험

○ cell : DEF 5X104/well

○ virus (500배 희석)

- Vaxxiduk CCAM1

○ Serum (1/10 희석 후 시작, 180 μ l serum free medium+20 μ l serum)

- Positive: 37dpi(SPF chicken)

- Negative: 0dpi(SPF chicken)

㉡ 2차 시험

○ cell : DEF 5X104/well

○ virus (500배 희석)

- Vaxxiduk CCAM1

○ Serum (1/10 희석 후 시작, 180 μ l serum free medium+20 μ l serum)

- Positive: 59dpi

- Negative: 0dpi SPF chicken

5dpi	2 ⁻¹	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12
(+) control	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0dpi	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
59dpi	×	×	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○
	×	×	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○
Mix	×	×	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○
	×	×	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○
Normal	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

(2) 오리리메펠라 항혈청 확보

(가) 항혈청(Serum) 제조

- ① MAT용 항원균주 : RA T1(S1)/RA T7(S7)
- ② 항원 제조용 배지 : Blood agar plate, Tryptic soy broth (TSB)
- ③ Washing buffer : Phosphate buffered saline (1xPBS)
- ④ 종균배양 : RA T1, RA T7을 blood agar plate에 접종하여 37°C, CO2 incubator 에서 36시간 배양 후 7mL TSB에 단일콜로니를 접종하여 15h 배양하였다(OD: 0.4, CFU: 1x10⁹/mL).
- ㉠ 균 배양액 1ml + Formalin 3 μ l (final concentration 0.3%) : 균을 고정하기 위해 Formalin 사용하였다.
- ㉡ overnight
- ㉢ adjuvant : ISA760VG
- ㉣ 1.5ml 근육접종 (0.7ml 대퇴부 + 0.7ml 가슴근육)
 - 항혈청 제작 : 6~7주령 닭에 *Riemerella anatipestifer* 1형, 7형을 1.5ml씩 근육접종 (접종액 역가 : 10⁸CFU/dose)하여 1차접종 3주차에 2차 접종, 2차 접종 2주차에 3차 접종 한 다음, 3차 접종 2주 후에 심장채혈하여 혈청을 수거하였다.



3. 고감도 항원검사용 휴대형 진단기 유효성 평가 및 기존 진단법과의 상관성 규명

가. DHAV-1 항원검사용 휴대형 진단기 평가

(1) 특이도 평가

(가) 닭 및 오리 종란의 요양막액 평가

Chicken AC negative sample

Egg No.	DHAV-1 kit	
	COI	Result
1	10.20	+
2	5.26	+
3	5.87	+
4	6.24	+
5	5.24	+
6	5.02	+
7	5.93	+
8	5.04	+
9	5.16	+
10	5.66	+
Average	5.96	+
SD	1.47	
Buffer (애니벳)	0.18	-

Duck AC negative sample

Egg No.	DHAV-1 kit	
	COI	Result
1	22.66	+
2	21.49	+
3	20.99	+
4	22.80	+
5	20.72	+
Average	21.73	+
SD	0.85	
Buffer (애니벳)	0.18	-

- 시험에 공시한 모든 닭 및 오리 종란의 요양막액(AC액, 음성대조)에 대해 비특이 반응을 확인
- 특히 오리 종란 시료에서 더 높은 역가를 보여 비특이 반응이 심한 것으로 확인됨

(나) 닭 및 오리 초대배양세포 평가

Chick embryo fibroblasts (CEF) cell

No.	Sample	DHAV-1 kit	
		COI	Result
1	CEF cell-1 (negative)	53.8	+
2	CEF cell-2 (negative)	43.26	+
3	CEF cell-3 (negative)	44.21	+
4	CEF cell-1 (DEV(+))	39.57	+
5	CEF cell-2 (DEV(+))	40.5	+
6	CEF cell-3 (DEV(+))	34.07	+
7	Average	42.6	+
8	SD	6.6	

Duck embryo liver (DEL) (culture for 5 days)

Sample	DHAV-1 kit	
	COI	Result
Buffer	0.25	-
DEL cell-1	46.25	+
DEL cell-2	35.93	+
DEL cell-3	51.21	+
DEL cell-4	38.10	+
DEL cell-5	37.5	+
Average	41.80	+
SD	5.92	

- 시험에 공시한 모든 닭 및 오리 세포배양액(음성대조)에 대해 비특이 반응을 확인

(다) 다른 가금질병 병원체 대상 특이도 평가

Other virus replicated in chicken embryo or CEF cells

Sample (Virus isolation method)	DHAV-1 kit	
	COI	Result
Duck virus enteritis-DEV (CEF)	12.85	+
Newcastle disease virus-NDV (AC)	40.38	+
Avian influenza virus-AIV (AC)	56.62	+
Buffer (애니벳)	0.27	-

- DEV, NDV, AIV 감염 세포배양액 및 종란 영양막액에 대해 비특이 반응 확인
- 위 결과들을 종합해 볼 때, DHAV-1 항원검사 키트의 경우 종란 AC액이나 DEF세포 배양액에 비특이 반응함으로써 특이도에 문제가 있는 것으로 판단됨
- 결과를 애니벳과 공유하고 이를 보완할 수 있는 방안 모색 중

나. DHAV-3 항원검사용 휴대형 진단기 평가

(1) 특이도 평가

(가) 다양한 음성시료 및 타 병원체(바이러스 및 세균) 대상 특이도 평가

DHAV-3 specificity test

No.	Sample (Strain, titer)		ichroma™	
			Value	Result
1	Control (negative)	PBS	0.6	-
2		Buffer (애니벳)	0.63	
3	Virus culture system (4)	Allantoic cavity (AC) fluid	0.48	-
4		Chick embryo fibroblasts (CEF) cells	0.64	-
5		Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells	0.36	-
6		Duck embryo liver (DEL) cells	0.61	-
7	Virus (4)	Newcastle disease virus (LaSota, 2 ⁸ HA)	0.54	-
8		Duck hepatitis A virus type 1 (DRL-62, 4.3 ELD ₅₀ /mL)	0.62	-
9		Duck enteritis virus (Holland, 7.45 ELD ₅₀ /mL)	0.52	-
10		Influenza virus (NWS, 8.3 EID ₅₀ /mL)	0.54	-
11	Bacteria (9)	<i>E. coli</i> (25922, 10 ⁹ CFU/mL)	0.62	-
12		<i>Salmonella</i> Typhimurium (14028, 10 ⁹ CFU/mL)	0.63	-
13		<i>Salmonella</i> Gallinarum (9184, 10 ⁹ CFU/mL)	0.66	-
14		<i>Salmonella</i> Pullorum (19945, 10 ⁹ CFU/mL)	0.63	-
15		<i>Salmonella</i> Enteritidis (12021, 10 ⁹ CFU/mL)	0.61	-
16		<i>Riemerella anatipestifer</i> serotype 1 (RA21, 10 ⁹ CFU/mL)	0.68	-
17		<i>Staphylococcus aureus</i> (25923, 10 ⁹ CFU/mL)	0.6	-
18		<i>Clostridium perfringens</i> Type C (3628, 10 ⁹ CFU/mL)	0.58	-
19		<i>Pasteurella multocida</i> serotype 1 (BA0001832, 10 ⁹ CFU/mL)	0.61	-

- 버퍼, 종란 AC액, 닭 및 오리 세포배양액 등 키트에 영향을 미칠 수 있는 시약 및 음성 시료에 대해 비특이 반응이 없는 것으로 확인됨
- 주요 가금질병 병원체(바이러스 4종, 세균 9종) 대상 검사시 비특이 반응이 없는 것으로 확인됨
- DHAV-3형 항원진단 키트의 경우 특이도에 문제가 없는 것으로 평가됨

(2) 민감도 평가

(가) 다양한 DHAV-3형 분리주 대상 민감도 평가

Detection DHAV-3 by ichroma in DHAV-3 positive (rt-PCR) samples

No.	Sample	rt-PCR (ct value)	ichroma (DHAV-3)	
			COI	Result
1	AP-04114-CE3 Du1 (liver)	15	1.21	+
2	AP-04203-CE4-Du1 (liver)-CE1	16	0.95	+
3	AP-04114-CE3 Du1 (spleen)	18	1.01	+
4	AP-04203-CE4-Du1 (liver)	19	1.18	+
5	AP-03337-CE3 Du1 (spleen)	19	1.07	+
6	AP-04203-CE1	20	0.5	-
7	AP-04203-CE4	20	0.57	-
8	AP-04009-CE5	20	0.78	-
9	AP-03337-CE2	20	1.88	+
10	AP-03337-CE3	20	2.55	+
11	AP-04203-CE4-Du1 (spleen)	21	1.29	+
12	AP-03337-CE3 Du1 (liver)	21	1.16	+
13	AP-04114-CE3	21	0.34	-
14	AP-04009-CE3-Du1 (liver)	24	1.27	+
15	AP-04009-CE4	27	0.59	-
16	AP-04009-CE3-Du1 (spleen)	27	1.31	+
17	AP-04009-CE3 (5-28)	28	0.63	-
18	AP-04009-CE3 (5-23)	29	0.47	-

Detection DHAV-3 by ichroma in DHAV-3 positive samples

ichroma (DHAV-3)		No. (%)	rt-PCR (ct value)
Result	COI		
Positive (+)	0.95-2.55	11 (61.1)	+
Negative (-)	0.34-0.78	7 (38.9)	+

- 국내 대표분리주 4종의 양성시료(종란, 간, 비장 등) 18건에 대해 민감도 평가 결과, 61.1%의 검출율을 보였음
- qPCR 결과(ct값)와의 상관성은 없는 것으로 판단됨. qPCR 검사결과, 바이러스 copy수가 높아도 음성인 경우가 있거나, 상대적으로 낮은 시료에서 양성으로 확인된 경우가 있었으며. 바이러스 copy수와 COI 값과의 상관성도 없었음

(나) 최소검출 한계 평가

① qPCR 기준

ichroma sensitivity test(qPCR ct value)

No.	Sample		rt-PCR (ct value)	ichroma (DHAV-3)	
				COI	Result
1	AP-04203-CE4-Du1(spleen)	원액	16.82	1.29	+
2		2x dilution	17.53	0.58	-
3		4x dilution	18.54	0.58	-
4		8x dilution	19.36	0.46	-
5		16x dilution	19.95	0.78	-
6	AP-03337-CE3	원액	18.8	2.55	+
7		2x dilution	19.87	0.56	-
8		4x dilution	20.85	0.74	-
9		8x dilution	21.85	0.59	-
10		16x dilution	23.69	0.62	-

- 분리주별로 LOD값이 다소 차이가 있지만 ct 값 18.8 이하 일 수 있음
- 다만 ct value 와 COI 값의 상관성이 없어 정확한 LOD 값 설정이 불가했음

② ELD₅₀ 기준

ichroma sensitivity test(ELD₅₀)

	Sample	ELD ₅₀ /ml (log)	Test (Individual tube)	ichroma	
				COI	Result
1	DHAV-3 (AP-04203-CE4-Du1-CE1)	4.2	1	0.92	+
2			2	0.97	+
3			3	0.95	+
4	Buffer (애니벳)			0.63	-

- 보유하고 있는 3형 바이러스 시료를 대상으로 민감도 평가 결과, LOD값은 4.2 ELD₅₀/m 1 역가로 확인됨

(3) 임상검체 대상 유효성 평가

(가) 오리 분변시료 대상 유효성 평가

- DHAV-3형(AP-04203)을 오리에 인공감염시킨 개체 6수 또는 접촉감염 시킨 개체 2수로 부터 얻은 임상검체(분변시료)를 대상으로 개발기기 유효성 평가를 진행함

Ichroma –clinical duck feces samples

rt-PCR	Ichroma result (No./%)	
	Positive	Negative
Positive (n=16)	3 (18.8)	13 (81.3)
Negative (n=9)	0	9 (100)
Total (n=25)	3 (12.0)	22 (88.0)

- qPCR 검사결과, 접종 후 6일째까지는 모든 개체(접촉감염 개체 포함)에서 양성을 보였으며, 접종후 10일째에는 6개체 중 5개체에서 양성으로 확인됨(접촉감염 2개체는 음성)
- 양성시료 16건에 대해 개발기기 평가 결과, 양성결과는 3건(18.8%)으로 확인됨
- 음성시료 9건은 모두 음성으로 확인되어 분변 임상검체에 대한 비특이 반응은 없었음

다. DEV 항원검사용 휴대형 진단기 평가

(1) 민감도 평가

(가) DEV감염 CEF 시료 대상 민감도 평가

Detection CEF cultured DEV by DEV kit

No.	Sample	DEV kit	
		COI	Result
1	Buffer(애니벳)	0.28	-
2	CEF cell-1 (negative)	0.37	-
3	CEF cell-2 (negative)	0.42	-
4	CEF cell-3 (negative)	0.42	-
5	CEF cell-4 (negative)	0.27	-
6	CEF cell-5 (negative)	0.31	-
7	CEF cell-1 (DEV-1(+))	0.31	-
8	CEF cell-2 (DEV-1(+))	0.32	-
9	CEF cell-3 (DEV-1(+))	0.28	-
10	CEF cell-4 (DEV-1(+))	0.37	-
11	CEF cell-5 (DEV-1(+))	0.28	-

CEF cell samples (culture for 5 days)

Detection CEF cultured DEV by DEV kit

No.	Sample	DEV kit		DEV PCR
		COI	Result	
1	Buffer(애니벳)	0.32	-	-
2	CEF cell-1 (negative)	0.37	-	-
3	CEF cell-2 (negative)	0.42	-	
4	CEF cell-3 (negative)	0.42	-	
5	CEF cell-1 (DEV-1(+))	0.31	-	
6	CEF cell-2 (DEV-1(+))	0.32	-	+
7	CEF cell-3 (DEV-1(+))	0.28	-	

CEF cell samples (culture for 5 days)

- DEV를 감염시켜 CPE(세포변성효과)가 확인된 시료 5건 및 PCR로 양성이 확인된 3건의 시료에 대해 개발기기 평가결과, 모두 음성으로 확인됨.
- CEF 음성대조군에 대해서도 모두 음성으로 확인되어 비특이 반응은 없는 것으로 판단됨

라. AI 항원검사용 휴대형 진단기 평가

(1) 특이도 평가

(가) 다양한 음성대조 시료 및 타 병원체(바이러스 및 세균) 대상 특이도 평가

ichroma™ TRIAS (Influenza A virus) specificity test

No	Sample (Strain, titer)		ichroma™ TRIAS	
			Value	Result
1	Control (positive)	Positive control-High	7.56	+
2		Positive control-Medium	6.99	+
3		Positive control-Low	2.99	+
4	Control (negative)	Buffer (애니벳)	0	-
5		PBS	0	-
6	Virus culture system (4)	Allantoic cavity (AC) fluid	0	-
7		Chick embryo fibroblasts (CEF) cells	0.01	-
8		Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells	0.01	-
9		Duck embryo liver (DEL) cells	0.01	-
10	Virus (4)	Newcastle disease virus (LaSota, 2 ⁸ HA)	0	-
11		Duck hepatitis A virus type 1 (DRL-62, 4.3 ELD ₅₀ /mL)	0.02	-
12		Duck hepatitis A virus type 3 (04203, 4.2 ELD ₅₀ /mL)	0.01	-
13		Duck enteritis virus (Holland, 7.45 ELD ₅₀ /mL)	0.02	-
14	Bacteria (9)	<i>E. coli</i> (25922, 10 ⁹ CFU/mL)	0.01	-
15		<i>Salmonella</i> Typhimurium (14028, 10 ⁹ CFU/mL)	0.02	-
16		<i>Salmonella</i> Gallinarum (9184, 10 ⁹ CFU/mL)	0.02	-
17		<i>Salmonella</i> Pullorum (19945, 10 ⁹ CFU/mL)	0.03	-
18		<i>Salmonella</i> Enteritidis (12021, 10 ⁹ CFU/mL)	0.02	-
19		<i>Riemerella anatipestifer</i> serotype 1 (RA21, 10 ⁹ CFU/mL)	0.03	-
20		<i>Staphylococcus aureus</i> (25923, 10 ⁹ CFU/mL)	0.02	-
21		<i>Clostridium perfringens</i> Type C (3628, 10 ⁹ CFU/mL)	0.01	-
22		<i>Pasteurella multocida</i> serotype 1 (BA0001832, 10 ⁹ CFU/mL)	0.02	-

- 버퍼, 종란 AC액, 닭 및 오리 세포배양액 등 키트에 영향을 미칠 수 있는 시약 및 음성 시료에 대해 비특이 반응이 없는 것으로 확인됨
- 주요 가금질병 병원체(바이러스 4종, 세균 9종) 대상 검사시 비특이 반응이 없는 것으로 확인됨
- IA(Influenza A) 항원진단 키트의 경우 특이도에 문제가 없는 것으로 평가됨

(2) 민감도 평가

(가) 최소검출 한계 평가

① H1N1

ichroma™ TRIAS sensitivity test-H1N1

No.	Sample	TCID ₅₀ /mL (log ₁₀)	ichroma™ TRIAS		EID ₅₀ /mL (log ₁₀)	HA	rt-PCR	
			COI Value	Result			Ct	Viral copies/ μl
1	H1N1 NWS (HA 2 ⁹ 8.3 EID ₅₀ 8.25 TCID ₅₀)	7	31.41	+	7.05	2.87919	nd	nd
2		6.7	24.47	+	6.75	1.43959	nd	nd
3		6.4	22.77	+	6.45	0.71980	nd	nd
4		6.1	13	+	6.15	0.35990	nd	nd
5		5.8	7.84	+	5.85	0.17995	20.36	2.36E+05
6		5.5	3.03	+	5.54	0.08997	21.20	1.37E+05
7		5.2	1.53	+	5.24	0.04499	22.05	7.87E+04
8		4.9	0.94	+	4.94	0.02249	23.14	3.87E+04
9		4.6	0.42	-	4.64	0.01125	24.03	2.17E+04
10		4.3	0.15	-	4.34	0.00562	25.94	6.27E+03
11		4.0	0.01	-	4.04	0.00281	29.11	8.00E+02

- H1N1 바이러스주 NWS를 대상으로 2진 희석하여 LOD값을 평가한 결과, 10^{4.9} TCID₅₀/ml 로 확인됨

② H9N2

ichroma™ TRIAS sensitivity test-H9N2

No.	Sample	TCID ₅₀ /mL (log ₁₀)	ichroma™ TRIAS		EID ₅₀ /mL (log ₁₀)	HA	rt-PCR	
			COI Value	Result			Ct	Viral copies/ μl
1	H9N2 01310 (HA 2 ¹⁰ 9.7 EID ₅₀ 6.05 TCID ₅₀)	5	68.36	+	8.65	91.26410	14.03	1.44E+07
2		4.7	43.56	+	8.35	45.63205	15.27	6.43E+06
3		4.4	30.49	+	8.05	22.81602	16.23	3.45E+06
4		4.1	22.15	+	7.75	11.40801	17.47	1.54E+06
5		3.8	9.84	+	7.45	5.70401	18.70	6.91E+05
6		3.5	6.22	+	7.14	2.85200	19.41	4.38E+05
7		3.2	1.71	+	6.84	1.42600	20.35	2.37E+05
8		2.9	1.03	+	6.54	0.71300	21.52	1.11E+05
9		2.6	0.26	-	6.24	0.35650	22.66	5.29E+04
10		2.3	0.17	-	5.94	0.17825	23.61	2.86E+04
11		2.0	0.08	-	5.64	0.08913	24.68	1.42E+04

- H9N2 바이러스주 01310주를 대상으로 2진 희석하여 LOD값을 평가한 결과, 10^{2.9} TCID₅₀ /ml 로 확인됨

(3) 임상검체 대상 유효성 평가

(가) 특이도 평가

- 닭 음성대조(인후두 및 총배설장 스왑, 분변), 오리 음성대조(분변) 시료를 대상으로 평가를 진행함

Detection influenza A virus from clinical samples (Negative samples)

Sample type	Source	State	No.	ichroma™ TRIAS	
				COI Value	Result
Cloacal swab (CL)	Chicken (SPF)	Negative	5	0-0.02	-
Oropharyngeal swab (OP)	Chicken (SPF)	Negative	5	0-0.03	-
Feces	Chicken (SPF)	Negative	8	0	-
	Duck (Broiler)	Negative	8	0	-
Total			26	0-0.03	-

- 모두 음성으로 확인되어 비특이 반응은 없는 것으로 확인됨

(나) 민감도 평가

- H9N2를 인공감염시킨 닭으로부터 채취한 임상검체(인후두 및 총배설강 스왑, 맹장편도)를 대상으로 유효성 평가를 진행함

Detection influenza A virus from clinical samples (infected chicken)

Sample type	No.	Positive (% , positive/test No.) by Ct interval				Total
		(<20)	(20 to <25)	(25-30)	(>30)	
Cloacal swabs (CL)	19	4/4 (100.0)	6/8 (75.0)	3/4 (75.0)	1/3 (33.3)	14/19 (73.7)
Oropharyngeal swab (OP)	13			3/12 (25.0)	0/1 (0.0)	3/13 (23.1)
Other (CT)	11	5/5 (100.0)	6/6 (100.0)			11/11 (100.0)
Total	43	9/9 (100.0)	12/14 (85.7)	6/16 (37.5)	1/4 (25.0)	28/43 (65.1)

- 총 43건의 양성시료에 대한 개발기기 검사 결과, 28건이 양성으로 나와 65.1%의 양성율을 확인함
- 고역가 일수록 양성율이 높은 것으로 평가 됨
- 인후두 스왑 시료의 경우 상대적으로 바이러스 역가가 낮았기 때문에 낮은 양성율을 보였고, 역가가 높은 맹장편도에선 qPCR 결과와 일치했음

4. 오리 항체검사용 ELISA 유효성 평가 및 기존 진단법과의 상관성 규명

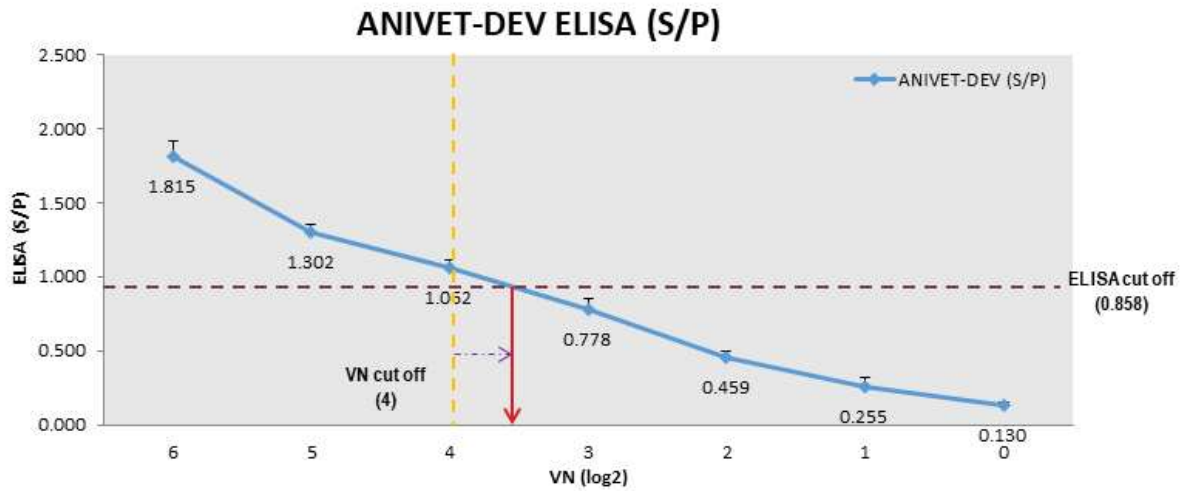
가. DEV 항체검사용 ELISA 유효성 평가

(1) 민감도 검사

(가) 최소검출 한계 평가

- DEV 항혈청(VN 6)을 2진 희석한 시료를 대상으로 ELISA 최소검출 한계를 평가 하였음

Compare detection of limit of DEV ELISA with VN test



- LOD값이 VN 3~4로 확인되어 VN시험법과 유사한 수준의 민감도 확인
- 항체역가가 감소함에 따라 ELISA O.D 값도 감소하는 경향을 뚜렷이 보임

(나) 임상검체 대상 유효성 평가

- 육용오리 5수 대상 DEV 백신주 면역 후 매주 채혈하여 확보한 혈청 대상 항체역가 검사를 진행함

Detection of DEV antibody in DEV immunized ducks

Group	Duck No.	DEV VN result (log2)							
		191011	191025	191102	191107	191113	191121	191127	191205
		6 wpv	8wpv	9wpv	10wpv	11wpv	12wpv	13wpv	14wpv
DEV immunization (Holland CCAM4)	2	9	9	8	10	10	8	8	9
	5	10	10	9	9	9	-	-	9
	6	9	10	10	9	8	9	9	8
	7	9	7	9	8	7	8	9	7
	8	9	7	7	8	8	8	8	9
	average	9.2	8.6	8.6	8.8	8.4	8.25	8.5	8.4
	sd	0.4	1.4	1.0	0.7	1.0	0.4	0.5	0.8

Group	Duck No.	ELISA result							
		191011	191025	191102	191107	191113	191121	191127	191205
		6 wpv	8wpv	9wpv	10wpv	11wpv	12wpv	13wpv	14wpv
DEV immunization (Holland CCAM4)	2	1.33	1.55	1.46	1.41	1.49	1.54	1.55	1.52
	5	1.34	1.47	1.24	1.08	1.22	-	-	1.42
	6	1.49	1.29	1.40	1.26	1.34	1.29	1.21	1.23
	7	1.38	1.33	1.32	1.39	1.34	1.26	1.28	1.45
	8	1.31	1.33	1.27	1.47	1.34	1.47	1.43	1.56
	average	1.4	1.4	1.3	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4
	sd	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

- 기존 항체 표준검사법인 중화항체시험법(VN test)과 비교 평가시 동일한 양성율을 확인

합

(2) 특이도 평가

(가) 오리 음성대조군 대상 평가

- 음성대조군 6개체의 2주, 3주, 5주령 때 채취한 혈청을 대상으로 ELISA 평가

Evaluation ANIVET-DEV ELISA specific for serum from older ducks (negative)

	Duck No.	2 week-old		3 week-old		5 week-old	
		ELISA (S/P ratio)	VN (log2)	ELISA (S/P ratio)	VN (log2)	ELISA (S/P ratio)	VN (log2)
Negative duck serum	1	0.503	<4	0.492	<4	0.644	<4
	2	0.2	<4	0.341	<4	0.492	<4
	3	0.369	<4	0.511	<4	0.645	<4
	4	0.242	<4	0.455	<4	0.66	<4
	5	0.245	<4	0.326	<4	0.465	<4
	6	0.309	<4	0.395	<4	0.597	<4
	Average	0.311	<4	0.420	<4	0.584	<4
	Positive (%)	0	0	0	0	0	0

ELISA Positive: S/P \geq 0.858; negative, S/P \leq 0.858. VN (log2) positive: \geq 4; negative, <4

- VN검사결과 모두 음성으로 확인된 시료에 대해서 ELISA 검사결과 모두 음성으로 확인되어 특이도에 문제가 없는 것으로 확인됨
- 다만, 오리 주령이 증가함에 따라 S/P ratio가 증가하는 양상을 보임

(나) 1일령 병아리 임상검체 대상 평가

- 1일령 병아리 21개체로부터 채취한 혈청에 대해 ELISA 검사결과 모두 음성으로 확인됨

(다) 타 오리질병 항혈청 대상 평가

- ① DHAV 1형 및 3형을 면역한 개체로부터 채취한 혈청에 대해 ELISA 검사 진행

Evaluation ANIVET-DEV ELISA specific for DHAV-1/3 immunized ducks

Group	Days post-vaccination (DPV)	ELISA (S/P ratio)	VN (log2)
DHAV-1 (Immunization)	19DPV	0.614	<4
	24DPV	0.529	<4
	42DPV	0.485	<4
	43DPV	0.442	<4
	45DPV	0.542	<4
DHAV-3 (Immunization)	12DPV	0.396	<4
	18DPV	0.243	<4
	25DPV	0.198	<4
	33DPV	0.445	<4
	39DPV	0.857	<4

ELISA Positive: S/P ≥ 0.858 ; negative, S/P ≤ 0.858 . VN (log2) positive: ≥ 4 ; negative, < 4

- VN test 및 ELISA 검사결과 모두 음성으로 확인됨

제3절 오리질병 진단기술 현장검증

1. 진단기술 현장검증을 위한 로드맵 작성 및 인프라 확보

가. 테스트-베드 농장 정보 수집 및 질병발생 상황분석

(1) 시험개요 및 방법

(가) 시험개요

① 시험대상 농장 : 국내 육용오리농장 5개소 및 종오리농장 1개소

No.	농장	지역	사육규모	품종	입추일
1	A	전남 나주	10,000수	페킨 육용오리	2017.6
2	B	전북 부안	12,000수	페킨 육용오리	2017.6
3	C	전북 김제	10,000수	페킨 육용오리	2017.6
4	D	충북 음성	8,000수	페킨 육용오리	2017.7
5	E	충남 천안	11,000수	페킨 육용오리	2017.8
6	F	전북 정읍	6,000수	페킨 종오리	2016.10

② 시험방법

㉠ 검사질병

AI(조류인플루엔자), DHV(오리바이러스성간염), DEV(오리바이러스성장염), DuCV(오리썩코바이러스), DPV(오리파보바이러스), DTMUV(템부수바이러스)로 바이러스질병 6종과 RA(오리리메텔라감염증), PM(오리콜레라), APEC(조류병원성대장균), SE/ST(가금파라티푸스감염증) 세균성질병 4종을 대상으로 검사하였다.

㉡ 검사방법 : 병원체검사 및 항체검사

[오리농장의 모니터링 대상 질병에 대한 검사방법]

질병명	검사방법		비고
	항원	항체	
조류인플루엔자	PCR	HI	
오리바이러스성간염	PCR	ELISA, VN	
오리바이러스성장염	PCR	ELISA, VN	
오리썩코바이러스	PCR	-	
오리파보바이러스	PCR	-	
템부수바이러스	PCR	-	
오리리메텔라감염증	균 분리동정	MAT	
오리콜레라	균 분리동정	-	
조류병원성대장균	균 분리동정	-	
가금파라티푸스감염증	균 분리동정	PA	

③ 질병 모니터링 결과

㉑ A농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	<i>Salmorella</i>
7일령	음성	양성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성
21일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 오리간염바이러스(DHV), 리메렐라(RA), 병원성대장균(APEC)의 항원이 검출되었으며, 그 외의 질병은 음성으로 확인되었다.

㉒ B농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	<i>Salmorella</i>
7일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
21일령	음성	음성	양성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 오리썬코바이러스(DuCV), 리메렐라(RA) 항원이 검출되었으며, 그 외의 질병은 음성으로 확인되었다.

㉓ C농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	<i>Salmorella</i>
7일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성
21일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 리메렐라(RA), 살모넬라(ST) 항원이 검출되었으며, 그 외의 질병은 음성으로 확인되었다.

㉔ D농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	<i>Salmorella</i>
7일령	음성	양성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성
21일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 오리간염바이러스(DHV), 리메렐라(RA), 살모넬라(ST) 항원이 검출되었으며, 그 외의 질병은 음성으로 확인되었다.

㉕ E농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	<i>Salmorella</i>
7일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성
21일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 리메렐라(RA), 살모넬라(SE) 항원이 검출되었으며, 그 외의 질병은 음성으로 확인되었다.

㉞ F농장 병원체검사

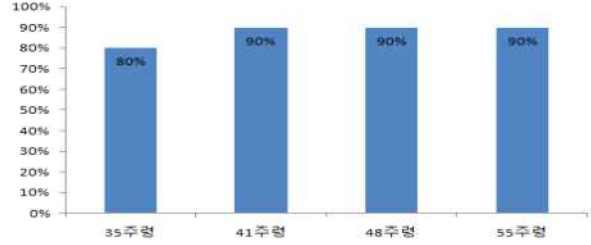
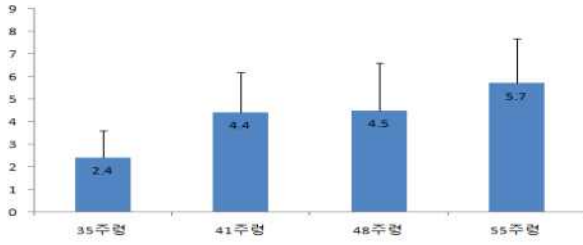
질병명 주령	AI	DHV	DuCV	DEV	MDPV	DTMUV	RA	PM	APEC	<i>Salmorella</i>
35주령	음성	음성	양성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성
41주령	음성	음성	양성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
48주령	음성	음성	양성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성
55주령	음성	음성	양성	음성	음성	음성	양성	음성	양성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 오리씨코바이러스(DuCV), 리메렐라(RA), 병원성 대장균(APEC)의 항원이 검출되었다. 오리씨코바이러스가 농장에 상재하는 것으로 판단되며, 리메렐라는 순환감염양상을 보였고, 그 외의 질병은 음성으로 확인되었다.

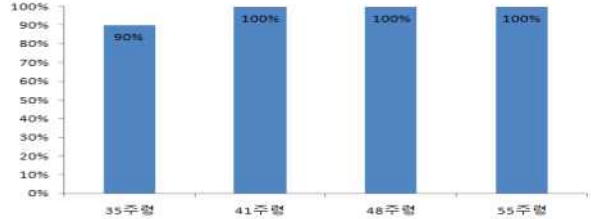
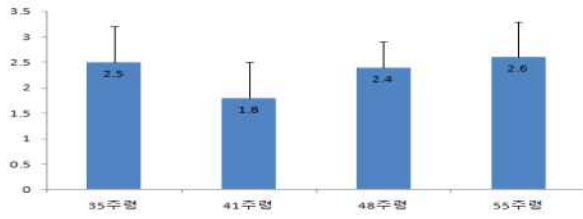
㉟ F농장 항체검사

질병명 주령	AI	DHV	DEV	EDS	RA	SE
35주령	0%	0%	0%	80% (2.4±1.2)	90% (2.5±0.7)	50% (1.3±0.2)
41주령	0%	0%	0%	90% (4.4±1.8)	100% (1.8±0.7)	70% (1.1±0.7)
48주령	0%	0%	0%	90% (4.5±2.1)	100% (2.4±0.5)	80% (1.3±0.6)
55주령	0%	0%	0%	90% (5.7±2.0)	100% (2.6±0.7)	70% (1.7±1.3)

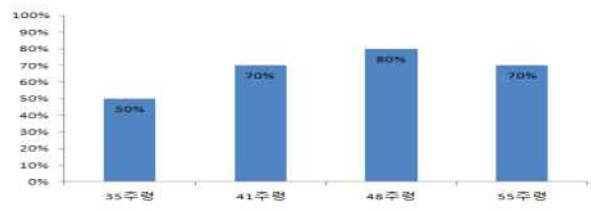
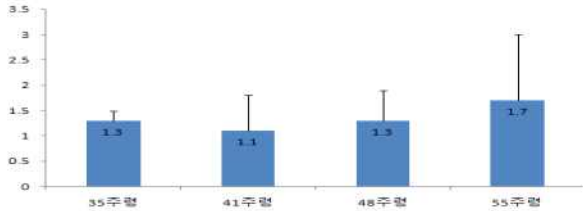
(가) EDS



(나) RA



(다) SE



- 주요 질병에 대한 항체수준 검사 결과, 오리리메렐라감염증(RA), 산란저하증(EDS) 및 SE(가금파라티푸스감염증)는 35주령, 41주령, 48주령, 55주령에서 항체가 검출되었는데 자염감염에 의한 EDS 및 SE 항체획득으로 후대병아리의 초기일령에서의 해당질병의 면역력이 부여될 것으로 판단된다. 리메렐라 항체검출은 35주령 이전에 병원체에 노출되었음을 알 수 있으며 항체가 수준과 48주령, 55주령에 리메렐라 항원 검출로 본 농장에 리메렐라 순환 감염이 일어나고 있는 것으로 판단되고, 산란저하에 관여하는 리메렐라의 특성상 재감염이 되지 않도록 종오리관리에 유의할 필요가 있다.
- 조류인플루엔자(AI), 오리바이러스성간염(DHV), 오리바이러스성장염(DEV) 항체는 음성으로 확인된다. DHV의 항체부재로 후대병아리의 초기감염시 해당질병 방어가 어려울 것으로 예상된다.

2. 항원검사용 현장 진단기술 현장검증 및 피드백

가. 테스트-베드 농장 정보 수집 및 질병발생 상황분석

(1) 시험개요 및 방법

(가) 시험개요

① 시험대상 농장 : 국내 육용오리농장 7개소

No.	농장	지역	사육규모	품종	입추일
1	A	전북 정읍	10,000수	페킨 육용오리	2018.4
2	B	전북 부안	9,000수	페킨 육용오리	2018.5

3	C	전북 부안	12,000수	폐킨 육용오리	2018.5
4	D	충북 음성	8,000수	폐킨 육용오리	2018.6
5	E	전북 김제	11,000수	폐킨 육용오리	2018.7
6	F	전북 정읍	6,000수	폐킨 육용오리	2018.7
7	G	전남 나주	9,000수	폐킨 육용오리	2018.9

② 시험방법

㉓ 검사질병

AI(조류인플루엔자), DHV(오리바이러스성간염), DEV(오리바이러스성장염), DuCV(오리썩코바이러스), DPV(오리파보바이러스), DTMUV(템부수바이러스)로 바이러스질병 6종과 RA(오리리메렐라감염증), PM(오리콜레라), APEC(조류병원성대장균), SE/ST(가금파라티푸스감염증) 세균성 질병 4종을 대상으로 검사하였다.

㉔ 검사방법 : 병원체검사 및 항체검사

[오리농장의 모니터링 대상 질병에 대한 검사방법]

질병명	검사방법		비고
	항원	항체	
조류인플루엔자	PCR	HI	
오리바이러스성간염	PCR	ELISA, VN	
오리바이러스성장염	PCR	ELISA, VN	
오리썩코바이러스	PCR	-	
오리파보바이러스	PCR	-	
템부수바이러스	PCR	-	
오리리메렐라감염증	균 분리동정	MAT	
오리콜레라	균 분리동정	-	
조류병원성대장균	균 분리동정	-	
가금파라티푸스감염증	균 분리동정	PA	

③ 질병 모니터링 결과

㉕ A농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	Salmonella
7일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
21일령	양성	음성	양성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 저병원성 조류인플루엔자(LPAI), 오리썩코바이러스(DuCV), 리메렐라(RA) 항원을 검출하였고, 그 외의 질병은 음성으로 확인하였다.

㉔ B농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	Salmonella
14일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성
28일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	양성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 리메렐라(RA), 살모넬라(SE), 병원성대장균(APEC) 항원이 검출되었고, 그 외의 질병은 음성으로 확인하였다.

㉕ C농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	Salmonella
7일령	음성	양성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성
21일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 오리간염바이러스(DHV), 리메렐라(RA), 병원성대장균(APEC)의 항원이 검출되었고, 그 외의 질병은 음성으로 확인하였다.

㉖ D농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	Salmonella
20일령	양성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성
30일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 저병원성 조류인플루엔자(LPAI), 리메렐라(RA), 살모넬라(ST) 항원이 검출되었고, 그 외의 질병은 음성으로 확인하였다.

㉗ E농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	Salmonella
7일령	음성	양성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성
28일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 오리간염바이러스(DHV), 리메렐라(RA), 살모넬라(spp) 항원이 검출되었고, 그 외의 질병은 음성으로 확인하였다.

㉞ F농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	Salmonella
5일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성
21일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 리메렐라(RA), 살모넬라(SE) 항원이 검출되었고, 그 외의 질병은 음성으로 확인하였다.

㉟ G농장 병원체검사

질병명 일령	AI	DHV	DuCV	DEV	DPV	DTMUV	RA	PM	APEC	Salmonella
5일령	음성	양성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성
33일령	음성	음성	음성	음성	음성	음성	양성	음성	음성	음성

주요 질병에 대한 항원 검사 결과, 오리간염바이러스(DHV), 리메렐라(RA), 살모넬라(SE) 항원이 검출되었고, 그 외의 질병은 음성으로 확인하였다.

3. 현장진단 항원진단기술 현장검증 및 피드백

가. 방역기관 대상 기술이전 및 현장실증(방역기관 3개소)

(1) 현장검사기기 적용 결과

(가) T-1 시험소

① 7개 농가대상 40개 시료에 대해 현장실증 진행

No.	농가명	축종	시료 종류	검사결과(COD)	대조 검사법 및 결과
1	A	삼계	인후두 스왑	-	qPCR(-)
2	A	삼계	인후두 스왑	+	qPCR(-)
3	A	삼계	인후두 스왑	-	qPCR(-)
4	A	삼계	인후두 스왑	-	qPCR(-)
5	A	삼계	인후두 스왑	-	qPCR(-)
6	B	육계	인후두 스왑	-	qPCR(-)
7	B	육계	인후두 스왑	-	qPCR(-)
8	B	육계	인후두 스왑	-	qPCR(-)
9	B	육계	인후두 스왑	-	qPCR(-)
10	B	육계	인후두 스왑	+	qPCR(-)

11	C	토종닭	인후두 스왑	-	qPCR(-)
12	C	토종닭	인후두 스왑	-	qPCR(-)
13	C	토종닭	인후두 스왑	+	qPCR(-)
14	C	토종닭	인후두 스왑	-	qPCR(-)
15	C	토종닭	인후두 스왑	+	qPCR(-)
16	D	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
17	D	육용오리	인후두 스왑	+	qPCR(-)
18	D	육용오리	인후두 스왑	Invalid	qPCR(-)
19	D	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
20	D	육용오리	인후두 스왑	Invalid	qPCR(-)
21	E	육용오리	인후두 스왑	Invalid	qPCR(-)
22	E	육용오리	인후두 스왑	+	qPCR(-)
23	E	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
24	E	육용오리	인후두 스왑	Invalid	qPCR(-)
25	E	육용오리	인후두 스왑	+	qPCR(-)
26	F	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
27	F	육용오리	인후두 스왑	+	qPCR(-)
28	F	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
29	F	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
30	F	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
31	F	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
32	F	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
33	F	육용오리	인후두 스왑	Invalid	qPCR(-)
34	F	육용오리	인후두 스왑	Invalid	qPCR(-)
35	F	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
36	G	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
37	G	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)

38	G	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
39	G	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
40	G	육용오리	인후두 스왑	+	qPCR(-)

② 종합결과

시험소	평가 대상 농가 수	평가 대상 시료 수	Ichroma 검사 결과			대조 검사법 비교평가	
			양성	음성	Invalid	위양성	위음성
T-1	7	40	9	25	6	22.5%(9/40)	-

(나) T-2 시험소

① 3개 농가대상 30개 시료에 대해 현장실증 진행

No.	농가명	축종	시료 종류	검사결과(COD)	대조 검사법 및 결과
1	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
2	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
3	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
4	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
5	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
6	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
7	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
8	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
9	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
10	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
11	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
12	A	육용오리	분변	-	qPCR(-)
13	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
14	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
15	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)

16	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
17	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
18	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
19	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
20	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
21	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
22	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
23	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
24	B	육용오리	분변	-	qPCR(-)
25	C	육용오리	분변	-	qPCR(-)
26	C	육용오리	분변	Invalid	qPCR(-)
27	C	육용오리	분변	-	qPCR(-)
28	C	육용오리	분변	+	qPCR(-)
29	C	육용오리	분변	-	qPCR(-)
30	C	육용오리	분변	-	qPCR(-)

② 종합결과

시험소	평가 대상 농가 수	평가 대상 시료 수	Ichroma 검사 결과			대조 검사법 비교평가	
			양성	음성	Invalid	위양성	위음성
T-2	3	30	1	28	1	3.3%(1/30)	-

(다) T-3 시험소

① 3개 농가대상 40개 시료에 대해 현장실증 진행

No.	농가명	축종	시료 종류	검사결과(COI)	대조 검사법 및 결과
1	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
2	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
3	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)

4	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
5	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
6	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
7	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
8	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
9	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
10	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
11	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
12	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
13	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
14	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
15	A	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
16	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
17	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
18	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
19	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
20	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
21	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
22	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
23	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
24	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
25	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
26	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
27	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
28	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
29	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
30	B	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)

31	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
32	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
33	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
34	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
35	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
36	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
37	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
38	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
39	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)
40	C	육용오리	인후두 스왑	-	qPCR(-)

② 종합결과

시험소	평가 대상 농가 수	평가 대상 시료 수	Ichroma 검사 결과			대조 검사법 비교평가	
			양성	음성	Invalid	위양성	위음성
T-3	3	40	0	40	0	-	-

제4절 사업화 성과 및 계획

1. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	9억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	6억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 80% 국외 : 5%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 20% 국외 : 1%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			22위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			15위

2. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	5년			
	소요예산(백만원)	25억원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	9억	12억	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0%	80%	85%
		국외	0%	5%	8%
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		고감도 항원검사 (TRIAS-Vet) - 조류인플루엔자 (AIV) - 아프리카돼지열병(ASFV), 구제역 (FMDV) 자동화 항체검사 (AFIAS-Vet) - 구제역 항체검사 (FMDV)			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	5	8	
	수 출	0	3	6	

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 가. 오리바이러스성간염을 비롯 주요 질병의 진단용 항원 3종이상, 항체 3종이상 개발
- 나. 병원체 고감도 항원검사를 위한 현장진단기 개발
- 다. 백신항체 검사를 위한 자동검사 시스템 구축 및 카트리치 개발
- 라. 스마트 지능형 오리 질병 감시 및 예방 시스템 구축

3-2. 목표 달성여부

- 가. 정성적 성과

연구개발 목표	연구개발내용 및 범위		달성도(%)
오리주요질병에 대한 신속 현장 진단법 및 모니터링 기술 개발	고감도 항원검사용 현장진단기 개발 및 소프트웨어 개발	병원체 항원검사를 위한 3종 병원체 항체개발 및 유효성 평가 (1종 이상)	100%
		병원체 항체검사용 ELISA 개발 및 최적화 (1종이상)	100%
		고감도 시분할형광 검사용 휴대형 현장진단기 시험품 개발 및 소프트웨어 개발	100%
		DHAV 항원검사용 카트리치 최적화 및 시험품 개발	100%
	오리 3종 고감도 항원검사용 현장 진단기 개발 및 검증	병원체 항원검사를 위한 3종 병원체 항체개발 및 유효성 평가 (2종이상)	100%
		병원체 항체검사용 ELISA 개발 및 최적화 (2종이상)	95%
		고감도 시분할형광 검사용 휴대용 현장진단기 시제품 및 소프트웨어 개발 (시제품 1종)	100%
		3종 병원체 항원 검사용 카트리치 최적화 및 시험품, 시제품 개발 (시제품 3종)	95%
	오리3종 항체 자동검사용 카트리치 개발 및 검증	병원체 항체검사용 ELISA 개발 및 최적화	90%
		병원체 백신 항체 검사를 위한 자동화 카트리치 개발 및 최적화	70%
		3종 병원체 항체검사용 카트리치 시험품, 시제품 개발 (시제품 3종) 및 소프트웨어 최적화	100%

오리질병 진단기술 적용법 확립 및 모니터링 기술 구축	오리 3종 질병 항원, 항 체검사를 위한 생물학적 원료 개발	3종 병원체 항원 library 구축 및 특성 규명	100%
		3종 병원체의 유전자 검사법 및 생물학적 검사법 확립	100%
		병원체 동물 시험접종 및 시료 패널 확보	100%
	오리 3종 병원체 항원검사 표준개발 및 진단기 유효성 평가	농장별 허드별 항원 분포조사 및 시료뱅크 구축	100%
		표준 항체 검사법 확립	100%
		시료뱅크 구축(항혈청 제작 및 확보)	100%
		고감도 항원검사용 휴대형 진단기 유효성 평가 및 기존 진단법과의 상관성 규명	90%
	오리 3종 병원체 항체검사 표준개발 및 진단기 유효성 평가	3종 병원체의 면역학적 항체 검사법 확립	100%
		항체검사용 자동면역진단기 유효성 평가	60%
		기존 진단법과의 상관성 규명	100%
		신규 진단기술을 활용한 오리 질병 모니터링 기술 확립	50%
		농장별 허드별 항체 분포조사 및 시료뱅크 구축	70%
오리질병 진단기술 현장검증	진단기술 현장검증을 위 한 로드맵 작성 및 인프 라 확보	기존 방역기관 오리질병 검사체계 분석	70%
		테스트-베드 농장 정보 수집 및 질병발생 상황분석	100%
		개발 진단기술 현장적용 및 검증을 위한 단계별 전략 수립	100%
	항원검사용 현장 진단기술 현장검증 및 피드백	테스트-베드 농장 정보 수집 및 질병발생 상황분석	100%
		현장실증 유효성 평가 및 피드백	100%
	자동검사용 항체 진단기술 현장검증 및 피드백	테스트-베드 농장 정보 수집 및 질병발생 상황분석	100%
		방역기관 대상 기술이전 및 현장실증	80%
		현장실증 유효성 평가 및 피드백	60%

나. 정량적 성과

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SCI	비 SCI						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	5	5	-	5	5	30	10	10	10	-	-	-	10	-	5	5	-	-		
최종목표	3	3	-	1	85	3	130	270	5	-	-	5	2	-	4	-	2	1	-	-
1차 연 도	목 표	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
	실 적								2			1			1		1			
2차 연 도	목 표	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	1	-	-	-	-	-
	실 적	1							2			4			1					
3차 연 도	목 표	2	1	-	1	5	1	10	-	1	-	2	1	-	1	-	2	1	-	-
	실 적	2			1	15			1			1			1					
소 계	목 표	3	1	-	1	5	1	10	-	3	-	5	2	-	3	-	2	1	-	-
	실 적	3	0	-	1	15	2	0	-	5	-	6	0	-	3	-	1	0	-	-
종료 1차연도	-	1	-	-	10	1	100	200	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
종료 2차연도	-	1	-	-	10	1	200	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 3차연도	-	-	-	-	20	-	300	600	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 4차연도	-	-	-	-	20	-	350	700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 5차연도	-	-	-	-	20	-	400	800	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
소 계	-	2	-	-	80	-	130	270	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
합 계	3	3	-	1	85	3	130	270	5	-	-	5	2	-	4	-	2	1	-	-

나-1. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Molecular characterization of fluoroquinolone resistance mechanisms of <i>Campylobacter</i> isolates from duck	Journal of Food Protection	Kang M	80(12)	미국	INT ASSOC FOOD PROTECTION	SCI	17.12.01	
2	Protective efficacy of a bivalent live attenuated vaccine against duck hepatitis A virus types 1 and 3 in ducklings	Veterinary Microbiology	Kang M	214(2)	네덜란드	ELSEVIER SCIENCE BV	SCI	18.02.01	
3	Live attenuated duck hepatitis virus vaccine in breeder ducks: protective efficacy and kinetics of maternally derived antibodies	Veterinary Microbiology	Roh JH	219(6)	네덜란드	ELSEVIER SCIENCE BV	SCI	18.06.01	
4	Immunogenicity and safety of a live <i>Riemerella anatipestifer</i> vaccine and the contribution of IgA to protective efficacy in Pekin ducks	Veterinary Microbiology	Kang M, Seo HS, Soh SH	222(8)	네덜란드	ELSEVIER SCIENCE BV	SCI	18.08.01	
5	Pathogenesis of duck circovirus genotype 1 in experimentally infected Pekin ducks	Poultry Science	Hong YT, Kang M	97(9)	영국	OXFORD UNIV PRESS	SCI	18.09.01	
6	Genetic characterization and epidemiological implications of <i>Campylobacter</i> isolates from wild birds in South Korea	Transboundary and Emerging Diseases	Wei B, Kang M, Jang HK	65(5)	미국	WILEY	SCI	19.01.01	

나-2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2017년 한국가금학회 제34차 정기총회 및 학술발표회	Roh JH	17.11.09	전북대학교	대한민국
2	2018년 대한수의학회 추계학술심포지움 -동물과 인간의 공존에 있어서 수의학의 역할-	Wei B	18.10.26	강원도 속초 텔피노골프앤 리조트	대한민국
3	2019 대한미생물학회 제137차 추계학술대회	Kwon BR	19.10.17	서울 건국대학교 새천년관 우곡국제회의 장	대한민국

나-3. 지식재산권

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	오리 리메펠라 감염증을 예방하기 위한 백신 조성물	대한 민국	전북대 학교산 학협력 단	18.08.06	10-2018-0 091475				20%
2	오리 간염 바이러스 및 오리 장염 바이러스의 고감도 시분할 형광을 이용한 동시 검사방법	대한민국	(주)애니 벳	19.11.29	10-2019-01 57553				100%
3	체의 진단장치	대한민국	(주)애니 벳	19.12.09	10-2019-01 62334				100%

나-4. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	졸업생배출	2017	1					1					1	

나-5. 취업 성과

취업 총인원	기관종류						
	학교	연구소	공공기관	기업			기타
				대기업	중견기업	중소기업	
1	1						

나-6. 사업화 현황

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	기술이전 자기실시	신제품개발	국내	동물용 현장진단 의료기기 개발	동물용 현장진단 의료기기 개발	(주)애니벳				

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 가. 본 과제에서는 고감도 현장형 병원체 검사용 진단기와 자동화된 항체검사 진단기를 포함하는 스마트 지능형 오리 및 동물질병 검사플랫폼을 개발하고자 하였음. 본 목표 구현을 위하여 기반이 되는 진단기와 시스템 구축을 완료하였으나, 오리병원체 탐지를 위한 원료물질의 경우 상품화된 원료가 없어 직접 개발에 많은 시간이 소요되었음. 당초 계획은 3년차까지 2종이상의 카트리치의 야외실증시험을 완료하고 품목허가를 진입하여야 하나, 품목허가까지 완성되지 못하였음.
- 나. 정성적 목표중 특허의 경우 기존 계획대로 3건의 특허가 완료되었으며, 현재 심사중에 있는 관계로 당해연도 계획인 특허등록 1 건은 완료되지 못하였음.
- 다. 정성적 목표 중 논문의 경우에는 기존계획대비 비SCI 논문 게재 실적이 미달 되었지만, 본 연구과제를 통하여 우수한 결과를 확보하여, 보다 학계에 미치는 파장 및 내용적으로 우수한 SCI 논문실적을 초과 달성하였음.
- 라. 전북대에서는 본 과제를 통하여 백신 및 공격접종을 통해 오리 및 닭의 항원, 항체 검체 패널을 충분히 확보하였고 3종 제품의 감도를 보완 후 구축된 표준검체 패널을 적극 활용하여 추가적인 유효성 검증을 추진하고자 함.
- 마. 후속 연구계획
- 전북대와의 유기적인 협력을 통하여 현재 완성된 2종 병원체(DHAV, DEV) 고감도 항원 검사 카트리치의 성능검증 및 전북대에서 구축하고 있는 시범농장을 통하여 야외실증시험을 완료하여 품목허가를 추진할 계획임.
 - 오리 분변에서의 검출 감도 향상을 위하여 오리 분변의 추출용액 성분을 보완하고, 오리분변 특이적인 비특이 제어 blocker screening / Europium conjugation 효율 극대화를 병행하고자 함.
 - 항체검사 제품의 경우 추가 연구를 통하여 카트리치 개발을 완료하고 야외실증시험을 지속 수행할 계획임. 아울러 현재 개발된 오리 3종 병원체 검사 제품만으로는 상품성이 부족하여 이를 보완하기 위해 조류인플루엔자 제품의 야외실증시험을 추진하여 제품화하고 제품군을 확대할 예정에 있음.

4장. 연구결과의 활용 계획 등

본 연구는 산업동물진단 체계를 변화시킬 수 있는 진단기기 플랫폼 구축을 목표로 고감도 병원체 항원 탐지를 현장에서 검사 가능한 진단기기인 TRIAS-Vet과 실험실에서 자동화된 항체검사가 가능한 AFIAS-Vet 두가지 진단기기 플랫폼을 완성하였음. 현재 동물진단은 주로 육안으로 검사하는 Rapid test와 ELISA 기반의 실험실 검사를 사용하고 있으나, 의료영역에서는 기기 기반의 검사로 빠르게 검사환경이 변화하고 있음.

본 과제를 통하여 구축된 동물용 현장진단기기 시스템은 산업동물 진단에서 혁신적인 변화를 유도할 수 있는 플랫폼으로, 현재의 랩서비스 중심의 진단을 진단기기 중심의 농장현장 검사시스템으로 변화를 줌으로써 질병 발생시 빠른 진단 및 선제적인 대처가 가능한 국가적인 시스템 구축 가능함,

자동화 항체 진단 모니터링 시스템의 확립을 통하여 질병발생 및 확산이전에 국가적인 주요질병 모니터링 및 방역시스템 구축이 가능한 제품을 개발하였음.

본 과제를 통하여 구축된 시스템 및 노하우를 이용하여 오리관련 질병뿐만이 아니라 국가적인 전방위적인 관리가 필요한 양돈질병 등 다양한 감염질병군에 대하여 토탈 관리 시스템 구축 가능할 것으로 판단됨.

본사에서 구축한 동물진단 온라인 플랫폼은 초기단계이지만, 본 플랫폼의 추가적인 개발을 통하여 범국가 감염진단 데이터베이스의 구축 및 관리가 가능함.

1. 사업화 대상 제품군

- 주관기관에서는 현재 동물병원 진단기기로서 VetChroma를 개발하여 반려동물 (개, 고양이)에서 15개 이상의 바이오마커, 호르몬, 감염병을 검사할 수 있는 진단제품을 판매하고 있으며, 2019년 현재까지 유럽, 한국, 중국시장에 4,300대를 판매공급 하고 있음.
- 본 과제에서 개발된 제품은 산업동물에서 병원체를 고감도로 현장검사 할 수 있는 TRIAS-Vet과 자동화된 항체검사 가능한 AFIAS-Vet 2종의 진단기 플랫폼을 개발완료 하였으며, 향후 산업동물 진단기 플랫폼으로 사업화를 추진하고자 함.

VetChroma



동물병원 진단검사

- 바이오마커 검사
- 호르몬 검사
- 세계 4300대 판매 (2019)
- 12종 항목

TRIAS-Vet



농장현장검사

- 감염병 신속검사
- 고감도 항원검사
- AIV, DHAV, DEV
- CSFV, ASFV, FMDV

AFIAS-Vet



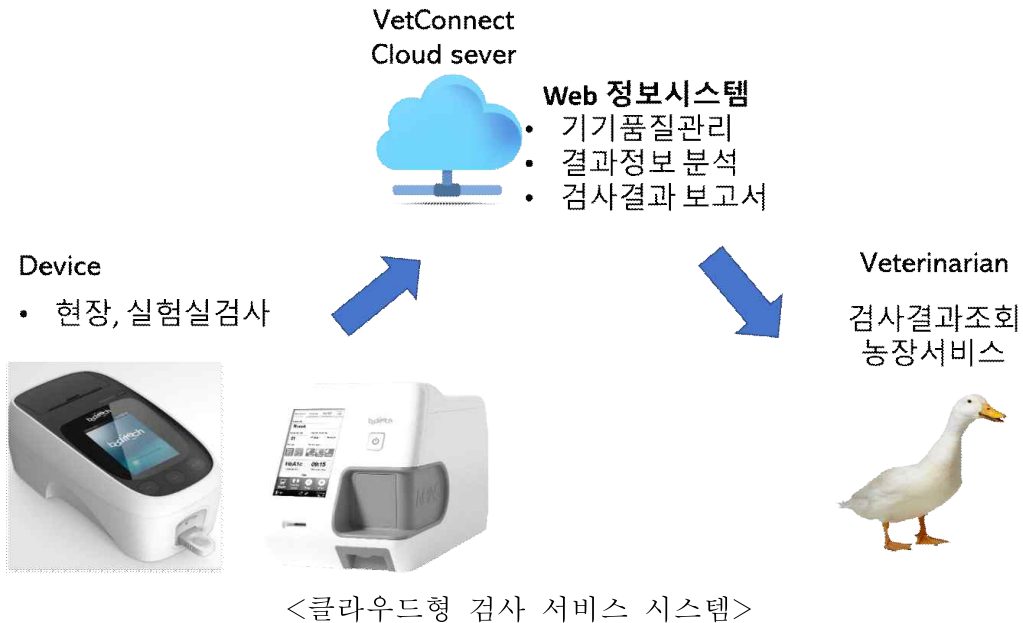
실험실검사

- 자동화 검사기기
- 감염병 항체검사
- DHAV, DEV, Remerella
- FMDV

<사업화 제품군>

2. 감염병 검사플랫폼의 서비스 구성안



- 본 연구에서 개발된 2종류의 진단기기는 위치에 관계없이 검사를 수행한 후 검사결과가 지능화된 클라우드에 연동되어 관리되며, 필요한 검사결과 보고서를 자동으로 생성할 수 있는 연결도구를 설계하여 반영하였음. 따라서 검사결과는 컴퓨터, 스마트폰에서 결과를 조회 분석할 수 있으며, 정부의 요청이 있는 경우 국가가축질병시스템에 연동이 가능함.



3. 향후 제품화 및 매출 계획

가) 제품화 및 제품확대 계획

- 본 과제에서는 제품확대 개발을 위한 2종의 진단기기 플랫폼을 완성하였으며, 개발 후 확대 투자를 통하여 오리 및 조류질병 병원체 검사 제품은 2021년 까지 제품화 완료를 추진할 계획임.
- 또한 2021년에 조류인플루엔자 제품을 추가하여 상품성을 증가시키고, 양돈질병 중 고위험도 병원체를 추가로 개발 착수하여 사업화를 지속할 계획임.
- 2021년에는 국내 시장에 출시하여 현재 상용제품이 없어 실험실 검사에 의존하고 있는 오리질병 검사에 현장진단 제품을 제공하여 오리산업에 기여하고자 함.

	2020	2021	2022	
TRIAS-vet 	고감도 현장검사 DHAV DEV AIV	AIV 추가개발 야외실증시험 품목별 허가	국내 출시 양돈제품 개발확대	중국, 아시아 출시
AFIAS-vet 	자동화 항체검사 DHAV-Ab DEV-Ab Riemerella-Ab	시제품 제작 야외실증시험 양돈제품 개발확대	야외실증시험 품목별 허가	한국, 중국 출시

<개발된 검사플랫폼의 제품화 및 확대계획>

나) 사업화 매출 계획

- 본 과제에서는 제품화를 위한 야외실증시험 등 품목별 개발이 완료되지 못하였으나, 2020년부터 품목허가를 확보한 후 국내 판매를 추진하고자 함. 아울러 2021-2022년에는 중국, 아시아, 유럽 시장으로 판매를 확대하고자 함. 이를 위하여 제품 양산을 위한 생산 설비 및 개발비용으로 19억원의 투자를 계획하고 있음.

	2020년	2021년	2022년
내수시장 (억원)	1 억원	2억원	5억원
수출(백만\$)		23만불	50만불
투자계획	6억원	9.5억원	9.5억원
제품확대	오리질병	가금질병	가금/양돈질병
판매지역	한국	중국/아시아	유럽시장

<개발 후 3년간 투자 및 판매계획>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.