

116103-
3

현장조류인플루엔자 Subtype 감별용 Rapid

id Kit 및 유전자칩 개발 및 산업화 최종보고서

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(✓) / 공개(✓), 비공개() 발간등록번호(✓)
가축질병대응기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-002918-01

현장 조류인플루엔자 Subtype 감별용 Rapid Kit 및 유전자칩 개발 및 산업화 최종보고서

2019. 11. 28.

주관연구기관 / (주)바이오노트
협동연구기관 / 한양대학교
협동연구기관 / 건국대학교

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

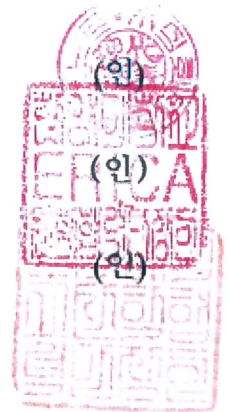
본 보고서를 “현장 조류인플루엔자 Subtype 감별용 Rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화”(개발기간 : 2016. 09. ~ 2019. 09.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 11 . 28.

주관연구기관명 : (주)바이오노트 (대표자)

협동연구기관명 : 한양대학교 산학협력단 (대표자)

협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자)



주관연구책임자 : (주)바이오노트 김선애

협동연구책임자 : 한양대학교 산학협력단 (황승용)

협동연구책임자 : 건국대학교 산학협력단 (박승용)

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116103-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.09.05 ~ 2019.09.04	단 계 구 분	3/ 3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	현장 조류인플루엔자 subtype 감별용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화			
	세부 과제명	1. 조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 및 감별진단용 (AIV, NDV, IBV) 다중 Rapid kit 개발 2. 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별용 현장형 유전자 칩 개발 및 산업화 3. 현장 조류인플루엔자 진단용 rapid 및 유전자칩 개발 및 산업화			
연구책임자	김선애(주관) 황승용(협동) 박승용(협동)	해당단계 참여연구원 수	총: 25명 내부: 25명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 350,000천원 민간: 116,667천원 계: 466,667천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 43명 내부: 43명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주) 바이오노트 (주관) 한양대학교 에리카산학협력단 (협동) 건국대학교 산학협력단 (협동)			참여기업명 (주) 바이오노트	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

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	<ul style="list-style-type: none"> ISS N:1865-1674 	<ul style="list-style-type: none"> 10-2 018-007 7052 10-2 019-010 6137 	<ul style="list-style-type: none"> 11-14 80523 -0035 69-01 								

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

1. 연구목적 및 내용

○ 현장 조류인플루엔자 subtype 감별 용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화

- 조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 용 다중 rapid-kit 개발
- 조류인플루엔자 감별진단 용 (ND, IB) 다중 rapid-kit 개발
- 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별 용 현장형 유전자칩 개발
- rapid-kit 및 유전자칩의 동물용진단기기 등록
- 현장형 진단기기의 현장적용

2. 연구개발성과

- Rapid kit 및 유전자칩 최소검출한계 농도 $10^{4.55}$ EID₅₀/ml 이하의 rapid kit 및 유전자 칩 개발
- rapid kit의 경우 현장에서 30분 이내, 유전자 칩의 경우 현장에서 6시간 이내 AI 및 subtype 진단 가능
- 기술이전 1건 실시
- 개발 품목 2건 제품화 및 동물용 제외진단기기 등록
- 개발 품목 1건 제외진단기기 등록 준비 중
- 과제 연구개발을 결과를 통한 특허출원 2건
- 과제 연구개발을 통한 논문 1건 게재완료, 1건 게재 확정

3. 활용계획 및 기대 효과

- Rapid kit 판매를 통한 수익 창출 및 지속적인 성능 개선
- 유전자칩 동물용의료기기 허가등록 완료 및 판매 실시
- 현장 방역 및 모니터링 시스템에 적용
- 기업체 자체 모니터링 시스템으로 활용
- (주)세스코 스마트팜 방역관리 시스템으로 활용
- 조류인플루엔자 피해효과 절감
- 국내·외 산업화를 통한 관련분야 이익 창출

보고서 면수

144면

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>현장 조류인플루엔자 subtype 감별 용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 용 다중 rapid-kit 개발 - 조류인플루엔자 감별진단 용 (ND, IB) 다중 rapid-kit 개발 - 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별 용 현장형 유전자칩 개발 - rapid-kit 및 유전자칩의 동물용진단기기 등록 - 현장형 진단기기의 현장적용 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Rapid kit 및 유전자칩 최소검출한계 농도 10^{4-5}EID₅₀/ml 이하의 rapid kit 및 유전자 칩 개발 - rapid kit의 경우 현장에서 30분 이내, 유전자 칩의 경우 현장에서 6시간 이내 AI 및 subtype 진단 가능 - 기술이전 1건 실시 - 개발 품목 2건 제품화 및 동물용 체외진단기기 등록 - 개발 품목 1건 체외진단기기 등록 준비 중 - 과제 연구개발을 결과를 통한 특허출원 2건 - 과제 연구개발을 통한 논문 1건 게재 완료, 1건 출간 확정 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 제품 판매를 통한 수익 창출 및 지속적인 성능 개선 - 현장 방역 및 모니터링 시스템에 적용 - 기업체 자체 모니터링 시스템으로 활용 - (주)세스코 스마트팜 방역관리 시스템으로 활용 - 조류인플루엔자 피해 절감 - 국내·외 산업화를 통한 관련분야 이익 창출 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>현장진단</p>	<p>신속진단</p>	<p>조류 인플루엔자</p>	<p>유전자칩</p>	<p>동물용 체외진단기기</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>On-site diagnosis</p>	<p>Rapid test kit</p>	<p>Avian Influenza</p>	<p>DNA chip</p>	<p>In vitro diagnostic device for animals</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	28
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	136
4. 연구결과의 활용 계획 등	140
붙임. 참고 문헌	144

<본문>

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 현장 조류인플루엔자 subtype 감별 용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화
 - 1) 현장에서 Rapid kit의 경우 30분 내, 유전자칩의 경우 5~6시간 내 진단
 - 2) 최소검출한계농도 $10^{3.4}$ EID₅₀/ml 이하
 - 3) 기술이전 2건 이상, 산업화 2건 이상

1-2. 연구개발의 필요성

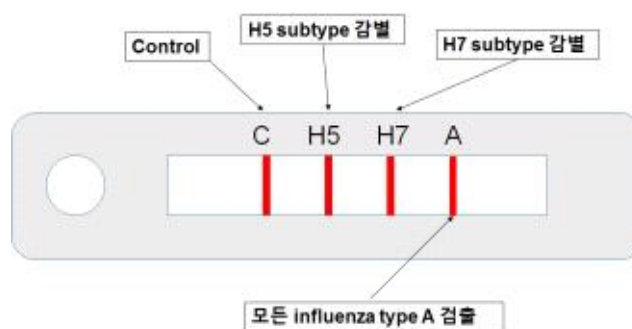
[연구개발 개요]

○ 연구개발 개요

1) 조류 인플루엔자 subtype 감별용 다중 rapid-kit :

- ① 3개의 항원 (모든 조류인플루엔자, H5 subtype, H7 subtype) 동시 진단 가능한 rapid kit.
- ② Control을 포함하여 총 4개의 항원검출 표지를 보유함.
- ③ 고병원성 조류 인플루엔자(HPAI)의 경우 기존 저병원성 H5 subtype 바이러스와 항원적 차이를 나타내므로, H5 subtype 감별은 HPAI를 주 진단 대상으로 함.
- ④ H7 subtype 감별은 기존 중국 및 야생조류에서 유행중인 바이러스를 대상으로 함.
- ⑤ 모든 조류 인플루엔자 검출은 기존 바이오노트에서 개발된 검증된 키트를 활용하여 개발함. (target protein: NP)
- ⑥ 신호는 Gold-particle을 이용하여 민감도가 높은 것을 선별.

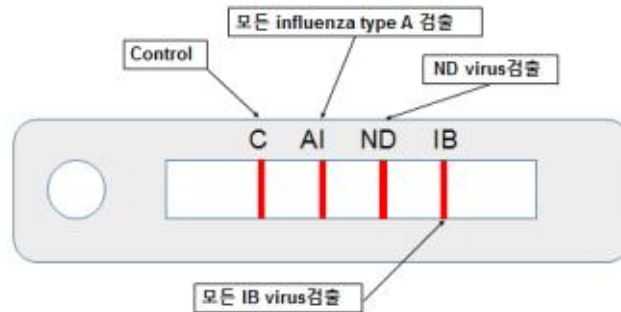
<AI subtype 감별 다중 rapid-kit 모식도>



2) 조류인플루엔자 감별진단(ND, IB)용 다중 rapid-kit :

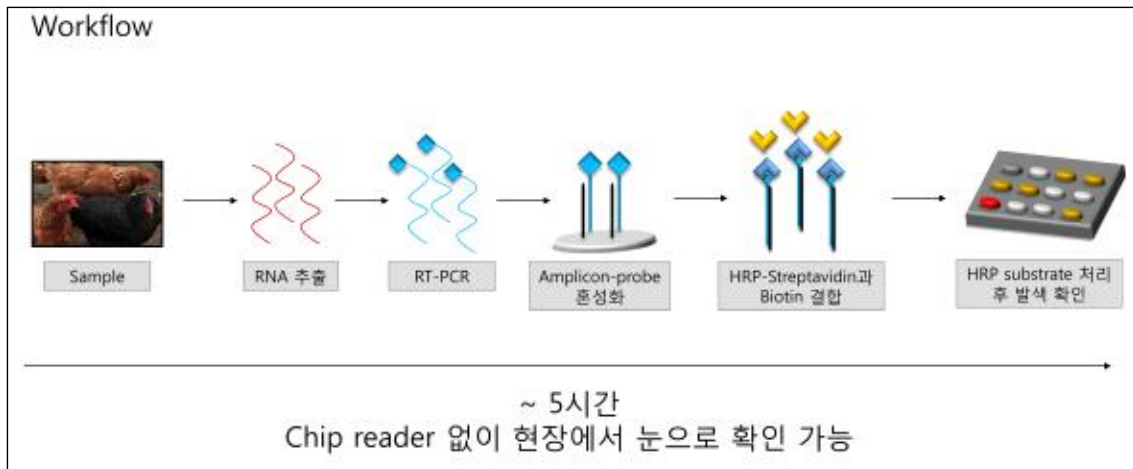
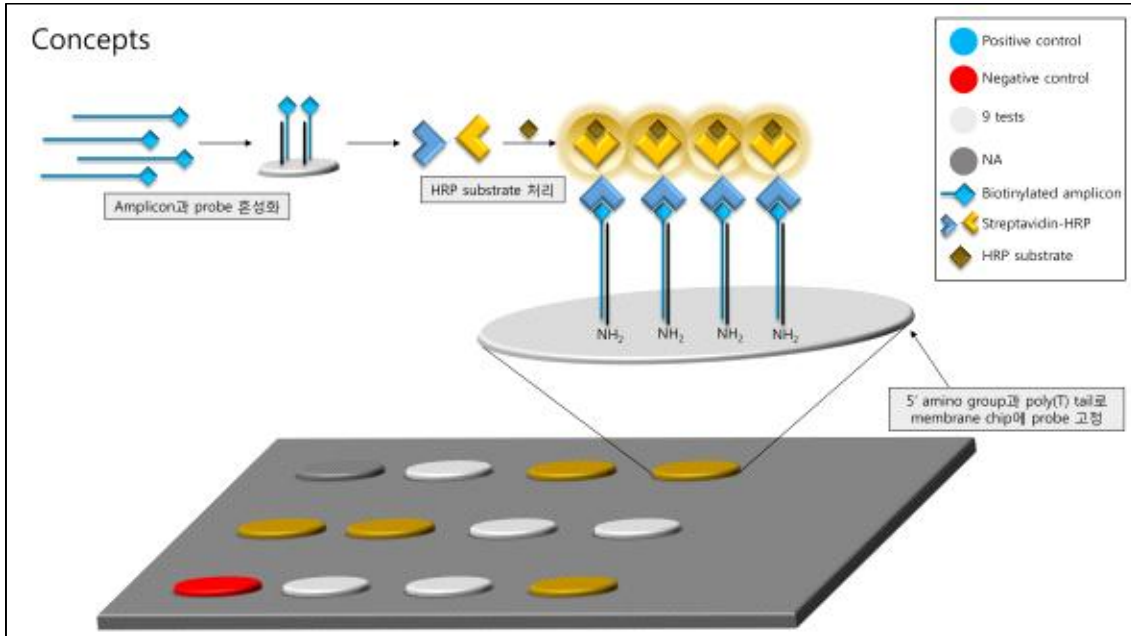
- ① 호흡기 증상을 보이는 3개의 주요 질병 (Avian influenza (AI), Newcastle disease(ND), Infectious bronchitis(IB)) 감별진단용 다중 rapid kit.
- ② control을 포함하여 총 4개의 항원검출 표지를 보유함.
- ③ 국내 및 중국의 주요 발생 strain을 주 대상으로 함.
- ④ 신호는 Gold-particle을 이용하여 민감도가 높은 것을 선별.

<AI, ND, IB 감별 다중 rapid-kit 모식도>



3) 조류인플루엔자 subtype 감별용 현장형 유전자칩

- ① 조류인플루엔자 주요 혈청형 (H5, H7, H9) 및 병원성 (LPAI, HPAI) 감별을 위한 현장형 유전자칩
- ② 기존 유전자칩의 경우 고가의 형광 scanner를 필요로 했던 점을 개선하기 위하여 발색 과정을 통하여 별도 장비 없이 눈으로 확인 가능한 유전자칩 개발.
- ③-1. Surface에 probe를 고정시키고, target DNA를 잡으면 Reporter probe가 target의 나머지 sequence에 붙음. 2가지 probe를 사용함으로써 특이도를 기존 방식보다 향상.
- ③-2. Biotin이 수식된 probe를 제작할 때, biotin을 monomer가 아닌 다수의 biotin이 중합된 polymer를 사용할 것임. HRP-Streptavidin 또한 HRP monomer가 아닌 polyHRP를 사용. 기존 방식은 1개의 biotin 분자에 1개의 streptavidin이 결합하는 방식이었으나 본 과제에서는 biotin polymer와 polyHRP를 사용하여 기존 방식에 비해 극미량의 DNA copy가 존재하여도 높은 수준의 발색 반응을 유도하여 민감도를 향상.
- ④ 기존 개발한 AI 유전자칩은 중국, 동남아시아, 중앙아시아 등 다수의 국가로부터 유래한 인플루엔자 strain을 잡아내는 probe를 설계하였음. 본 과제에서는 중국 및 주요 동남아시아 국가 유래 strain을 목표로 probe를 설계할 것이므로 기존 과제로부터 입증된 probe, primer set을 참고 및 활용하여 본 과제에서 사용할 probe 및 primer를 설계.
- ⑤ 기존 연구 개발과제를 통해 개발된 현장형 유전자 추출장비, PCR 장비 등을 본 연구로 개발될 시제품 평가에 활용.



○ 연구개발 용도 및 적용분야

<Rapid kit 및 유전자칩>

- ① 지역 가축방역위생본부 등 방역기관의 현장진단 기술로의 활용
- ② (주)하림, 목우촌 등 양계회사의 도계장 및 농장 level 에서의 자체 관리 시스템으로의 활용
- ③ (주)세스코 'smart farm' 사업에 적용하여 현장 질병관리 기술로의 활용
- ④ 유전자칩의 경우 현장진단 뿐 아니라 실험실적 HPAI 조기 확진 기술로 사용 가능
- ⑤ Rapid kit 이용 사전 검사 후 HPAI 확진을 위하여 유전자칩을 이용하여 정밀 검사 진행

○ 기존기술과의 차별성

1) Rapid kit

- ① 기존 조류인플루엔자 단일 진단 키트의 고병원성 조류 인플루엔자 (H5 HPAI)에 대한 최소 검출한계 농도는 약 10^5 EID₅₀/ml로 낮아 본 과제에서는 고병원성 조류 인플루엔자에 대한 최소 검출한계 농도를 기존 대비 약 10~100배 (10^{3-4} EID₅₀/ml)까지 낮춰 민감도를 향상시키고자 함.

- ② 기존 단일키트와 달리 subtype 구분 가능한 다중 진단을 가능하게 하여 현장에서의 진단시간을 감소시키고 바이러스 subtype에 따른 방역정책 적용을 가능하도록 함.
- ③ 조류인플루엔자 뿐 아니라 주요 조류 호흡기 질병인 ND, IB를 동시 진단 가능한 kit를 개발함으로써 임상진단에 효율적으로 이용 가능하도록 함.

2) 유전자 칩

- ① 기존 개발된 조류인플루엔자 진단용 유전자칩의 경우 고가의 대형 형광 scanner 장비가 필요하여 현장적용 및 각 지방 방역기관에서의 적용에 어려움이 있었으나 본 과제에서는 육안으로 확인 가능한 유전자칩을 개발함으로써 이를 현장진단 및 실험실적 진단에 적용하고자 함.
- ② 육안으로 확인 가능한 유전자칩의 개발은 probe의 다량 이용이 필요하여 기존 대비 가격이 상승될 수 있으나, 본 과제를 통하여 probe 선별을 통하여 개수를 줄여 합리적인 가격이 되도록 할 예정이다. 또한, 고가의 대형 형광 scanner 장비가 필요 없어 적용 시 기존 대비 경제성이 높을 것으로 사료됨.

[연구개발 대상의 국내·외 현황]

○ 국내 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술현황

- 상용화된 대부분의 조류 인플루엔자 현장 진단 키트는 항원-항체 반응과 금 파티클에 의한 발색, 모세관 현상을 이용한 수평 이동(lateral flow)에 기반한 것임. 최근 기존 수평 이동 방식의 키트에 금 이외의 형광 색소를 이용해 검출 민감도를 높이고 스마트폰을 이용한 고유의 검출 시스템을 개발하는 연구가 국내 연구진에 의해 진행 중임.
- 기존 조류인플루엔자 rapid-kit의 최소검출한계농도는 매뉴얼 상 $10^3\text{EID}_{50}/\text{ml}$ 정도로 표기되어 있으나 이는 바이러스 strain에 따라 상이하며 현재 가금농가에 큰 피해를 일으키고 있는 HPAI 바이러스에 대한 최소검출한계 농도는 약 $10^5\text{EID}_{50}/\text{ml}$ 정도임.
- 기존 낮은 민감도의 rapid-kit는 HPAI 방역용으로 이용하기에 어려움. 10~100배 정도의 최소검출한계농도 감소가 필요하며 이에 대한 많은 연구가 진행중임.
- HPAI 바이러스를 확진하기 위해서는 HA 유전자의 염기서열 분석이 진행되어야 하며 이를 수행하는데에는 약 3~5일 정도의 시간이 소요됨.
- 유전자칩의 경우 현재 조류인플루엔자 단과 subtyping까지 동시에 가능한 유전자칩이 개발되고 있으나 고가의 대형 형광 scanner가 필요하여 현장에서 사용하기 어려움.

2) 시장현황

- 동물용 진단 키트의 시장 규모는 가축전염병 발생 여부에 큰 영향을 받음. 2016년 3월 기준, 동물 진단용 키트는 약 1200만원의 시장 규모를 보였으나, 고병원성 조류 인플루엔자와 구제역이 전국적으로 유행한 2011년 3월에는 4억 원 이상으로 늘어남(1). (출처: 한국동물약품협회)
- 인플루엔자 백신 및 치료제의 사용 증가에 더불어 진단 시장의 규모도 비례하여 증가 중임. 2009년 맞춤형 합성생명공학 클러스터에서 (주)바이오니아 주관으로 (주)제노포커스, 생명연구원, KAIST, 충남대학교가 참여해 신종인플루엔자 단기간 진단 키트가 개발됨. 이 키

트는 개발 후 3년간 약 210억 원의 매출을 기록하였고 국내 신종인플루엔자 진단 시장의 60% 이상을 점유함(2). (출처: 지식경제부)

3) 경쟁기관현황

- 2016년 6월 기준 농림축산검역본부에 등록된 동물용 의료기기 제조 및 수입업체는 (주)바이오노트 이외에 (주)래피젠, (주)메디안디노스틱의 2개 사가 존재함. 이 중 (주)메디안디노스틱은 조류 인플루엔자 항체 검출 키트만을 판매함.
- 유전자칩의 경우 아직 조류인플루엔자 검출용으로 상용화 된 것이 없음.

4) 지식재산권현황

- 바이러스 진단 방법에 대한 특허는 고병원성 조류 인플루엔자의 국내 유행 직후인 2006년부터 매년 평균 25건 이상 출원되고 있음. 바이러스 진단 방법 종류별 특허출원 분포는 유전자 검사방법이 50%를 차지하며 rapid kit에 가장 많이 사용되는 항원 검사방법은 11%를 차지함(3). (출처: 특허청)
- 바이러스 진단 관련 주요 특허 중 현장 진단 키트에 관한 내용에는 'H5형 고병원성 및 일반 조류 인플루엔자 바이러스 항원 진단 스트립 및 그 제조 방법((주)바이오노트, 2006년)'이 있음.
- 인플루엔자 진단 분야의 특허 분석에서 한국, 일본, 미국은 기술혁신의 주체인 특허 출원 인수와 기술혁신의 결과인 특허 출원수가 동시에 증가하는 것으로 나타나 모두 기술 발전 기로 볼 수 있음(4). (출처: 인플루엔자 진단 특허분석 보고서, 한국보건산업진흥원)

5) 표준화현황

- 2015년 8월부터 약사법 및 의료기기법 개정에 따라 동물용 체외진단시약이 동물용의약품에서 의료기기로 관리전환됨. 동물용 체외진단시약의 허가 및 신고 관리 기관인 농림축산검역본부는 기술문서 작성 가이드라인을 지속적으로 업데이트하여 제조수입사의 품질을 관리하고 있음.

○ 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술현황

- 상용화된 조류 인플루엔자 진단용 rapid kit는 A형 인플루엔자 검출이 주류였지만 HPAI(Highly Pathogenic Avian Influenza) 바이러스의 세계적 유행에 따라 H1, H5 등 hemagglutinin subtype 분류를 목적으로 하는 rapid kit도 개발되었음. 30분 이내에 결과를 도출하며 대부분이 인플루엔자 바이러스 항원을 탐지하는 면역반응을 기반으로 함. 금 파티클을 이용한 발색 방식이 대부분이었지만 최근에는 형광소 또는 앵타머에 기반한 방식도 개발되고 있음.
- 인플루엔자 진단의 평균 논문인용수는 24.5건, 평균 특허인용수는 7.45건으로 응용기술 위주의 개발보다는 기초과학과 연계된 기술 개발이 진행 중인 것으로 판단됨(4). (출처: 인플루엔자 진단 특허분석 보고서, 한국보건산업진흥원)
- 해외에도 HPAI 바이러스 방역정책에 이용 가능한 수준의 민감도를 나타내는 rapid-kit는 개발되어 있지 못함.

- 유럽 및 미국에서는 인플루엔자 바이러스 진단을 위해 현재까지 real-time PCR을 이용한 진단방법이 이용되고 있으며, HPAI 바이러스 확진에 필요한 염기서열 분석에 마찬가지로 3~5일 정도가 소요됨.

2) 시장현황

- 동물 진단 시장 규모는 2008년 20억 달러에서 2011년 25억 달러로 성장했고, 2016년까지 30억 달러에 도달할 것으로 예상됨 (5). (출처: *세계의 동물 의료 및 진단 시장 보고서, BCC Research*)

- 세계적으로 감염 면역학 검사용 시약의 시장 규모는 2000년 4억 7천만 달러에서 2005년 7억 2천만 달러, 2015년 11억 5천만 달러로 증가함. 연평균성장률 또한 2000-2008년 기간 5.3%에서 2008-2015년에 6.9%로 증가 추세를 보임 (6). (출처: *Medical Equipment Market Analysis & Forecasts to 2015, GlobalData*)

3) 경쟁기관현황

- 세계 체외진단 시장 점유율은 2013년 기준 Alere가 35.6%를 나타냄.

- 미국의 Becton Dickinson, Quidel, Alere 및 호주의 Inverness Medical 등이 A,B형 인플루엔자 진단 키트를 생산 중이며, 영국 BioChek는 A형 인플루엔자 진단 키트를 생산 중임. 스페인의 Cultek은 A형 인플루엔자 진단 키트와 세계 최초의 H5형 진단 키트를 생산 중임.

- 현재 유전자칩을 생산하여 판매 하고 있는 대표적인 회사는 미국의 Affymetrix사이며, Affymetrix사는 반도체 제조기술의 일종인 photolithography 기법을 최초 사용하여 1.28cm² 안에 65,000개의 서로 다른 oligonucleotide(25 mer)를 가진 chip을 제작하였고, 현재 400,000여개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 제조 할 수 있는 기술을 보유하고 있으며, CYP 450, p53 그리고 HIV의 돌연변이를 검출하는 유전자칩을 개발하였다.

4) 지식재산권현황

- 인플루엔자 진단 분야의 특허 출원수는 전반적으로 증가중이며 특히 미국 특허의 출원이 지속적으로 증가 추세를 나타냄. 국가별 특허점유율은 미국이 54%(미국공개 36%, 등록 18%), 유럽 38% 순으로 나타남. 특허의 키워드 중 Binding compounds active site, specimen reaction measuring 및 sample device test가 가장 많이 나타남 (7). (출처: *인플루엔자 진단 특허분석 보고서, 한국보건산업진흥원*)

5) 표준화현황

- 미국의 경우, 임상 분야에서 사용되는 진단용 rapid kit를 조작성의 복잡성을 기준으로 구분하고 있는데, 조작성과 결과 분석이 간단한 경우 FDA 승인이 필수적이지 않지만 (8) (출처: *CLIA(Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988) waived*), kit 종류에 따른 조작성의 다양성과 시료 선택의 중요성 등으로 인해 사용자 교육을 강력히 권유하고 있음 (9). (출처: *WHO*)

[연구개발의 중요성]

○ AI 발생 및 피해 현황

- 1) 조류인플루엔자(Avian Influenza, AI) 바이러스는 병원성에 따라 닭에 감염 시 가벼운 호흡기 증상, 1-30% 내외의 폐사와 산란저하를 유발하는 저병원성 조류인플루엔자 (Low Pathogenic Avian Influenza, LPAI), 그리고 95% 이상의 높은 치사성을 보이는 고병원성 조류인플루엔자 (Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI)로 크게 2가지 병형으로 구분됨.
- 2) 국내에서는 H5N1형 HPAI가 2003년 최초 발생 이후, 2006년, 2008년, 2010년까지 총 네 번째 발생을 기록함. 2014년에 HPAI로서 다섯 번째 발생이자 이전까지 발생한 적이 없었던 H5N8형 HPAI가 야생조류 및 가금 농장에서 발생하였고, 2016년 3월 마지막 발생이 보고되어 약 2년 2개월간 가금 농가에 막대한 피해를 주고 있음.
- 3) HPAI H5N1이 발생했던 2003~04년(피해액 874억 원), 2006~07년(339억 원), 2008년(1,817억 원) 및 2010~11년(807억 원)에 비해 H5N8이 발생한 2014~2015년 시기의 피해액이 2,386억 원으로 이전 발생사례 대비 큰 피해가 발생됨. (그림 1).

참고		그간 AI 발생현황				
구분	'03~'04년	'06~'07년	'08년	'10~'11년	'14/15년	
시기	겨울철 (03.20~03.31) (102일간)	겨울철 (06.12~07.30) (104일간)	봄철 (08.4.1~5.12) (42일간)	겨울철 (10.12.29~5.16) (139일간)	겨울철 ① 14.1.16~7.25 (195일간) ② 14.9.24~15.6.10 (260일간) ③ 15.9.14~11.15 (62일간)	
발생형	H5N1형	H5N1형	H5N1형	H5N1형	H5N8형	
피해액	874억원 살처분보상금 458 생계소득인정 55 임식용기수 33	339억원 살처분보상금 253 생계소득인정 15 임식용기수 71	1,817억원 살처분보상금 683 생계소득인정 48 임식용기수 126	807억원 살처분보상금 670 생계소득인정 39 임식용기수 98	①+② 2,386억원(예상) 살처분보상금 1,392 (1차 1,017, 2차 375) 생계소득인정 67(1차 42, 2차 25), 임식용기, 수계 등 916(14: 870, 15: 46) ③ 경산 중 살처분보상금 143차, 광항	

[그림 1] 국내 HPAI 발생 현황 및 피해 규모(10) (출처 : 농림축산검역검사본부)

- 4) 우리나라는 HPAI 상재국인 중국과 인접하고 있으며, 다양한 철새들의 이동경로에 위치하고 있어 HPAI 발생가능성이 매우 높음. 이러한 상황에서 피해액 감소를 위한 대비가 필요한 실정임.
- 5) 질병 전파를 50%만 예방하더라도 2014년 같은 경우 1000억 원 이상 피해액을 절약할 수 있었으며, 조기 질병 차단 시 2000억 원 가량의 간접적인 경제적 효과가 있을 것으로 파악됨.

○ 현장진단기술 개발 필요

- 1) 질병의 전파 차단 및 조기대처를 위하여 고효율의 현장진단 기술 개발이 필요함.
- 2) 현재 종란접종법을 이용한 진단방법은 약 3일 이상의 시간이 소요되며, 이에 따라 바이러스 전파가능성이 향상함. 따라서 예방적 살처분 범위가 넓어질 수밖에 없으며 이에 따라 살처분

보상금 등 피해액이 증가하게 됨.

- 실제 2014년도 예방적 살처분을 실시한 386 농가 중 실제 양성 농가는 103개(26.7%) 음성 농가는 283개(73.3%)로 확인됨. 현장 진단을 통한 조기 진단 및 예방적 살처분 범위 감소 시 약 70%의 피해액 감소 (약 1400억원)가 기대됨.
- 바이러스 예찰을 실시한 경우 현장에서 진단결과를 알지 못하여 양성농가 방문 후 주변 농가를 방문하는 경우가 발생하게 되고 이에 따라 검사자에 의한 바이러스 전파에 대한 우려의 목소리가 높아지고 있음. 노동력 부족에 따라 1인 1농가 방문이 어려운 실정에서 간이적인 검사를 통한 검사자의 이동여부 결정이 필요할 것으로 사료됨.
- 국내 발생은 대부분 야생조류를 통한 바이러스의 유입이나 2014년도 발생사례 조사 결과 농장 간 전파로 인하여 바이러스가 지속하여 발생하였음이 확인되었음(II) (Kwon et al., EID, 2015). 조기 발견을 통한 농장 간 전파 최소화는 국내 발생 피해액 절감에 큰 역할을 할 것으로 기대됨.
- HPAI 바이러스의 경우 strain 및 감염축종, 감염 연령 등에 따라 바이러스 배출량이 다르나, 최근 발생한 HPAI 바이러스를 이용한 연구결과에 따르면 닭, 오리, 메추리 및 머스코비오리 등에서 감염 7일째 까지 약 10^{3-4} EID₅₀/ml 정도의 바이러스를 배출하는 것으로 확인됨. 하지만 현재 현장진단 기술의 최소검출한계농도는 HPAI 바이러스에 대하여 약 10^5 EID₅₀/ml로 확인되어 임상증상 발현개체 혹은 폐사체에서의 진단을 위해서 현장진단 기술의 민감도 10~100배 정도의 향상이 필요함.

Table 1. Pathogenicity and transmissibility of the Korean H5N8 virus in domestic poultry species.

Group	No. of virus-positive birds/total no. of birds (Log ₁₀ ± SD) sampled at the following times:										Serology	
	2 dpi		5 dpi		7 dpi		9 dpi		11 dpi		eUSA	H _i log ₂
	OP	CL	OP	CL	OP	CL	OP	CL	OP	CL		
Layer chicken inoculated	8/8 (3.3 ± 0.3)	7/8 (2.9 ± 0.1)	6/6 (4.8 ± 0.8)	6/6 (4.8 ± 0.6)	1/1 (4.8)	1/1 (2.6)	-	-	-	-	0/5	-
Layer chicken contacts	1/6 (1.9)	3/6 (2.0 ± 0.2)	3/6 (2.0 ± 0.3)	0/6	2/6 (2.7 ± 1.1)	2/6 (1.9 ± 0.1)	1/6 (4.8)	2/6 (3.5 ± 0.8)	0/5	0/5	0/5	0/5
Korean native chicken inoculated	2/5 (4.3 ± 1.1)	2/5 (2.7 ± 0.9)	1/3 (4.4)	1/3 (2.0)	1/3 (4.6)	1/3 (3.4)	1/2 (1.8)	0/2	1/2 (2.0)	1/2 (2.3)	1/2	1/2 (6.0)
Korean native chicken contacts	0/3	0/3	2/3 (3.8 ± 2.5)	1/3 (5.1)	1/2 (1.5)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Quail inoculated	4/4 (5.0 ± 0.3)	4/4 (4.1 ± 0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quail contacts	2/4 (1.9 ± 0.1)	2/4 (1.9 ± 0.4)	2/4 (2.7 ± 1.2)	1/4 (3.8)	1/3 (4.6)	1/3 (3.5)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Muscovy duck inoculated	4/4 (3.8 ± 1.1)	4/4 (3.3 ± 1.0)	4/4 (4.0 ± 0.8)	4/4 (3.6 ± 0.7)	4/4 (2.7 ± 0.6)	3/4 (1.8 ± 0.8)	3/4 (1.8 ± 0.5)	2/4 (2.4 ± 0.5)	2/4 (1.7 ± 0.2)	1/4 (1.3)	4/4	4/4 (5.3 ± 1.3)
Muscovy duck contacts	1/4 (1.5)	0/4	4/4 (4.7 ± 0.9)	4/4 (3.8 ± 0.4)	4/4 (3.4 ± 1.1)	4/4 (2.5 ± 0.8)	4/4 (2.7 ± 0.3)	3/4 (2.3 ± 0.7)	3/4 (1.8 ± 0.2)	3/4 (1.7 ± 0.2)	4/4	4/4 (5.5 ± 1.3)

Note: dpi: days post infection, OP: oropharyngeal swab, CL: cloacal swab.

<표1. H5N8 HPAI 바이러스의 사육 가금류 별 바이러스 배출량>

- 본 과제에서는 30분 이내 조류 인플루엔자 여부를 감별할 수 있는 rapid-kit 및 6시간 이내 현장에서 고병원성 조류 인플루엔자 여부를 확진할 수 있는 유전자 칩을 개발할 예정임.



<그림. 현장진단 기술 개발의 필요성>

<AI Subtype 및 병원성 확인>

- AI 조기진단에서 중요한 점은 HPAI 여부 확인임. 국내에서는 H9N2 바이러스를 포함하여 많은 LPAI 바이러스들이 발생하고 있으며, 특히 HPAI의 주요 감염 대상인 오리의 경우 매우 다양한 바이러스를 보유하고 있는 것으로 확인됨.
- 야생오리의 경우에는 더욱 더 다양한 종류의 바이러스가 확인되고 있으며, 이는 오리농가로 유입될 가능성이 높은 실정임. 이러한 상황에서 다른 AI 바이러스와 HPAI 바이러스의 구분은 불필요한 살처분을 예방하기 위한 핵심 기술이 될 것으로 기대됨.
- 현재 조류 인플루엔자를 진단하는 많은 현장 기술들이 개발되어 있으나 H5 subtype 감별 및 고병원성 여부를 구분하는 기술은 개발되어 있지 않음. 현재는 종란접종 후 유전자 sequencing을 통하여 고병원성 H5 바이러스를 확진할 수 있으며 이는 국가기관 등 기술적으로 완성된 실험실에서 약 3~5일이 소요됨.
- 특히 고병원성 H5 조류 인플루엔자 항원을 대상으로 하는 실험은 Biosafety level 3 (BL3) 이상의 시설을 보유하고 있어야 하며 이에 대한 제품개발 및 평가가 제대로 이루어지고 있지 않음.
- 본 과제에서는 바이오노트에서 보유하고 있는 다양한 항체를 이용 건국대학교의 BL3 실험실에 H5 HPAI 바이러스를 이용 실험을 진행할 예정임.
- 선행 연구를 통해 개발된 유전자 칩의 경우 6시간 이내 subtype 감별 뿐 아니라 병원성 여부까지 확인이 가능하며, PCR product를 여러 probe로 감별 가능하다는 점에서 sequencing을 대체하여 확진 기술로 이용 가능함.

<AI 감별진단>

- Newcastle disease(ND) 및 Infectious bronchitis(IB)의 경우 호흡기 및 산란저하를 일으키며 AI 바이러스와 유사한 임상증상을 나타냄.
- 국내에서는 저병원성 H9N2 바이러스 및 IB 바이러스가 농가에 큰 피해를 일으키고 있어 이에 대한 감별진단이 주요한 상황임.
- 고병원성 ND 바이러스 및 HPAI 바이러스는 모두 닭에 감염 시 큰 폐사율을 나타내어 이 두 질병의 현장에서의 감별진단은 국가전염병 관리를 위하여 매우 주요한 실정임.
- 현재 국내에서는 ND 백신을 이용하고 있으나 미국, 유럽 등 국외에서는 ND 백신을 이용하고 있지 않은 경우가 많아 HPAI와 함께 주요 관리 대상이 되고 있음.

<현장형 유전자 칩의 개발>

- HPAI 바이러스는 LPAI 바이러스와 달리 multi-basic cleavage site를 보유하고 있는 것이 특징이며 이를 검사하기 위해서는 현재 종란 배양 후 sequencing을 진행 하여야하며 이는 약 3~5일이 소요됨.
- 기존 개발된 유전자 칩의 경우 HPAI를 단시간내 검사 가능한 기술로 소개되었으나 고가의 형광 스캐너를 필요로 한다는 점에서 사용에 제한이 있었음.

- 이에 따라 본 과제에서는 기존 형광 dye를 대체하여 현장에서 발색 가능한 platform을 개발하여 현장에서 6시간 이내 HPAI를 확진하는 기술을 개발하고자 함.
- 현장형 PCR 장비 등은 기존 연구과제를 통하여 개발되어 있어 현장형 유전자 칩 개발 시 바로 산업화가 가능할 것으로 기대됨.

[선행연구 내용 및 결과]

<Rapid kit>

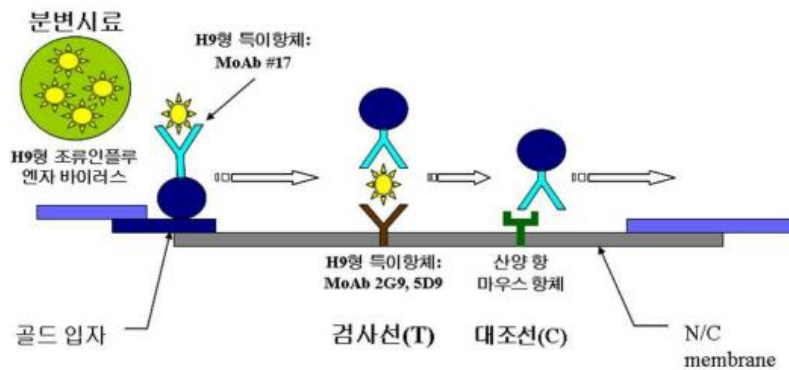
- 조류 인플루엔자(고병원성 H5) 바이러스 단독 혈청형 항원 검사키트 개발

: 분변 검체를 활용하여 고병원성 H5 조류인플루엔자 항원을 검사할 수 있는 키트를 개발하여, 허가 후 시판



- 조류 인플루엔자(저병원성 H9) 바이러스 단독 혈청형 항원 검사키트 개발

: 분변 검체를 활용하여 저병원성 H9 조류인플루엔자 항원을 검사할 수 있는 키트를 개발하여, 허가 후 시판



<유전자 칩>

- 조류 종관별 DNA Chip 개발

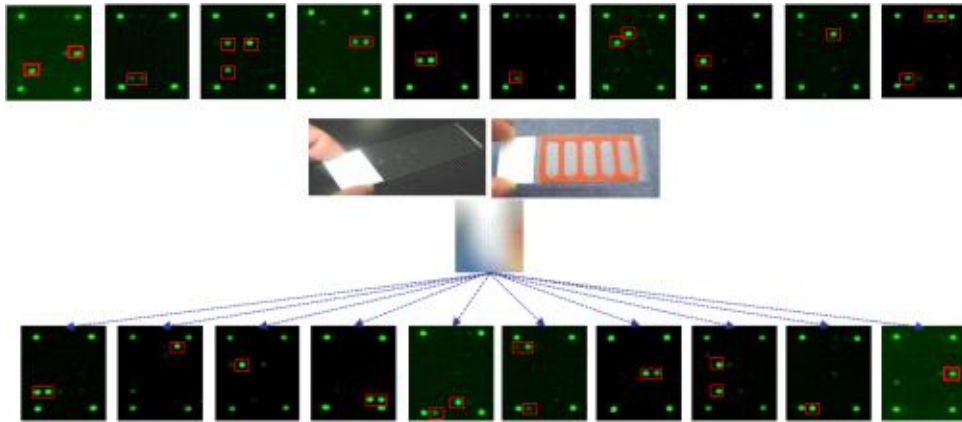


그림 . 조류 종관별 DNA Chip

○ 조류 인플루엔자 subtyping DNA Chip 개발

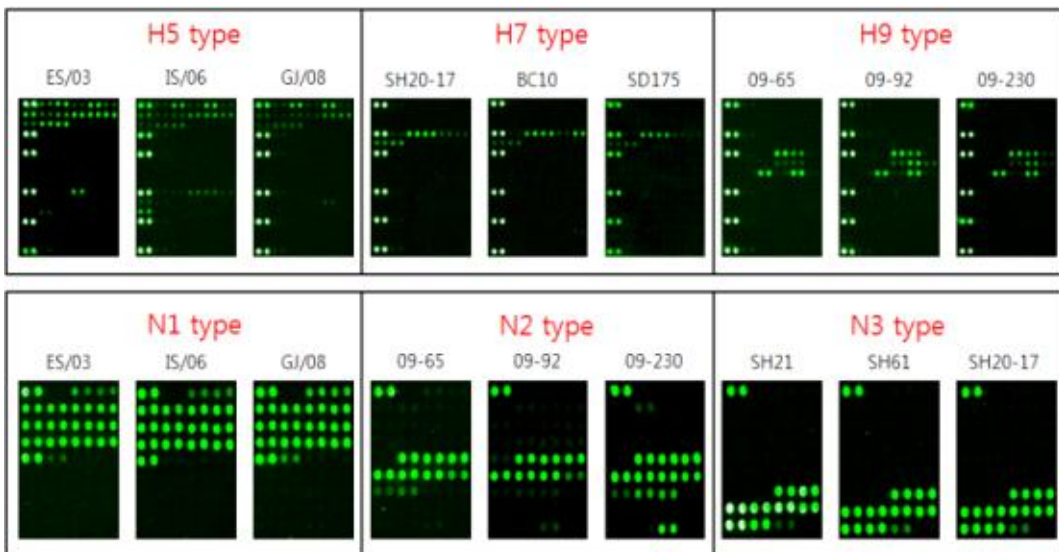


그림. 조류 인플루엔자 주요 subtyping DNA Chip

○ 조류 인플루엔자 subtype 및 병원성 감별 유전자 칩의 개발

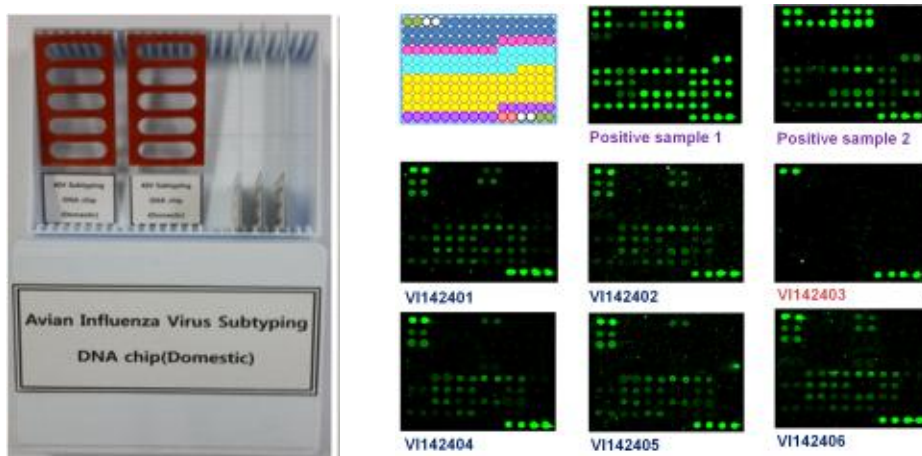


그림. 유전자칩을 이용한 고병원성 조류 인플루엔자 진단

- 고병원성 조류 인플루엔자 진단용 유전자칩의 개발을 위하여 건국대학교 BL-3 시설을 이용하여 고병원성 바이러스 및 실제 조류의 임상시료를 이용하여 유전자칩의 개발 및 평가를 진행함. 확보된 고병원성 조류 인플루엔자 시료 및 관련 BL-3 시설은 본 과제 수행에 이용될 예정임.

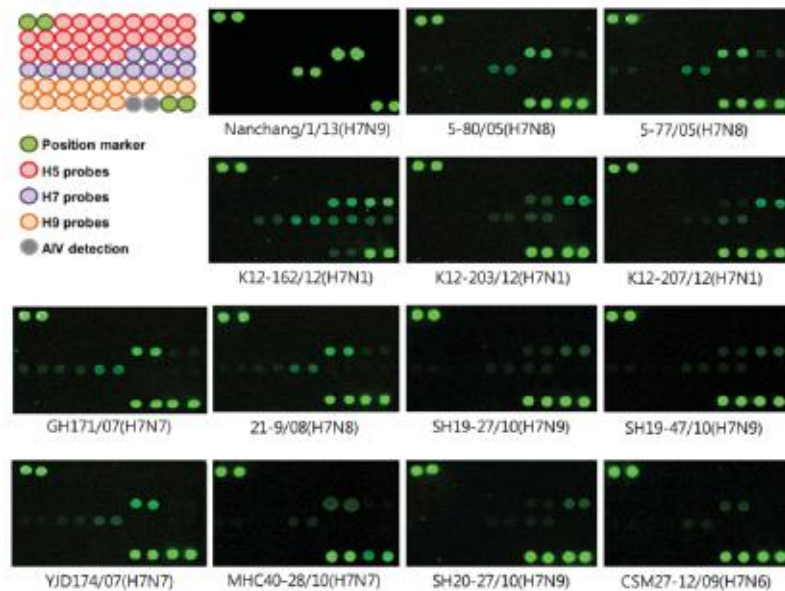


그림. 유전자칩을 이용한 중국 H7N9 바이러스 진단

- 중국 H7N9 바이러스 진단을 위하여 해당 유전자를 합성하였으며, 동일 subtype의 바이러스 균주를 이용하여 해당 유전자칩의 효능을 평가함. 진단 전략 및 시료는 본 과제 수행에 활용될 예정임.

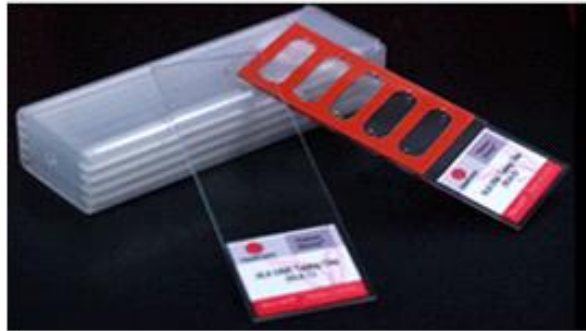
*사업신청팀의 선행특허 및 실용화 실적 자료

1) 발명의 명칭: 마이크로어레이의 신호증가용 보조 프로브, 표적물질, 키트, 보조프로브 설계 방법 및 마이크로어레이의 신호측정방법

- 특허등록번호: 제 10-0939454호
- 특허등록일 :2010년 1월 22일
- 요약서

본 발명은 마이크로어레이의 신호증가용 보조 프로브, 표적물질, 키트, 보조프로브 설계방법 및 마이크로어레이의 신호 측정방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는, 염기서열 또는 이것의 변이를 알고자 하는 대상 산물로부터 증폭시킨 표적산물을 마이크로어레이 사의 표적 프로브에 혼성화 시킴에 있어서, 상기 표적 프로브의 표적 형광물질이 나타내는 신호감도를 증가시키기 위하여, 별도의 보조 형광물질을 가지는 보조 프로브를 함께 혼성화(hybridization) 시키는 것이다.

2) 발명의 명칭: HLA 유전자형 분석을 위한 올리고뉴클레오티드 조성물 및 그 검사방법(국내 특허등록, 중국특허등록):바이오코아(주)공동특허



- 특허등록번호: 제 10-0581002호(중국 ZL200480042529.4)

- 특허등록일 : 2006년 5월 10일

- 요약서

본 발명은 혈액, 세포 및 조직으로부터 DNA를 추출하고 HLA 유전자에 대한 PCR을 시행한 후에 HLA 올리고뉴클레오티드 칩과 반응시킴으로써 HLA 유전자형을 분석하는 방법에 관한 발명으로, 하나의 슬라이드 위에서 HLA-A, -B, -Cw, -DR에 대한 유전자형의 분석을 간단하고 정확하게 검사하는 방법을 제공한다.

3) 발명의 명칭: 다기능성 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응의 산물을 확인하는 방법

- 특허등록번호: 제 0464084호

- 특허등록일: 2004년 12월 20일

- 요약서

본 발명은 PCR에 사용되는 프라이머의 염기서열을 포함하는 5' 말단 및 프라이머로부터 합성되는 1개내지 20개의 염기를 포함하는 3' 말단을 포함하는 다 기능성 프라이머를 부착시킨 고상 지지체에서 바이오틴 또는 형광물질이 결합된 염기를 사용하여 PCR을 수행한 다음, 전기 PCR 수행에 의하여 생성된 산물에 결합되어있는 바이오틴 또는 형광물질을 검출하여 PCR 산물을 확인하는 방법, 다기능성 프라이머를 부착시킨 고상지지체와 PCR 혼합물을 포함하는 PCR 산물 확인용 키트 및 남성불임 관련 유전자에 대한 다기능성 프라이머를 포함하는 남성 불임 진단키트에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 본 발명의 다기능성 프라이머가 프라이머 뿐만 아니라 탐침으로도 작용할 수 있기 때문에, 증폭과 교잡이 한 번에 수행되어 보다 간편하고 신속하며 정확하게 PCR 결과를 확인할 수 있다.

4) 발명의 명칭 : 조류인플루엔자 바이러스 검사용 프로브 조성물, 유전자 칩 그리고 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법

- 특허등록번호: 제 10-1592247호
- 특허등록일: 2016년 02월 01일
- 요약서

본 발명은 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형을 결정하는 HA 유전자의 아형 (H5형, H7형, H9형) 및 NA 유전자의 아형(N1형, N2형, N3형) 판별과 병원성의 검사가 동시에 가능하면서도 조류인플루엔자 바이러스를 조기에 신속하고 정확하게 검사할 수 있는 조류인플루엔자 바이러스 검사용 프로브 조성물, 유전자 칩 그리고 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 저가의 비용으로 5시간 이내에 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형 및 병원성 감별이 가능하고 저병원성 H9형 바이러스의 감별과 더불어 경제적이며 빠른 진단으로 고병원성 조류인플루엔자 발생시 조기진단에 따른 초동대처로 질병발생 피해를 최소화하는데 기여할 수 있다.

5) 발명의 명칭 : 조류인플루엔자 바이러스를 고감도로 검사하기 위한 키트, 이를 위한 조류인플루엔자 바이러스 검사용 프로브 조성물 및 유전자 칩, 그리고 이들을 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법

- 특허등록번호: 제 10-1610134호
- 특허등록일: 2016년 04월 08일
- 요약서

본 발명은 HA 유전자의 아형 판별과 병원성 여부의 검사가 동시에 가능하면서도, 검사대상 조류 인플루엔자 바이러스가 고병원성인지 또는 저병원성인지 여부를 민감도 높게 신속하고 정확하게 검사할 수 있는 조류인플루엔자 바이러스 검사용 프로브, 유전자 칩 및 검사용 키트 그리고 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 가금류에 치명적이고 인체에도 치명적일 수 있는 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형과 병원성 여부의 검사가 동시에 가능하되, 특히 고병원성인지 또는 저병원성인지 여부를 민감도 높게 신속하면서도 정확하게 그리고 경제적으로 검출하는 기술을 제공하여 조류인플루엔자 바이러스에 대한 방역 대책을 신속하게 마련하게 함으로써 조류인플루엔자 바이러스의 확산에 의한 위험을 조기에 차단할 수 있다.

6) 발명의 명칭 : 신속 면역크로마토그래피법에 의한 H5형 고병원성 및 일반조류인플루엔자 바이러스 항원 진단 스트립 및 그 제조방법

- 특허등록번호: 제 10-0762825호
- 특허등록일: 2007년 09월 21일
- 요약서

본 발명은 신속 면역크로마토그래피법에 의한 일반 조류인플루엔자 및 H5형 고병원성 조류인플루엔자 진단 스트립 및 그 제조방법에 관한 발명으로 상세하게는 헤마글루티닌 항원이 H1부

터 H5형인 모든 조류 인플루엔자 바이러스에 공통적인 항체 및 헤마글루티닌 항원이 H5인 고병원성 조류인플루엔자에 특이적인 항체를 사용하여 신속 면역크로마토그래피법에 의해 조류 분변 또는 조직에서 일반 조류인플루엔자 바이러스 및 H5인 고병원성 조류인플루엔자 감염 여부를 신속하고 감별적으로 검사할 수 있는 진단 스크립 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

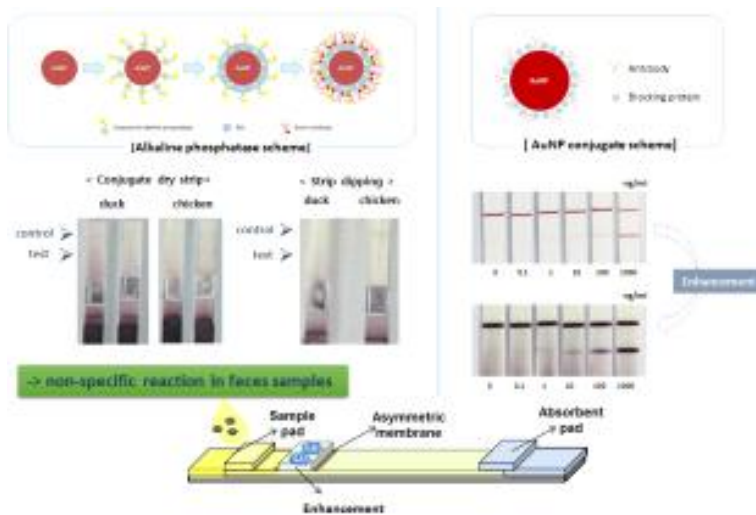
7) 발명의 명칭 : 신속 면역크로마토그래피법에 의한 H9형 조류인플루엔자 바이러스 진단 키트 및 이를 이용하여 H9형 조류인플루엔자를 진단하는 방법

- 특허등록번호: 제 10-1211593호
- 특허등록일: 2012년 12월 06일
- 요약서

본 발명은 헤마글루티닌 항원이 H9형 조류인플루엔자에 특이적인 항체를 이용한 신속 면역크로마토그래피법에 의해 닭 총 배설강(분변) 스왑시료에서 H9형 조류인플루엔자 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 진단키트 및 이를 이용하여 H9형 조류인플루엔자를 진단하는 방법에 관한 것이다.

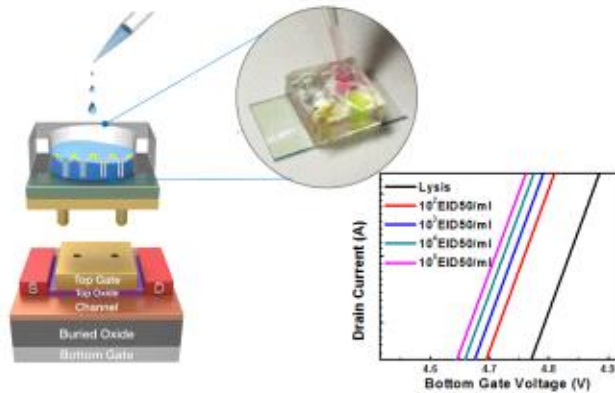
<기타 진단관련 선행연구>

○ Rapid kit enhancement



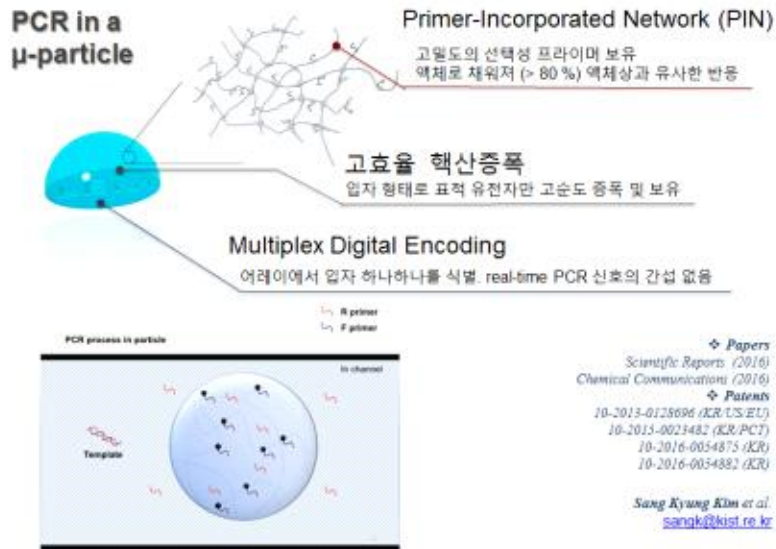
- 기존 건국대학교, 한국과학기술원 (KIST) 및 광주과학기술원 (GIST)이 공동연구를 통해 개발한 조류 인플루엔자 rapid kit enhncera
- 본 기술은 기존 rapid kit의 신호를 증폭시켜줄 수 있는 추가 시약을 통해 rapid kit의 최소검출한계 농도를 추가적으로 약 10배 감소 시키는 효능을 나타냄.
- 위 연구과제 개발 과정에서 확보한 시료 및 기술은 본 과제의 개발 제품 평가 및 산업화에 활용 될 예정이며, 향후 본 기술과 접목을 통하여 rapid kit 최소검출한계 농도 감소에 활용 될 예정이다.

○ dFET



- 건국대학교와 한국과학기술원 (KIST)의 공동 연구를 통해 항원 항체 결합을 민감하게 측정할 수 있는 현장 조류 인플루엔자 진단용 disposable FET(Field Effect Transistor)를 개발이 진행중이며, 위 제품의 개발은 현장에서의 진단 민감도 향상에 기여할 것으로 기대됨.
- 위 연구과제 개발 과정에서 확보한 시료 및 기술은 본 과제의 개발 제품 평가 및 산업화에 활용 될 예정이며, 향후 본 기술과 함께 적용하여 현장 진단의 민감도 향상에 기여하고자 함.

○ PIN PCR



- PIN PCR 방법은 PCR 효율을 높여주고 여러 primer의 중첩 사용이 가능하다는 장점을 보유하고 있으며 현재 건국대학교와 한국과학기술원 (KIST)의 공동 연구를 통해 조류 인플루엔자 subtyping을 위한 multiplex PCR 개발이 진행중임.
- 위 기술은 본 과제를 통해 개발하고자 하는 유전자칩의 진단을 위한 PCR 민감도 향상에 기여할 것으로 기대됨.

1-3. 연구개발 범위

[1차년도: 개발 및 최적화]

1) 개발 목표

- ① 주관연구기관(바이오노트)
 - 조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 용 다중 rapid-kit 개발
 - 조류인플루엔자 감별진단 용 (ND, IB) 다중 rapid-kit 개발
- ② 제1협동연구기관(한양대학교)
 - 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별용 현장형 유전자칩 개발
- ③ 제2협동연구기관(건국대학교)
 - Rapid-kit 및 유전자칩 개발용 항원 및 cDNA 제공
 - Rapid kit 및 유전자칩 실험실 내 효능 평가

2) 개발 내용 및 범위

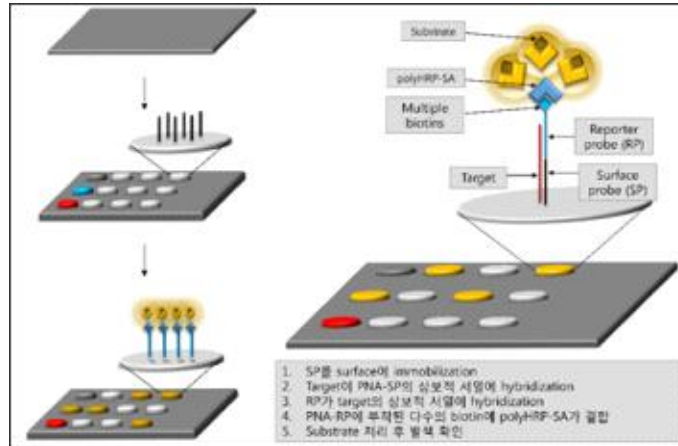
- ① 주관연구기관(바이오노트) :
 - 다중 rapid kit 제작 용 항체 선별
 - 진단용 buffer 및 항체 등의 최적화
 - 다중 rapid kit platform 및 제작 공정 확립



<그림. 다중 rapid kit 개발 모식도>

② 제1협동연구기관(한양대학교) :

- 표적 조류인플루엔자 염기서열 조사 및 확보
- 표적 특이도 향상을 위한 2가지 종류의 probe 설계 및 제작
- Probe 고정조건 기초실험
- multi biotin polymer 및 poly HRP를 활용한 민감도 향상조건 기초실험
- 현장형 발색 방법 비교 실험 (HRP substrate인 DAB, TMB, OPD, ABTS 등의 산화를 통한 발색법 및 그 외 다양한 chemistry에 대한 test)
- chip surface 별 발색반응 test
- 유전자칩 내 probe와 target 혼성화 반응 조건 기초실험



<발색반응을 이용한 유전자칩 개념도>

③ 제2협동연구기관(건국대학교)

가. Rapid kit 개발 용 불활화 항원 제공

- 고병원성 조류 인플루엔자 (HPAI) rapid kit 용 항체 pair 개발을 위한 고병원성 조류 인플루엔자 항원을 제공함.
- 건국대학교 보유 H5 HPAI 바이러스의 BL3 실험실 내 대량 배양 후 배양 바이러스를 Formalin 처리함. 종란에 2회 계대하여 불활화 여부를 확인한 후 반출함.
- LPAI 바이러스의 경우 건국대학교 수의과대학 내 배양 및 불활화를 실시함.
- 표준 정제 항원 약 3종 (LPAI H5N2, H7N7, H9N2 등), HPAI 4종, LPAI 10종, negative control (종란 allantoic fluid, NDV, IBV, 분변 등) 제공 예정
- 표준 정제 항원의 경우 원심분리 상층액을 0.45 μ m filter를 이용하여 filtering 후 삼투막 (Spectra/PorMWCO 1000; Spectrum Laboratories, Houston)을 이용 dialysis를 진행함.

나. Protein 항원 제공

- Baculovirus에 원하는 유전자를 삽입 후 insect cell에 감염시켜 발현시켜 protein 항원을 제작함.
- 제작한 항원은 정제 후 정량을 측정하여 제공하며, 향후 개발 키트의 평가에도 이용함.
- HA 3종, NP 3종 이상을 발현하여 제작할 예정임.

다. 유전자칩 개발 용 cDNA 제공 (20종 이상)

- HPAI 바이러스의 경우 BL3 실험실 내, LPAI 바이러스의 경우 BL2 실험실에서 RNA를 추출함.
- 추출한 RNA는 reverse transcription kit를 이용하여 cDNA를 제작 후 안전성을 위하여 Klenow enzyme을 이용하여 double strand cDNA를 제작함.
- 제작한 cDNA는 한양대학교에 제공하여 유전자칩의 1차적인 screening 물질로 이용함.
- cDNA는 HPAI 10종 LPAI 30종 및 negative control 등으로부터 제작할 예정임.

라. 유입 가능 바이러스 분석

- 2003년 이후 국내에 피해를 입혀온 HPAI 바이러스는 모두 중국 동남부에서 유래함.
- 중국 동남부 중심의 바이러스 분석을 통하여 향후 유입 가능 바이러스의 sequence를 확보함.
- 확보한 sequence는 유전자칩의 검증시험에 이용함.
- 유입가능 바이러스의 sequence 분석을 통하여 유전자칩의 probe를 재 구성함.
- 중국 Qingdao University 및 몽골의 State Central Veterinary Laboratory의 협조 요청을 통한 유입 가능 해외 바이러스 항원 분석 및 kit 검증에 대하여 협의를 진행함.

다. 개발 단계에서의 실험실 내 효능평가

- 개발단계에서 개발제품의 효능평가를 위한 바이러스 시료, 소수의 임상시료, 분변 등을 적용함.
- 제품의 예상 민감도, 특이도 및 최소검출한계농도 등을 측정함.
- 제품의 기존 기술 대비 향상 정도를 측정함.
- Rapid kit의 항체 pair를 선별하여 시제품 제작이 가능하도록 함.
- 유전자칩의 경우 probe를 선별하여 시제품 제작이 가능하도록 함.

구분	종류	세부내용	
항원	표준 정제 항원	2종 (H5N2, H7N7, H9N2)	
	WIV (Whole Inactivated virus)	H5 LPAI 10종 HPAI 3종	
		Non-H5 H1-H12 LPAI NDV, IBV	
	Protein	HA	4종 (HPAI)
		NP	3종 (H5N1, H5N8, H9N2)
유전자	cDNA	H1-H12 avian influenza H5 HPAI 포함	
분변	Negative 분변	닭 및 오리 분변	

<표. 과제 수행 관련 건국대학교 보유 AIV 항원 및 유전자 등>

[2차년도: 시제품 개발 및 효능평가]

1) 개발 목표

① 주관연구기관(바이오노트)

- 조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 용 다중 rapid-kit 시제품 개발
- 조류인플루엔자 감별진단 용 (ND, IB) 다중 rapid-kit 시제품 개발

② 제1협동연구기관(한양대학교)

- 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별용 현장형 유전자칩 시제품 개발

③ 제2협동연구기관(건국대학교)

- Rapid-kit 및 유전자칩 시제품 효능 평가

2) 개발 내용 및 범위

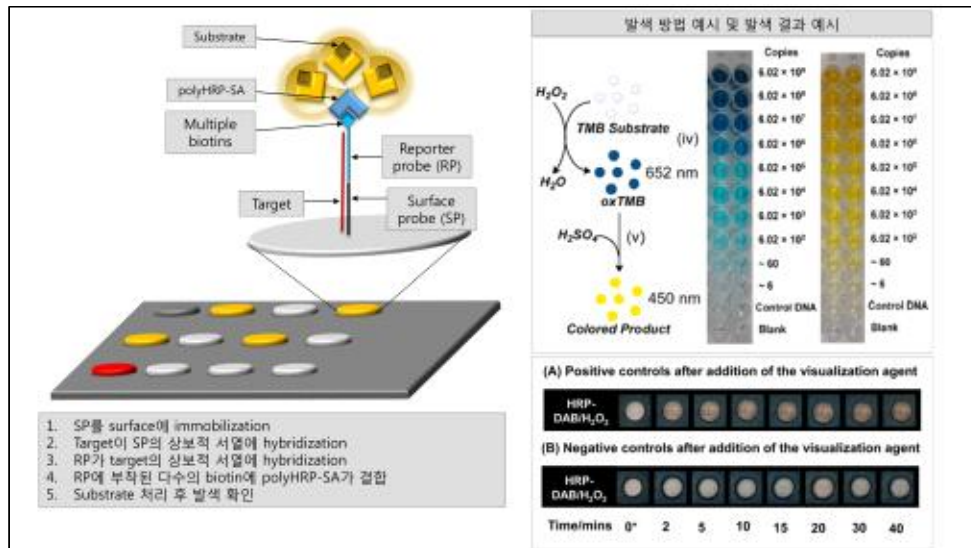
① 주관연구기관(바이오노트) : Gold-particle 기반 Rapid kit 시제품 개발



<Rapid kit 시제품 예시>

② 제1협동연구기관(한양대학교) :

- Probe 개수 최소화
- Multi biotin polymer 및 poly HRP를 활용한 민감도 향상조건 최적화
- 유전자칩 내 probe와 target 혼성화 반응 조건 최적화
- Chip surface 및 발색반응 chemistry 최종 선정
- 발색반응을 이용한 현장형 유전자칩 시제품 개발



<발색반응의 결과 및 시제품의 예시>

③ 제2협동연구기관(건국대학교)

가. 시제품 효능 평가

- 주관 및 제1협동에서 개발된 rapid-kit 및 유전자칩의 시제품에 대한 효능평가를 실시함.
- 효능 평가는 바이러스 표준시료 및 protein 시료를 이용하여 기존 기술 및 종란점종법 대비 성능을 확인함.
- 표준 바이러스를 PBS에 10진 희석하여 키트 검출능 확인 후 키트의 최소검출 한계 농도 (EID₅₀/ml) 를 확인함.
- 표준 바이러스를 분변을 섞은 PBS에 10진 희석하여 키트 검출능 확인 후 분변 조건에서의 키트의 최소검출 한계 농도 (EID₅₀/ml)를 확인함.
- protein 항원을 10진 희석하여 키트 검출능 확인 후 키트의 최소검출 한계 농도 (mg/ml)를 확인함.

나. 임상시료 적용

- 건국대학교 보유 swab 시료 및 분변시료 약 100건 이상 (양성 50건, 음성 50건)을 이용하여 키트의 민감도 및 특이도를 확인함.
- 임상시료의 바이러스 양을 real-time PCR을 통하여 정량 측정하여 최소검출한계농도를 측정함.
- SPF 닭을 이용하여 H9N2 바이러스 접종 후 2일 간격으로 swab시료에서 검출여부를 확인하여 kit 의 detection 가능 시기를 측정함.

다. BL3 실험실 내 고병원성 조류인플루엔자 실험 진행

- HPAI 표준 바이러스를 이용하여 바이러스의 최소검출 한계농도를 측정함.
- 건국대학교 BL3 실험실 보유 HPAI 임상시료 (swab, 분변)를 이용하여 민감도 및 특이도를 측정함.
- BL3 실험실 내에서 SPF 닭을 HPAI 감염시킨 후 2일 간격으로 swab시료에서 검출여부를 확인하여 kit의 detection 가능 시기를 측정함.

[3차년도: 제품 등록 및 산업화]

1) 개발 목표

① 주관연구기관(바이오노트)

- 조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 용 다중 rapid-kit 제품등록 및 산업화
- 조류인플루엔자 감별진단 용 (ND, IB) 다중 rapid-kit 시제품 제품등록 및 산업화

② 제1협동연구기관(한양대학교) : 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별 용 현장형 유전자 칩 제품등록 및 산업화

③ 제2협동연구기관(건국대학교) : Rapid-kit 및 유전자칩의 현장적용 및 효능평가

3) 개발 내용 및 범위

① 주관연구기관(바이오노트) : 제품등록 진행

보관기간, 정밀도 등 제품등록 관련 실험 진행

제품 보완 시 보완서류 작성

제품 가격 책정 및 산업화 대상 선정

기술이전 및 산업화

② 제1협동연구기관(한양대학교) : 제품등록 진행

보관기간, 정밀도 등 제품등록 관련 실험 진행

제품 보완 시 보완서류 작성

제품 가격 책정 및 산업화 대상 선정

기술이전 및 산업화

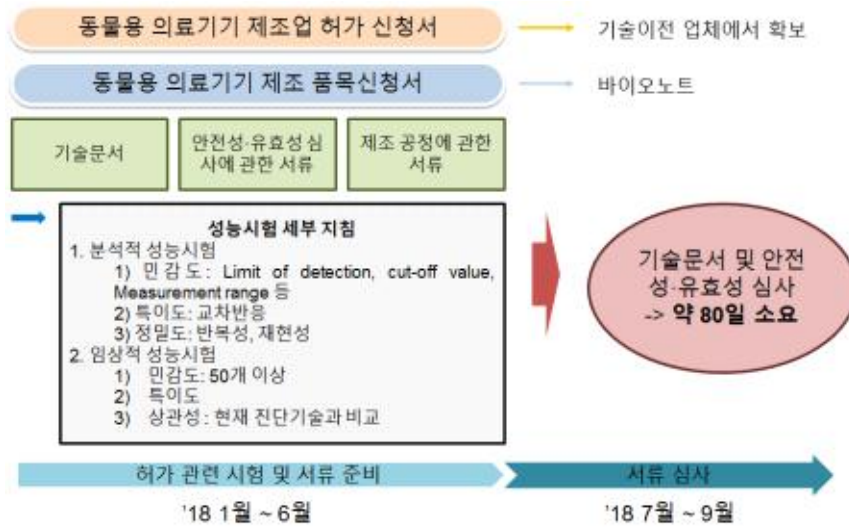
③ 제2협동연구기관(건국대학교) :

가. 현장적용을 통한 추가 시험 자료 확보

- 겨울철 철새도래지 방문 및 철새 분변시료 검사 시행 (300건 이상)
- 생가축유통시장 (모란시장 등) 방문하여 샘플 채취 후 샘플에서의 검사 시행 (30건 이상)
- 닭 및 오리 농장을 방문하여 샘플 채취 후 검사 시행 (10건 이상)
- 채취한 시료는 현장에서 rapid-kit 및 유전자칩 검사 후 냉장보관 상태에서 실험실로 운송 후 종란접종법을 이용 양성, 음성 판정을 실시함.

나. 제품 등록을 위한 추가 실험 진행

- 검사 성적서에 대하여 농림축산검역본부와 협의 후 제품등록을 위한 추가 실험을 실시함.
- Rapid-kit 및 유전자칩의 보관기간에 따른 안정성 검사
- 신규 분리주에 대한 최소검출한계 농도 및 민감도 검사



<제품등록 과정 모식도>

2. 연구수행 내용 및 결과

[연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계]

1) 주관연구기관(바이오노트) [현장 조류인플루엔자 subtype 검출 및 감별진단용 rapid kit 개발]

- 조류인플루엔자 현장진단용 H5, H7 subtype 검출용 다중 rapid-kit 개발
- 제2협동연구기관(건국대)에서 제공하는 개발용 불활화 항원을 이용하여 제작용 항체 선발
- 건국대학교 송창선 교수, 이중복 교수, 농림축산검역본부 이운정 연구관을 포함한 자문위원단과 함께 rapid-kit의 효율을 높일 방법을 모색.
- 관련 연구개발에 대한 특허를 출원하고 시제품 결과에 따른 농림축산본부에 동물용 제외 진단기기 제품등록 진행.

2) 제1협동연구기관(한양대) [조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별용 현장형 유전자칩 개발]

- 협동연구기관이 기존 보유하고 있는 기술인 조류 인플루엔자의 주요 혈청형, 병원성 동시 감별진단키트의 현장적용을 위한 연구 및 개발
- 민감도 측정을 위한 혈청형별 재조합 DNA를 1.0×10^6 부터 1.0×10^1 copy number까지 연속 희석하여 검출 한계를 측정하고 현장에서 추출한 RNA의 검출한계를 측정하여 민감도 향상조건 최적화.
- 유전자 칩 내에서의 Primer, Probe 표적 반응농도와 PCR 반응 조건 최적화 실험 진행
- Real-time PCR 유전자 칩 및 형광카메라를 이용한 육안으로 확인 가능한 진단 및 검출로 인한 민감도, 정확성 향상
- 제2협동연구기관(건국대)에서 제공하는 cDNA를 이용하여 유전자 marker 탐색 및 최적화
- 반복실험을 통한 현장형 유전자칩 platform 최적화.

3) 제2협동연구기관(건국대) [Rapid-kit 및 유전자칩 제작용 샘플 제공 및 실험실내 평가]

- 주관연구기관(바이오노트)에서 제작할 rapid-kit 제작용 항원 및 제1협동연구기관(한양대)에서 제작할 유전자 칩에 적용할 cDNA 제공.
- 다양한 혈청형의 조류인플루엔자 바이러스와 감별진단을 위한 다른 조류 호흡기 바이러스(NDV, IBV)의 불활화 항원 제공.
- 주관연구기관 및 제1협동연구기관(한양대)에서 제작한 시제품에 대한 효능평가.
- 시제품들에 대한 특이도 및 검출한계 시험 진행.
- 제품 등록을 위한 기타 추가 실험실내 실험 진행.
- 농림축산검역본부 및 경기도 축산위생연구소와 협의하여 실제 현장진단에 시범 적용 할 예정.

○ Rapid-kit 및 유전자칩 산업화

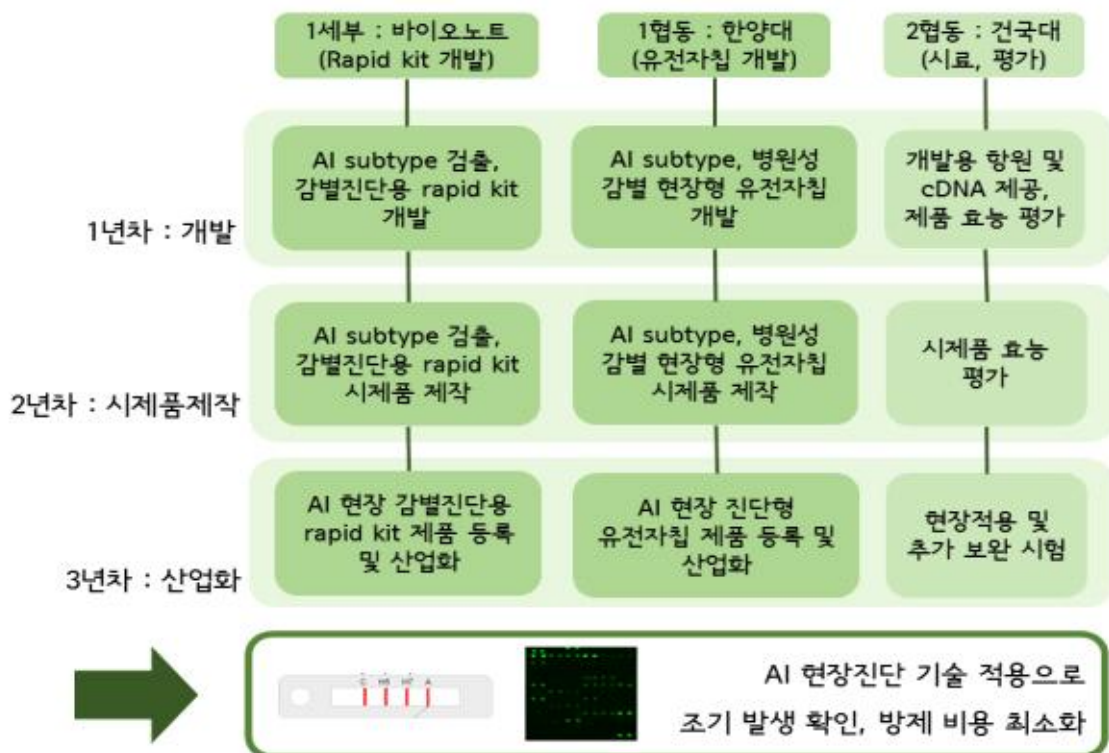
- 관련된 특허를 출원하여 지적재산권을 확보하고, 진단용 rapid-kit와 reader에 대한 동물용 진단용품 등록 추진. 실제 방역현장에서 적용토록 할 예정.
- rapid-kit의 경우 생산시설을 확보하고 있는 바이오노트에서 자체 산업화 실시예정.

- 유전자칩의 경우 한양대에서 기술 개발 및 시제품 생산을 진행하고, (주) 바이오코아 등의 유전자칩 생산업체에 기술이전 후 산업화 실시 예정.
- 실제 농장 통제시스템을 운영중인 (주)세스코(김형준 책임연구원)와 협의하여, 실제 상황에 준하는 농장 모의시험 진행 예정.

○ 다른 기관과의 협조방안

- 농림축산검역본부 인플루엔자 전문 연구팀 업무협력 (이윤정 연구관)
 - : 조류 인플루엔자 바이러스의 발생 특성 및 방역 현황 자문, rapid-kit, 유전자칩의 진단 target에 대한 자문.
- 경기도 축산위생연구소와의 업무 협력
 - : 실제 방역현장에서 사용하는 진단방법에 대한 애로사항, 개선방안 논의. rapid-kit 및 유전자칩 개발 후 현장평가 협력
- USDA 인플루엔자 연구팀과 업무협력 (이동훈 박사)
 - : 미국의 인플루엔자 방역 대응방식 및 진단기술 방향에 대한 자문
- (주)세스코 연구팀과의 업무협력 (김형준 책임연구원)
 - : 본 연구과제에서 개발 예정인 rapid-kit과 유전자칩의 현장적용에 대한 추가 개선사항 및 방역시스템에 대한 자문
- (주)하림, (주)목우촌 등 양계 기업과 가금 농가 및 현장진단 담당자와의 업무 협력
 - : 실제 현장상황에서의 조류인플루엔자 진단에 대한 개선방향 제안, 현장 적용 협조

<세부과제별 연차 목표>



[연구개발 추진일정]

일련 번호	연구내용	1차년도												책임자 (소속기관)	
		월별 추진 일정													
		9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	다중 rapid kit 제작용 항체 선별								■	■	■			하건우 (바이오노트)	
2	rapid kit 진단용 buffer, 항체 등 최적화								■	■	■	■	■	하건우 (바이오노트)	
3	다중 rapid kit platform 제작 공정 확립											■	■	하건우 (바이오노트)	
4	표적 AI 염기서열 조사 및 확보	■	■											황승용 (한양대학교)	
5	2가지 probe 설계 및 제작 (SP, RP)		■	■	■									황승용 (한양대학교)	
6	Probe 고정 조건 기초실험			■	■	■								황승용 (한양대학교)	
7	민감도 향상 조건 기초실험			■	■	■	■							황승용 (한양대학교)	
8	유전자칩 내 probe와 target 혼성화 반응조건 기초실험					■	■	■	■	■				황승용 (한양대학교)	
9	현장형 발색 방법 비교 실험 (chemistry별, chip surface별 test)								■	■	■	■	■	황승용 (한양대학교)	
10	유입 가능 바이러스 분석	■	■	■	■	■	■	■						사리타 (건국대학교)	
11	제품 개발용 항원, cDNA 제공								■	■	■	■	■	사리타 (건국대학교)	
12	rapid kit, 유전자칩 실험실내 평가											■	■	사리타 (건국대학교)	
2차년도															
1	다중 Rapid kit 시제품 개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	하건우, 김선애 (바이오노트)
2	표적별 probe 가짓수 최소화 설계 및 실험	■	■	■										황승용 (한양대학교)	
3	혈청형 별 Real-time PCR Primer, Probe 설계 및 기초실험 Gene synthesis	■	■	■	■									황승용 (한양대학교)	
4	Standard curve 설정 기초실험 및 건국대 제공 cDNA screening 실험					■	■	■	■	■				황승용 (한양대학교)	
5	건국대 제공 종란 접종 RNA의 Screening Test								■	■	■	■	■	황승용 (한양대학교)	
6	병원성 감별용 Primer, Probe 설계 및 제작												■	황승용 (한양대학교)	
7	기존 rapid kit 시제품 효능 평가						■	■	■	■	■	■	■	박승용 (건국대학교)	
8	고병원성 조류인플루엔자 실험	■	■	■	■	■	■	■						박승용 (건국대학교)	
3차년도															
1	다중 Rapid kit 시제품 시제품개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	김선애 (바이오노트)
2	Rapid kit 제품 등록										■	■	■	김선애 (바이오노트)	
4	병원성 감별용 Primer, Probe 설계 및 제작	■												박승용 (한양대학교)	
5	유전자칩 제품 등록 준비 시험	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	박승용 (한양대학교)	
6	유전자칩 제품 등록										■	■	■	박승용 (한양대학교)	
7	개발제품 효능 평가			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	박승용 (건국대학교)	
8	개발제품 인상시료 적용								■	■	■	■	■	박승용 (건국대학교)	
9	현장적용	■									■	■	■	박승용 (건국대학교)	

[연구결과]

○ 주관연구기관(바이오노트)

[1차 년도]

1. 단클론항체에 대해 매칭 테스트 진행

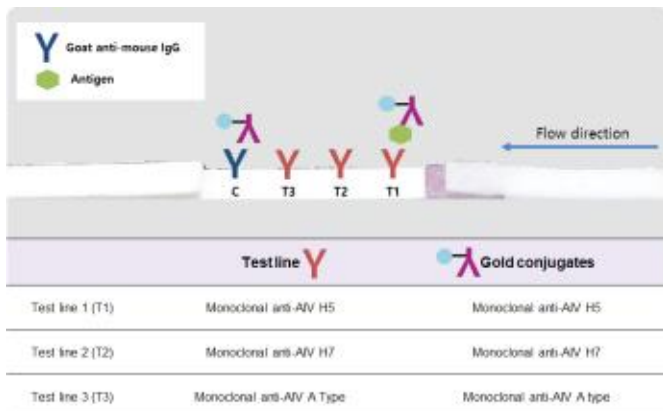


[그림] 생산된 단클론항체 중 최적의 pair를 찾기 위한 매칭 테스트 진행

2. 선별된 단클론 항체를 멤브레인에 코팅하여 연구용 Rapid-kit 생산

1) Assay format

1-1) H5, H7 subtype 검출용

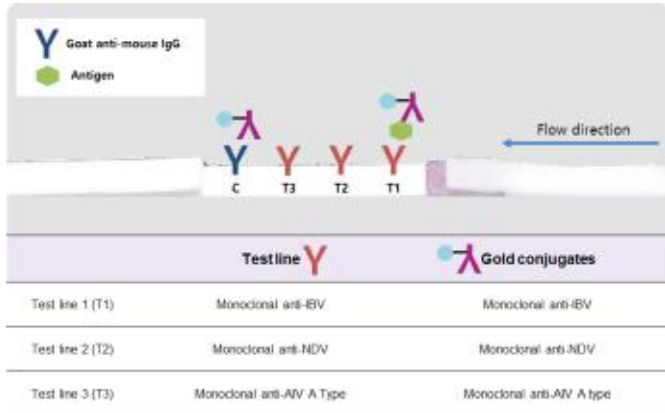


[그림] 코팅된 나이트로셀룰로오스 멤브레인 모식도

모식도	해석
	Invalid 판정 불가 - 재실험
	음성
	H5형 AIV 감염
	H7형 AIV 감염
	AIV A type 감염

[그림] 결과의 판정

1-2) 감별진단용 (ND, IB) 키트



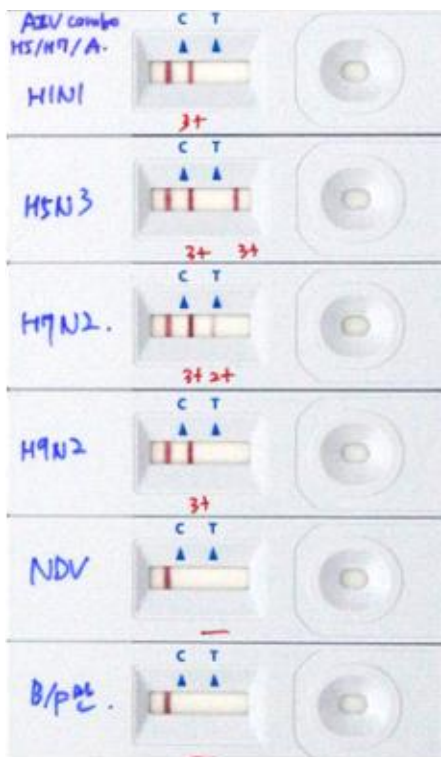
[그림] 코팅된 나이트로셀룰로오스 멤브레인 모식도

모식도	해석
	Invalid 판정 불가 - 재실험
	음성
	IBV 감염
	NDV 감염
	AIV A type 감염

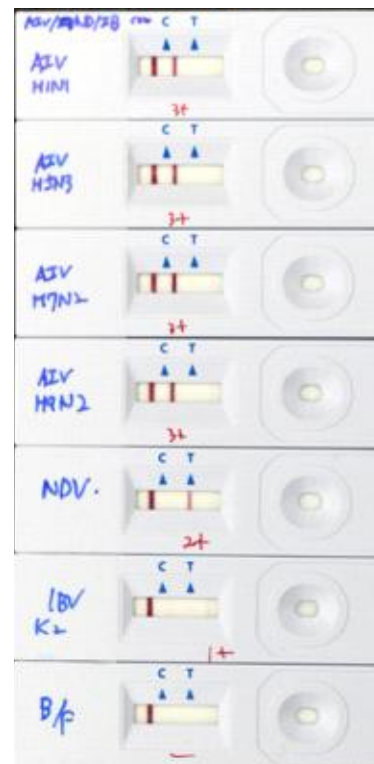
[그림] 결과의 판정

2) 실험 결과

- 각 subtype별로 검체를 점적했을 때, 실험 디자인 시 의도한 결과대로 나타났는지 확인
- 제2협동 건국대학교 실험실로부터 Titer가 확실한 바이러스를 불활성화한 상태로 인계받아 검출 한계 테스트 필요 (8월 예정)
- 농도별로 slope가 형성되도록 각 검사선별 미세 조정 필요 (8월 예정)



[그림] H5, H7 subtype 검출용



[그림] 감별진단용 (ND, IB) 키트

[2차 년도]

- ▶ 다중 진단 플랫폼에서 발생할 수 있는 위양성 및 위음성 발생 여부 확인
 - 본사 내 표준물질(불활화 바이러스 배양액) 이용하여 조건별 비교 테스트
 - 코팅 라인별 교차 반응 없는 조건으로 최적화 필요

1. AIV/NDV/IBV 다중 진단 키트 최적화 실험

[실험 1-1] Conjugates 통합 조건/ 분리 조건 비교

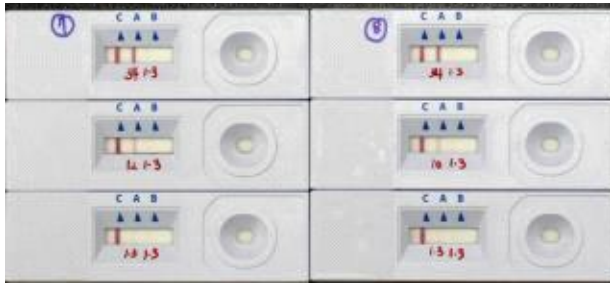
Total conc.		통합 조건												분리 조건											
		10 ug			7.5 ug			8.75 ug			10 ug			10 ug			12.5 ug			17.5 ug			20 ug		
		AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV
AIV	고	26	1-3	-	26	-	-	26	1-3	-	34	1-3	-	26	1	-	20	1	-	34	1-3	-	34	1-3	-
	중	7	3	-	7	-	-	7	1	-	7	1-3	-	5	1	-	3	1	-	12	1-3	-	10	1-3	-
	저	1-3	1-3	-	1-3	-	-	1-3	1-3	-	3	1-3	-	1-3	±	-	1-3	1-3	-	1-3	1-3	-	1-3	1-3	-
NDV	고	-	30	-	-	26	-	-	1-3	-	-	30	-	-	26	-	-	26	-	-	26	-	-	20	-
	중	-	20	-	-	16	-	-	±	-	-	26	-	-	26	-	-	26	-	-	20	-	-	16	-
	저	-	5	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	7	-	-	7	-	-	7	-	-	5	-
IBV	KM91	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-	7	-	-	7	-	-	5	-	-	5
	M41	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-	6	-	-	7	-	-	7	-	-	5	-	-	7
	9016	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-	7	-	-	7	-	-	5	-	-	7

- AIV 감도 증가를 위해 민감도 상향 조정 시 NDV 라인에서 교차 발색 관찰됨
- NDV 교차 발색 없이 민감도 상향 가능하도록 최적화 필요
- NDV 및 IBV 민감도 상향 조절 필요

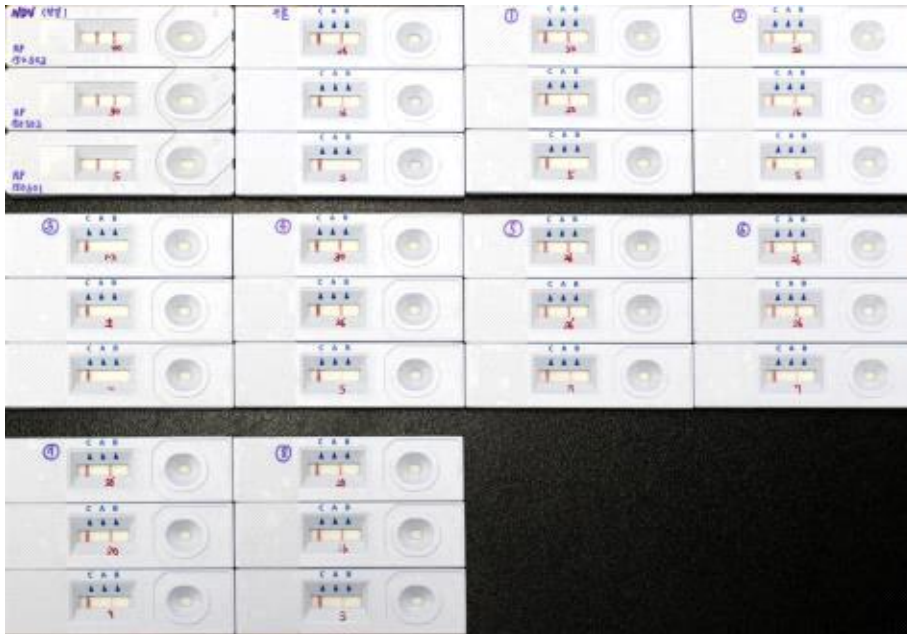
[Raw data]

1) AIV 조건별 실험

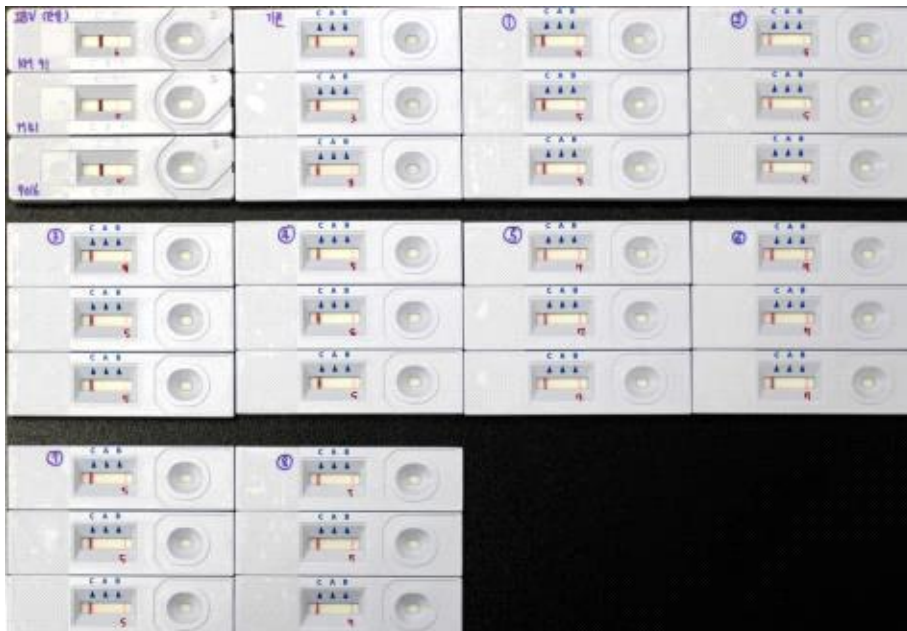




2) NDV 조건별 실험



3) IBV 조건별 실험



[실험 1-2] AIV Conjugates 첨가 조건별 교차 발색 테스트

AIV 단독 처리		3.75 ug			5 ug			5.625 ug		
		AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV
AIV	고	34	-	-	34	-	-	40	±	-
	중	7	-	-	7-10	-	-	10	±	-
	저	1	-	-	2	-	-	2	±	-

- AIV 감도 상향 조정 시 NDV 라인에서 교차 발색 관찰됨
- AIV 반응성은 NDV 라인에서 교차 발색이 나타나기 전 조건인 5 ug 조건으로 고정
- NDV, IBV 라인 최적화 실험 진행

[실험 1-3] NDV, IBV Conjugates 첨가 조건별 교차 발색 및 민감도 비교 실험

AIV	5 ug											
NDV	1.25 ug			2.5 ug						2.5 ug		
	+ 1.25 ug			-			+ 1.25 ug			+ 1.25 ug		
IBV	3.75 ug									6.25 ug		
	조건 1			조건 2			조건 3			조건 4		
Test line	T3	T2	T1	T3	T2	T1	T3	T2	T1	T3	T2	T1
	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV	AIV	NDV	IBV
AIV	3	1~3	-	1~3	1	-	3	1~3	-	3	1~3	-
NDV (저)	-	1~3	-	-	3	-	-	3	-	-	3~5	-
NDV (중)	-	3~5	-	-	5	-	-	5~7	-	-	7	-
NDV (고)	-	34	-	-	46	-	-	54	-	-	60	-
IBV KM91	Trace	-	5~7	Trace	-	5	-	Trace	5	Trace	Trace	7
IBV 9016	-	-	5	-	-	7	Trace	-	7	1	-	7~10
IBV K2	-	-	10	-	-	7~10	Trace	Trace	12	1	-	14
IBV M41	-	Trace	7	-	-	5~7	-	-	5~7	Trace	-	7~10

- NDV 및 IBV 항체 접합체의 첨가량을 높일 경우 교차 발색됨
- 첨가량 고정 후, 위양성 낮출 수 있는 방법 모색 필요

2. AIV A type/AIV H5/AIV H7 다중 진단 키트 최적화 실험

[실험 2-1] 접합체 처리 조건별 테스트

	조건 1			조건 2			조건 3			조건 4			조건 5			조건 6		
	#1 (C+H5)			#3 (C+A)			#5 (C+H7)			#7 (C+H5+H7)			#9 (C+H5+A)			#11 (C+H7+A)		
	#2 (H7+A)			#4 (H5+H7)			#6 (H5+A)			#8 (A)			#10 (H7)			#12 (H5)		
Cap.	H5	H7	A	H5	H7	A	H5	H7	A	H5	H7	A	H5	H7	A	H5	H7	A
H1N1	-	-	10	-	-	12	-	-	7	1~3	-	12	-	-	7	-	-	10
H5N3	34	-	54	46	-	50	46	-	54	40	±	54	34	-	50	40	-	54
H7N2	±	1~3	80	±	1~3	80	±	1~3	80	±	1~3	80	±	1~3	70	-	1~3	70
NDV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IBV Qx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Buffer only	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 골드 패드 처리 조건에 따라 결과 양상이 조금씩 다름
- 특히, H5 골드와 All type 원료를 섞을 경우, H1N1 배양액 적용 시에도 H5라인에서 발색됨

[실험 2-2] 코팅 라인 농도별 / 위치별 감도 비교 테스트

	조건 1			조건 2			조건 3			조건 4			조건 5			조건 6		
Conjugates	5+6			5+6			5+6			5+6			5+6			5+6		
Membrane (mg/ml)	H5	H7	A	H5	H7	A	H5	H7	A	A	H5	H7	A	H5	H7	A	H5	H7
	2	1.5	2	2	2	2	2.5	2.5	2	2	2	1.5	2	2	2	2	2.5	2.5
H1N1	±	-	3~5	-	-	5	-	-	5	5	-	-	7	-	-	7	-	-
H5N3	7	-	46	10	-	40	20	-	46	50	7	-	50	7	-	50	10	-
H7N2	-	1~3	80	±	1~3	60	±	1~3	80	80	-	1~3	70	-	1~3	80	-	1~3
NDV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IBV Qx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Buffer only	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 다중 진단 플랫폼을 적용하면서, H5 배양액 및 H7 배양액에 대한 특이성이 다소 떨어짐
- 더 높은 특이성의 추가 항체 개발 진행 필요
- 조건별 확실한 비교를 위해 더 많은 종류의 배양액 검체 필요

[3차 년도]

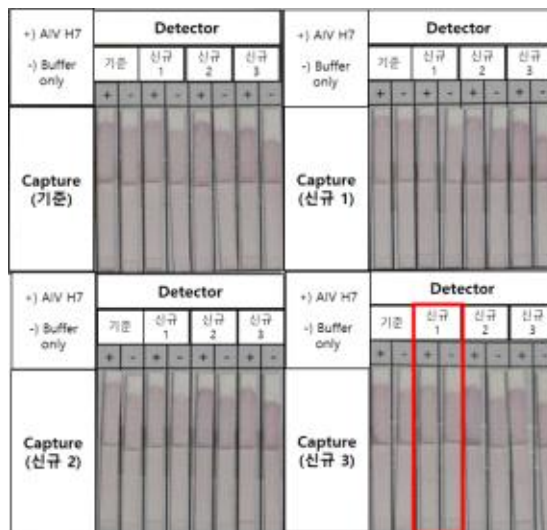
▶ 시제품 개발 계속 진행

- 2차년도 개발 4 line platform 기반 감도 및 특이도 향상 신규 원료 적용
- 최종 시제품 조건 확보

1. AIV A type/AIV H5/AIV H7 다중 진단 kit 개발

1) AIV subtype 감별 kit H7 원료 재선별

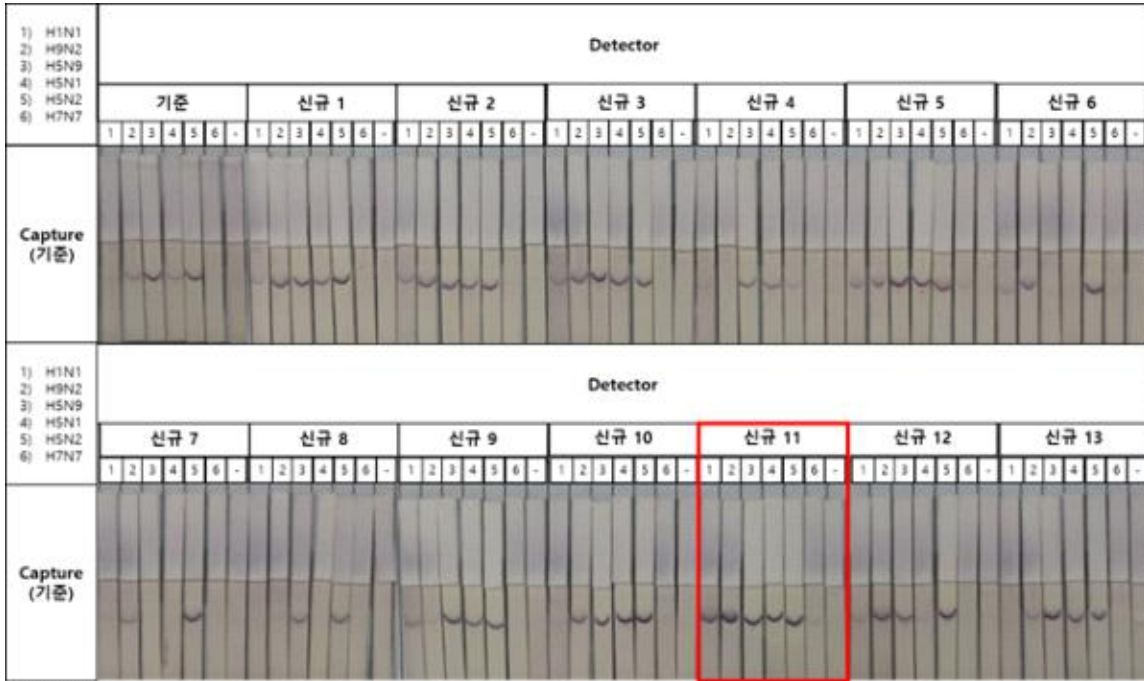
- 2차년도 실험결과에서 기존 개발품의 AIV H7에 대한 감도가 낮은 것을 보완하기 위하여 추가 원료의 제작, 선별을 수행함.



- ▶ 실험결과 기존원료보다 H7에 대하여 감도가 향상된 신규 원료 2종으로 구성된 1개의 새로운 capture, detector Pair를 선별함.

2) AIV type A 원료 재선별

- 기존 AIV type A detector 원료 대비 여러 subtype에 대하여 반응성이 높은 신규 원료 제작 및 선별



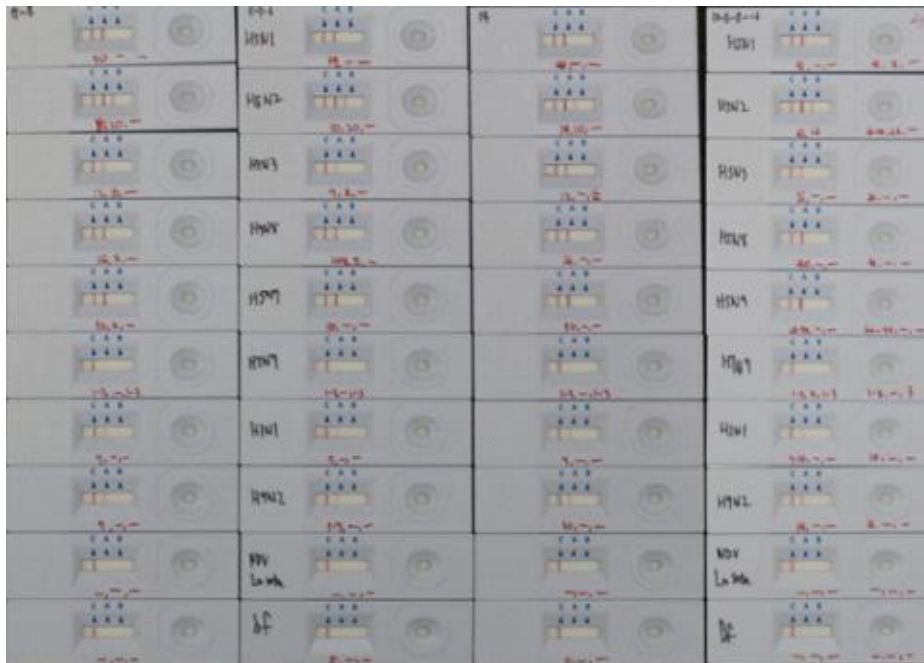
▶ 기존 원료 대비 6종 AIV subtype 검체에 대하여 감도가 향상된 신규원료 11 선별

3) AIV A type/AIV H5/AIV H7 다중 진단 kit의 gold pad 조건 선별

- 신규 Anti-AIV type A 원료, Anti-AIV H7 원료 적용 및 H5 원료 조성 조절

Condition		1			2			3			4		
Gold pad		a-AIV A 원료 6 vol.			a-AIV A 원료 6 vol.			a-AIV A 원료 6 vol.			a-AIV A 원료 10 vol.		
		a-AIV H5 원료#1 8 vol.			a-AIV H5 원료#1 5 vol.						a-AIV H5 원료#1 8 vol.		
		a-AIV H5 원료#2 8 vol.			a-AIV H5 원료#2 5 vol.						a-AIV H5 원료#2 8 vol.		
					a-AIV H5 원료#3 6 vol.			a-AIV H5 원료#3 14 vol.					
		a-AIV H7 원료 8 vol.			a-AIV H7 원료 8 vol.			a-AIV H7 원료 8 vol.			a-AIV H7 원료 16 vol.		
검체		AIV A	H5	H7	AIV A	H5	H7	AIV A	H5	H7	AIV A	H5	H7
H5N1	양성	50	-	-	34	-	-	46	-	-	46	-	-
H5N2		50	20	-	50	20	-	54	10	-	60	26	-
H5N3		12	trace	-	7	trace	-	12	-	trace	16	-	-
H5N8		26	trace	-	20~26	trace	-	26	-	-	40	-	-
H5N9		50	trace	-	50	-	-	50	-	-	60~70	-	-
H7N7		1~3	-	1~3	1~3	-	1~3	1~3	-	1~3	1~3	trace	1~3
H1N1		7	-	-	7	-	-	7	-	-	7~10	-	-
H9N2		7	-	-	5~7	-	-	10	-	-	14	-	-
NDV La sota	음성	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Buffer only		-	-	-	-	-	-	trace	-	-	-	-	-

[Raw data]



- ▶이전 실험 대비 H7 subtype 검출 가능 확인
- ▶H5 및 H7 test line에서 subtype의 경우 감도가 낮는데, 이는 바이러스 불활화 과정에서 hemagglutinin의 변형이 일어난 것으로 추정
- ▶ 비특이 반응 없이 감도 우수한 조건 1 확정

4) AIV A type/AIV H5/AIV H7 다중 진단 kit 최종 조건 선별

- 선별된 Detector 원료 최적 처리량 조절

condition	최종 후보 조건 1			최종 후보 조건 2		
	T3 : AIV A	T2 : H5	T1 : H7	T3 : AIV A	T2 : H5	T1 : H7
검체						
H1N1	14	-	-	26	-	-
pH1N1	10	-	-	20	-	-
H5N3	20	12	-	40	20	-
H5N1	34	trace	-	54	trace	-
H5N2	50	46	-	70~80	70	-
H5N3	10	trace	-	30	trace	-
H5N8	40~46	trace	-	60	-	-
H7N2	54~60	-	10	70~80	-	20
H7N7	1~3	-	1~3	3	-	1~3
H9N2	20	-	-	40	-	-
H9N2	14	-	-	34	-	-
NDV La Sota	-	-	-	-	-	-
IBV QX	-	-	-	-	-	-
Buffer	-	-	-	-	-	-

2. AIV/NDV/IBV 다중 진단 키트 개발

1) NDV 감도 향상을 위한 신규 원료 선별

- 2차년도 결과 부족했던 NDV에 대한 감도 및 특이도 향상 신규 원료 추가 제작, 선별

			Detector																																																											
+/- NDV	기존 원료										신규 원료 1										신규 원료 2										+/- NDV	기존 원료										신규 원료 1										신규 원료 2										+/- NDV
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-											
+	[Microscopy images]										[Microscopy images]										[Microscopy images]										+	[Microscopy images]										[Microscopy images]										[Microscopy images]										+
-	[Microscopy images]										[Microscopy images]										[Microscopy images]										-	[Microscopy images]										[Microscopy images]										[Microscopy images]										-

▶ 기존 원료 구성 pair 대비 감도 상승한 기존 capture 원료 및 신규원료 5 detector 적용 조건 선별

2) IBV 신규 원료 선별

- IBV에 대한 검출 감도 및 특이도 향상을 위한 신규 원료 추가 제작 및 선별

		Detector					Detector					Detector		
+/- IBV	+/- Buffer	기존 Det	신규 1	신규 2	+/- IBV	+/- Buffer	기존 Det	신규 1	신규 2	+/- IBV	+/- Buffer	기존 Det	신규 1	신규 2
		+	-	+			-	+	-			+	-	+
+	+	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]	+	+	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]	+	+	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]
+	-	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]	+	-	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]	+	-	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]
-	+	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]	-	+	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]	-	+	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]
-	-	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]	-	-	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]	-	-	[Microscopy image]	[Microscopy image]	[Microscopy image]

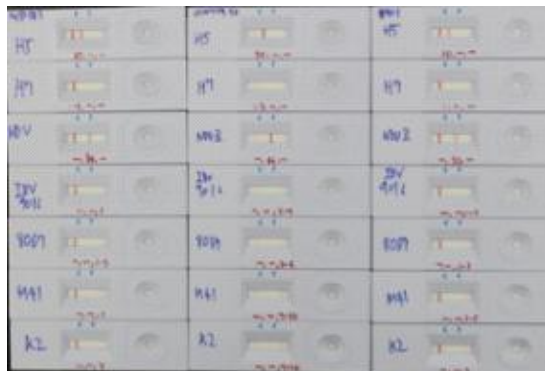
▶ 기존 원료 구성 pair 대비 감도가 상승한 기존 capture 및 신규원료 1 detector 적용 pair 조건 선별

3) 신규 선별 원료 적용 및 sample pad 조건 선별

- 신규 선별된 NDV 및 IBV 원료를 detector로 적용하고 sample pad에 의한 비특이 반응 및 감도 비교

실험군	조건 1			조건 2			조건 3		
Gold pad 1	a-AIV 원료 8 vol.			a-AIV 원료 8 vol.			a-AIV 원료 8 vol.		
Gold pad 2	a-NDV 신규원료 6 vol. + a-IBV 신규원료 6vol.			a-NDV 신규원료 6 vol. + a-IBV 신규원료 6vol			a-NDV 신규원료 6 vol. + a-IBV 신규원료 6vol		
Sample pad	No treated glass fiber			Buffer 처리 Glass fiber			Paper pad		
Test line	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV
AIV H5N3	30	-	-	50	-	-	30	-	--
AIV H7N7	1~3	-	-	1~3	-	-	1	-	--
NDV	-	34	-	-	46	-	-	30	--
IBV 9016	-	-	3	-	-	5~7	-	-	1~3
IBV 8067	-	-	1~3	-	-	3~5	-	-	1~3
IBV M41	-	-	3	-	-	7~10	-	-	3~5
IBV K2	-	-	3	-	-	7~10	-	-	3

[Raw data]

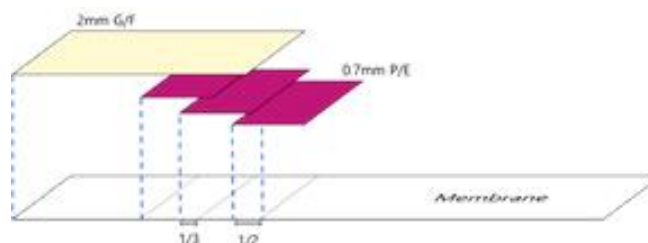


- ▶ 3가지 조건에서 모두 교차 반응 및 비특이 반응은 없음
- ▶ Buffer가 처리된 sample pad에서 감도 가장 우수

4) IBV test line 감도 조절 실험

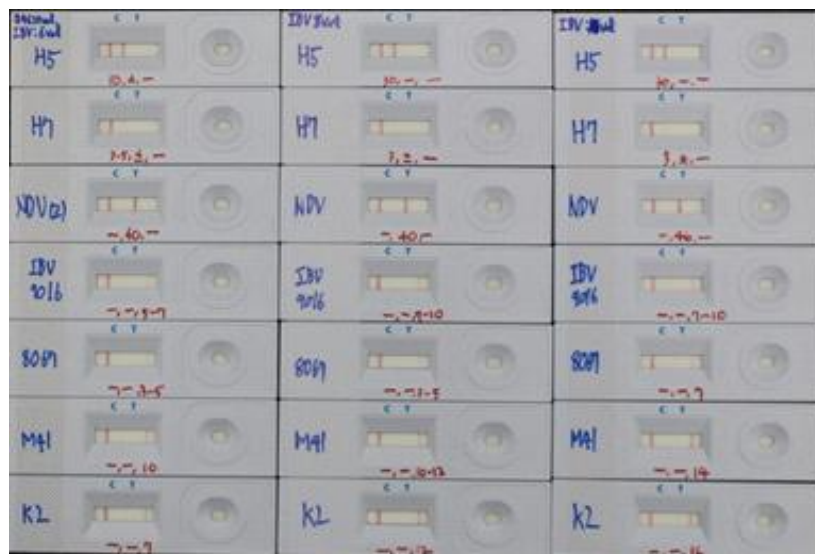
- Detector 조절을 위한 원료별 gold pad 분리
- IBV test line의 감도 향상을 위한 처리량 조절
- AIV A test line 감도 향상을 위한 처리량 증대(기준 8 -> 10 vol.)

[그림] Gold pad 원료별 개별 분리 모식도



실험군	조건 1			조건 2			조건 3		
Gold pad 1	a-AIV 원료 10 vol.			a-AIV 원료 10 vol.			a-AIV 원료 10 vol.		
Gold pad 2	a-NDV 신규원료 6 vol.			a-NDV 신규원료 6 vol.			a-NDV 신규원료 6 vol.		
Gold pad 3	a-IBV 신규원료 6 vol.			a-IBV 신규원료 8 vol.			a-IBV 신규원료 10 vol.		
Test line	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV
AIV H5N3	30	±	-	30	-	-	30	-	-
AIV H7N7	3~5	±	-	3	±	-	3	±	-
NDV	-	40	-	-	40	-	-	46	-
IBV 9016	-	-	5~7	-	-	7~10	-	-	7~10
IBV 8067	-	-	3~5	-	-	3~5	-	-	7
IBV M41	-	-	10	-	-	10~12	-	-	14
IBV K2	-	-	7	-	-	12	-	-	16

[Raw data]



- ▶ Anti-AIV A detector 처리량 증가에 따른 NDV line trace 수준의 비특이 반응 발생
- ▶ Anti-IBV detector 원료 처리량 증가에 따른 비특이 반응의 감도가 상승하거나 발생수가 증가하지 않는 것으로 보아 AIV A detector 영향으로 추정됨
- ▶ IBV 감도 가장 우수한 조건3 선별

5) 전개 buffer 종류별 test

- 비특이 반응 제거 개선 및 감도 향상을 위한 전개 buffer 종류별 screening

Buffer	AM			A			B			D			F			G		
	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV
AIV H5N3	34	trace	-	34	-	-	20	-	-	50	-	1	40	-	-	40	trace	1
NDV	-	34	-	-	30	-	-	40	-	50	50	trace	-	46	-	60	1~3	1~3
IBV 8067	-	trace	1~3	-	-	1~3	-	1~3	3	-	1~3	7~10	-	1	1~3	-	1~3	3~5

Buffer	I			J			M			N			P			U		
	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV
AIV H5N3	34	-	-	10	1~3	trace	40	1~3	-	34	-	-	20	trace	-	34	1~3	1~3
NDV	-	46	-	trace	50	trace	-	60	-	-	40	-	-	60	-	-	46	-
IBV B067	-	-	3	-	trace	trace	-	3	3~5	-	-	5~7	-	trace	trace	-	1~3	3~5

Buffer	W			CC			CF			LP			ZK			IS		
	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV
AIV H5N3	30	1~3	trace	14	3	1	34	3	1~3	26	1	-	26	1	1	20	3~5	1~3
NDV	-	46	-	-	60	-	1	50	1~3	-	50	-	-	54	-	trace	60	1~3
IBV B067	-	1~3	3~5	-	3	5	trace	3~5	5	trace	1	3	-	trace	14	1~3	5	12

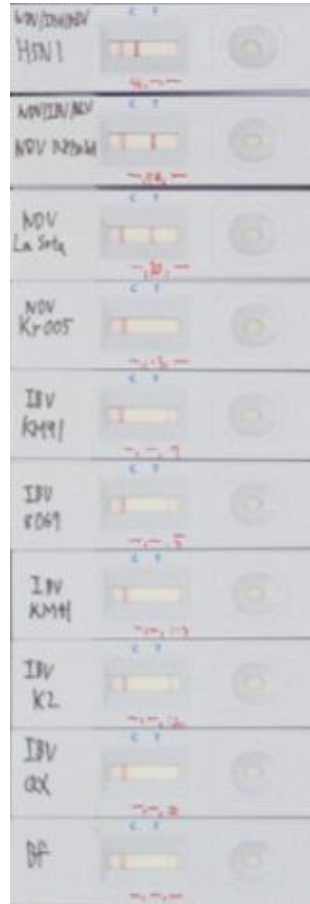
Buffer	DG			HI			HC			YF			IS		
	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV	T3: AIV	T2: NDV	T1: IBV
AIV H5N3	30	trace	-	34	3~5	trace	16	1~3	1~3	26	-	-	40	trace	-
NDV	-	46	-	-	50	trace	1	54	1	-	34	-	-	46	-
IBV B067	-	-	3	-	3~5	5	-	1~3	1~3	-	-	3	-	1~3	7~10

- ▶ N buffer 감도, 특이도 가장 우수함
- ▶ D, IS, ZK buffer에서 감도 우수하나 비특이 발생
- ▶ A, I, YF buffer에서 특이도 우수하나 IBV 감도 낮음
- ▶ 최종 N buffer 선별

6) AIV/NDV/IBV 다중진단 kit 최종조건 test

- 선별된 최종조건으로 감도, 특이도 test 실시

검체		Test line	T3 : AIV A	T2 : NDV	T1 : IBV
H5N1		AIV 양성	46	-	-
NDV	RP150303	NDV 양성	-	54	-
NDV La sota	La Sota		-	30	-
NDV Kr005	Kr005		-	1~3	-
IBV	KM91		-	-	7
IBV	8067	IBV 양성	-	-	5
IBV	KM41		-	-	1~3
IBV	K2		-	-	12
IBV	OX		-	-	trace
Buffer only		음성	-	-	-

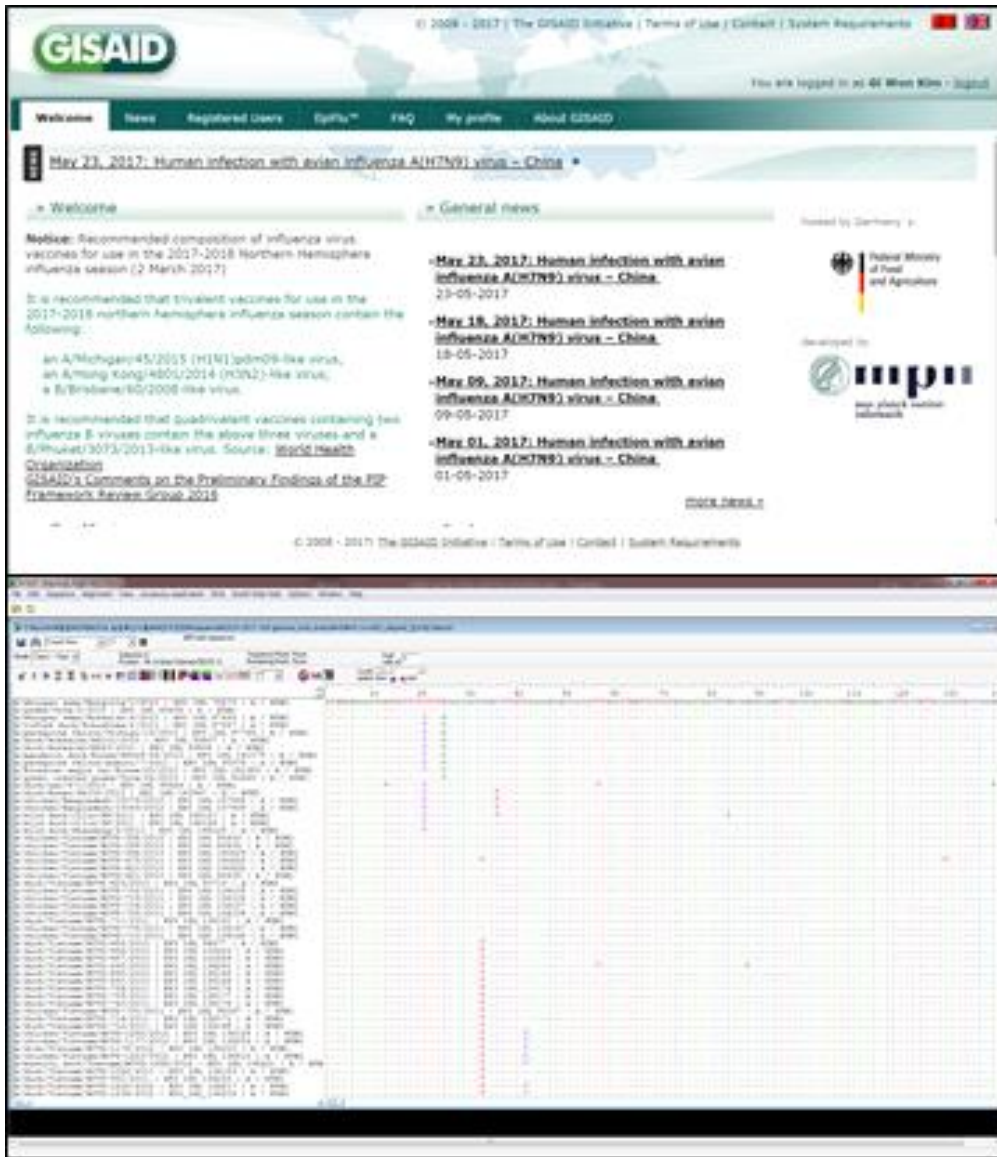


- ▶ AIV, NDV, IBV 검체에 대한 개별 test line 반응성 확인
- ▶ IBV 검체에 대하여 NDV test line에 trace 수준의 비특이 일부 발생하나, 일반 사용자가 관찰하기에는 매우 낮은 수준
 - ▶ IBV 검체 일부 subtype의 경우 감도 낮음. 다만 IBV 항체 원료의 경우 target이 virus의 hemagglutinin을 target으로 하고 있으며, IBV의 경우 AIV와 마찬가지로, 경우 고위험성 병원체로 지정 시설 외 반출 시 바이러스의 병원성 제거를 위하여 formaldehyde로 바이러스를 불활성화시키는데, 이때 hemagglutinin의 변성을 초래하여 감도가 저하될 수 있음
 - ▶ 이에 따라 최종적인 성능 시험은 건국대학교의 Biosafety Level 3 시설 내에서 배양된 실 바이러스를 대상으로 수행하기로 함
 - ▶ 최종선별 조건으로 건국대 Biosafety Level 3 시설 내에서 실 virus를 이용한 시험에서 AIV는 $\log(\text{EID}_{50}/\text{ml}) = 4.5$, NDV는 $\log(\text{EID}_{50}/\text{ml}) = 4.0 \sim 5.0$, IBV는 $\log(\text{EID}_{50}/\text{ml}) = 4.5 \sim 5.5$ 의 검출한계, 특이도 100%를 나타내었다. (건국대학교 3차년도 연구결과 참조)

○ 제 1협동연구기관 (한양대학교)

[1차 년도]

1. 표적 AI 염기서열 조사 및 확보

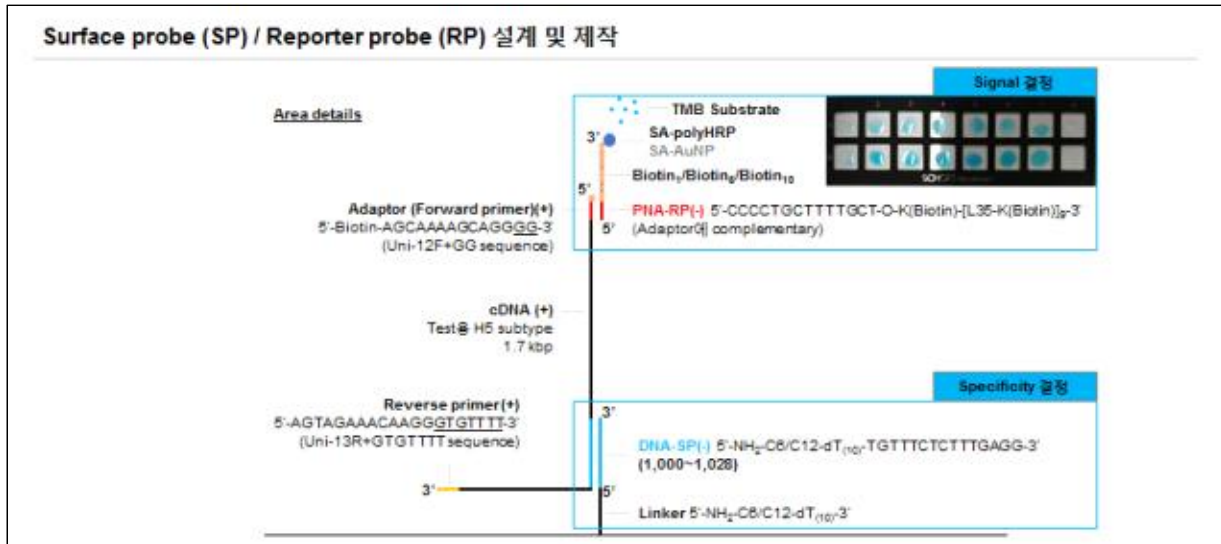


- GISAID EpiFlu DB로부터 2010~2017 수집된 HA subtype별 sequence 확보 (host: avian / location: Asia;Europe, full genome) 2017년 2월 기준 H5 n = 465 / H7 n = 339 / H9 n = 257

- 제2협동기관 건국대학교 보유한 기 수집된 HA subtype별 sequence 확보

- 기존 수행 과제에서 검증된 subtyping용, 병원성 감별용 probe set을 활용 및 기존 probe 들의 새롭게 추가 수집된 sequence들에 대한 적용성 분석 후 H5/H7/H9/병원성 감별용 probe set 설계 예정

2. 2가지 probe 설계 및 제작 (SP, RP)



- 각 probe 합성은 핵산분자 합성/제작 전문 회사에 의뢰하여 진행하였음.
- SP는 DNA oligo로 surface에 고정시키기 위해 5'말단에 amine group을 수식, surface와의 물리적 거리를 충분히 확보하여 target의 고정효율을 높이고자 target complementary sequence의 upstream에 C6/C12-dT(10) spacer를 수식함. C6/C12 spacer는 발색기초조건 수립 후 spacer의 길이에 따른 발색향상여부를 실험예정.
- SP의 complementary sequence는 기초실험을 위하여, 제2협동연구기관 건국대로부터 제공받은 H5 subtype cDNA의 1,000~1,028nt 염기서열을 표적으로 하며 다른 HA subtype과 cross-reactivity가 없게끔 설계함. 추후 기존 수행과제에서 활용했던 probe set과 염기서열 분석을 통해 다양한 subtype별 probe를 설계 예정. (건국대와 협업)
- RP는 PNA oligo로 target template의 5'말단에 있는 adaptor sequence와 상보적인 서열로 설계함. AIV RNA를 cDNA로 합성증폭 시 adaptor sequence가 추가 합성된 universal primer (Uni-12F-adaptor/Uni-13R)를 사용하여 cDNA 말단에 adaptor sequence가 추가되도록 함.
- RP의 3'말단에는 발색을 위한 SA-HRP가 결합할 수 있는 biotin을 수식함. 발색반응을 증폭시키고 민감도를 향상시키기 위해 multiple biotin을 수식하였음. Biotin 1개, 5개, 10개씩 수식된 RP1, RP5, RP10을 합성하고 기초실험을 위하여 RP5를 활용함. 추후 biotin 개수에 따른 발색향상 여부를 실험할 예정임.

3. Probe 고정 조건 기초실험

- 설계한 SP, RP, target의 혼성화 이후 발색이 일어나는지를 확인하기 위하여 기초실험을 진행함.
- Epoxysilane slide, Aldehydesilane slide 등 칩의 경우 주문제작기간이 오래 소요되고 단가문제로 96-well plate를 이용함.
- 96-well plate 상에 H5_SP (C6 spacer)를 spotting buffer와 함께 고정하고, Target-RP5를 혼성화 후 발색을 확인하여 SP-target-RP conjugation이 일어남을 확인함.

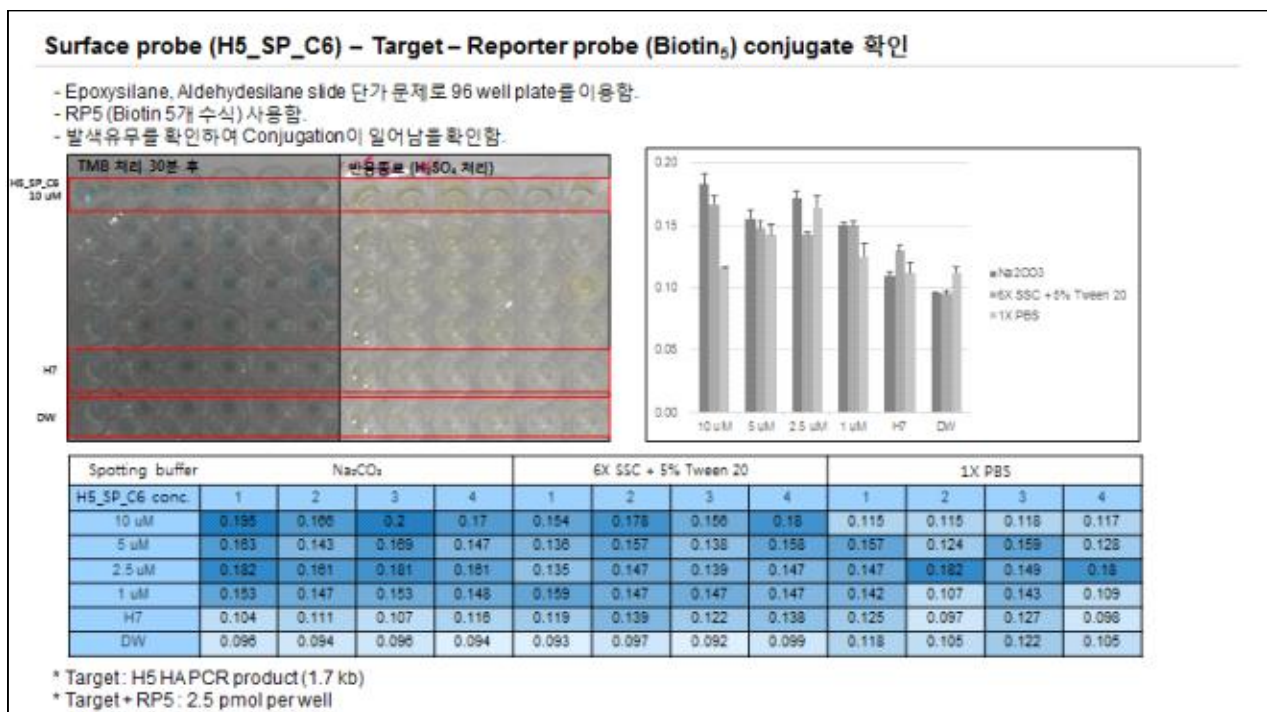
- 문헌조사 및 기존수행과제에서 사용된 spotting buffer 및 여러 반응조건을 토대로 기초발색조건을 설정하였음.

* spotting buffer : standard하게 사용되는 spotting buffer인 6X SSC와 문헌조사를 통해 확보한 Na₂CO₃, 1X PBS를 테스트한 결과 1X PBS는 부적절한 것으로 판단됨.

* spotting 시간 : 발색기초조건 수립을 위해 문헌 및 기존수행과제에서의 조건 사용. (상온, 16시간, humidity chamber 내에서 incubation)

* spotting 농도 : 발색기초조건 수립을 위해 문헌 및 기존수행과제에서의 조건 사용. H5_SP_C6 10 uM ~ 1 uM 농도구배 실험결과 plate 상에서 1 uM까지 발색이 확인되었음.

* washing : 1X SSC + 0.8% tween 20 x 1회, 0.1X SSC + 0.1% tween 20 x 2회, DW x 1회 3분 mild shake

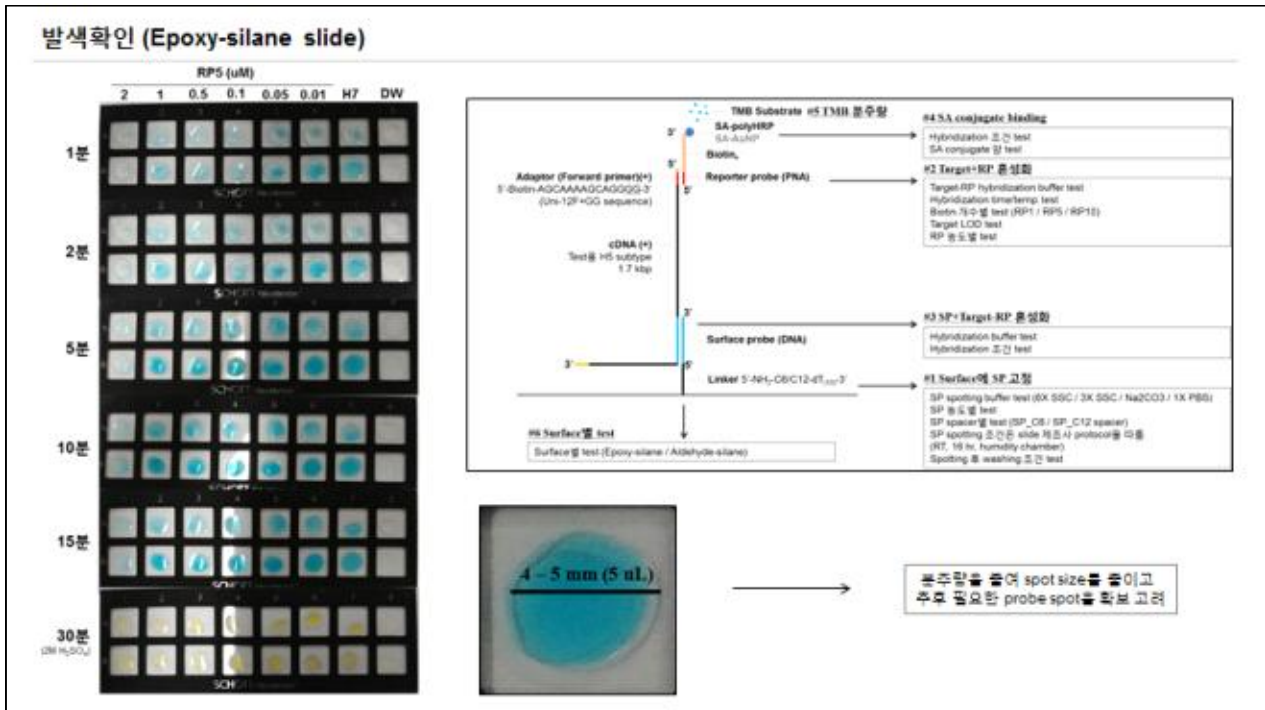


4. 유전자칩 내 probe와 target 혼성화 반응조건 기초실험

- SP-target-RP에 SA-HRP 분주 후 30분간 발색을 관찰하였음.
- SP 50 uM, target 50 ng 일 때 RP 10 nM 까지 충분한 발색이 관찰되었음.
- SP와 target의 양이 발색에 주요한 영향을 줄 것으로 생각됨.
- H7 subtype spot에서 양성반응이 관찰된 것으로 보아 SA-HRP 반응 후 washing 과정을 좀 더 강하게 변경하여 실험진행 중.
- 현재 SP 농도테스트를 진행중.

[예정사항]

- Target 양과 SP 농도의 상관관계 테스트



- 민감도 향상 조건 기초실험

* Biotin 개수별 발색비교

* Washing 조건 최적화

- 현장형 발색 방법 비교 실험 (chemistry별, chip surface별 test)

* SA-Gold nanoparticle 활용 발색 테스트

* aldehydesilane slide, Nitrocellulose membrane에서의 surface별 테스트

[2차 년도]

1. 혈청형별 Real-time PCR Primer, Probe 설계 및 기초실험 Gene synthesis

1) M gene Primer set, Probe 설계

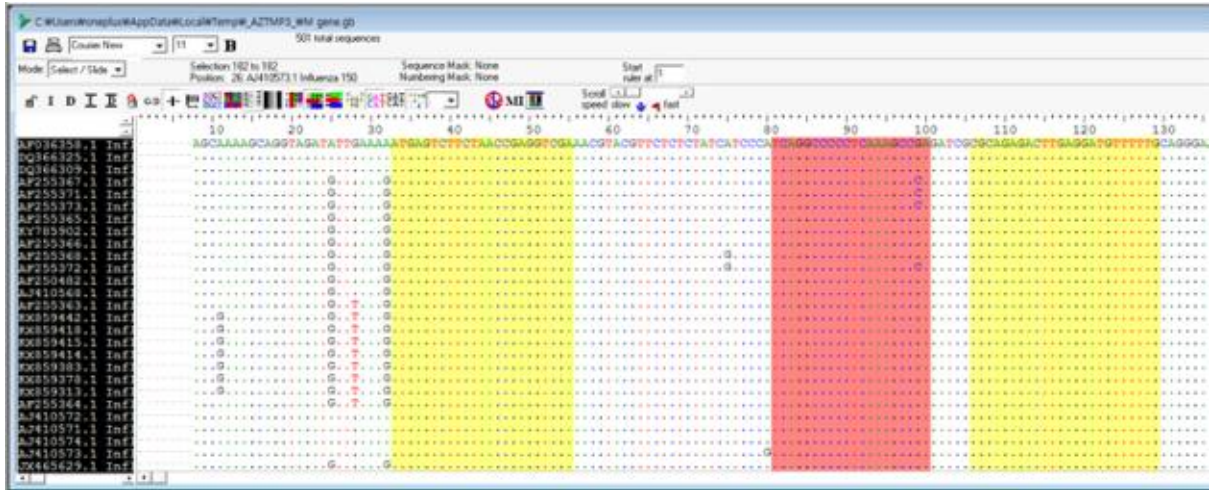


그림 61 . M_Primer, Probe design (Bioedit) ; Yellow - primer set, Red - Probe position

- Genbank와 건국대학교에서 제공받은 서열 확보
- 기 수행과제와 Reference paper에서 검증된 Positive control 로 사용될 M gene universal Primer, Probe를 바탕으로 본 Real time 실험 조건에 맞춰 설계

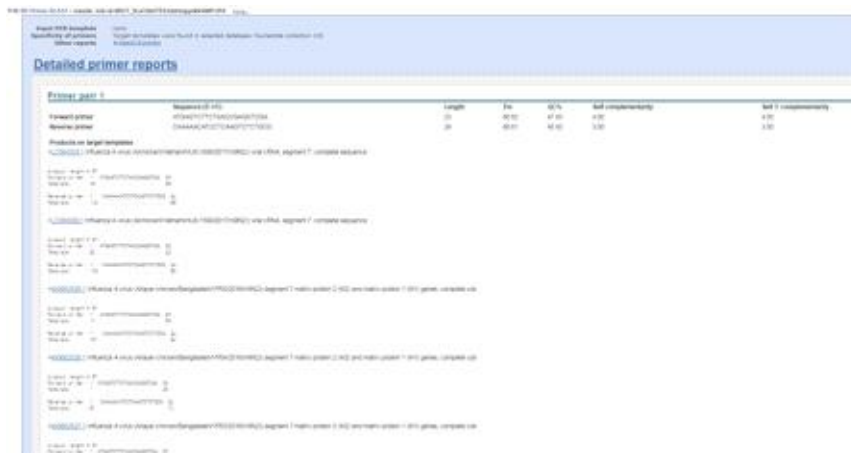


그림 62 . M_Primer set_ (NCBI / Primer-Blast)

Gene	Primer	Primer Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	TaqMan Probe(5'-3')	Tm (°C)
M	Forward	TGA GTC TTC TAA CCG AGG T	59	97	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1	70
	Reverse	CAA AAC ATC YTC AAG TCT CTG	58-59			

표 1 . 설계한 M gene Primer , Probe set

2) H5 subtype Primer set, Probe 설계

Index	Name	Sequence (5'-3')	평균 identity
1	H5-01	CARCTTAGGGATAATGCAA	95.76441
2	H5-02	ATAAACTCTAGTATGCCATTCCACA	97.76208
3	H5-03	TGAAACACCTATTGAGCRGA	94.32261
4	H5-04	AGTG TAGCKGGATGGCTHC	91.71103
5	H5-05	ACYCAAAAGGCAATAGAYGG	93.12745
6	H5-06	CARCTTARGGATAATGCAA	93.83814
7	H5-07	CARCTTARGGATAATGCAA	94.16194
8	H5-08	ACYCAAAAGGCAATAGAYGG	93.12745
9	H5-09	GAAACACCTATTGAGCAGG	93.01528
10	H5-10	AGTG TAGCGGGATGGCTCC	90.56821
11	H5-11	ACTCAAAAGGCAATAGACGG	89.96245
12	H5-12	CYGCTTAAGGATAATGCARA	87.24715
13	H7-01	AATGCTGAAGAAGATGGVAC	92.21587
14	H7-02	CAATGTGACCAATTCCTAGAA	84.24
15	H7-03	GRAGAAGCTCTGAGGCAAAT	85.69444
16	H7-04	AAYGCGAAGAAGATGGVAC	87.29524
17	H7-05	GRARAASCTCTGAGGCARAT	83.11508
18	H9-01	CDACTGTCGCCTCATCTCT	95.32208
19	H9-02	ATTTATTGACTGTCGCCTC	99.00519
20	H9-03	ACTGTCGCCTCATCTCTTGT	98.86494
21	H9-04	CDACYGTCGCCTCATCTCT	92.76494
22	H9-05	ATTTATTGACYGTCGCCTC	96.52597

표 2 . < 기존 probe의 최신 유입 가능 바이러스에 대한 identity >

- 위의 표 2를 참고하여 가장 identify가 높은 H5-02 와 그와 같은 Position의 H5-12를 기준으로 하여 Real-time PCR 에 맞도록 Primer set , Probe design

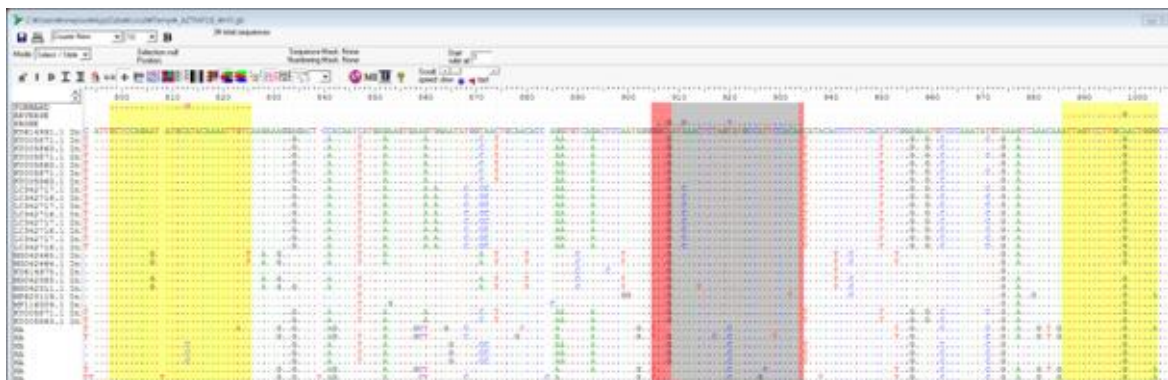


그림 63 . H5_Primer, Probe _ design (Bioedit) ; Yellow - primer set, Red - Probe , grey - 기존 array-용 probe position

Gene	Primer	Primer Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	TaqMan Probe(5'-3')	Tm (°C)
H5	Forward	CCA GAA TAT GCM TAC AAA ATT GT	58-59	200	FAM-TTG TGG AAT GGC ATA CTA GAG TTT ATC GC-BHQ1	66
	Reverse	CCA GTC GCA AGG ACT AAT	59			

표 3 . 설계한 H5 subtype Primer , Probe set



그림 64 . H5 subtype_primer set_ (NCBI/ Primer-Blast)

3) H7 subtype Primer set, Probe 설계

- 위의 표 2를 참고하여 가장 identify가 높은 H7-01 와 그와 같은 Position의 H7-04를 기준으로 하여 Real-time PCR 에 맞도록 Primer set , Probe design

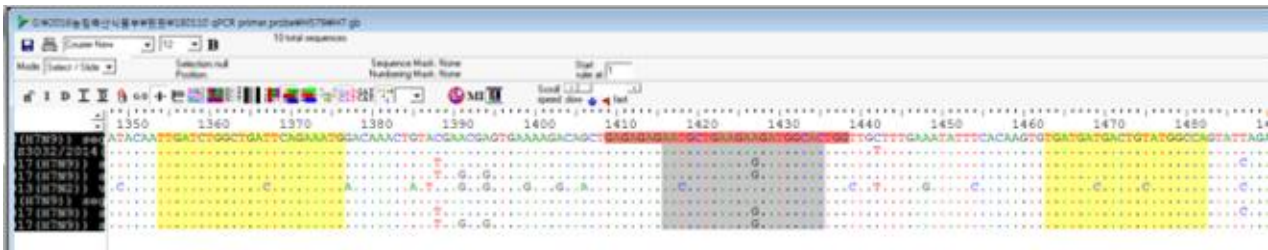


그림 65 . H7_Primer, Probe design (Bioedit) ; Yellow - primer set, Red - Probe position, Grey - Array용 Probe position

Gene	Primer	Primer Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	TaqMan Probe(5'-3')	Tm (°C)
H7	Forward	ATC TGG CTG ATT CAG AAA TG	58	125	FAM-CCA GTG CCA TCT TCT TCA GCA TTC TCT CTC-BHQ1	70
	Reverse	GGC CAT ACA GTC RTC ATC	58-61			

표 4. 설계한 H7 subtype Primer , Probe set

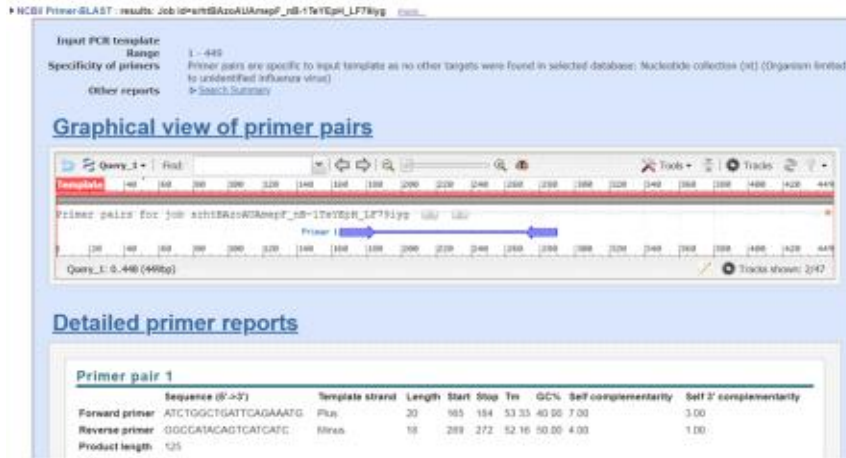


그림 66 . H7 Primer set. (NCBI / Primer-blast)

4) H9 subtype Primer set, Probe 설계

- 위의 표 2를 참고하여 가장 identify가 높은 H9-02 와 나머지 Probe는 모두 같은 Position 이므로 이를 기준으로 하여 Real-time PCR 에 맞도록 Primer set , Probe design

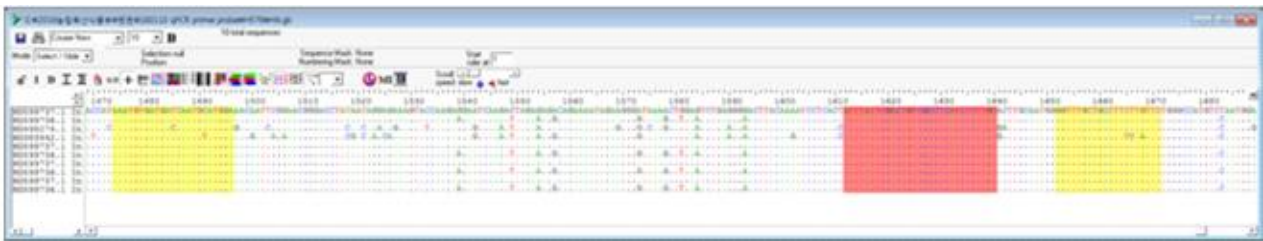


그림 67 . H9_Primer, Probe design (Bioedit) ; Yellow - primer set, Red - Probe position

Gene	Primer	Primer Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	TaqMan Probe(5'-3')	Tm (°C)
H9	Forward	ATG TGA TGA TCA ATG CAT GGA	59	195	FAM-ATT TAT TCG ACT GTC GCC TCA TCT CTT GT-BHQ1	67
	Reverse	AAC AAG AAG GCA GCA AAC	59			

표 5 . 설계한 H9 subtype Primer , Probe set



그림 68 . H9 Primer set (NCBI / Primer-Blast)

5) 기초 실험용 Gene synthesis

- 실제 건국대에서 제공받은 샘플에 적용하기 전 기초실험을 위해 혈청형별로 가장 major한 서열을 pUC57 vector를 이용해 합성

Name	GenBank	Sequence (5'-3')	Length(bp)
H5	KY005871.1	AGAGTGGTGCCAAAAATAGCTACTAGATCCCAAGTAAACGGGCAAAGTGGGAAG AATGGATTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCGGATGATGCAATCCACTTCGAGA GTAATGGAAATTTTATGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGG GGAATCAACAATTATGAAAAGTAAAATGGAATATGGCAATTGCAACACCAAAA TGTCAAACTCCAATAGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAATATACA CCCTCTCACTATCGGGGAGTGCCCAAAATACGTGAAATCAAACAAATTAGTCC TTGCGACTGGGCTCAGAAATAGTCTCTAAGAGAAAGAAGAAGAAAAAGAGG ACTATTTGGGGCCATAGCAGGGTTTATAGAGGGAGGATGGCAAGGAATGGTAG ATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAAT	450
H7	MF988738.1	GCTTATAGAAAAAACAACCAACAATTTGAGTTGATAGACAATGAATTCAT GAGGTAGAGAAGCAAATCGGTAATGTGATAAATTGGACCAGAGATTCTATAA CAGAAGTGTGGTCATACAATGCTGAACTCTTGGTAGCAATGGAGAACCAGCAT ACAATTGATCTGGCTGATTCAGAAATGGACAACTGTACGAACGAGTGAAAA GACAGCTGAGAGAGAATGCTGAAGAAGATGGCACTGGTTGCTTTGAAATATT TCACAAGTGTGATGATGACTGTATGGCCAGTATTAGAAATAACACCTATGATC ACAGCAAATACAGGGAAGAGGCAATGCAAAATAGAATACAGATTGACCCAGTC AAACTAAGCAGCGGCTACAAAGATGTGATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCATC ATGTTTCATACTTCTAGCCATTGTAATGGG	450
H9	MG599737.1	GAAACTAGACTCAATATGATCAATAATAAAAATTGATGACCAAATACAAGACG TATGGGCATACAATGCAGAGATGCTAGTATTGCTTGAAAACCAGAAAACACTC GATGAGCATGACGCAAACGTGAACAATCTATATAACAAAGTGAAGAGGGCCCT GGGCTCAAATGCACTGGAAGATGGAAGGGTTGTTTCGAACTATACCATAAAT GTGATGATCAATGCATGGAAACAATTTCGGAACGGGACCTATAATAGGAGAAA GTACCAAGAGGAATCAAGACTAGAGAGACAGAAAATAGAAGGGATAAAACTG GAGTCTGAGGGGACTTACAAAATCCTCACTATTTATTCGACTGTGCCTCATC TCTTGTACTTGCAATGGGGTTTGTCTGCTTCTTGTCTGGGCCATGTCTAATG GATCATGCAGGTGCAACATTTGTATATAA	450
M gene	AF036358.1	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAAATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCAAACG TACGTTCTCTCTATCATCCCATCAGGCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGA CTTGAGGATGTTTTTGCAGGGGAAGAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATG GCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGAATTTTAGGGTTTG TGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGATTTGTCC AAAATGCCCTAAATGGGAATGGAGACCCAAACAACATGGACAGGGCAGTTAAA CTATAACAAGAAGCTGAAGAGGGAAATGACATTCCATGGAGCAAAGGAAGTTGC ACTCAGTTACTCAACTGGTGGCCTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATAACAAC GGATGGGAACAGTGACCACAGAAGT	450

표 6 . 기초실험 Test 용 Plasmid 합성정보

2. Standard curve 설정을 위해 각각의 sample Serial dilution (10⁻⁶ ~ 10⁻¹)을 이용한 기초실험 및 건국대 제공 cDNA를 이용한 Screening 실험

1) Gene synthesis_ Subtype별 Primer, Probe set Test_Quantstudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA)

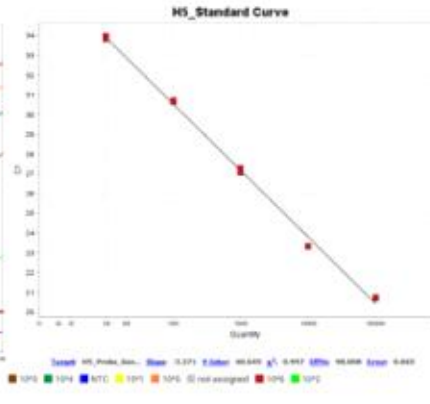
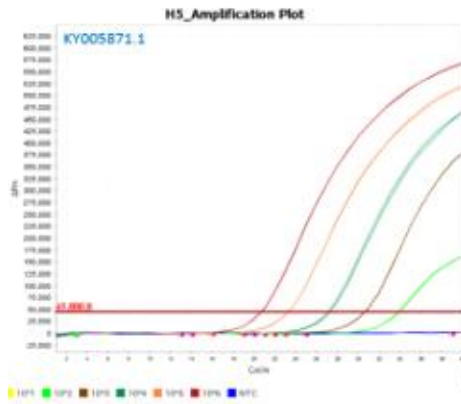
- 각 혈청형별 (H5/H7/H9/M_P.C)로 아래의 조건과 같이 Real-Time PCR 진행 (2반복)

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
H5	Forward	CCA GAA TAT GCM TAC AAA ATT GT	58-59	H7	Forward	ATC TGG CTG ATT CAG AAA TG	58
	Reverse	CCA GTC GCA AGG ACT AAT	59		Reverse	GGC CAT ACA GTC RTC ATC	58-61
	H5_Probe(-)	FAM-TTG TGG AAT GGC ATA CTA GAG TTT ATC GC-BHQ1	66		H7_Probe(-)	FAM-CCA GTG CCA TCT TCT TCA GCA TTC TCT CTC-BHQ1	70

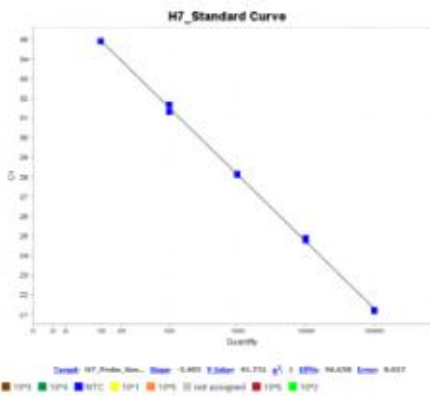
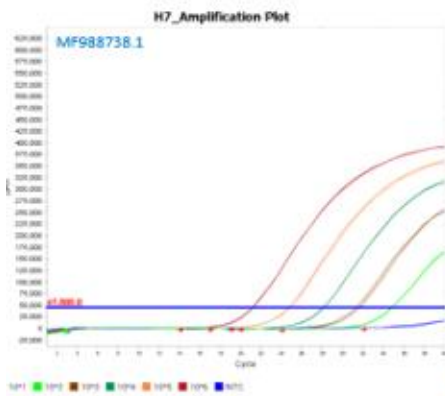
Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
M gene	MIP_C1_qPCR_F Primer	ATG AGT CTT CTA ACC GAG GTC GA	64	H9	Forward	ATG TGA TGA TCA ATG CAT GGA	59
	MIP_C1_qPCR_R Primer	CAA AAA CAT CYT CAA GTC TCT GCG	63-65		Reverse	AAC AAG AAG GCA GCA AAC	59
	MIP_C1_qPCR_Probe	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1	70		H9_qPCR_Probe	FAM-ATT TAT TGG ACT GTC GCC TCA TCT TCT GT-BHQ1	67

	Amount
RR390A	10ul
Primer	10pmole
Probe	5pmole
Template	10 ⁶ 10 ⁵ 10 ⁴ 10 ³ 10 ² 10 ¹
Total	20ul

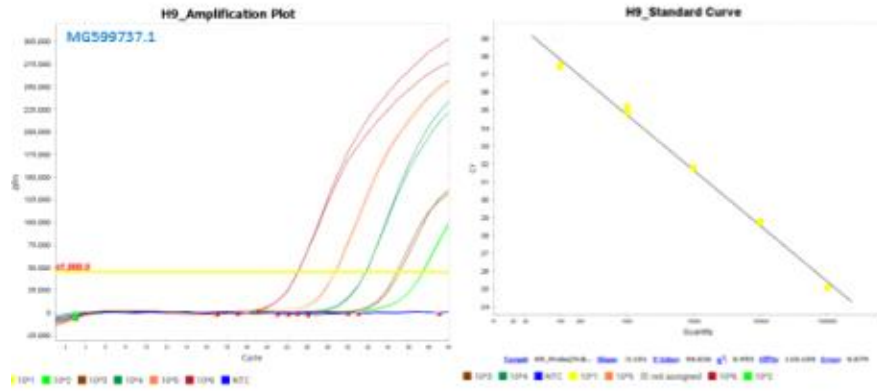
Quant Studio 3	Temp.(°C)	Time	Cycles
Pre-denaturation	95	30sec	1
Denaturation	95	3sec	45
Annealing	56	30sec	



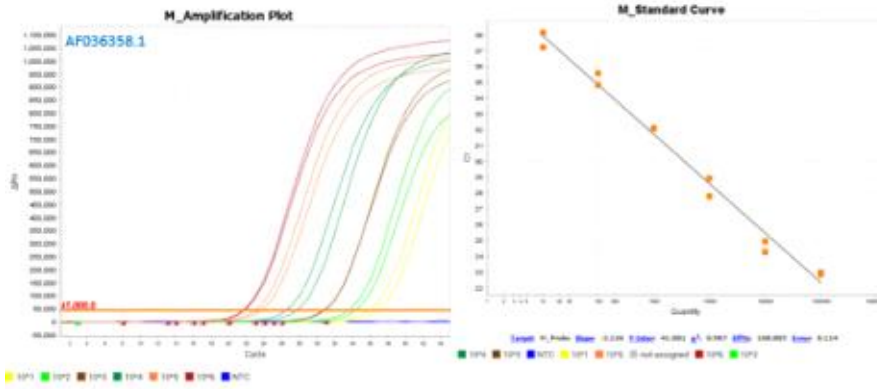
H5_Probe	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	NTC
Ct	20.894	23.342	27.278	30.651	33.847	-
	20.750	23.317	27.078	30.707	33.954	-



H7_Probe	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	NTC
Ct	21.236	24.865	28.120	31.311	34.886	-
	21.187	24.769	28.165	31.668	34.912	-



H9_Probe	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	NTC
Ct	25.063	28.765	31.796	34.908	37.405	-
	25.075	28.806	31.802	35.196	37.482	-



M Probe	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	NTC
Ct	22.983	24.265	27.773	32.100	35.583	37.231	-
	22.844	24.938	28.943	32.049	34.836	38.144	-

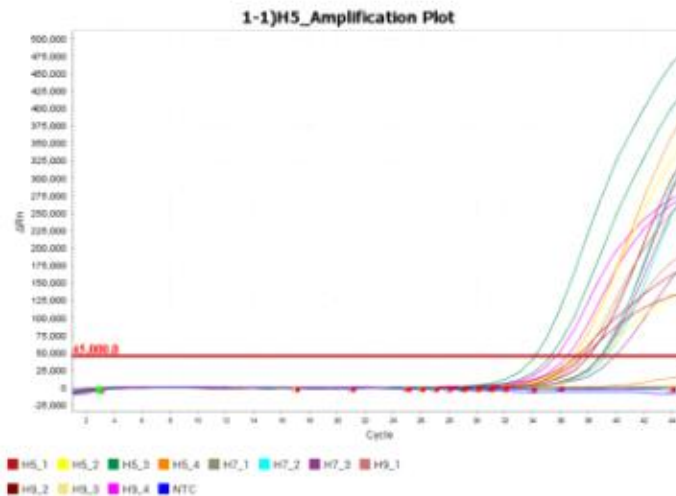
2) 건국대 sample screening 실험 (cDNA) _ Subtype별 Primer, Probe set Test_Quantstudio
 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA)

① H5 Primer, Probe set _ 건국대 sample screening 실험 (cDNA)

• 건국대 sample screening 실험 _ 1-1) H5 Probe (Tm 56°C , 45 cycle)

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
H5	Forward	CCA GAA TAT GCM TAC AAA ATT GT	58-59
	Reverse	CCA GTC GCA AGG ACT AAT	59
	1-1) H5_Probe(-)	FAM-TTG TGG AAT GGC ATA CTA GAG TTT ATC GC-BHQ1	66

	Amount	Quant Studio 3	Temp.(°C)	Time	Cycles
RR390A	10ul	Pre-denaturation	95	30sec	1
Primer	10pmole	Denaturation	95	3sec	45
Probe	5pmole	Annealing	56	30sec	
Template	H5 4종, H7 3종, H9 4종 (10pg)				
Total	20ul				



1-1) H5 probe	H5_310	H5_404	H5_652	H5_662	NTC
Ct	35.216	36.922	33.312	34.987	-
	34.603	34.921	32.258	43.655	-

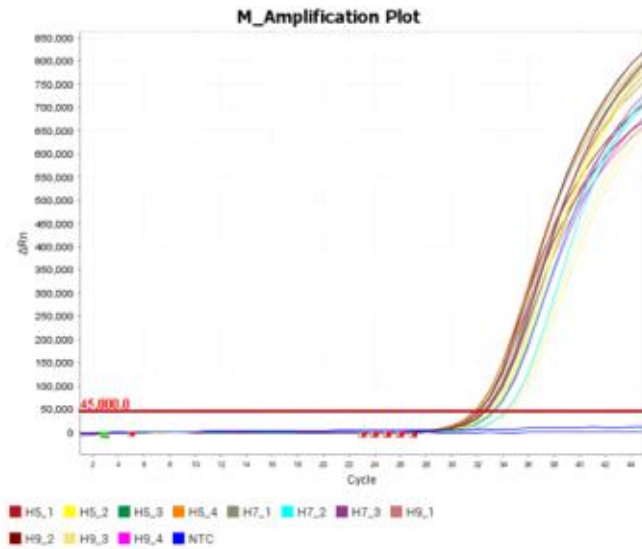
1-1) H5 probe	H7_5-11	H7_5-77	H7_21-9
Ct	-	36.924	37.600
	-	37.320	36.996

1-1) H5 probe	H9_8G39	H9_20-36	H9_220	H9_256
Ct	35.733	36.821	-	33.683
	36.972	35.955	35.402	34.366

B4

② M gene Primer, Probe set : 다른 subtype과 동일한 Melting temperature를 갖도록 수정 후 Test.

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
M gene	M(P.C)_F_Tm de	TGA GTC TTC TAA CCG AGG T	59
	M(P.C)_R_Tm de	CAA AAC ATC YTC AAG TCT CTG	58-59
	M(P.C)_qPCR_Probe	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1	70

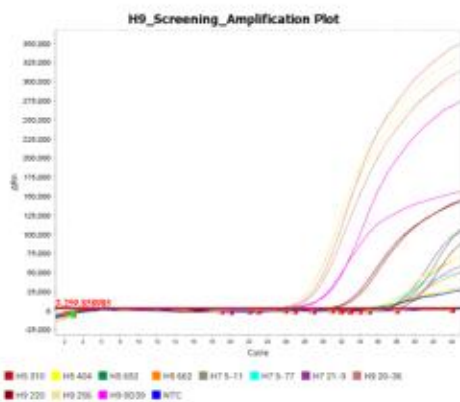


M probe	H5_310	H5_404	H5_652	H5_662	NTC
Ct	32.587	33.000	32.684	31.879	-
	32.091	33.059	32.128	32.186	-

M probe	H7_5-11	H7_5-77	H7_21-9
Ct	32.242	34.184	33.358
	31.889	33.235	32.728

M probe	H9_8G39	H9_20-36	H9_220	H9_256
Ct	32.464	31.814	34.261	33.278
	32.516	32.103	34.561	32.988

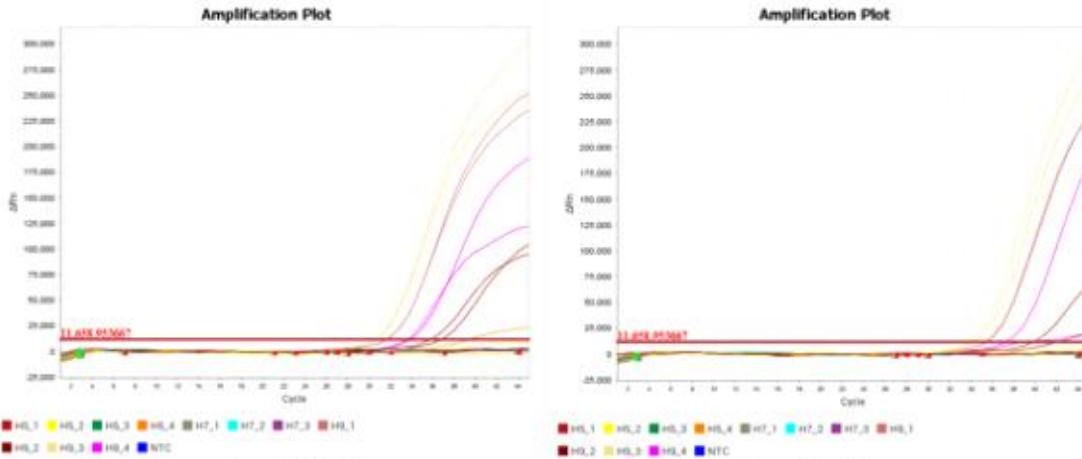
③ H9 subtype Primer, Probe set _ 건국대 sample screening 실험 (cDNA)



Ing	H5_310	H5_404	H5_652	H5_662	Ing	H7_5-11	H7_5-77	H7_21-9
Ct	-	36.380	36.832	36.704	Ct	-	34.924	35.542
	38.139	35.409	35.086	35.718		36.581	42.157	36.563

Ing	H9_256	H9_220	H9_20-36	H9_8G39	NTC
Ct	25.592	30.644	25.017	26.234	36.483
	26.379	30.906	25.694	26.058	-

- 표적 혈청형 이외의 다른 subtype에서 signal detection이 되었지만 target subtype에 Ct가 눈에 띄게 차이남.
- 건국대로부터 cDNA를 제공받아 nested PCR의 형태로 인한 현상으로 예상됨.
- 따라서 Template의 농도를 1/10, 1/100 로 희석하고, RNA 제공 요청



Template 100pg

100pg	H5_310	H5_404	H5_652	H5_662
Ct	-	-	-	39.413
	-	-	-	-

100pg	H7_5-11	H7_5-77	H7_21-9
Ct	-	-	-
	-	-	-

100pg	H9_256	H9_220	H9_20-36	H9_8G39	NTC
Ct	31.737	35.863	30.642	33.702	-
	31.734	36.923	30.816	33.954	-

Template 10pg

10pg	H5_310	H5_404	H5_652	H5_662
Ct	-	-	-	-
	-	-	-	-

10pg	H7_5-11	H7_5-77	H7_21-9
Ct	-	-	-
	-	-	-

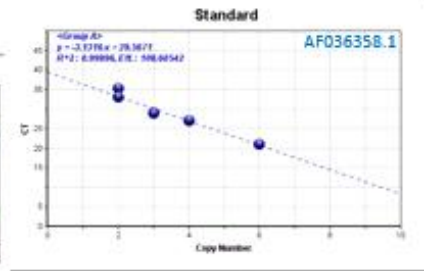
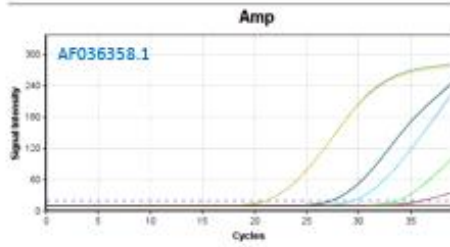
10pg	H9_256	H9_220	H9_20-36	H9_8G39	NTC
Ct	35.471	39.933	34.266	37.373	-
	35.551	42.129	33.979	39.080	-

- 최종 목표는 one step RT-qPCR이므로 RNA를 이용한 Test의 필요로 함
- 따라서, 제 2협동기관 건국대학교로부터 혈청형별 RNA를 요청 후 Test 진행

3) Gene synthesis _ Portable 장비인 Gene checker UF150을 이용한 Test

• Gene Checker UF-150 TEST _ M gene (Tm 56°C , 40 cycle) _ 10⁶ 10⁴ 10³ 10²

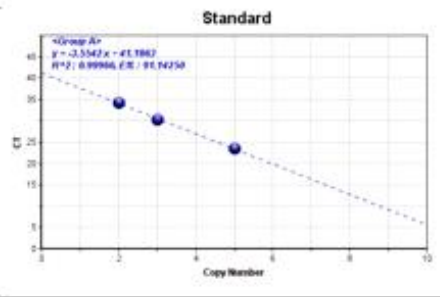
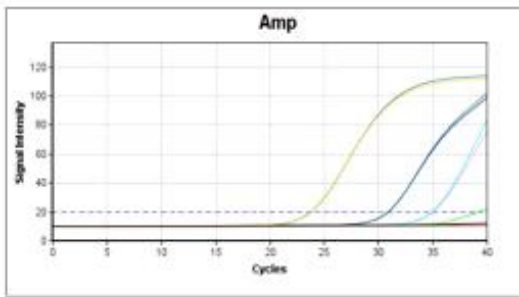
	Amount	Gene checker UF-150	Temp.(°C)	Time	Cycles
Master Mix	5ul	Pre-denaturation	95	30sec	1
Primer	10pmole	Denaturation	95	3sec	40
Probe	5pmole	Annealing	56	30sec	
Template	10 ⁶ 10 ⁴ 10 ³ 10 ²				
Total	10ul				



M Probe	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	NTC
Ct	21.06	27.02	29.03	33.05	-
	21.07	27.04	29.06	33.26	-

• Gene Checker UF-150 TEST _ H5 (Tm 56°C , 40 cycle) _ 10⁶ 10⁴ 10³ 10²

	Amount	Gene checker UF-150	Temp.(°C)	Time	Cycles
Master Mix	5ul	Pre-denaturation	95	30sec	1
Primer	10pmole	Denaturation	95	3sec	40
Probe	5pmole	Annealing	56	30sec	
Template	10 ⁶ 10 ⁴ 10 ³ 10 ²				
Total	10ul				



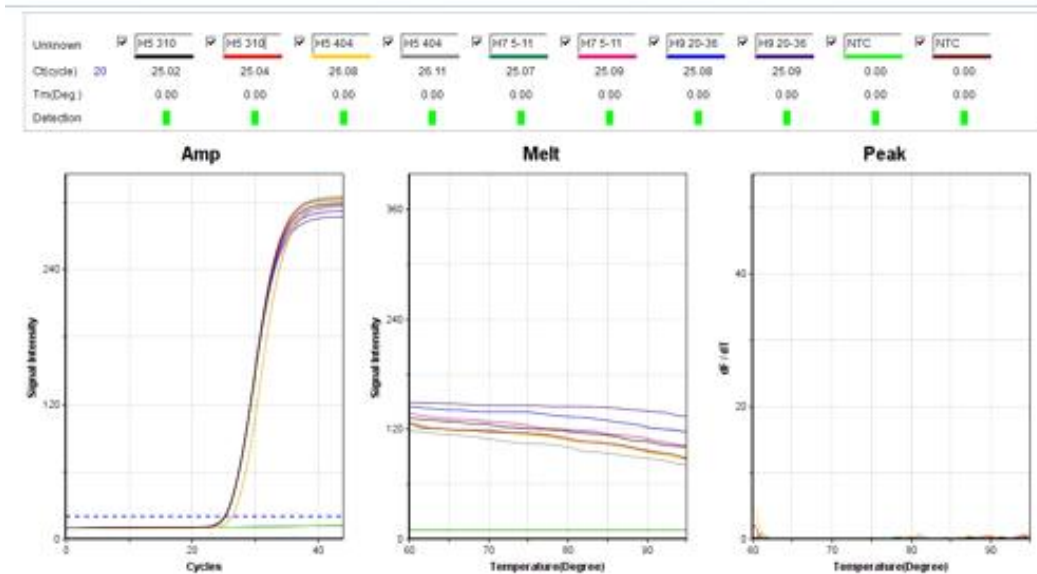
H5_Probe	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	NTC
Ct	23.48	30.26	34.14	-	-
	23.52	30.28	34.2	-	-

4) 건국대 sample screening 실험 (cDNA)_ Portable 장비인 Gene checker UF150을 이용한 Test

- Gene Checker UF-150을 이용한 건국대 Sample Screening 실험_M Probe

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')
M gene	M(P.C)_qPCR_F Primer	ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGA
	M(P.C)_qPCR_R Primer	CAAAAACATCYTCAAGTCTCTGCG
	M(P.C)_qPCR_Probe	FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1

	Amount	Quant Studio 3	Temp.(°C)	Time	Cycles
Master Mix	5ul	Pre-denaturation	95	30sec	1
Primer	10pmole	Denaturation	95	3sec	45
Probe	5pmole				
Template	H5 4종, H7 3종, H9 4종 (1ng)	Annealing	60	30sec	
Total	10ul				



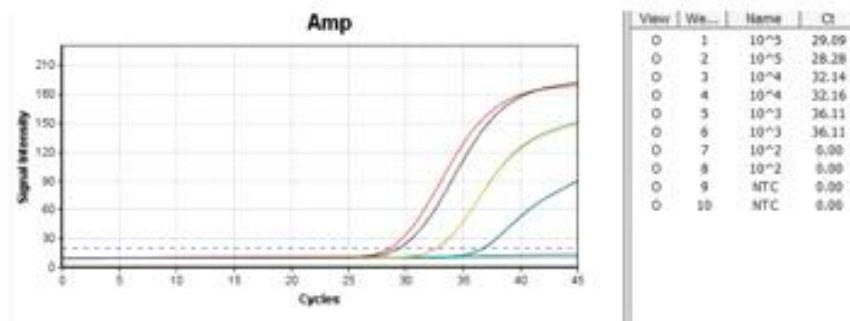
Gene Checker UF-150	H5_310	H5_404	H7_5-11	H9_20-36	NTC
Ct	25.02	26.08	25.07	25.08	-
	25.04	26.11	25.09	25.09	-

- H9 Gene synthesis 원본을 다시 희석하여 Inner Quencher를 부착한 H9 probe로 Gene Checker UF-150 TEST

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
H9	Forward	ATG TGA TGA TCA ATG CAT GGA	59
	Reverse	AAC AAG AAG GCA GCA AAC	59
	Dual-labeled Quencher Probe	FAM-ATT TAT TCG /ZEN/ ACT GTC GCC TCA TCT CTT GT-8HQ1	

Quant studio 3	Amount	Gene Checker	Amount
RR390A	10ul	Master Mix	5ul
Primer	10pmole	Primer	10pmole
Probe	5pmole	Probe	5pmole
Template	10 ⁵ 10 ⁴ 10 ³ 10 ²	Template	10 ⁵ 10 ⁴ 10 ³ 10 ²
Total	20ul	Total	10ul

	Temp.(°C)	Time	Cycles
Pre-denaturation	95	30sec	1
Denaturation	95	3sec	45
Annealing	56	30sec	



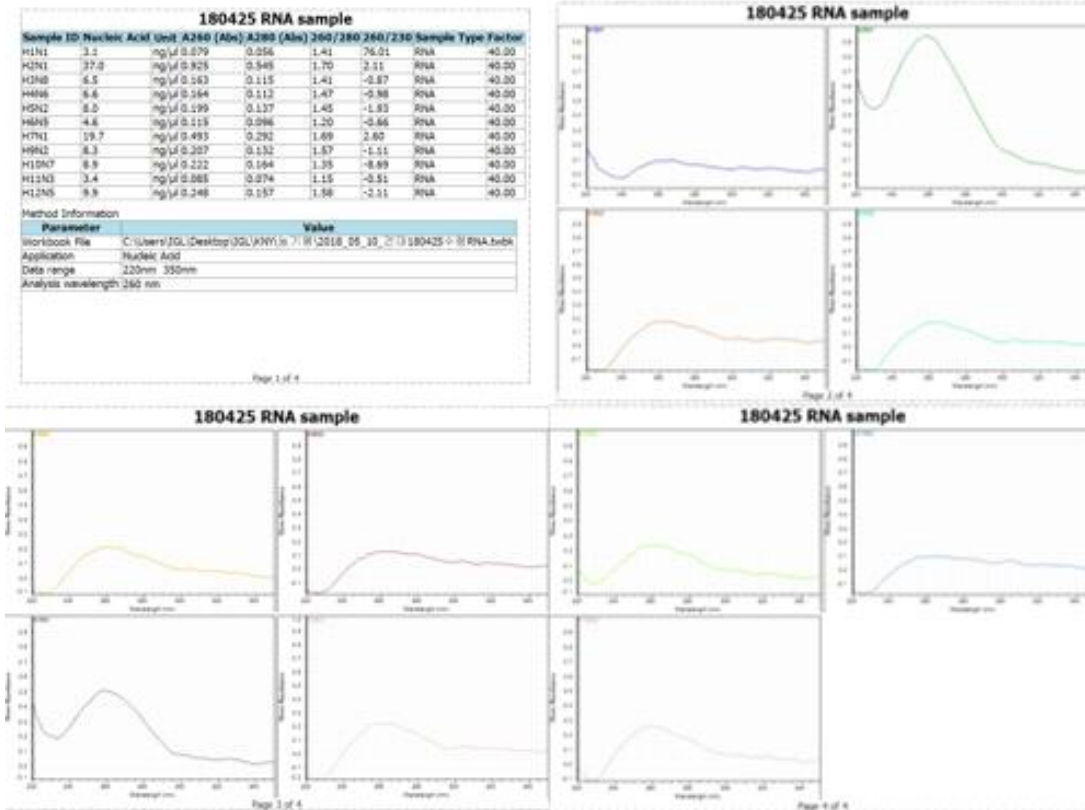
- 다른 혈청형에 비해 민감도가 떨어지는 것을 확인하여 최적화 조건 Test 진행 예정

3. 건국대로부터 제공받은 종란 집중 RNA의 Screening Test (혈청형 별 1개씩 제공)

1) RNA sample을 이용한 One-step RT-qPCR

• 건대 RNA sample 을 이용한 RT-qPCR screening test _ M gene

- 지난번 4월 25일에 건대에서 수령한 AIV RNA sample을 이용한 screening을 하기 위해 일단 먼저 nano-drop



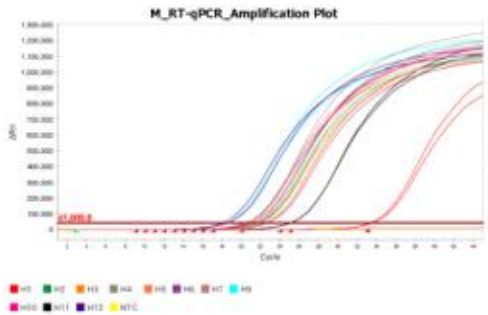
• 건대 RNA sample 을 이용한 RT-qPCR screening test _ M gene , H5, H7

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
M gene	M(P.C.)_qPCR_F Primer	ATG AGT CTT CTA ACC GAG GTC GA	64
	M(P.C.)_qPCR_R Primer	CAA AAA CAT CYT CAA GTC TCT GCG	63-65
	M(P.C.)_qPCR_Probe	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1	70

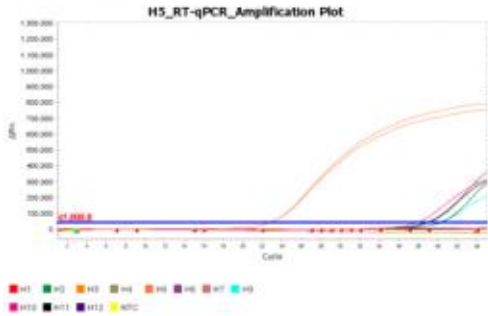
Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
H5	Forward	CCA GAA TAT GCM TAC AAA ATT GT	58-59
	Reverse	CCA GTC GCA AGG ACT AAT	59
	1-1) H5_Probe(-)	FAM-TTG TGG AAT GGC ATA CTA GAG TTT ATC GC-BHQ1	66

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
H7	Forward	ATC TGG CTG ATT CAG AAA TG	58
	Reverse	GGC CAT ACA GTC RTC ATC	58-61
	1-1) H7_Probe(-)	FAM-CCA GTG CCA TCT TCT TCA GCA TTC TCT CTC-BHQ1	70

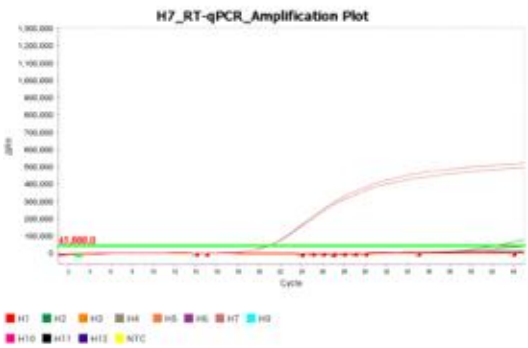
	Amount	Quant Studio 3	Temp.(°C)	Time	Cycles
Master mix 40007	10ul	Reverse transcription	50	5 min	1
Primer	10pmole	Pre-denaturation	95	30 sec	1
Probe	5pmole	Denaturation	95	3 sec	45
Template	원래샘플의 1/20 희석 후 1ul사용	Annealing	56	30 sec	
Total	20ul				



M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
Ct	-	33.530	21.937	21.887	20.810	22.645
	-	33.680	21.712	21.982	20.722	22.500
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
Ct	-	20.542	18.639	21.270	25.295	18.165
	22.854	20.692	18.698	21.247	25.295	18.728



M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
Ct	-	-	40.366	-	40.304	22.921
	-	-	-	-	39.277	22.902
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
Ct	-	39.196	-	-	38.974	-
	-	-	40.355	37.964	-	-



M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
Ct	-	-	-	-	-	-
	-	-	42.306	-	-	-
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
Ct	-	20.953	-	-	-	-
	-	20.989	-	-	-	-

- 또한 H5와 H7의 보유 샘플의 sequence 및 추가 시료 요청하여 현 보유 Probe와의 matching을 통해 Probe 추가 design.

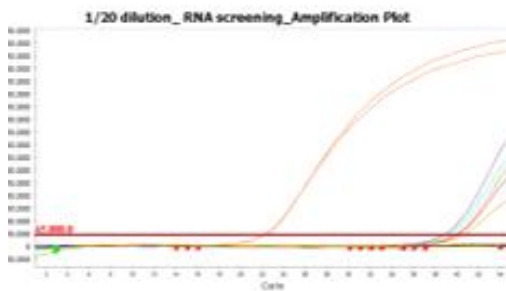
- 제공받은 종란 접종 RNA는 배양된 RNA로 실제 현장에서 분변에서 추출한 RNA로 Test 필요.

- 현재 보유중인 RNA를 1/20로 희석하였으나 실제 분변RNA의 양은 훨씬 적은 양으로 예상되므로 1/200, 1/2000 로 추가 희석하여 Test (분변 RNA는 이보다도 훨씬 적을 것)

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
H5	Forward	CCA GAA TAT GCM TAC AAA ATT GT	58-59
	Reverse	CCA GTC GCA AGG ACT AAT	59
	1-1) H5_Probe(-)	FAM-TTG TGG AAT GGC ATA CTA GAG TTT ATC GC-BHQ1	66

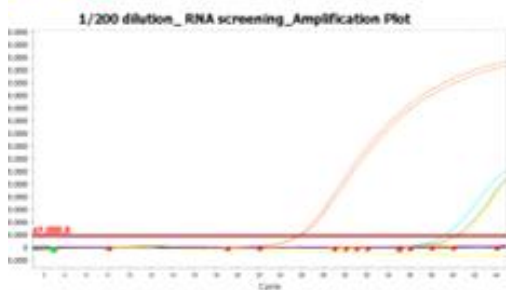
	Amount
Master mix 40007	10ul
Primer	10pmole
Probe	5pmole
Template	1/20 , 1/200 , 1/2000
Total	20ul

Quant Studio 3	Temp.(°C)	Time	Cycles
Reverse transcription	50	5 min	1
Pre-denaturation	95	30 sec	1
Denaturation	95	3 sec	45
Annealing	56	30 sec	



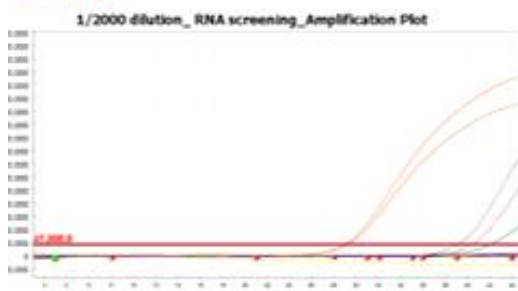
M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
Ct	-	-	-	39.903	-	22.242
	-	-	-	40.617	-	22.158
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
Ct	38.837	-	39.232	-	-	-
	40.074	-	-	39.833	-	-

< 1/20 dilution RNA>



M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
Ct	-	-	-	-	40.280	25.868
	-	-	-	-	-	25.611
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
Ct	-	-	-	40.336	-	-
	-	-	39.180	-	40.818	-

< 1/200 dilution RNA>



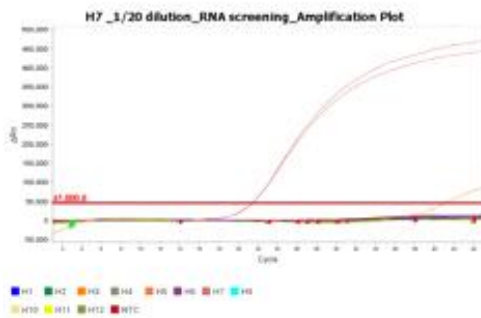
M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
Ct	-	-	-	-	39.230	29.033
	-	-	42.041	-	-	29.256
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
Ct	-	-	-	-	-	-
	-	40.424	-	-	-	-

< 1/2000 dilution RNA>

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
H7	Forward	ATC TGG CTG ATT CAG AAA TG	58
	Reverse	GGC CAT ACA GTC RTC ATC	58-61
	1-1) H7_Probe(-)	FAM-CCA GTG CCA TCT TCT TCA GCA TTC TCT CTC-BHQ1	70

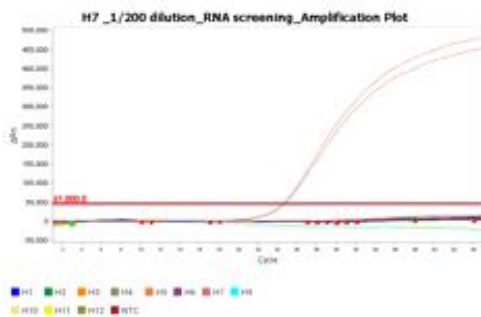
	Amount
Master mix 40007	10ul
Primer	10pmole
Probe	5pmole
Template	1/20 , 1/200 , 1/2000
Total	20ul

Quant Studio 3	Temp.(°C)	Time	Cycles
Reverse transcription	50	5 min	1
Pre-denaturation	95	30 sec	1
Denaturation	95	3 sec	45
Annealing	56	30 sec	



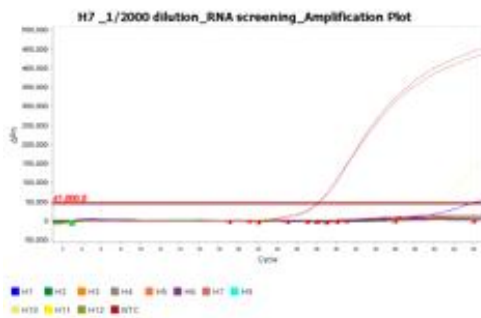
M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
Ct	-	-	-	38.158	-	-
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
Ct	-	19.576	-	-	-	-
	-	19.676	-	-	-	-

< 1/20 dilution RNA >



M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
Ct	-	-	-	-	-	-
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
Ct	-	22.918	-	-	-	-
	-	22.694	-	-	-	-

< 1/200 dilution RNA >



M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
Ct	-	-	-	-	-	-
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
Ct	-	39.794	-	-	-	-
	-	26.277	-	-	-	-
	-	25.814	-	-	-	-

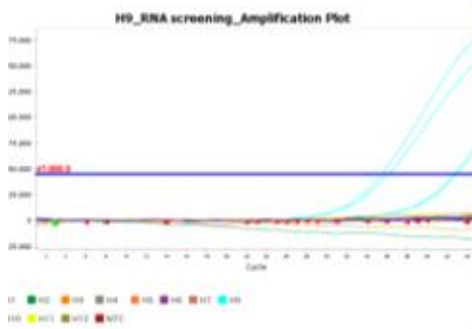
< 1/2000 dilution RNA >

Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
H9	Forward	ATG TGA TGA TCA ATG CAT GGA	59
	Reverse	AAC AAG AAG GCA GCA AAC	59
	1-1) DQ_ H9 probe	FAM-ATT TAT TCG /ZEN/ ACT GTC GCC TCA TCT CTT GT-BHQ1	67

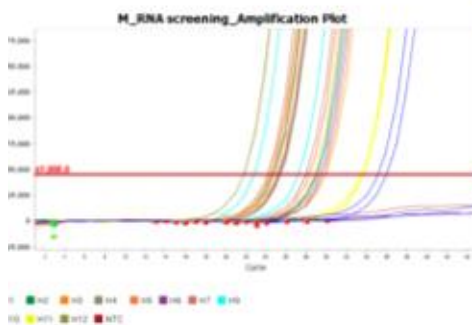
Target	Oligo name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
M	Forward	TGA GTC TTC TAA CCG AGG T	59
	Reverse	CAA AAC ATC YTC AAG TCT CTG	58-59
	M probe	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1	70

	Amount
Master mix 40007	10ul
Primer	10pmole
Probe	5pmole
Template	1/200, 1/2000
Total	20ul

Quant Studio 3	Temp.(°C)	Time	Cycles
Reverse transcription	50	5 min	1
Pre-denaturation	95	30 sec	1
Denaturation	95	3 sec	45
Annealing	56	30 sec	



H9	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
1/200 Ct	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
1/2000 Ct	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
H9	H6	H7	H9	H10	H11	H12
1/200 Ct	-	-	35.518	-	-	-
	-	-	36.182	-	-	-
1/2000 Ct	-	-	42.978	-	-	-
	-	-	42.714	-	-	-



M	NTC	H1	H2	H3	H4	H5
1/200 Ct	-	36.087	24.870	24.401	24.777	25.247
	-	35.244	24.888	24.557	24.669	24.928
1/2000 Ct	-	-	29.165	29.818	29.098	28.418
	-	-	29.125	30.016	28.926	28.394
M	H6	H7	H9	H10	H11	H12
1/200 Ct	25.357	24.267	22.881	25.078	33.743	21.822
	25.411	24.220	22.845	24.781	33.661	21.851
1/2000 Ct	29.643	27.997	27.304	28.962	33.780	25.576
	29.436	28.053	27.295	28.756	33.427	25.514

- H9 type이 다른 subtype 에 비해 Ct와 민감도가 낮은 결과로 확인됨
- 이러한 결과는 분변 RNA로 Test했을 때 아예 detection 되지 않을 것으로 예상되므로 문제 해결필요
- 최적화 과정 추가 진행

4. 병원성 감별용 Primer, Probe 설계 및 제작

1) 저병원성 감별용 Primer, Probe 설계

- 기 수행과제의 3가지의 저병원성 Probe를 기반으로 Realt-time PCR의 조건에 맞춰 설계



그림 9 . LPAIV_Primer, Probe design (Bioedit) ; Yellow - primer set, Red - Probe position

Gene	Primer	Primer Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	TaqMan Probe(5'-3')	Tm (°C)
HA	Forward	GGC AAA GTG GGA GAA TGG A	63	364	FAM-AGA AAC AAG AGG ACT ATT CGG (MGB)-BHQ1	61 (+7°9)
	Reverse	CCT CCT TCT ATG AAT CCT GCT AT	61			

표 6 . 설계한 LPAI subtype Primer , Probe set



그림 10 . LPAIV_ Primer set. (NCBI / Primer-blast)

2) 고병원성 감별용 Primer, Probe 설계

- 기 수행과제의 고병원성 Probe를 기반으로 Real-time PCR의 조건에 맞춰 설계
- 건국대로부터 보유하고 있는 HPAI_H5 서열을 제공받음.
- NCBI reference sequence (n=69) + 건대 제공 sequence (n=13)를 bio edit으로 alignment하여 variation 확인.
- NCBI reference sequence 중 H7 HPAI는 현재 보유서열과 align자체가 불가능해 보이므로 일단 보류하고 H5_HPAIV를 먼저 설계

HPAI-01	AGAAG AAAAA GA GAGGA CTT TTT	HPAI (고병원성)
HPAI-02	G AAG AAAAA GA GAGGG CTA TTT	
HPAI-03	AG AAG AAG AAAAA GAGGA CTA TTT	
HPAI-04	G AAG AAG AAG AAAGA GAGGA CTA TTT	
HPAI-05	G AAG AAG AAAAA GAGGA CTG TTT	
HPAI-06	G AAG AAG AAAAA GAGGA CTG TTT GG	
HPAI-07	G AAG AAAAA GAGGA CTG TTT GGA GC	
HPAI-08	G AGA GAG AAG AAG AAAAA GAGGA C	
HPAI-09	AAG AAG AAAAA GAGAGGA YTA TTT	
HPAI-10	AG AAG AAG AAAAA GAGGACTR TTT	
HPAI-11	CA AAG AGA GAG AAG AAG AAAAA GAGGA	
HPAI-12	CA AAG GGA GAG AAG AAG AAAAA GAGGA	
HPAI-13	CT AAG AGA GAA GAG AAG AAAAA GAGGA	
HPAI-14	T AGA GGG AAG AAG AAG AAAAA GAGGA CT	
HPAI-15	T AGA GAG AAG AAG AAG AAAAA GGGGA CT	
HPAI-16	G AGA GAA AAG AAG AAA AAARA GAGGA CT	
HPAI-17	G AGA GGG AAG AAG AAA AAAGA GAGGA	
HPAI-18	G RGR RAR RAG AAG AAAAA GAGGA YTR TTT	
HPAI-19	G AGA GAG AAG AAG AAAAA GAGGA CTG TTT	
HPAI-20	G AGA GAG AAG AAG AAAA GAGGA TTG TTT	
HPAI-21	G AGA GAA GAG AAG AAAAA GAGGA CTA TTT	
HPAI-22	G AGA AAA GAG AAG AAAAA GAGGA CTG TTT	
HPAI-23	G AGA GAG AAG AAG AAAAA GAGGA TTA TTT	
HPAI-24	G GGA GAG AAG AAG AAAAA GAGGA CTG TTT	
HPAI-25	A GGG AAG AAG AAG AAAAA GAGGA CTA TTT	
HPAI-26	A GAG AAG AAG AAG AAAAA GGGGA CTG TTT	

그림 11 . 기 수행과제의 array용 Probe (색 별로 같은 Position을 목표로 하는 Probe 분류)

- 가장 많은 HPAI-18부터 26번까지를 동일 Probe로 여기고 Real-time PCR의 조건에 맞는 Primer와 Probe 설계

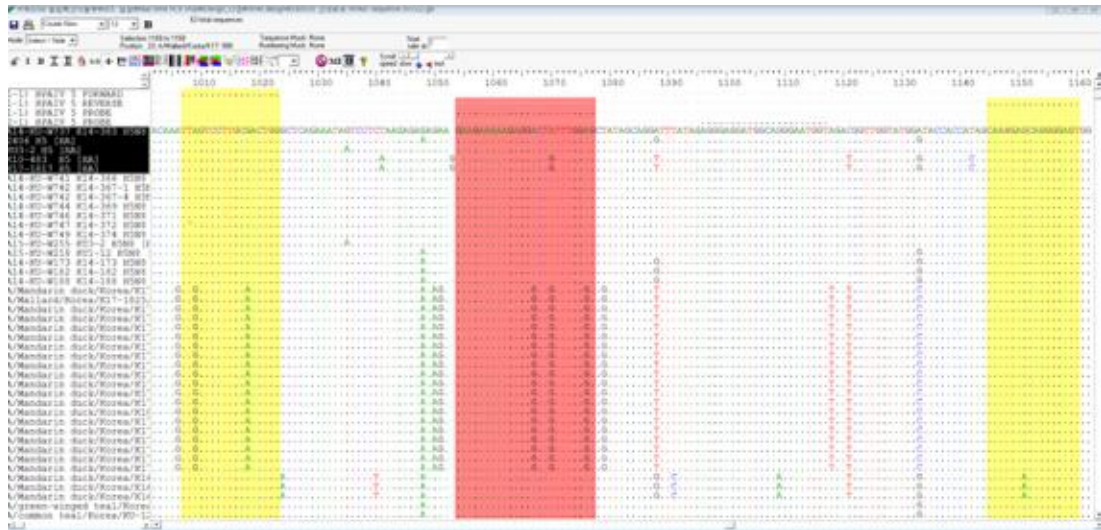


그림 12 . HPAIV 5_Primer, Probe design (Bioedit) ; Yellow - primer set, red - probe

- Reverse Primer 와 PROBE(+)의 dimer 형성이 예상되어 Probe(-)로 바꿔줌. (MGB 부착예정)

Gene	Primer	Primer Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	TaqMan Probe(5'-3')	Tm (°C)
HA	Forward	TTA GTC CTT GCG ACT GG	59	153	FAM-CTC CAA ATA GTC CTC TTT TTC TTC (MGB) -BHQ1	59 (+7.9)
	Reverse	ACT CCC CTG CTC ATT G	59			

표 7 . 설계한 HPAIV_ Primer , Probe set



그림 14. HPAIV_ Probe (NCBI / Primer-blast)

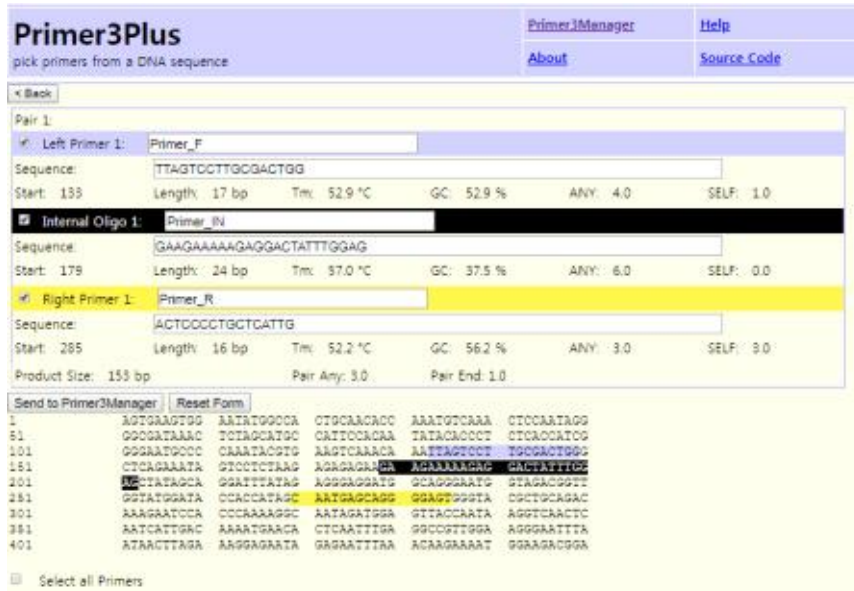


그림 15 . HPAIV_ Primer, Probe set (Primer 3)



그림 13 . HPAIV_ Primer set. (NCBI / Primer-blast)

- 기초 실험용 Gene synthesis
- 실제 건국대에서 제공받은 샘플에 적용하기 전 기초실험을 위해 혈청형별로 가장 major한 서열을 pUC57 vector를 이용해 합성

Name	REFERENCE	Sequence (5'-3')	Length(bp)
HPAIV_H5	A14-KU-W737- K14-363_H5N8 [HA]	TCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAAGTGGAAATATGGCCACTGC AACACCAAATGTCAAACCTCAATAGGGGCGATAAACTCTAGCATGCCATTCCAC AATATACACCCTCTACCATCGGGGAATGCCCAAATACGTGAAGTCAAACAAA TTAGTCTTGGGACTGGGCTCAGAAATAGTCTCTAAGAGAGAGAA-GAAGAAA AAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGATTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAA TGGTAGACGGTTGGTATGGATACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTAC GCTGCAGACAAAGAATCCACCCAAAAGGCAATAGATGGAGTTACCAATAAGGT CAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAATTTGAGGCCGTTGGAAGGGAAAT TAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAAATGGAAGACGGAT TCCTAGATGTCTGGACTTATAATG	450

[3차 년도]

▶ 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별용 현장형 유전자칩 개발

- 협동연구기관이 기존 보유하고 있는 기술인 조류 인플루엔자의 주요 혈청형, 병원성 동시 감별진단키트의 현장적용을 위한 연구 및 개발
- 민감도 측정을 위한 혈청형별 재조합 DNA를 1.0×10^6 부터 1.0×10^1 copy number까지 연속 희석하여 검출 한계를 측정하고 현장에서 추출한 RNA의 검출한계를 측정하여 민감도 향상조건 최적화.
- 유전자 칩 내에서의 Primer, Probe 표적 반응농도와 PCR 반응 조건 최적화 실험 진행
- Real-time PCR 유전자 칩 및 형광카메라를 이용한 육안으로 확인 가능한 진단 및 검출로 인한 민감도, 정확성 향상
- 협동연구기관2(건국대)에서 제공하는 cDNA를 이용하여 유전자 marker 탐색 및 최적화
- 반복실험을 통한 현장형 유전자칩 platform 최적화.

제품 등록을 진행하기 위해, 2차년도에 제작된 AIV Primer, Probe 세트를 기반으로, 교차반응, 민감도, 재현성 시험을 진행.

Subtype별 디자인된 Primer, Probe 서열 정보				
Target	Name	Sequence(5'-3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
M gene	Forward	TGA GTC TTC TAA CCG AGG T	59	96
	Reverse	CCA AAA CAT CCT CAA GTC TCT G	60	
	Probe	TCA GGC CCC /ZEN/ CTC AAA GCC GA	70	
H5	Forward	CCA GAA TAT GCM TAC AAA ATT GT	58-59	200
	Reverse1	CCA GTC GCA AGG ACT AAT	59	
	Reverse2	CCA GTT GCA AGG ACC AA	60	
	Probe	TTG TGG AAT /ZEN/ GGC ATA CTA GAG TTT ATC GC	66	
H7	Forward1	GCT GAT TCA GAA ATG GAC AA	59	120
	Forward2	GCT GAC TCA GAA ATG AAC AA	59	
	Reverse1	GGC CAT ACA GTC ATC <u>ATC</u>	58	
	Reverse2	CCA TGC AGT CGT CAT C	58	
	Probe	CCA GTG CCA /ZEN/ TCT <u>TCT</u> TCA GCA TTC TCT CTC	70	
H9	Forward	ATG TGA <u>TGA</u> TCA ATG CAT GGA	59	195
	Reverse	AAC AAG <u>AAG</u> GCA <u>GCA</u> AAC	59	
	Probe	ATT TAT TCG /ZEN/ ACT GTC GCC TCA TCT CTT GT	67	
HPAIV	Forward	CCA AAT ACG TGA AGT CAA ACA	59	124
	Reverse	TGC CAT CCT CCC TCT ATA A	59	
	Probe1	TAA G+AG +AG+A /ZEN/ G+AA GAA G+AA AAA GAG G	68	
	Probe2	TAA GAG AAA /ZEN/ A+GA G+A+A +G+AA AAA GAG G	66	

표 22 AIV subtyping Primer, Probe Set

1. 교차반응 시험

species	Ref seq
IBV(Avian infectious bronchitis virus)	NC_001451.1
APMV(Avian paramyxovirus)	KY681684.1
NDV(Newcastle disease virus)	NC_039223.1

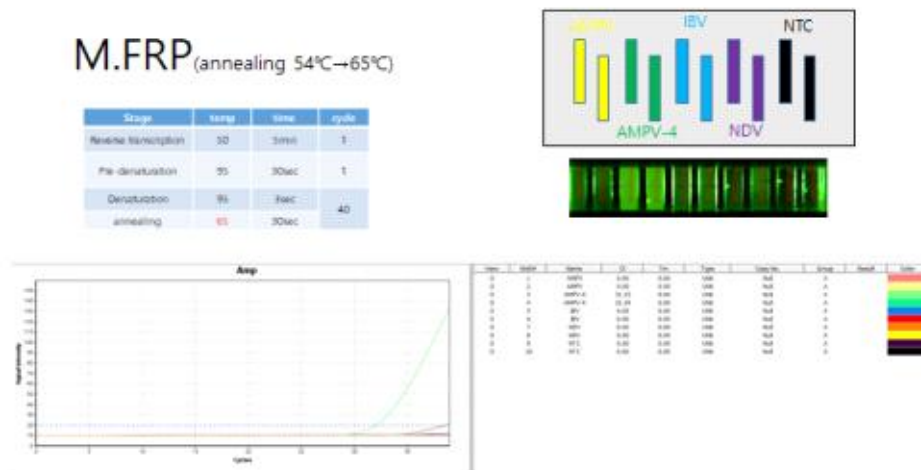
표 23. 교차반응 샘플(건국대학교)

-AIV 샘플에 대하여 교차반응 확인 샘플로써 이용되는 3 종의 샘플을 건국대학교에서 받아 시험을 진행하였다.

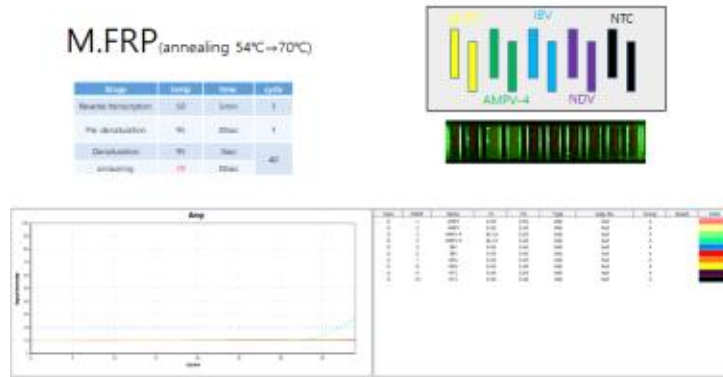
Stage	temp(℃)	time	cycle
Reverse transcription	50	5min	1
Pre-denaturation	95	30sec	1
Denaturation	95	3sec	40
Annealing	54	30sec	

표 24. 기존 Real-time PCR 조건

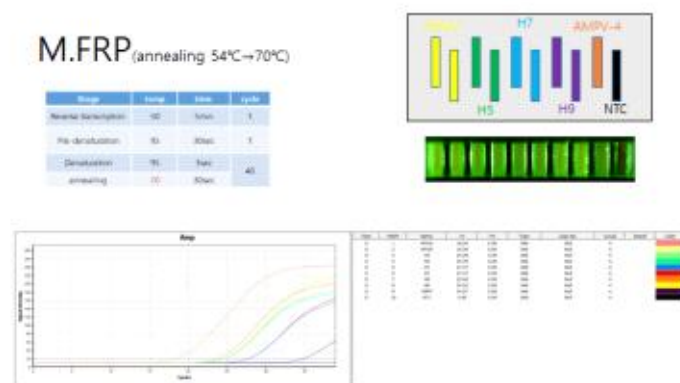
- 기존 조건으로 시험을 진행 할 시, 교차반응 샘플에서 양성 나오는 것을 확인하였다.
- 교차반응 샘플에서 음성이 나오게 하기 위하여, 기존의 조건을 변경하며 최적화를 진행하였다.
- 교차반응 시험을 위해 조건을 변경 할 경우, 민감도 및 재현성 시험에 영향을 미칠 것을 고려하여 진행하였다.



-기존 설정값인 어닐링(신장) 온도 54℃에서 65℃로 변경하여 시험 진행 한 결과, AMPV-4에서 양성 반응이 나오는 것을 확인하였다.

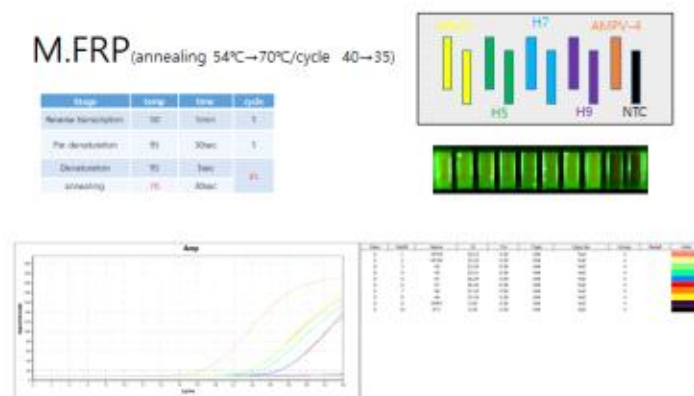


-65°C에서도 양성 반응이 나오는 것을 확인한 뒤, 70°C로 조정하여 시험을 진행하였으나 AMPV-4 샘플에서 다시 양성 반응이 나오는 것을 확인하였다.



-문제가 되는 AMPV-4 교차 반응 샘플을, AIV 샘플과 함께 Real-time PCR 시험을 진행 해 보았다.

-Cycle 수를 줄인다면, AIV 샘플에서는 문제 없이 양성이 나오고 교차 반응 샘플에서는 음성이 나올 것으로 확인한 뒤 Cycle 수를 40 Cycle에서 35 Cycle로 줄인 뒤 다시 시험을 진행해 보았다.



-40Cycle에서 35Cycle로 Cycle 수를 줄이자, AIV 샘플에서는 문제 없이 양성이 나왔으며 AMPV-4 샘플에서는 음성이 나오는 것을 확인할 수 있었다.

-이 조건을 모든 Primer, Probe set에 적용시켜보았다.

- 2반복 실험 결과, AIV 샘플에서는 양성, 교차반응 샘플에서는 음성 결과 확인
- 교차반응 시 최적의 결과를 도출 해내기 위하여 기존 정립되었던 조건에서 어닐링 온도와 사이클 수 변경 및 적용 하였다.

Stage	temp	time	cycle
Reverse transcription	50	5min	1
Pre-denaturation	95	30sec	1
Denaturation	95	3sec	40
annealing	54	30sec	

변경전

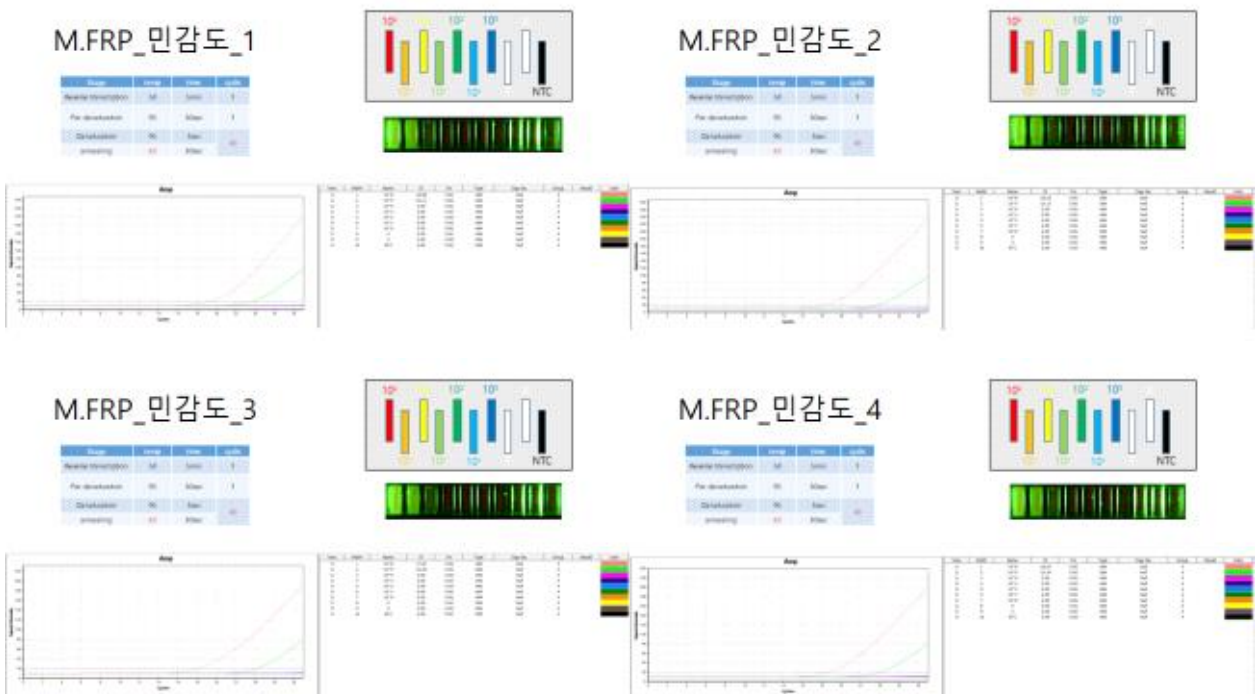
->

Stage	temp	time	cycle
Reverse transcription	50	5min	1
Pre-denaturation	95	30sec	1
Denaturation	95	3sec	30
annealing	63	30sec	

변경후

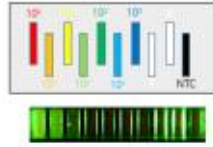
2. 민감도 시험

- 유전자 칩에 적용 될 Primer, Probe Set의 민감도는 10^6 copies/ μ l부터 10^0 copies/ μ l 까지 10배씩 희석한 합성 유전자에 대해 측정하였다.
- 교차 반응 시험에서 정립한 PCR 조건으로 시험하였다.



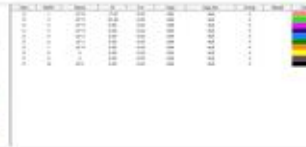
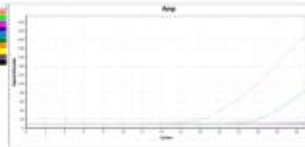
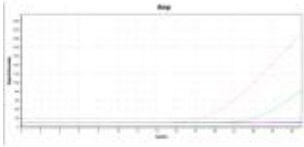
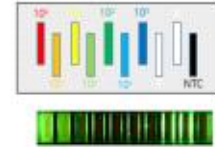
M.FRP_민감도_5

Sample	Group	Time	Value
Abiotic (non-inoculated)	M	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1



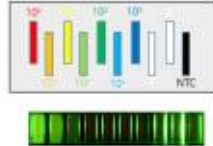
M.FRP_민감도_6

Sample	Group	Time	Value
Abiotic (non-inoculated)	M	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1



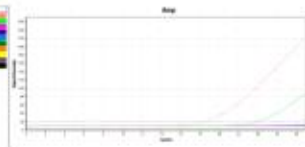
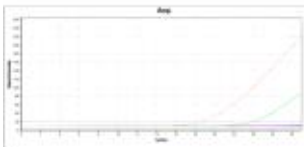
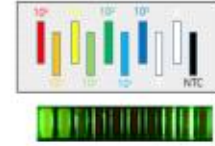
M.FRP_민감도_7

Sample	Group	Time	Value
Abiotic (non-inoculated)	M	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1



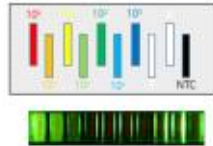
M.FRP_민감도_8

Sample	Group	Time	Value
Abiotic (non-inoculated)	M	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1



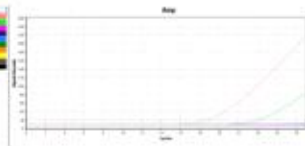
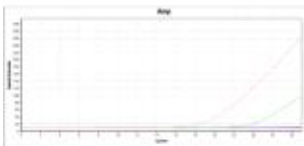
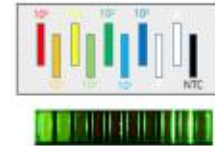
M.FRP_민감도_9

Sample	Group	Time	Value
Abiotic (non-inoculated)	M	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1

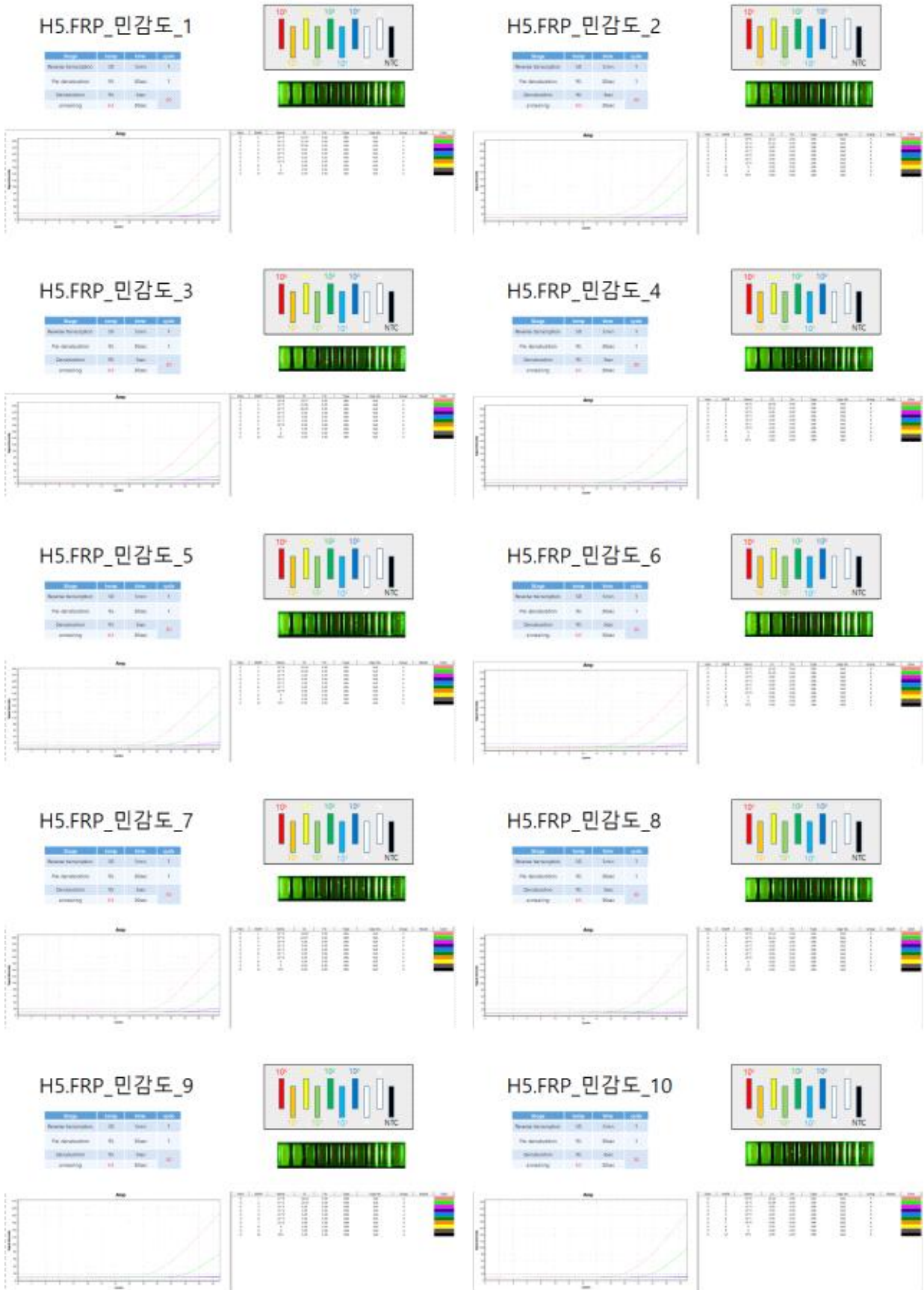


M.FRP_민감도_10

Sample	Group	Time	Value
Abiotic (non-inoculated)	M	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1
Pre-inoculation	NS	30min	1
Decontamination	NS	30min	1



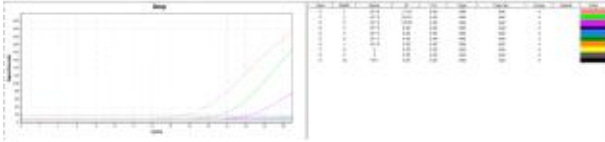
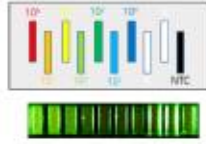
-M Gene 검출용 Primer, Probe set는 민감도가 10^5 copies/ μ l인 것으로 확인되었다.



-H5 Gene 검출용 Primer Probe set는 민감도가 10^5 copies/ μ l인 것으로 확인되었다.

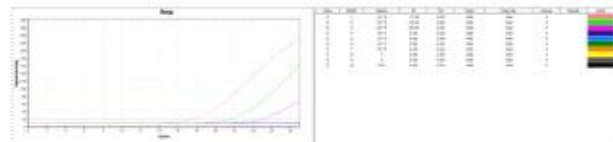
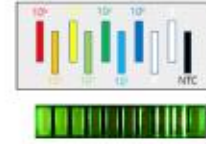
H7.FRP_민감도_1

Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35



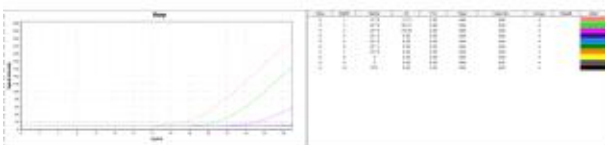
H7.FRP_민감도_2

Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35



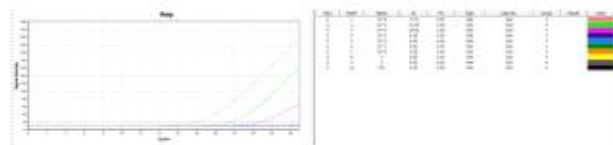
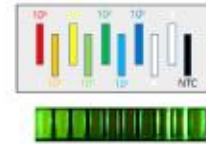
H7.FRP_민감도_3

Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35



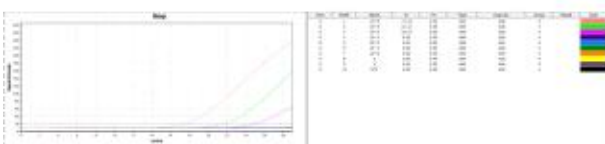
H7.FRP_민감도_4

Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35



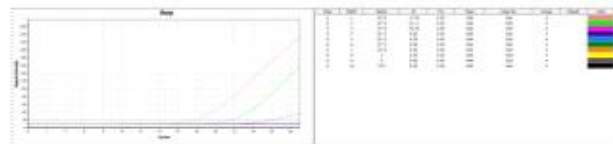
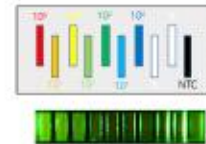
H7.FRP_민감도_5

Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35



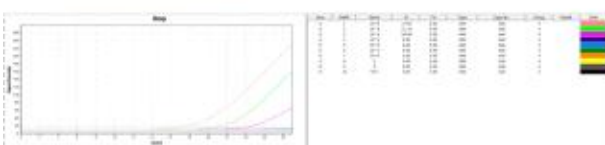
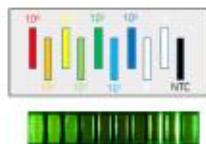
H7.FRP_민감도_6

Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35



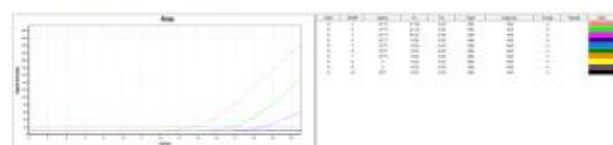
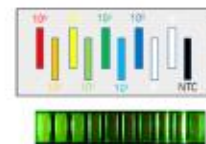
H7.FRP_민감도_7

Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35



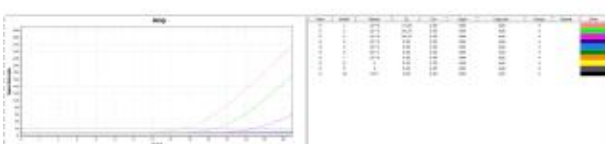
H7.FRP_민감도_8

Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35



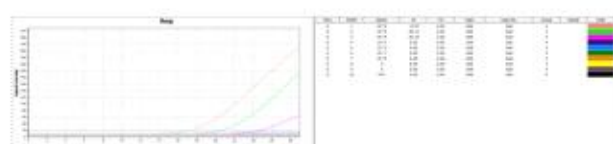
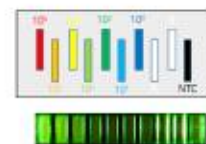
H7.FRP_민감도_9

Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35

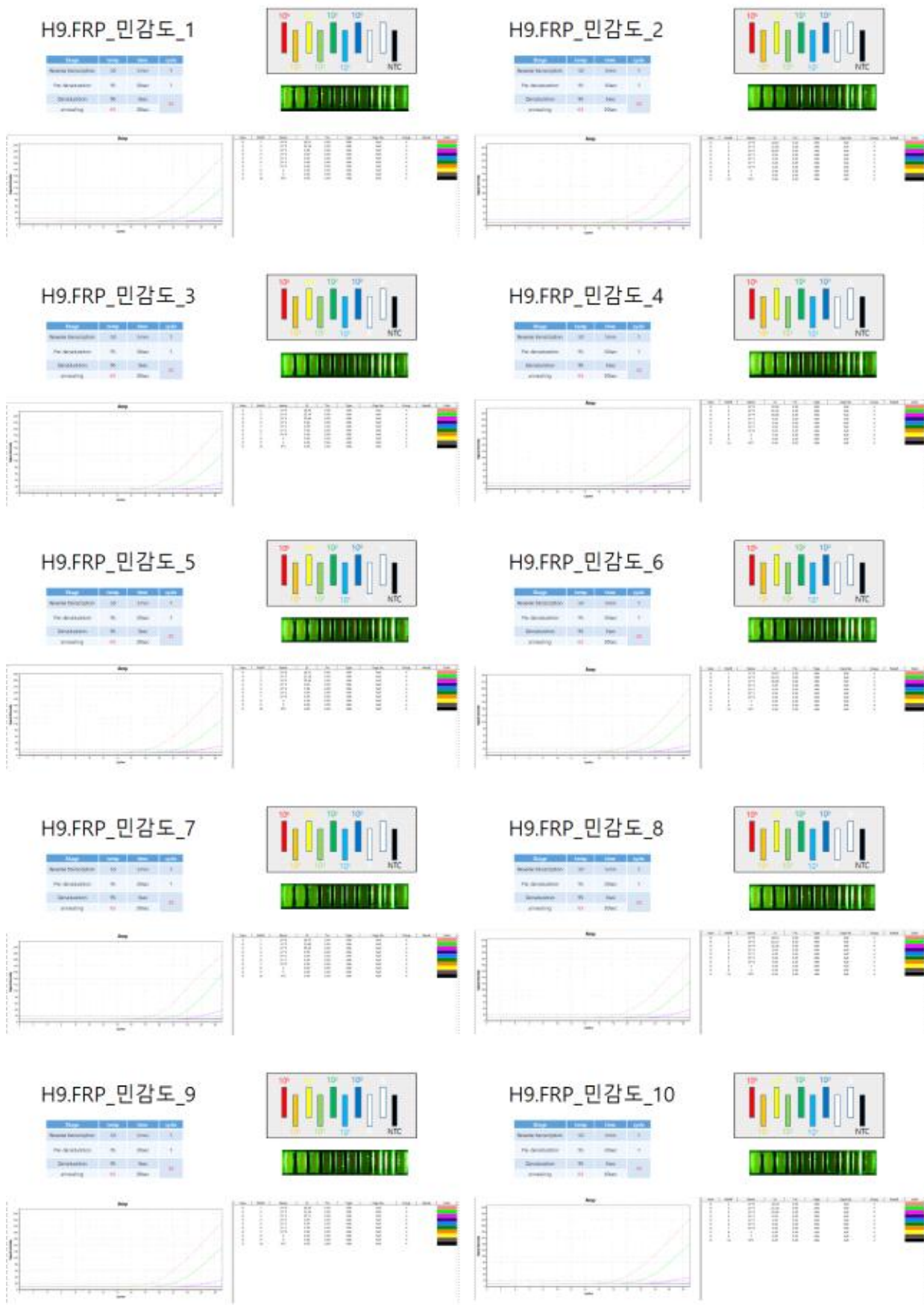


H7.FRP_민감도_10

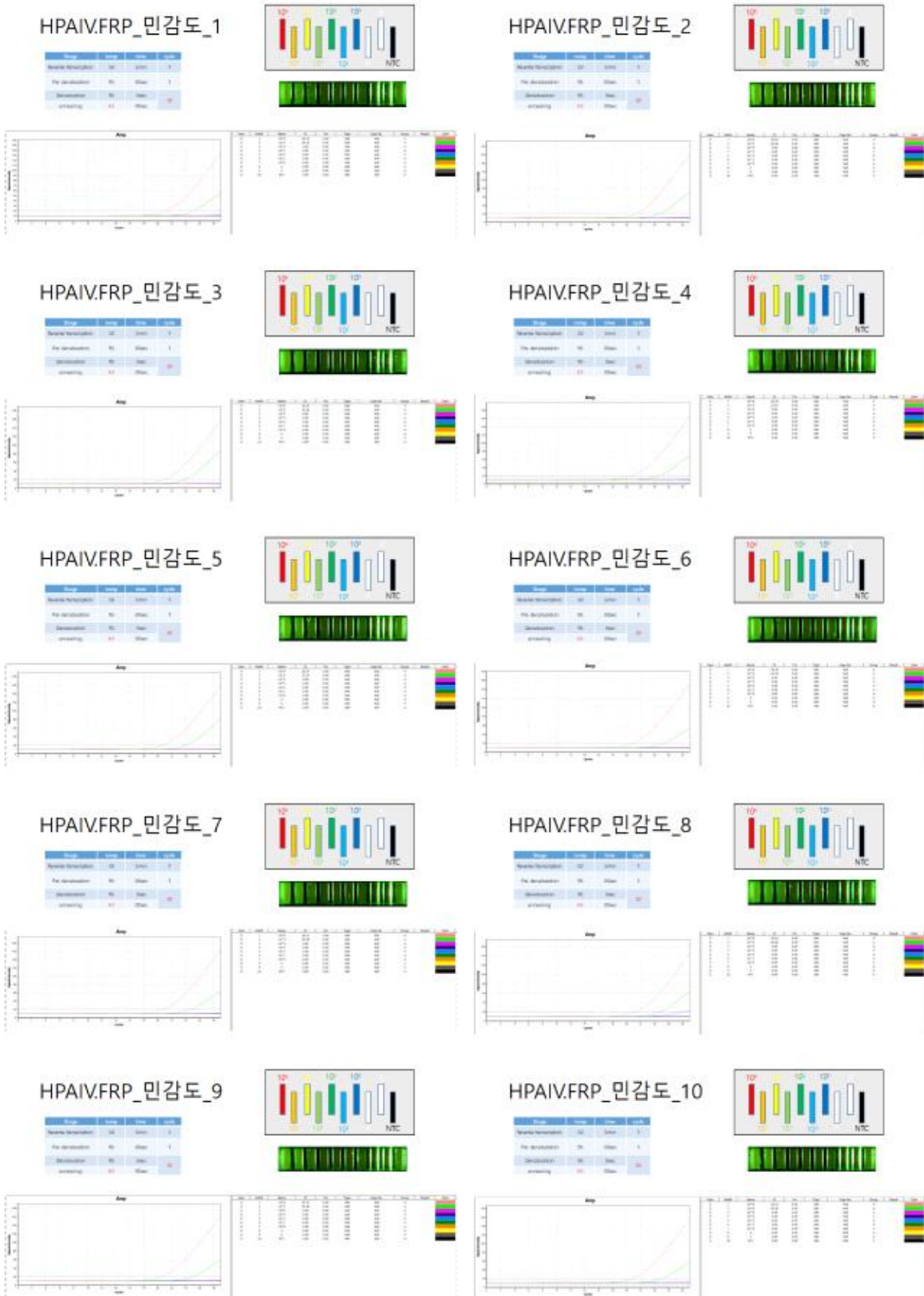
Stage	Temp	Time	Cycle
Reverse Transcription	38	10min	1
Pre-Amplification	95	30sec	1
Amplification	95	30sec	35
cooling	4	30sec	35



-H7 Gene 검출용 Primer, Probe set는 민감도가 10^4 copies/ μ l인 것으로 확인되었다.



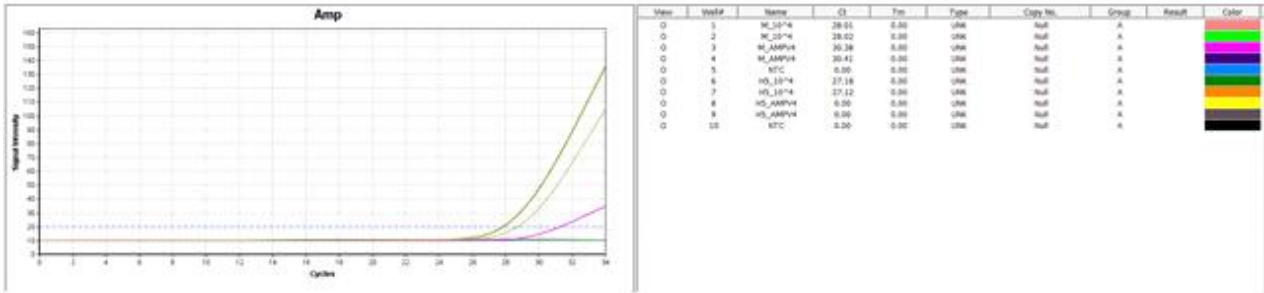
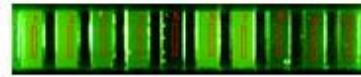
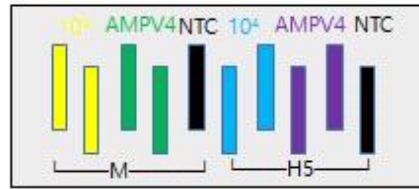
-H9 검출용 Primer, Probe set는 민감도가 10⁴ copies/μl인 것으로 확인되었다.



-HPAIV Gene 검출용 Primer, Probe set는 민감도가 10⁵copies/ μ l인 것으로 확인되었다.

샘플 적용

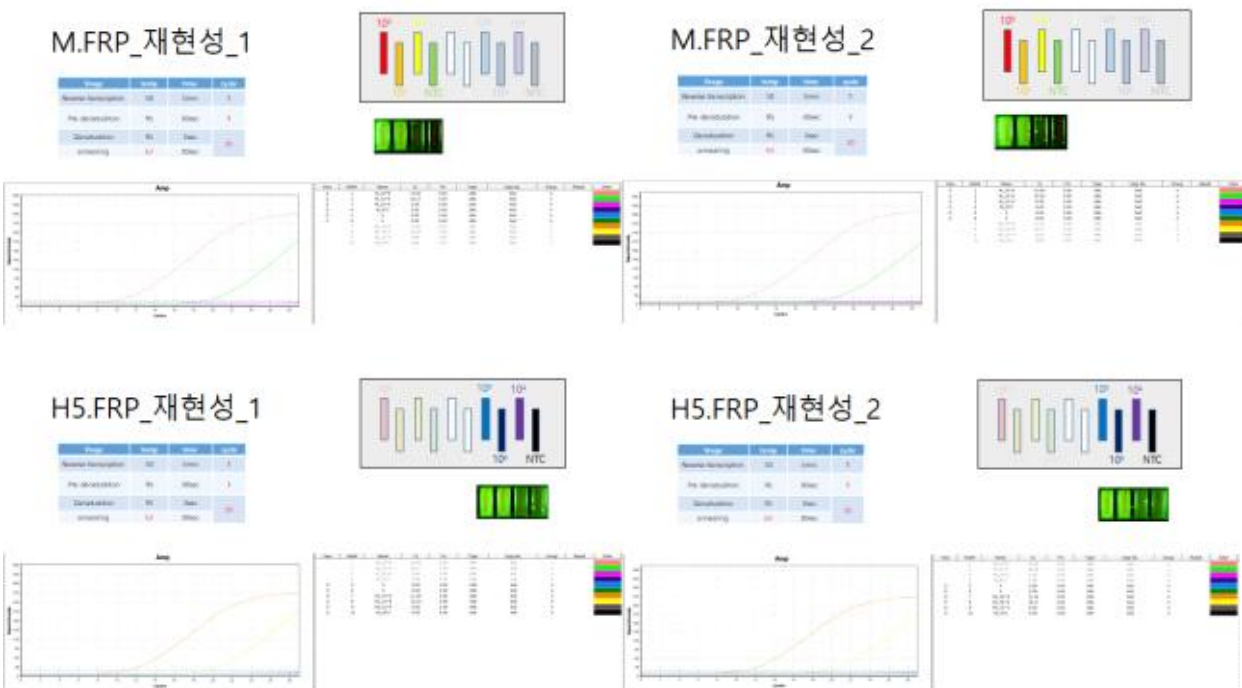
Stage	temp	time	cycle
Reverse transcription	50	5min	1
Pre denaturation	95	30sec	1
Denaturation	95	3sec	35
annealing	63	30sec	

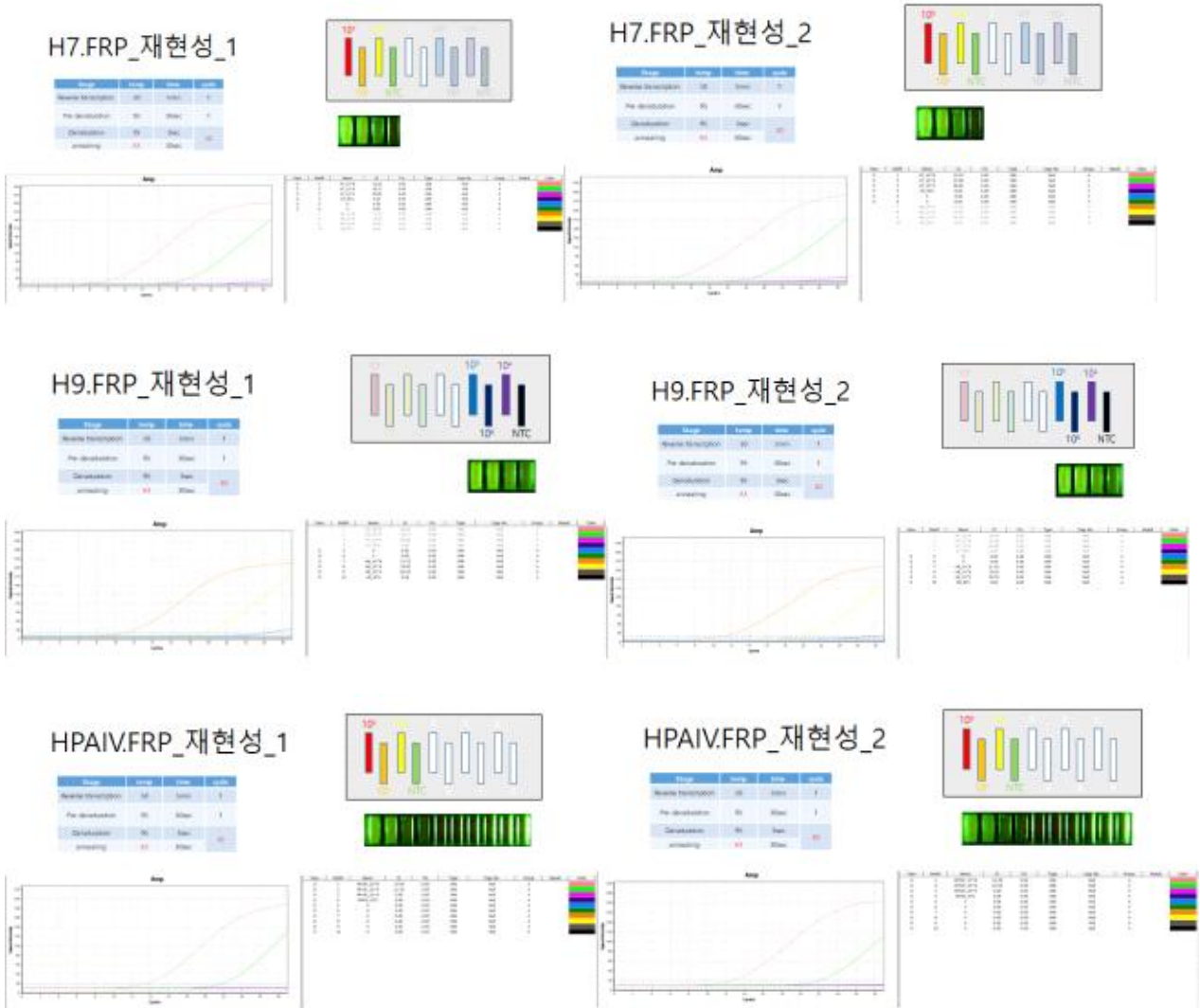


-민감도가 낮은 것으로 확인되어 추가적으로 조건 최적화 실험을 진행하였으나, 교차 반응 시험 샘플에서 양성 나오는 것으로 확인되어 추후 조건 조정, 혹은 Primer, Probe set의 시퀀스 조정을 할 계획이다.

3. 재현성 시험

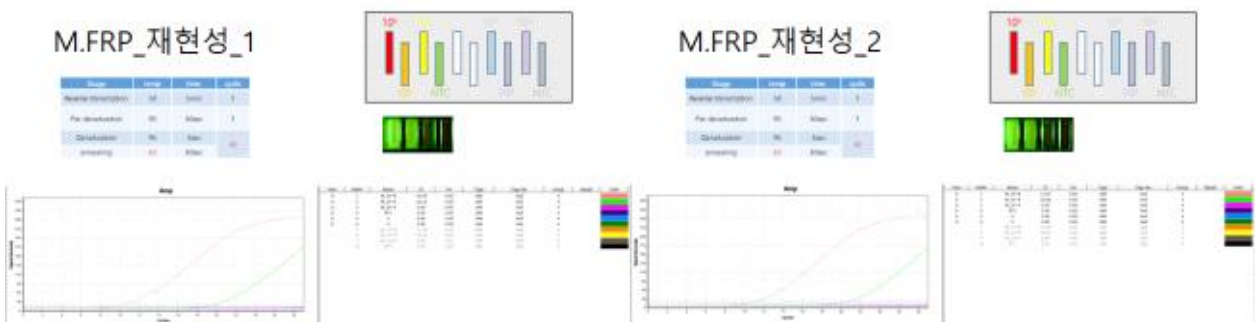
-재현성 시험은 1일 2회 반복 시험으로, 저농도(10^4 copies/ μ l), 중간농도(10^6 copies/ μ l), 고농도(10^8 copies/ μ l)의 합성 유전자 샘플에 대해 진행되었다.





-1일차 재현성 시험 결과 Ct 값 평균

FRP set	저농도(10^4 copies/ μ l)	중간농도(10^6 copies/ μ l)	고농도(10^8 copies/ μ l)
M	0	19.185	10.425
H5	0	19.135	11.180
H7	26.920	18.275	10.330
H9	26.085	19.140	11.280
HPAIV	0	21.430	13.160



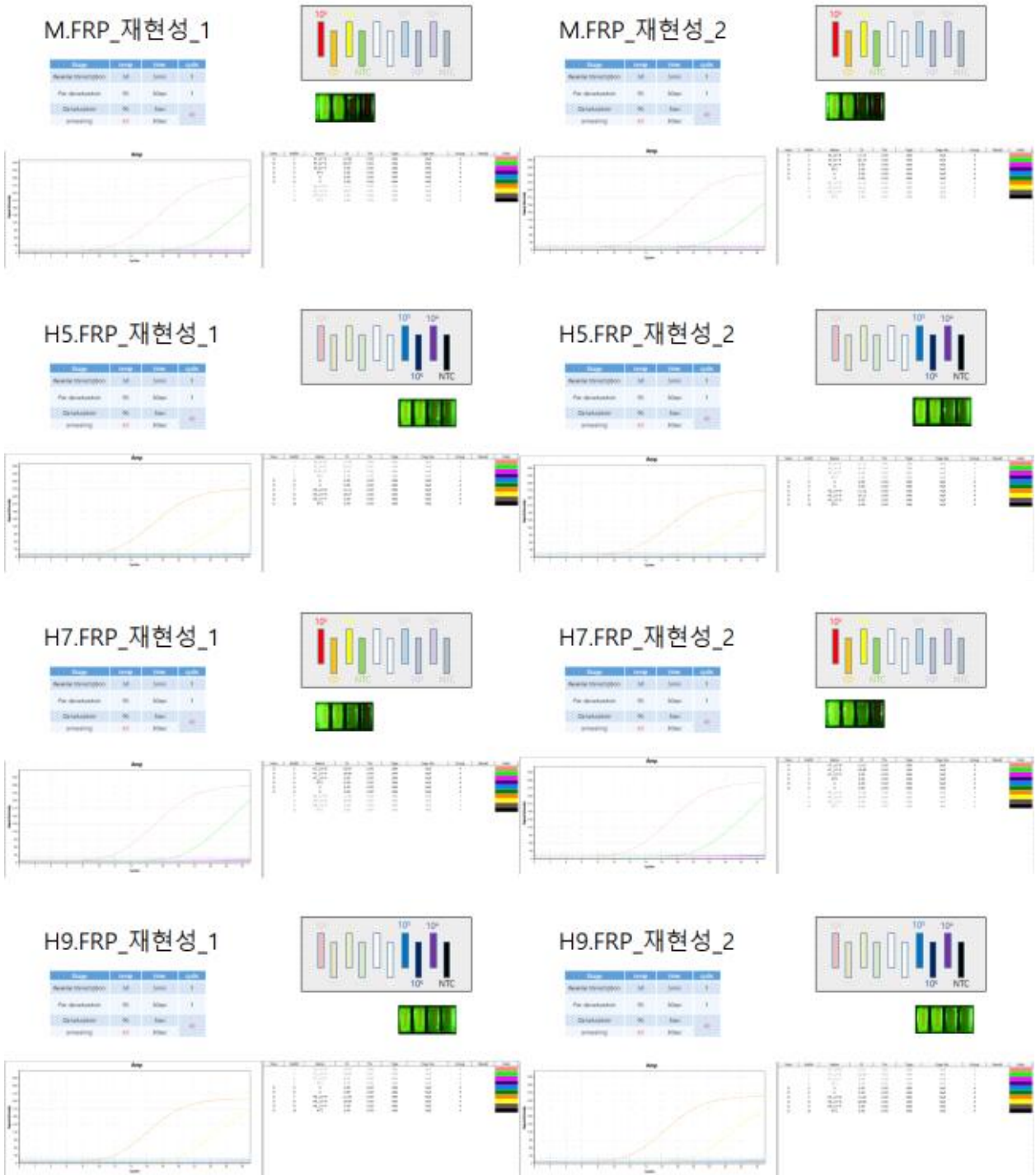


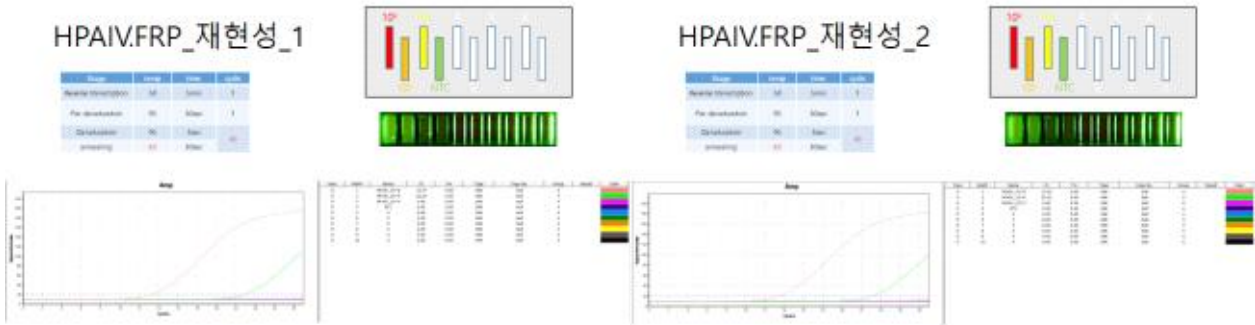
-2일차 재현성 시험 Ct 값 평균

FRP set	저농도(10^4 copies/ μ l)	중간농도(10^6 copies/ μ l)	고농도(10^8 copies/ μ l)
M	0	19.605	10.755
H5	0	19.115	11.105
H7	0	18.625	10.575
H9	0	18.655	11.330
HPAIV	0	21.200	13.170

-3일차 재현성 시험 Ct 값 평균

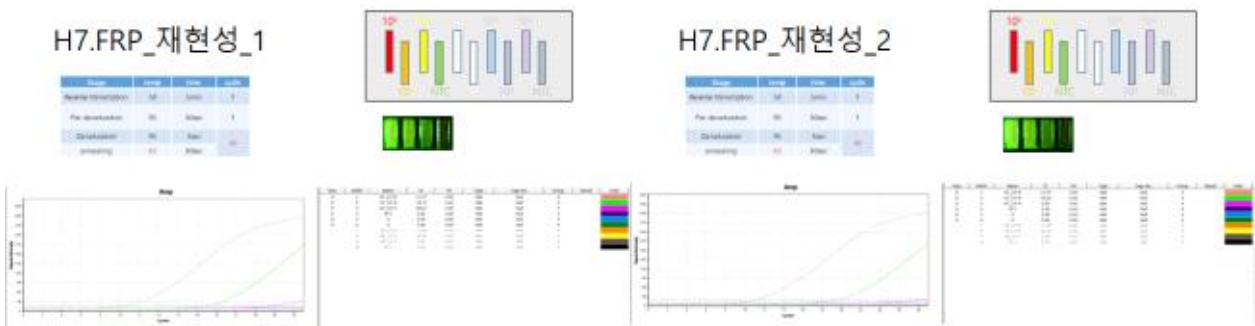
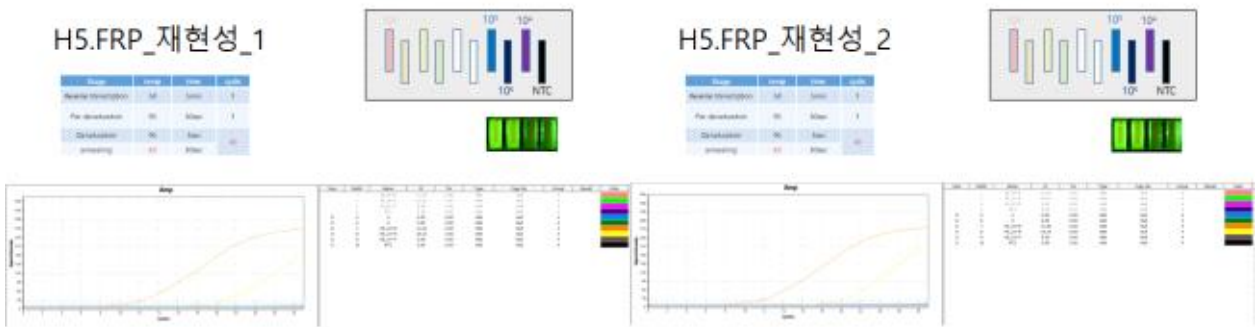
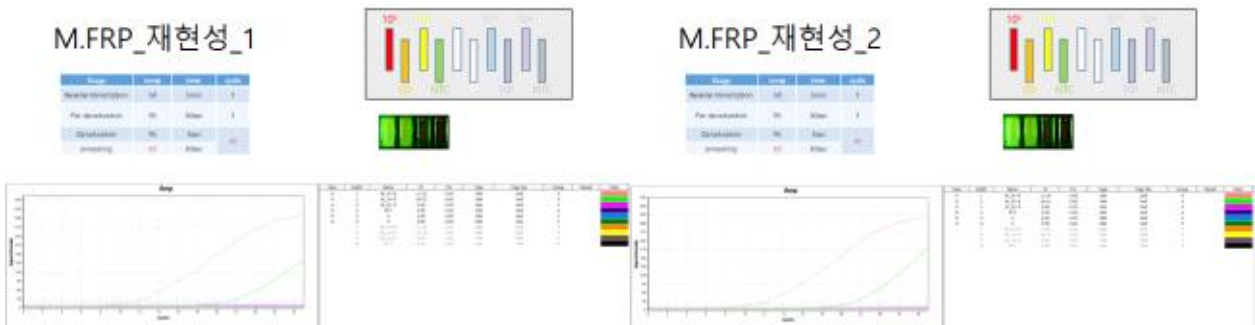
FRP set	저농도(10^4 copies/ $\mu\ell$)	중간농도(10^6 copies/ $\mu\ell$)	고농도(10^8 copies/ $\mu\ell$)
M	0	20.020	11.230
H5	0	19.195	11.235
H7	0	18.615	10.870
H9	0	18.655	11.245
HPAIV	0	22.145	13.820

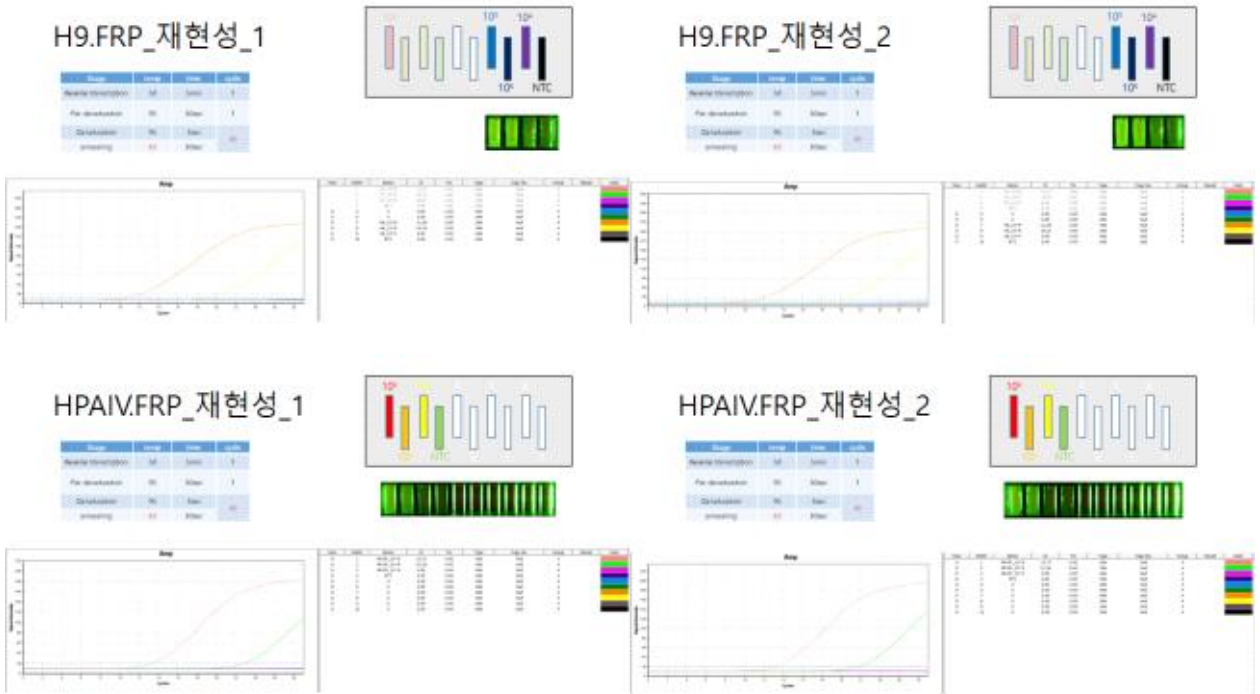




-4일차 재현성 시험 Ct 값 평균

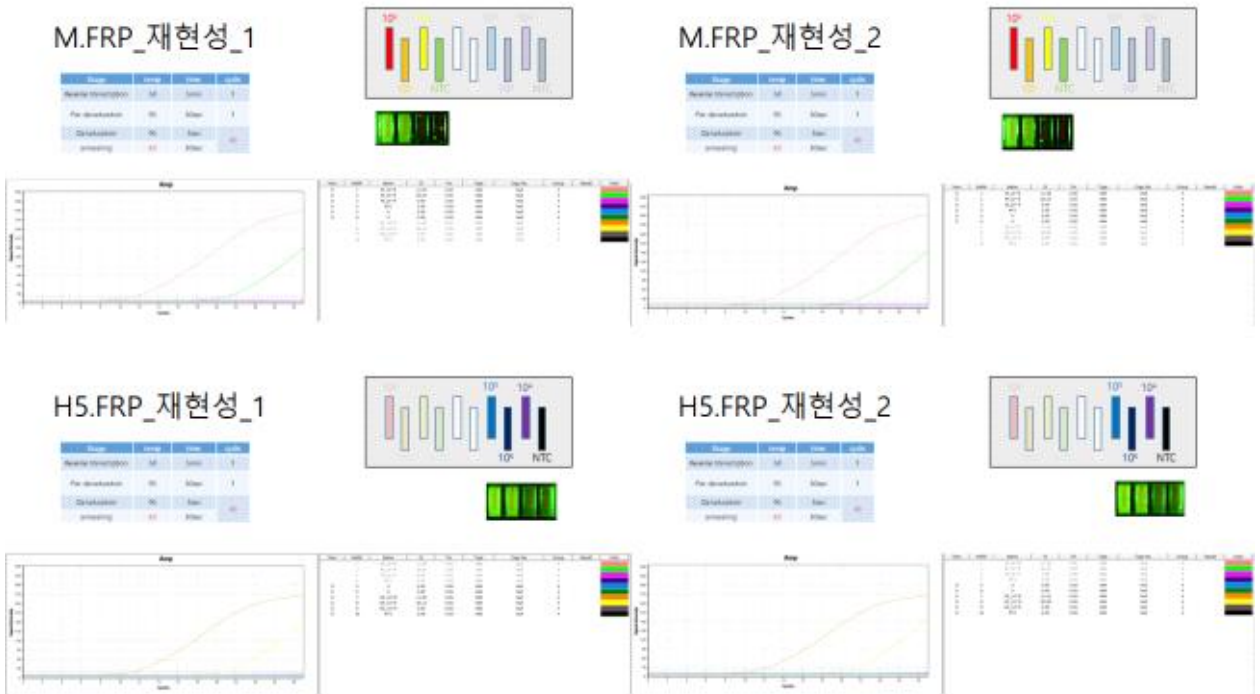
FRP set	저농도(10^4 copies/ μ l)	중간농도(10^6 copies/ μ l)	고농도(10^8 copies/ μ l)
M	0	20.105	11.115
H5	0	19.095	11.135
H7	0	18.970	10.990
H9	0	18.990	11.035
HPAIV	0	22.330	13.345





-5일차 재현성 시험 Ct 값 평균

FRP set	저농도(10^4 copies/ $\mu\ell$)	중간농도(10^6 copies/ $\mu\ell$)	고농도(10^8 copies/ $\mu\ell$)
M	0	20.165	11.280
H5	0	19.210	11.305
H7	0	19.185	11.270
H9	0	19.205	11.290
HPAIV	0	21.760	13.240





-6일차 재현성 시험 Ct 값 평균

FRP set	저농도(10^4 copies/ μ l)	중간농도(10^6 copies/ μ l)	고농도(10^8 copies/ μ l)
M	0	20.235	11.390
H5	0	20.105	11.410
H7	0	19.190	11.255
H9	0	19.670	11.270
HPAIV	0	22.665	13.755



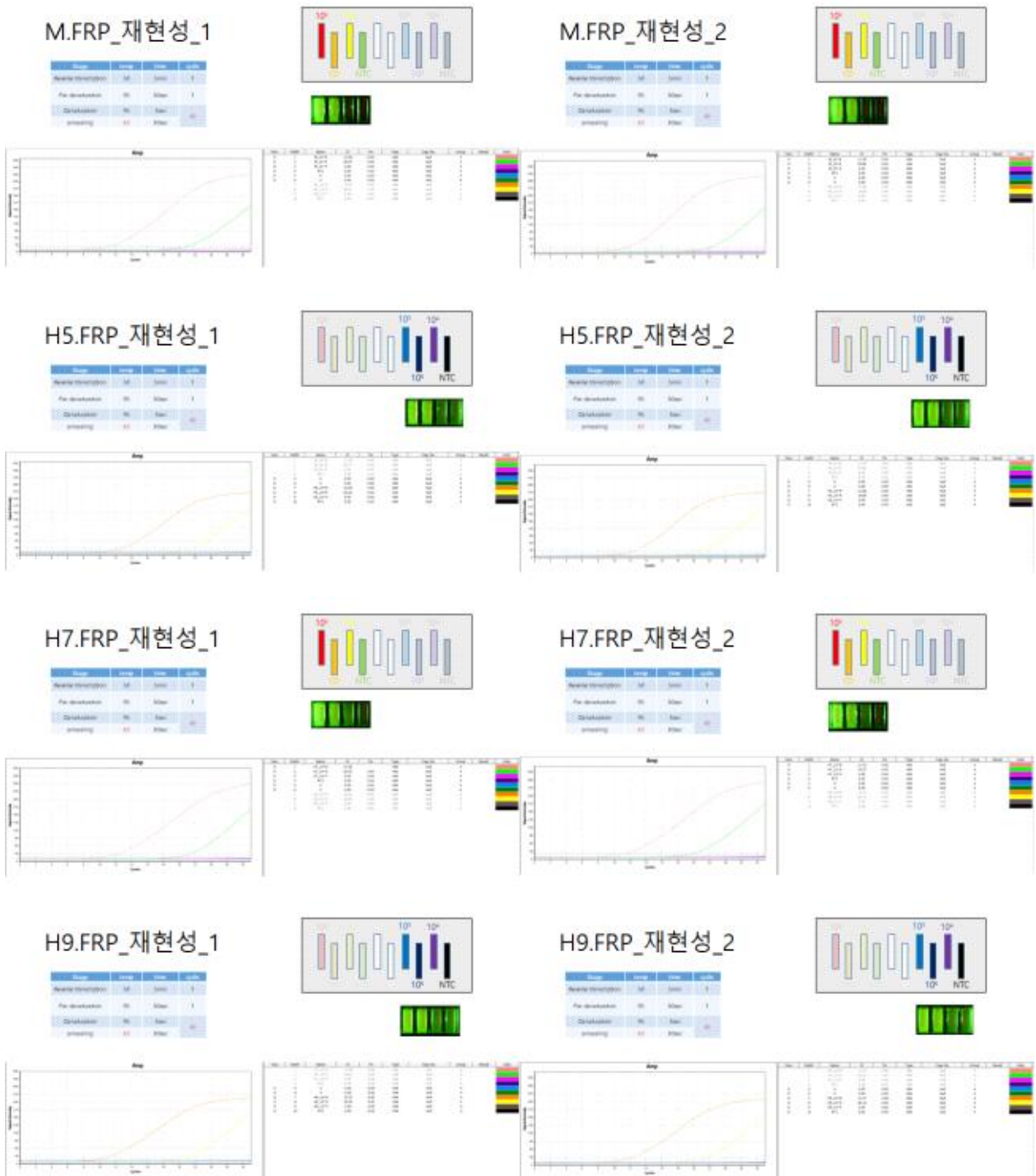


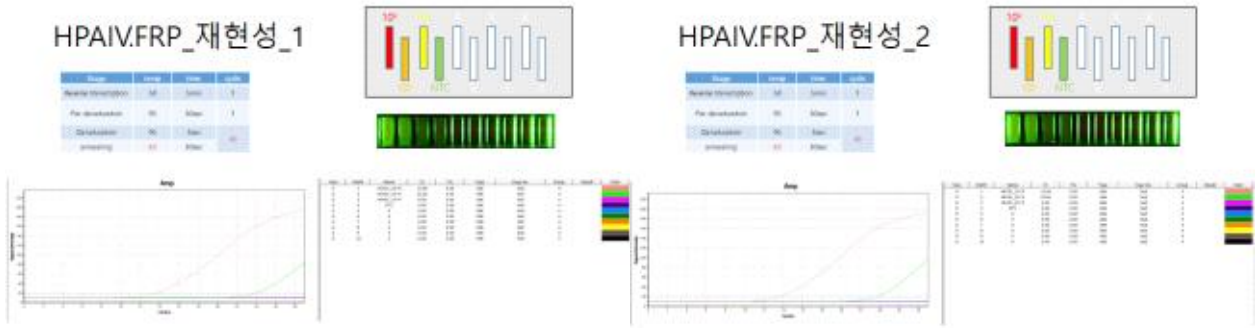
-7일차 재현성 시험 Ct 값 평균

FRP set	저농도(10 ⁴ copies/μl)	중간농도(10 ⁶ copies/μl)	고농도(10 ⁸ copies/μl)
M	0	21.070	11.205
H5	0	20.080	11.650
H7	0	19.550	11.390
H9	0	19.205	11.405
HPAIV	0	22.335	13.470

-8일차 재현성 시험 Ct 값 평균

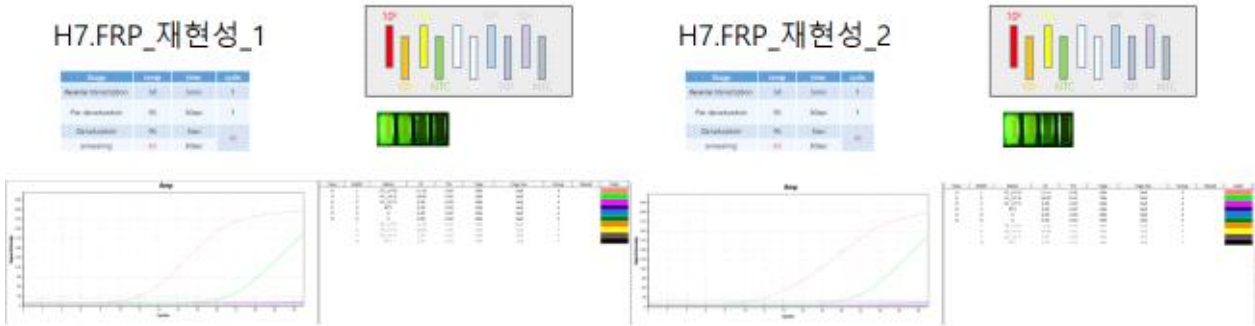
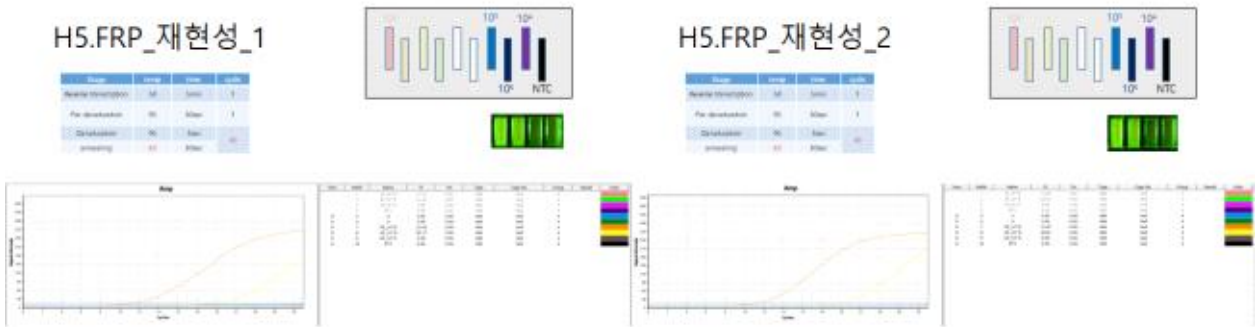
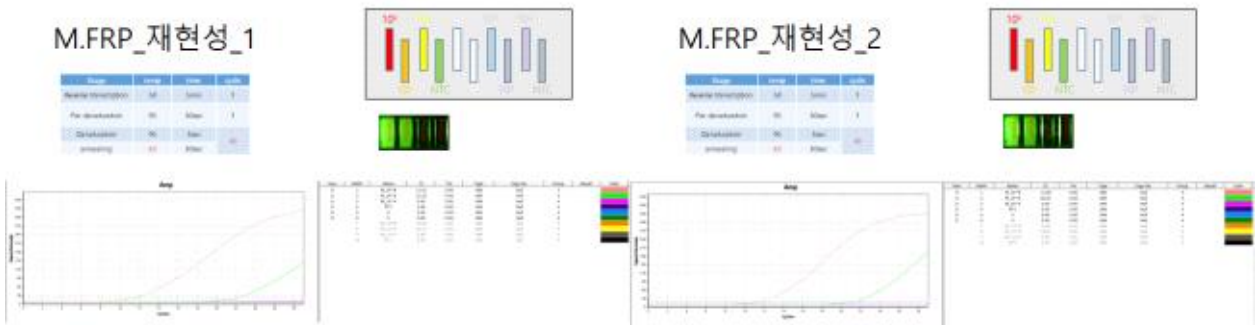
FRP set	저농도(10^4 copies/ μ l)	중간농도(10^6 copies/ μ l)	고농도(10^8 copies/ μ l)
M	0	21.000	11.475
H5	0	19.995	11.795
H7	0	19.550	11.775
H9	0	19.515	11.320
HPAIV	0	22.755	13.520

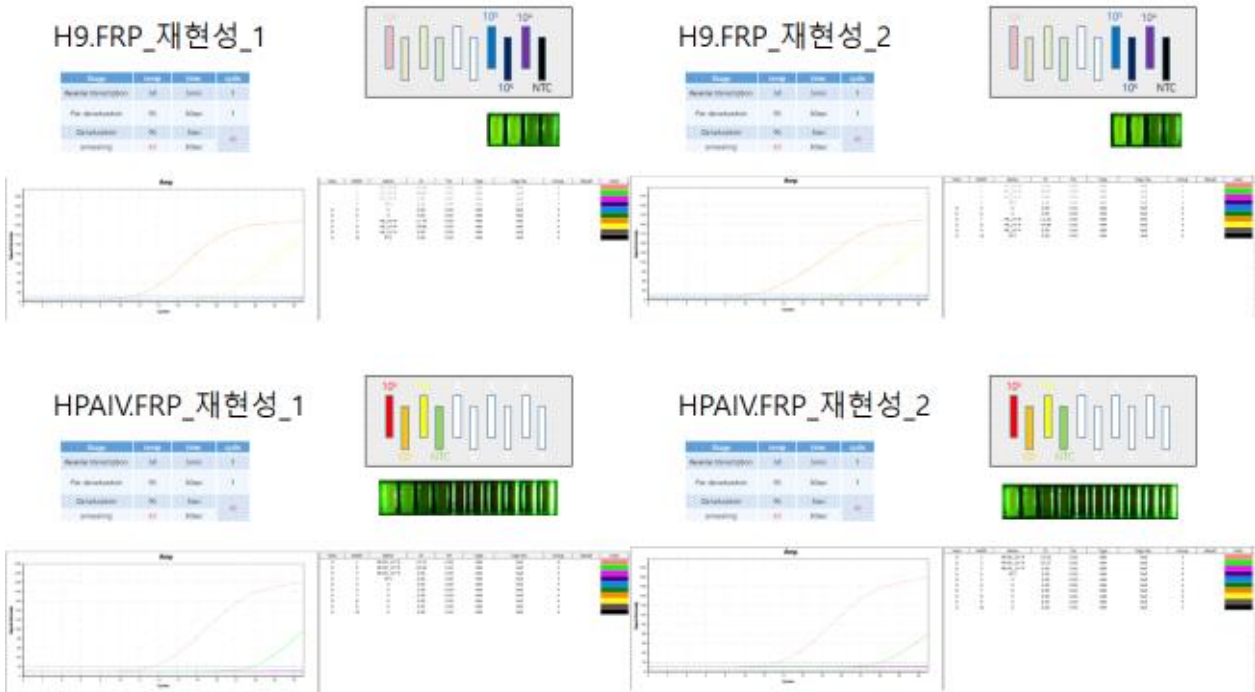




-9일차 재현성 시험 Ct 값 평균

FRP set	저농도(10^4 copies/ μ l)	중간농도(10^6 copies/ μ l)	고농도(10^8 copies/ μ l)
M	0	20.465	11.170
H5	0	19.935	11.955
H7	0	19.645	11.345
H9	0	20.05	10.940
HPAIV	0	23.15	13.665





-10일차 재현성 시험 Ct 값 평균

FRP set	저농도(10^4 copies/ μ l)	중간농도(10^6 copies/ μ l)	고농도(10^8 copies/ μ l)
M	0	21.065	11.615
H5	0	19.990	12.035
H7	0	19.825	11.370
H9	0	19.830	11.570
HPAIV	0	23.215	13.375

-재현성 시험 결과(Ct 값 평균치)

FRP set	저농도(10^4 copies/ μ l)	중간농도(10^6 copies/ μ l)	고농도(10^8 copies/ μ l)
M	0	20.292	11.266
H5	0	19.586	11.481
H7	0	19.143	11.117
H9	0	19.292	11.269
HPAIV	0	22.299	13.452

-10일 간의 재현성 Test 결과, Ct 값 평균치에 ± 1.000 이하의 오차 범위를 보였다.

4. 추후 보완 사항

- 교차 반응 시험 조건에 맞추어 시험을 진행 하였을 때 민감도 저하 현상 발생.
- 교차 반응 시험과 민감도 시험에 대한 동시 최적화를 위한 조건 변경 및 Primer, Probe set의 서열 조정 예정(T_m 값을 올리기 위한 LNA 추가 등).
- 유전자 칩 시험조건 최적화 완료 후 제품 등록 및 사업화를 진행.

○ 제 2협동연구기관 (건국대학교)

[1차 년도]

1. 유입 가능 바이러스 분석

1) 야생조류 예찰을 통한 최신 유행주 항원 확보

- 국내 철새 도래지 예찰 진행: 총 6번 서산 천수만, 천안 풍세천 및 청주 미호천 지역 등을 방문하여 총 2507건의 야생조류 분변을 채집하였으며, H5N6 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스를 포함하여 총 5건 (H5N6, H2, H4, H7 및 H3N8)의 AI 바이러스를 확보함

일시	채취지역	수량	HA 양성	AIV 양성
2016. 10. 14	천수만 A지구	281	2 (NDV)	
	천수만 B지구	150	-	
2016. 10. 28	풍세천 (봉강교)	391	1	1 (H5N6)
	풍세천 (갈매 2리)	105	-	
2016. 11. 02	풍세천 (봉강교)	202	1	1 (H2)
	풍세천 (풍세교차로)	2	-	
	천수만	23	-	
2016.11.11	산평천 (까마귀)	266	1(NDV)	
2016.12.20 - 21	풍세천	269	2	2 (H4, H7)
	미호천	347	1	1 (H3N8)
2017.01.05 - 06	풍세천	434	3 (APMV4)	
	미호천	37		
합계		2507	11	5

[표. 2016-17 야생조류 도래지 예찰 결과]

- 이외 국립환경과학원 등의 의뢰로 추가 37건의 AI 바이러스를 추가로 확보하여 본 연구과제 개발에 이용할 예정임.

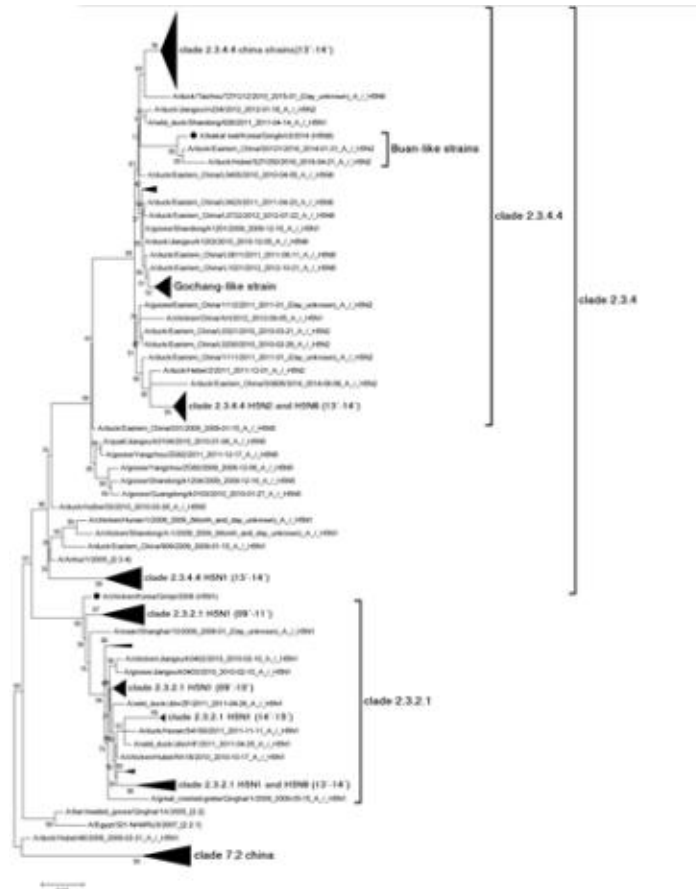
2) 중국 및 동남아 지역 유행 바이러스 분석

- 최근 중국의 OIE HPAI 발생 보고 분석 결과는 아래 표와 같으며 최근 H5N6 및 H5N8 바이러스가 유행 중인 것으로 파악되며, 최근 H7N9 바이러스가 고병원성으로 변이된 것이 보고됨.

[표. 중국 OIE 발생 보고 현황(12)]

발생연도	subtype	숙종	outbreak	case	위치
2015	H5N2	birds	3	25012	Tibet, Jiangsu
	H5N6	birds	6	12081	Hunan, Jiangsu, Guangdong
	H5N1	birds	19	9153	Hunan, Guangdong, Guizhou, Yunan, Guangxi, Jiangsu, Tibet, Chinghai, Jiangxi
		Whooper Swan, Common Pochard, Greater Scaup	1	66,25.2	Henan
		Bar-headed Goose	1	(415 death)	Tibet
		Black-necked Grebe:Podicipodidae	1	(300 death)	Inner Mongolia,
		Great Black-headed Gull	1	2361	
H5N1	tiger	1	2	Guangxi	
2016	H5N6	birds	38	96355	Hunan, Guizhou, Jiangxi, GANSU, HUBEI
	H5N1	birds	1	5869	Guizhou
20117	H5N8	Mute Swan, Black Swan	2	99	SHANXI, HUBEI
	H7N9	birds	1		GUANGDONG
	H5N6	birds	-	-	Hunan, Guizhou, Jiangxi, GANSU, HUBEI

- 중국에서 유행중인 바이러스의 Phylogenetic analysis 결과 현재 Clade 2.3.2.1c에 속하는 H5N1 바이러스 및 Clade 2.3.4.4B H5N8 및 Clade 2.3.4.4C H5N6 바이러스가 유행중인 것으로 확인됨



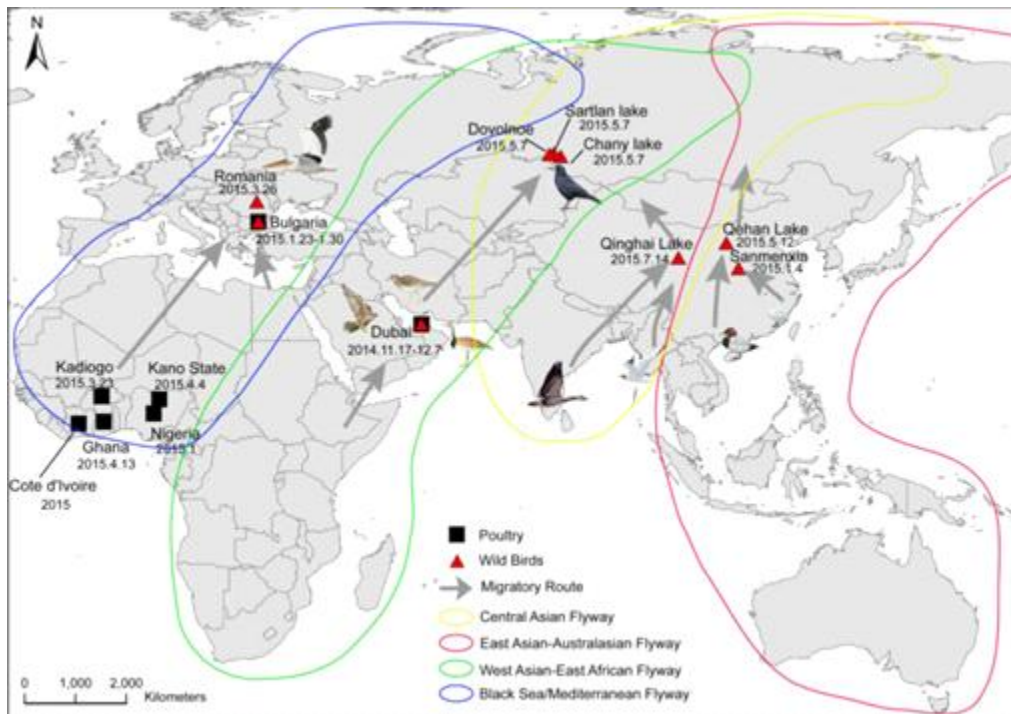
[그림. 중국 최근 발생 HPAI 바이러스의 phylogenetic analysis 결과]

- 현재 2014년 이후 전 세계 적으로 Clade 2.3.4.4 바이러스가 전파되고 있으며 이 바이러스는 총 4개의 subgroup (Group A; H5N8, Group B; H5N8, Group C; H5N6, Group D; H5N6) 으로 나뉘어 짐. 이에 대한 분석 결과는 아래 그림과 같음.



[전세계 Clade 2.3.4.4 바이러스 전파 현황]

- 2016년도 겨울 중국 및 동남아 지역의 Clade 2.3.2.1c 바이러스가 야생조류에 의해 유럽 및 동남아 지역으로 전파되어 향후 국내 발생 가능성이 높은 것으로 확인됨.

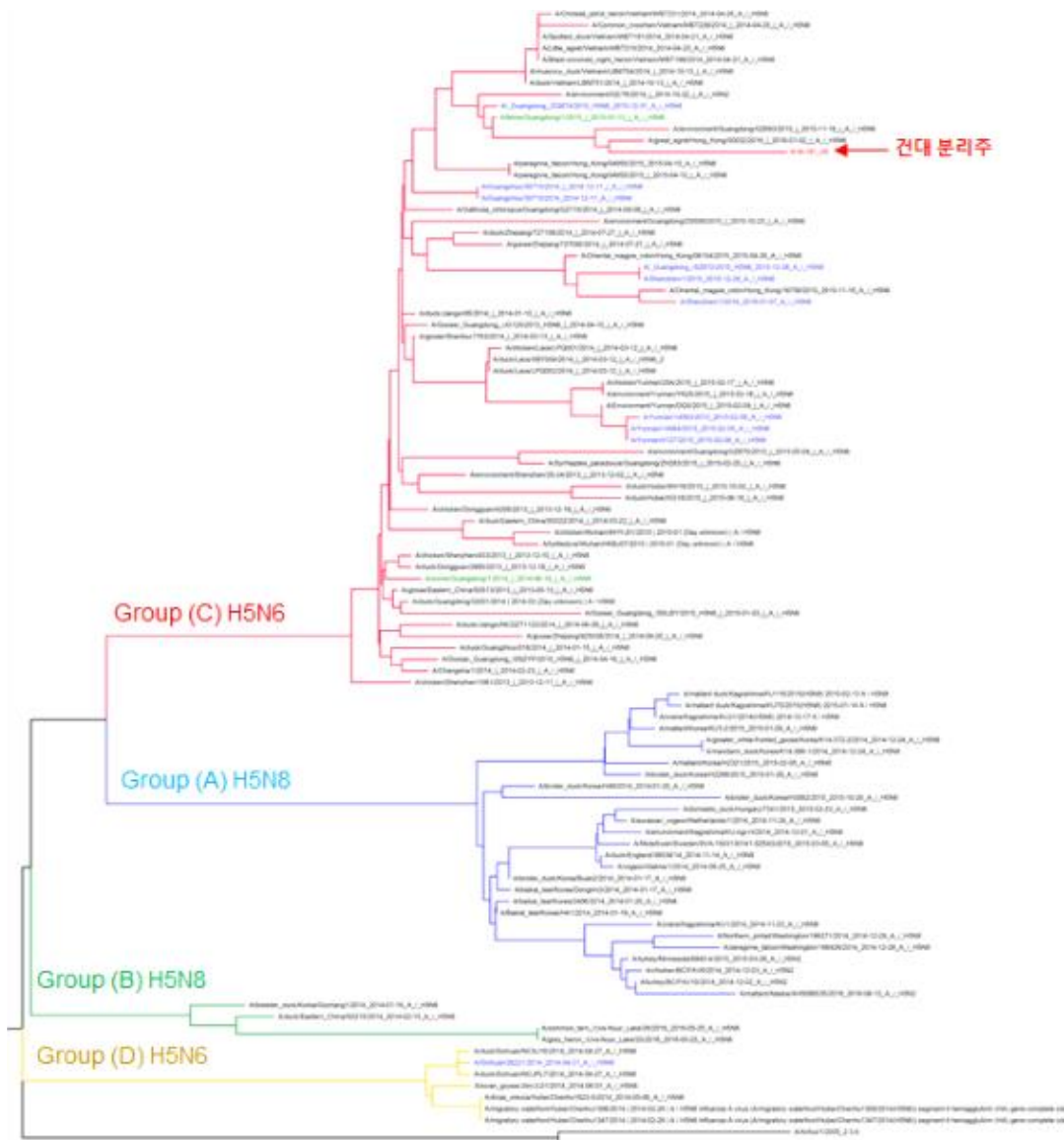


[Clade 2.3.2.1c H5N1 HPAI 바이러스의 전세계 발생 현황(13) (Bi Y et al., Virol Sin., 2016)]

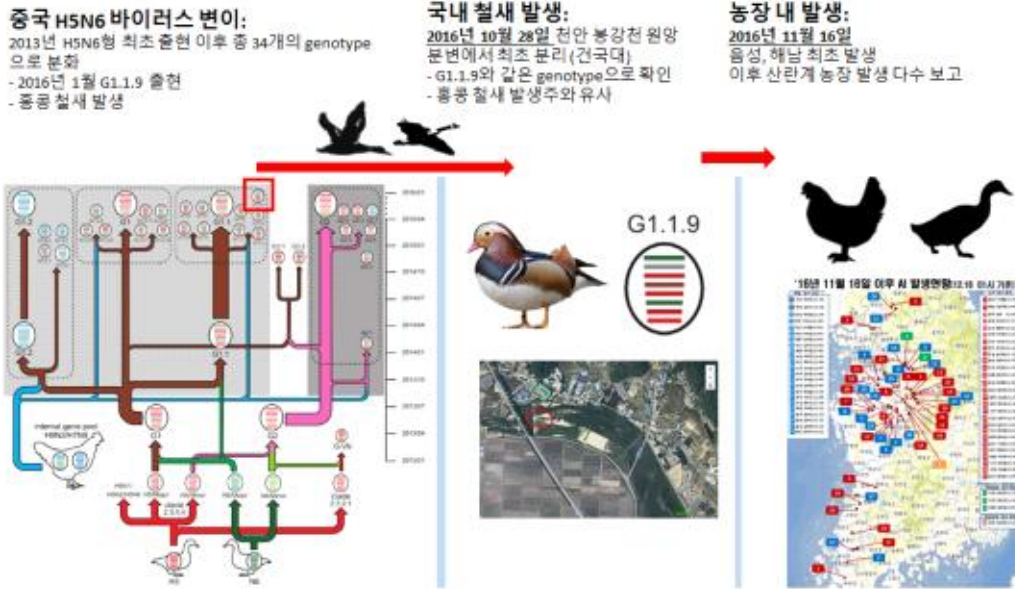
- 현재 중국 및 주변국 유행 바이러스 중 Clade 2.3.4.4D H5N6 바이러스 및 Clade 2.3.2.1c 바이러스가 아직 국내에 유입되지 않았으며, 국내 발생주에 이를 포함하여 향후 진단 기술 개발에 이용하고자 함.

3) Sequence 분석을 통한 유입 패턴 분석

- 자체 예찰 과정에서 분리된 H5N6 HPAI 바이러스의 유전자 분석 결과 국내에 유입된 H5N6 바이러스는 중국에서 2013년 이후 유행중인 Clade 2.3.4.4 Group C에 속하는 것으로 확인됨.
- 국내 유입과 거의 동시에 발표된 중국 논문(12) (Bi et al., Cell Host & Microbe, 2016)에 따르면 중국의 H5N6 바이러스는 총 34개의 genotype으로 분리 되었다는 것이 보고됨. 국내 발생 바이러스의 유전자 분석결과 34개 genotype 중 G1.1.9 genotype의 바이러스와 가장 유사한 것으로 확인됨.



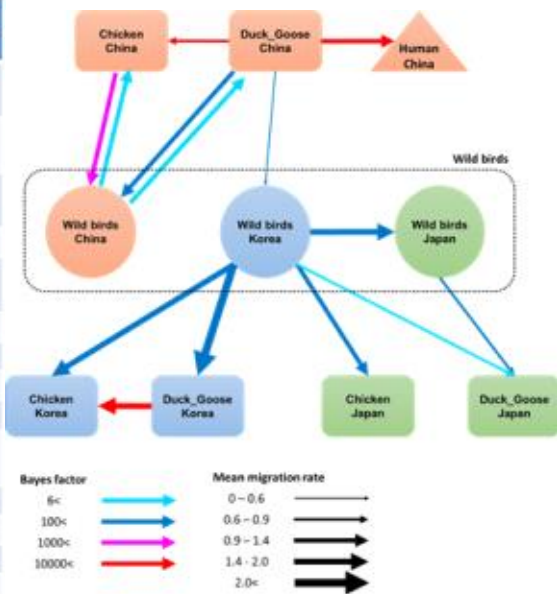
[그림. H5N6 HPAI 2016년 분리주의 phylogenetic tree 분석 결과]



[그림. H5N6 HPAI 2016년 분리주의 국내 유입 모식도]

- 2014년 발생 H5N8 및 2016년 발생 H5N6 바이러스에 대한 Bayesian 통계 분석 결과 축종 별 바이러스 전파 경로 분석 결과 중국을 경유하는 철새 및 국내 오리류가 바이러스 전파의 주원인일 가능성이 높은 것으로 파악됨.(본 연구는 국립환경과학원 용역과제를 통하여 도출됨)

From	To	Bayes factor	Posterior probability	Mean Migration rate
Duck_Goose/Korea	Chicken/Korea	223692.57	1.00	1.955
Duck_Goose/China	Chicken/China	223692.57	1.00	0.863
Duck_Goose/China	Human/China	223692.57	1.00	1.033
Chicken/China	Wild_birds/China	6037.68	1.00	1.068
Duck_Goose/China	Wild_birds/China	580.40	0.99	0.972
Wild_birds/Korea	Wild_birds/Japan	463.66	0.98	1.432
Wild_birds/Korea	Chicken/Japan	360.86	0.98	0.962
Wild_birds/Korea	Duck_Goose/Korea	339.62	0.98	2.492
Wild_birds/Korea	Chicken/Korea	319.24	0.97	1.569
Duck_Goose/China	Wild_birds/Korea	231.48	0.97	0.318
Wild_birds/Japan	Duck_Goose/Japan	158.04	0.95	0.684
Wild_birds/China	Duck_Goose/China	19.17	0.70	0.954
Wild_birds/Korea	Duck_Goose/Japan	16.67	0.67	0.666
Wild_birds/China	Chicken/China	7.10	0.46	0.995

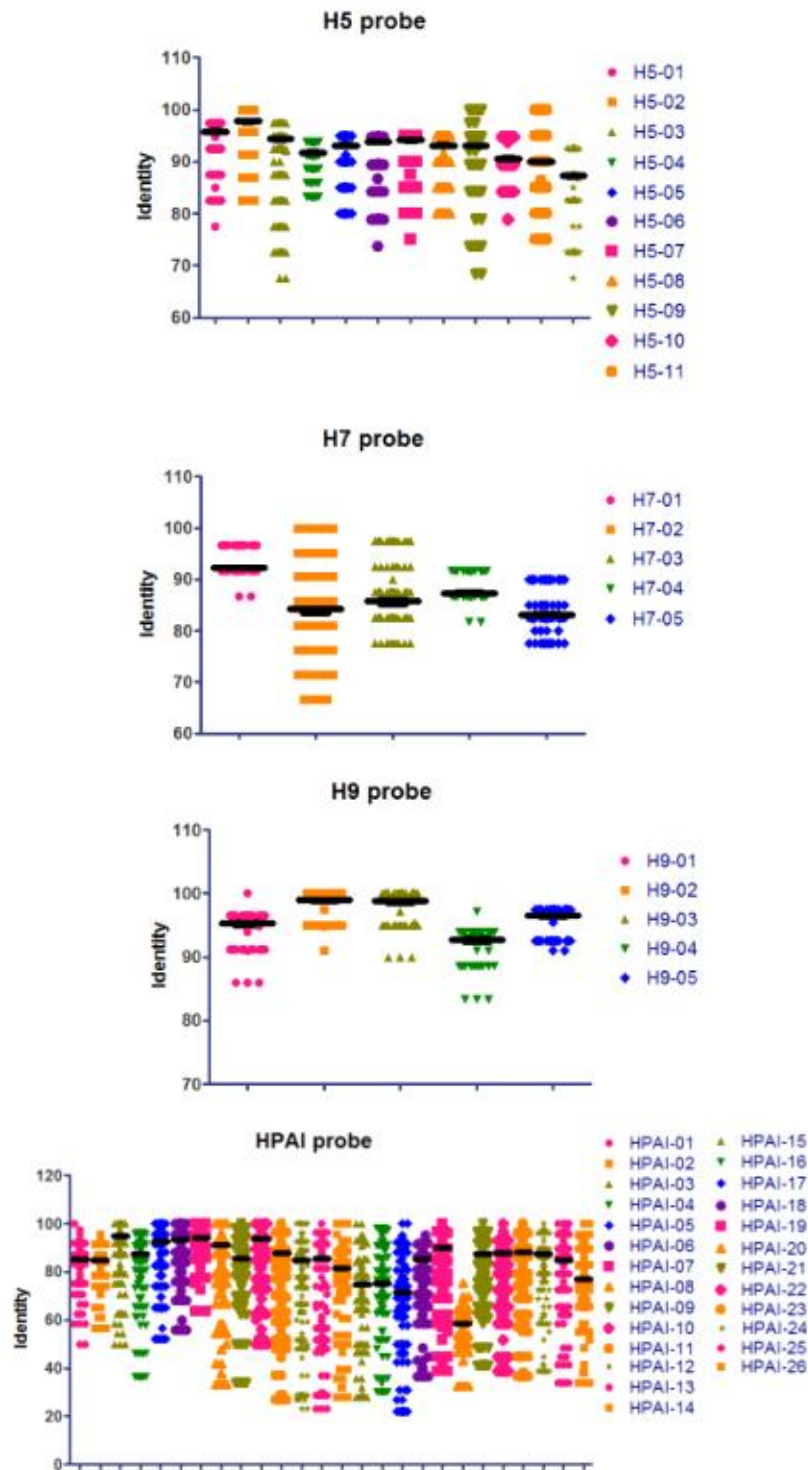


[H5N8 및 H5N6 바이러스의 Bayesian analysis 결과]

- 본 연구수행 결과를 통하여 현재 야생조류를 통하여 중국의 바이러스가 유입되고 있으며 특히 오리류로 인한 전파 가능성이 높은 것으로 확인됨. 연구결과를 기반으로 하여 향후 진단기기 개발 시 야생조류 및 오리에서의 검출력 평가가 중요할 것으로 사료됨.

4) 유입가능 바이러스 sequence 분석을 통한 유전자칩 probe 재구성

- 사전 연구과제를 통해 개발된 형광 probe이용 유전자칩의 육안 확인가능 유전자칩으로 재개발을 위한 probe 선별 작업을 진행함.
- 현재 유행 바이러스의 유전자 sequence 정보를 기반으로 기존 사용되던 probe의 identity를 확인함. H5 probe의 경우 총 1295개의 sequence와 비교하였으며, H7 probe의 경우 126개, H9 probe의 경우 77개, HPAI probe의 경우 1332개의 sequence와 비교함. 결과는 아래 그림 및 표와 같음.



[그림. 각 probe의 유입 가능 바이러스 sequence에 대한 identity 확인 그림]

[표. 기존 probe의 최신 유입 가능 바이러스에 대한 identity]

Index	Name	Sequence (5'-3')	평균 identity
1	H5-01	CARCTTAGGGATAATGCAAA	95.76441
2	H5-02	ATAAACTCTAGTATGCCATTCACA	97.76208
3	H5-03	TGAAACACCTATTGAGCRGA	94.32261
4	H5-04	AGTGTAGCKGGATGGCTHC	91.71103
5	H5-05	ACYCAAAAGGCAATAGAYGG	93.12745
6	H5-06	CARCTTARGGATAATGCAA	93.83814
7	H5-07	CARCTTARGGATAATGCAAA	94.16194
8	H5-08	ACYCAAAAGGCAATAGAYGG	93.12745
9	H5-09	GAAACACCTATTGAGCAGG	93.01528
10	H5-10	AGTGTAGCGGGATGGCTCC	90.56821
11	H5-11	ACTCAAAAGGCAATAGACGG	89.96245
12	H5-12	CYGCTTAAGGATAATGCARA	87.24715
13	H7-01	AATGCTGAAGAAGATGGVAC	92.21587
14	H7-02	CAATGTGACCAATTCCTAGAA	84.24
15	H7-03	GRAGAAGCTCTGAGGCAAAT	85.69444
16	H7-04	AAYGCYGAAGAAGATGGVAC	87.29524
17	H7-05	GRARAASCTCTGAGGCARAT	83.11508
18	H9-01	CDACTGTGCGCTCATCTCT	95.32208
19	H9-02	ATTTATTTCGACTGTGCGCTC	99.00519
20	H9-03	ACTGTGCGCTCATCTCTTGT	98.86494
21	H9-04	CDACYGTCGCTCATCTCT	92.76494
22	H9-05	ATTTATTTCGACYGTCGCTC	96.52597
23	HPAI-01	AGAAGAAAAAAGAGAGGACTTTT	85.32027
24	HPAI-02	GAAGAAAAAAGAGAGGGCTATTT	84.67402
25	HPAI-03	AGAAGAAGAAAAAGAGGACTATTT	94.70465
26	HPAI-04	GAAGAAGAAGAAAGAGAGGACTATTT	87.36164
27	HPAI-05	GAAGAAGAAAAAAGAGGACTGTTT	92.65541
28	HPAI-06	GAAGAAGAAAAAAGAGGACTGTTTGG	93.20293
29	HPAI-07	GAAGAAAAAAGAGGACTGTTTGGAGC	94.19452
30	HPAI-08	GAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGAC	91.15285
31	HPAI-09	AAGAAGAAAAAAGAGAGGAYTATTT	85.63821
32	HPAI-10	AGAAGAAGAAAAAAGAGGACTRTTT	93.73971
33	HPAI-11	CAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGA	87.67192
34	HPAI-12	CAAAGGGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGA	84.97072
35	HPAI-13	CTAAGAGAGAAGAGAAGAAAAAGAGGA	85.36329
36	HPAI-14	TAGAGGGAAGAAGAAGAAAAAGAGGACT	81.33288
37	HPAI-15	TAGAGAGAAGAAGAAGAAAAAGGGGACT	74.89317
38	HPAI-16	GAGAGAAAAGAAGAAAAAARAGAGGACT	75.17823
39	HPAI-17	GAGAGGGAAGAAGAAAAAAGAGAGGA	71.35871
40	HPAI-18	GRGRRARRAGAAGAAAAAGAGGAYTRTTT	85.00856
41	HPAI-19	GAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGACTGTTT	89.86479
42	HPAI-20	GAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGATTGTTT	58.39707
43	HPAI-21	GAGAGAAGAGAAGAAAAAGAGGACTATTT	87.30405
44	HPAI-22	GAGAAAAGAGAAGAAAAAGAGGACTGTTT	87.64767
45	HPAI-23	GAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGATTATTT	88.20616
46	HPAI-24	GGGAGAGAAGAAGAAAAAGAGGACTGTTT	87.39354
47	HPAI-25	AGGGAAGAAGAAGAAAAAGAGGACTATTT	84.87875
48	HPAI-26	AGAGAAGAAGAAGAAAAAGGGGACTGTTT	77.01179

- 본 분석결과는 향후 유전자칩의 platform이 완성됨에 따라 상위 probe를 선별에 이용 하고자 함.

2. 불활화 항원 제공

- HPAI 바이러스 4건 및 LPAI 바이러스 10건에 대한 바이러스 배양 및 불활화 항원 제작을 실시 하였으며 세부 내역은 아래 표와 같음.

[표. 건국대학교 불활화 항원 제작 목록]

번호	균주명	분리년도	Subtype	병원성	유래
1	K10-483	2010	H5N1	HPAI	야생조류 분변
2	VI142406	2014	H5N8	HPAI	야생조류 폐사체
3	N15-99	2015	H5N8	HPAI	야생조류 분변
4	K16-187-3	2016	H5N6	HPAI	야생조류 분변
5	k040110	2010	H9N2	LPAI	가금류
6	K09-652	2009	H5N2	LPAI	야생조류 분변
7	K10-310	2011	H5N2	LPAI	야생조류 분변
8	K15-109	2015	H1	LPAI	야생조류 분변
9	K15-142	2015	H3	LPAI	야생조류 분변
10	K16-602-5	2016	H6	LPAI	야생조류 분변
11	K12-207	2016	H7	LPAI	야생조류 분변
12	K16-168-5	2016	H7	LPAI	야생조류 분변
13	K16-115-3	2016	H9	LPAI	야생조류 분변
14	K15-39-4	2015	H9	LPAI	야생조류 분변

- 3건의 바이러스에 대하여 정제를 실시하여 항체 제작을 위한 정제 항원을 제작함. 세부 내역은 아래 표와 같음.

[표. 건국대학교 정제 항원 제작 목록]

번호	균주명	분리년도	Subtype	병원성	유래	농도
1	01310	2006	H9N2	HPAI	가금류	160ug/ml
2	k040110	2010	H9N2	HPAI	가금류	16ug/ml
3	N15-99	2015	H5N8	HPAI	야생조류 분변	120ug/ml

3. protein 항원 제공

- HA 단백질 4종을 Baculovirus vector system을 이용하여 발현 진행 하였으며 세부 내역은 아래와 같음.
- 발현된 HA 단백질은 Bradford 염색법을 이용하여 총 단백질 농도를 측정하였으며 결과는 아래 표와 같음.

[표. 건국대학교 발현 HA 단백질 목록]

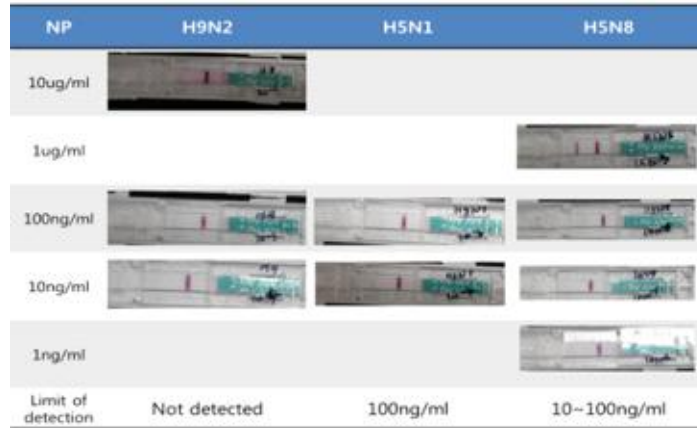
번호	균주명	Subtype	병원성	유래	농도
1	A/Vietnam/1194/2004	H5N1	HPAI	베트남	80ug/ml
2	A/Indonesia/5/2005	H5N1	HPAI	인도	50ug/ml
3	A/chicken/Korea/ES/2003	H5N1	HPAI	가금류	130ug/ml
4	A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010	H5N1	HPAI	야생조류 분변	180ug/ml

- NP 단백질의 경우 단백질 합성을 통하여 제작을 진행하였으며 세부 목록은 아래 표와 같음.

[표. 건국대학교 제작 NP 단백질 목록]

번호	균주명	Subtype	병원성	유래	농도
1	K10-483/2010	H5N1	HPAI	야생조류 분변	0.26mg/ml
2	K040110	H9N2	LPAI	가금류	0.35mg/ml
3	VI142406	H5N8	HPAI	야생조류 폐사체	1.22mg/ml

- 기존 키트 이용 확인 결과 H9N2 단백질의 경우 발현에 문제가 있는 것으로 확인되어 이외 2개 단백질을 분양 예정임.



<NP 단백질의 기존 키트 반응성 평가>

4. 유전자칩 개발 용 cDNA 제공 (20종 이상)

1) AIV RNA 추출 및 cDNA 제공

- 유전자칩 개발을 위한 총 11건의 cDNA를 제공 하였으며 세부 내역은 아래 표와 같음.

[표. 건국대학교 제공 AIV cDNA 목록]

번호	균주명	분리년도	Subtype	병원성	유래
1	K08-404	2008	H5N2	LPAI	야생조류 분변
2	K10-310	2010	H5N2	LPAI	야생조류 분변
3	K09-652	2009	H5N2	LPAI	야생조류 분변
4	K09-662	2009	H5N1	LPAI	야생조류 분변
5	5-11	2005	H7N8	LPAI	야생조류 분변
6	21-9	2008	H7N8	LPAI	야생조류 분변
7	5-77	2005	H7N8	LPAI	야생조류 분변
8	K11-220	2011	H9N2	LPAI	야생조류 분변
9	20-36	2007	H9N2	LPAI	야생조류 분변
10	K12-256	2012	H9N2	LPAI	야생조류 분변
11	8G39	2005	H9N2	LPAI	야생조류 분변

- 제공한 cDNA 염기서열을 분석하여 함께 제공함.

2) 임상시료 항원 패널 구축

- 향후 개발된 진단 기기의 효능 검증을 위하여 고병원성 감염 오리의 swab 시료 150건의 RNA 및 cDNA 패널을 구축하였으며 세부 항목은 아래 표와 같음.

- 구축된 cDNA 패널은 향후 유전자칩 시제품 개발 후 평가용 시료로 이용될 예정임.

번호	real-time PCR CTvalue	log (EID50/ml)	번호	real-time PCR CTvalue	log (EID50/ml)	번호	real-time PCR CTvalue	log (EID50/ml)
1	22.976	4.893	51	31.459	2.438	101	34.40	1.587
2	31.878	2.316	52	neg	neg	102	29.12	3.115
3	28.618	3.260	53	31.608	2.394	103	34.70	1.498
4	31.470	2.434	54	31.516	2.421	104	34.06	1.685
5	29.968	2.869	55	30.509	2.713	105	31.47	2.435
6	neg	neg	56	neg	neg	106	29.62	2.970
7	32.219	2.218	57	32.636	2.097	107	28.90	3.180
8	neg	neg	58	neg	neg	108	neg	neg
9	19.813	5.809	59	22.867	4.925	109	21.94	5.192
10	32.670	2.087	60	30.940	2.588	110	22.87	4.923
11	26.509	3.871	61	23.302	4.799	111	29.50	3.005
12	28.173	3.389	62	35.238	1.343	112	20.14	5.715
13	31.083	2.546	63	28.038	3.428	113	29.69	2.950
14	neg	neg	64	33.360	1.887	114	20.67	5.562
15	33.100	1.963	65	33.298	1.905	115	21.26	5.389
16	neg	neg	66	35.947	1.138	116	18.83	6.093
17	22.976	4.894	67	31.356	2.467	117	20.96	5.477
18	29.631	2.967	68	neg	neg	118	23.60	4.712
19	24.249	4.525	69	25.313	4.217	119	26.89	3.759
20	31.111	2.538	70	31.756	2.352	120	29.92	2.884
21	34.004	1.701	71	32.907	2.018	121	25.01	4.304
22	33.294	1.906	72	34.510	1.554	122	29.51	3.003
23	37.332	0.737	73	35.230	1.346	123	31.68	2.372
24	neg	neg	74	neg	neg	124	27.73	3.517
25	27.617	3.550	75	31.701	2.368	125	21.89	5.209
26	29.126	3.113	76	32.928	2.012	126	22.59	5.006
27	25.251	4.235	77	25.004	4.306	127	27.79	3.500
28	28.711	3.233	78	27.932	3.459	128	31.22	2.506
29	21.957	5.188	79	21.482	5.326	129	32.81	2.047
30	31.053	2.555	80	27.711	3.523	130	32.39	2.169
31	24.109	4.565	81	33.861	1.742	131	31.92	2.303
32	28.919	3.173	82	33.994	1.704	132	38.09	0.518
33	23.955	4.610	83	31.257	2.496	133	38.30	0.457
34	32.659	2.090	84	34.079	1.679	134	neg	neg
35	26.635	3.834	85	24.641	4.412	135	36.44	0.997
36	27.859	3.480	86	34.337	1.605	136	neg	neg
37	31.362	2.466	87	26.009	4.015	137	32.94	2.008
38	34.007	1.700	88	31.324	2.477	138	neg	neg
39	33.611	1.814	89	18.51	6.187	139	19.88	5.790
40	37.718	0.626	90	21.54	5.310	140	28.75	3.221
41	17.942	6.351	91	31.12	2.537	141	neg	neg
42	31.095	2.543	92	17.83	6.382	142	neg	neg
43	25.593	4.136	93	29.43	3.026	143	neg	neg
44	32.580	2.113	94	24.93	4.329	144	neg	neg
45	29.221	3.086	95	19.52	5.895	145	neg	neg
46	neg	neg	96	22.69	4.975	146	neg	neg
47	31.178	2.519	97	17.60	6.448	147	35.64	1.228
48	neg	neg	98	29.09	3.123	148	32.73	2.070
49	33.904	1.730	99	34.90	1.442	149	20.62	5.575
50	34.382	1.591	100	31.86	2.320	150	30.59	2.688

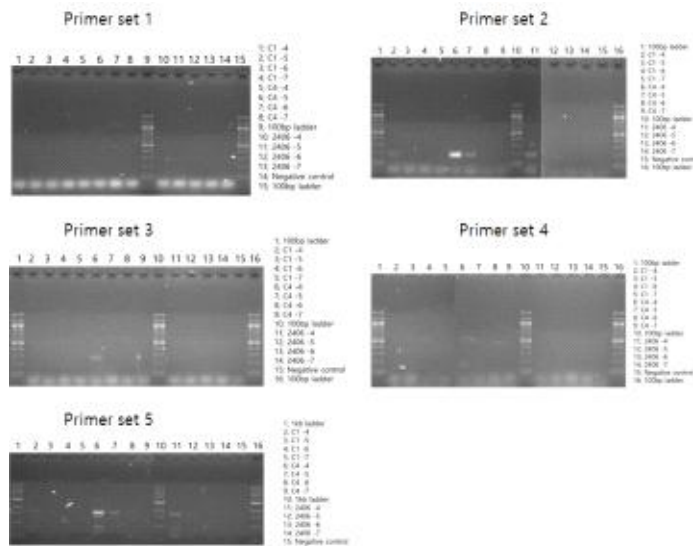
3) H5 PCR 조건 최적화

- 유전자칩의 경우 PCR 효율에 따라 진단 효율이 달라지므로 PCR 효율 최적화를 위한 H5 검출용 PCR primer set를 비교함.

- 2014년 발생 H5N8 1종, 2016년 발생 H5N6 바이러스 2종에 대하여 각 희석배수별 기준 HA 총 5종의 primer set의 PCR 효율을 비교함. 사용된 Primer의 list는 아래 표와 같음.

numb.	Primer	Sequence	Product size	reference
1	5H-F	5'-GGA ATA TGG TAA CTG CAA CAC CA-3' (23mer)	700bp	L. Shi et al., Acta virologica, 2014
	5H-R	5'-AAC TGA GTG TTC ATT TTG TCA ATG-3' (24mer)		
2	H5_234_C S_F	5'-AAC ACC AAG TGT CAA ACT CC-3' (20mer)	200bp	MJ Slomka et al., Avian Pathol, 2012
	H5_234_C S_R	5'-CCC TGC TAT AGC TCC AAA TA-3' (20mer)		
3	H5-918F	5'-CCA RTR GGK GCK ATA AAY TC-3' (20mer)	249bp	K. Tsukamoto et al., J Clin Microbiol, 2008
	H5-1166R	5'-KGT CTG CWG CRT AYC CRC TY-3' (20mer)		
4	HA-1057-1-F	5'-GGR GAA TGC CCC AAA TAY GT-3' (20mer)	170bp	A. Gall et al., J Clin Microbiol, 2008
	HA-1232-1-R	5'-TTG CTA TGV TGR TAW CCA TAC CA-3' (23mer)		
5	N-HA-1	5'-AGC AAA AGC AGG GG-3' (14mer)	1778bp	E. Hoffman et al., Arch Virol, 2001
	N-NS-890R	5'-AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT-3' (20mer)		

- 5번 Primer set는 기존 인플루엔자 바이러스 유전자 분석용으로 널리 사용되고 있는 primer set이며 이전 과제에서 유전자칩 분석을 위한 primer로 사용됨.
- 총 5개의 primer set의 PCR 효율 비교 결과는 아래 그림 및 표와 같으며 MJ Slomka에 의해 보고된 2번 primer set의 경우 기존에 사용하던 5번 primer set와 비슷한 증폭 효율을 나타낸 것으로 확인됨.



[그림. 각 primer set의 바이러스 희석배수 별 PCR 효율 비교 분석 결과]

[표. 각 primer set의 바이러스 희석배수 별 PCR 효율 비교 분석 결과 정리]

Virus	Dilution	Primer set				
		1	2	3	4	Control
C1 (H5N6)	-4		√			√
	-5					√
	-6					
	-7					
C4 (H5N6)	-4		√	√	√	√
	-5		√			√
	-6		√			√
	-7					
2406 (H5N8)	-4		√		√	√
	-5		√			√
	-6					
	-7					

- 본 연구에서는 기존 primer 보다 고병원성 바이러스에 대해 효율이 높은 primer set를 선별하지 못하여 향후 One-step RT-PCR 및 자체 Primer 제작 등 다각도로 PCR 효율 상승 연구를 진행할 예정이다.

5. 개발 단계에서의 실험실 내 효능평가

- 현 바이오노트 키트의 최근 H5N6 바이러스에 대한 최소검출한계농도 평가 결과 $10^{3.5}EID_{50}/ml$ 까지 detection이 가능한 것으로 확인됨.



[그림. 고병원성 H5N6 바이러스의 희석배수 별 kit 검사 결과]

- 기존 연구결과 폐사체에서 약 $10^5 EID_{50}/ml$ 의 바이러스가 배출되는 것으로 알려져 있어 본 키트는 폐사체 검사 시 바이러스를 검출 가능한 것으로 확인됨.
- 하지만 폐사하지 않고 바이러스를 퍼트릴 것으로 예상되는 오리류 및 야생조류의 경우 검출 시 위음성이 나올 수 있어 추가적인 민감도 향상이 필요할 것으로 판단됨.
- 이외 다수의 임상시료를 적용하여 기존 키트의 검출 민감도를 측정하였으며 결과는 아래와 같음.

[표. 임상시료 적용 기존 키트 민감도 측정 결과]

sample	시료 정보				Bionote RapidKit ^C	
	구분		virus	CT value ^A		EID 환산 값 ^B
1-10 O 2d	swab	Oro	H5N6	21.333	5.369	3
1-6 O 2d	swab	Oro	H5N6	25.170	4.258	1
1-21 O 2d	swab	Oro	H5N6	26.974	3.736	0.5
1-21 V 2d	swab	Vent	H5N6	30.626	2.679	0
1-14 O 2d	swab	Oro	H5N6	24.191	4.542	2
1-9 O 2d	swab	Oro	H5N6	21.938	5.194	3
1-9 V 2d	swab	Vent	H5N6	31.228	2.505	0
1-13 O 2d	swab	Oro	H5N6	27.712	3.522	0
1-13 V 2d	swab	Vent	H5N6	32.906	2.019	0
1-7 O 2d	swab	Oro	H5N6	22.589	5.005	2
1-10 O 4d	swab	Oro	H5N6	26.573	3.852	2
1-10 V 4d	swab	Vent	H5N6	neg	neg	0
1-6 O 4d	swab	Oro	H5N6	25.263	4.231	3
1-6 V 4d	swab	Vent	H5N6	29.408	3.031	0.5
1-21 O 4d	swab	Oro	H5N6	28.580	3.271	0
1-21 V 4d	swab	Vent	H5N6	31.617	2.392	2
1-14 O 4d	swab	Oro	H5N6	26.594	3.846	1
1-14 V 4d	swab	Vent	H5N6	28.381	3.329	1
1-9 O 4d	swab	Oro	H5N6	26.418	3.897	3
1-9 V 4d	swab	Vent	H5N6	23.480	4.747	0
1-13 O 4d	swab	Oro	H5N6	25.940	4.035	2
1-13 V 4d	swab	Vent	H5N6	29.466	3.014	1
1-7 O 4d	swab	Oro	H5N6	28.215	3.377	2
1-7 V 4d	swab	Vent	H5N6	33.581	1.823	0
1-7 V 2d	swab	Vent	H5N6	34.292	1.618	0
1-17 V 2d	swab	Vent	H5N6	33.415	1.871	0
1-17 O	swab	Oro	H5N6	30.970	2.579	0
1-17 V	swab	Vent	H5N6	33.865	1.741	0
1-12 O	swab	Oro	H5N6	31.054	2.555	0
1-12 V	swab	Vent	H5N6	33.944	1.718	0
1-15 O	swab	Oro	H5N6	33.850	1.745	0
1-15 V	swab	Vent	H5N6	neg	neg	0
1-16 O	swab	Oro	H5N6	26.078	3.995	1
1-16 V	swab	Oro	H5N6	neg	neg	0
1-10O	swab	Oro	H5N6	34.685	1.504	0
1-10V	swab	Vent	H5N6	neg	neg	0
1-6 O	swab	Oro	H5N6	32.871	2.029	0
1-6 V	swab	Vent	H5N6	31.397	2.456	0
1-21 O	swab	Oro	H5N6	31.324	2.477	0
1-21 V	swab	Vent	H5N6	31.403	2.454	0
1-13 O	swab	Oro	H5N6	32.124	2.245	0
1-7 O	swab	Oro	H5N6	33.932	1.722	0

^A M gene real-time PCR 결과

^B 단위: log(EID₅₀/ml)

^C 육안확인결과 값 (3: 신호 매우 강함, 2: 신호 강함, 1: 신호 약함, 0.5: 신호 매우 약함, 0: 신호 없음)

<표. 임상시료 이용 Bionote NP 단백질 검출 키트 검사 결과>

- 검사결과 Bionote NP 키트의 경우 임상시료에 대하여 약 10³EID₅₀/ml 이상 농도의 시료를 검출 가능한 것으로 확인됨.

[2차 년도]

1. 시제품 효능 평가

- 주관 및 제1협동에서 개발된 rapid-kit 및 유전자칩의 시제품에 대한 효능평가를 실시함.
- 효능 평가는 바이러스 표준시료 및 protein 시료를 이용하여 기존 기술 및 종란접종법 대비 성능을 확인함.
- 표준 바이러스를 PBS에 10진 희석하여 키트 검출능 확인 후 키트의 최소검출 한계 농도 (EID₅₀/ml)를 확인함.
- 표준 바이러스를 분변을 섞은 PBS에 10진 희석하여 키트 검출능 확인 후 분변 조건에서의 키트의 최소검출 한계 농도 (EID₅₀/ml)를 확인함.
- 유전자 칩을 이용한 키트 효능 평가의 경우 해당 바이러스의 RNA 및 Sequence 제공

① Rapid Kit

A. AIV Ag Test Kit



[그림. 바이오노트 사의 AIV Ag Test Kit]

[표. AIV 바이러스 배양액 11종 이용 최소검출한계농도 확인시험 결과]

No.	subtype	균주명	원액 농도 (log(EID ₅₀ /ml))	최소검출 한계농도 ^A (log(EID ₅₀ /ml))	비고
				Bionote	
1	H1N1	pH1N1	7.0	3.0	
2	H5N2 LPAI	K15-207	7.0	2.5	
3	H5N2 LPAI	K14-246	7.5	3.0	
4	H5N2 LPAI	K09-652	7.5	3.0	
5	H5N8 HPAI	2406	8.0	4.0	
6	H5N6 HPAI	K16-187-3	8.5	4.0	
7	H7N8	K16-917-5	8.0	4.0	
8	H7N8	K16-831-4	8.0	4.0	
9	H7N8	K17-903-1	8.0	4.0	
10	H9N2	K15-39-4	7.5	4.0	
11	H9N2	K040110	8.5	4.0	



[그림. 농축바이러스를 이용하여 바이러스 검출 한계 농도(mg/ml) 확인시험]

- 시험 결과 0.6 μ g/ml의 바이러스 100 μ l 사용한 농도까지 검출 가능함 (60ng)

B. NDV Ag Test Kit



[그림. 바이오노트 사의 NDV Ag Test Kit]

[표 . NDV 바이러스 배양액 4종을 이용 최소검출 한계농도 확인시험 결과]

No.	균주명	원액 농도 (log(EID ₅₀ /ml))	최소검출 한계농도 (log(EID ₅₀ /ml))		비고
			Bionote		
1	LaSota	9.5	6		
2	B1	9.5	6		
3	Kr005	9.0	6		
4	K148	9.5	6		



[그림. NDV 바이러스 배양액 4종을 이용한 최소검출 한계농도 확인시험]

- 최소검출한계농도 확인 결과 여러 바이러스에 대하여 6 log(EID₅₀/mL)로 확인되었음

C. AIV/NDV/IBV Ag Test Kit



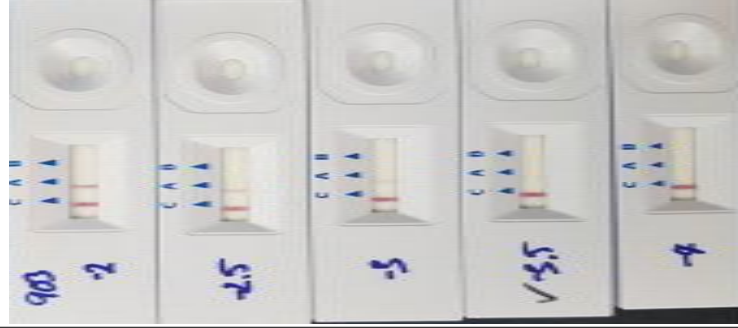




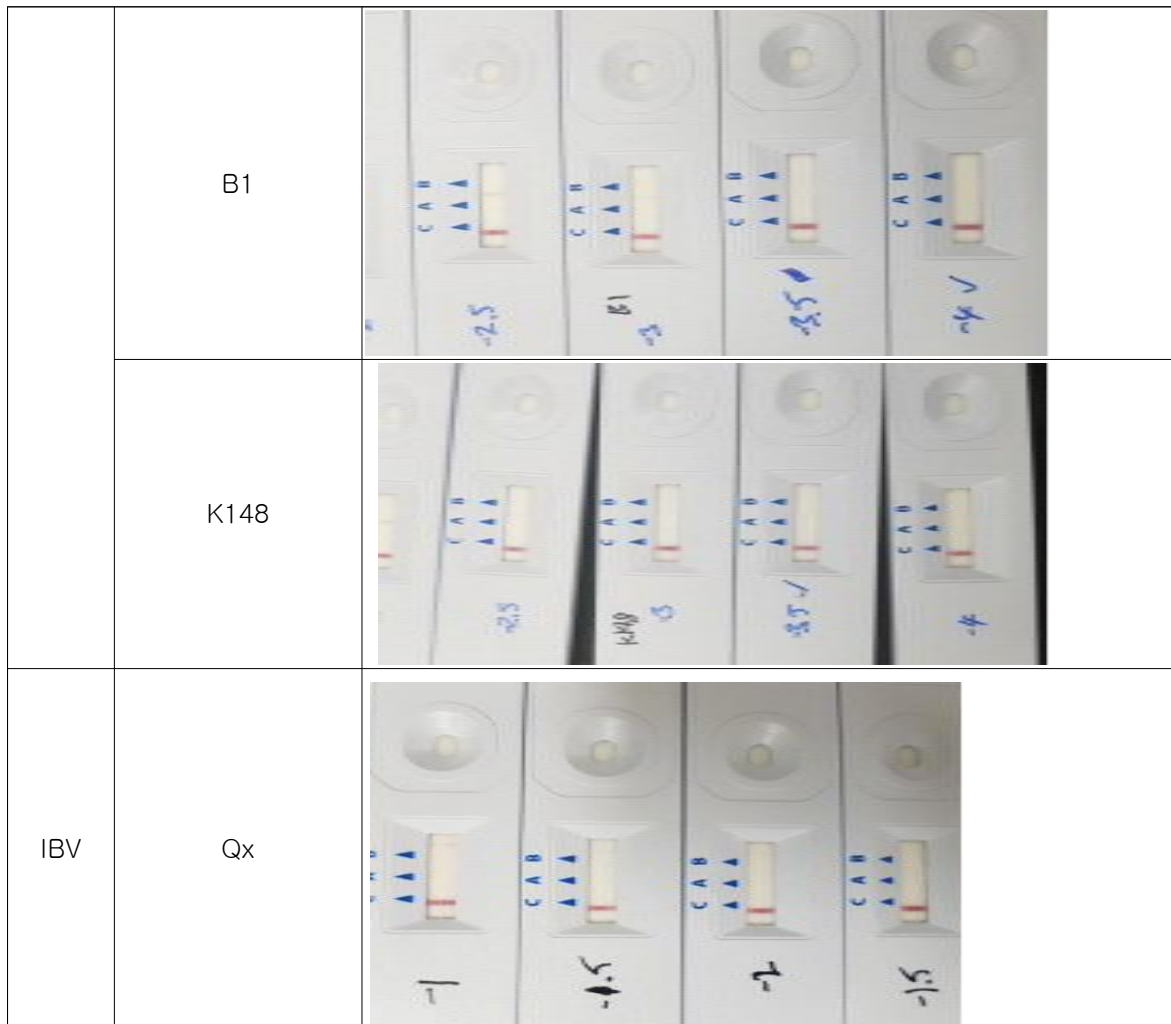
[그림. 바이오노트 사의 AIV/NDV/IBV Ag test Kit]

[표. AIV/NDV/IBV Ag test Kit를 이용한 최소검출 한계농도 확인시험]

바이러스	균주명	원액 농도 (log(EID ₅₀ /ml))	최소검출 한계농도 (log(EID ₅₀ /ml))	비고
			Bionote	
AIV	K09-652(H5N2)	7.5	4	
	K14-246(H5N2)	7.5	3.5	
	K17-903(H7N8)	8	4.5	
NDV	LaSota	9.5	6.0	
	Kr005	9.5	6.0	
	B1	9.0	5.0	
	K148	9.5	6.0	
IBV	Qx	8.0	6.0	

[표. AIV/NDV/IBV Ag test Kit를 이용한 최소검출 한계농도 확인시험 사진]

바이러스	균주명	비고
	K09-652(H5N2)	
AIV	K14-246(H5N2)	
	K17-903(H7N8)	
NDV	LaSota	
	Kr005	



-AIV/NDV/IBV의 최소검출 한계농도 실험결과 AIV: 3.5~4.5log (EID50/ml), IBV: 6 log(EID50/ml) NDV:5.0~6.0 (EID50/ml)로 측정되었음

② 유전자 칩

유전자 칩 제작 및 평가를 위한 AIV sequence 및 RNA 제공

- 유전자 칩 개발 및 평가를 위한 AIV Sequence와 RNA를 제공하였으며 세부내역은 아래와 같음

[표. AIV Sequence]

번호	균주명	분리년도	Subtype	병원성	유래
1	K09-652	2009	H5N2	LPAI	야생조류 분변
2	K12-94	2010	H7N1	LPAI	야생조류 분변
3	K040110	2010	H9N2	LPAI	토종닭
4	K10-483	2010	H5N8	HPAI	야생조류 분변
5	K14-363	2014	H5N8	HPAI	야생조류 분변
6	KU3-2	2015	H5N8	HPAI	야생조류 분변
7	K16-187-3	2016	H5N6	HPAI	야생조류 분변
8	K17-1817	2017	H5N6	HPAI	야생조류 분변
9	2406	2014	H5N8	HPAI	야생조류 분변
10	K17-1888	2017	H5N6	HPAI	야생조류 분변

11	KU-12	2015	H5N8	HPAI	야생조류 분변
12	N15-99	2015	H5N8	HPAI	야생조류 분변
13	K14-366-1	2014	H5N8	HPAI	야생조류 분변
14	K14-367-1	2014	H5N8	HPAI	야생조류 분변
15	K14-369-3	2014	H5N8	HPAI	야생조류 분변
16	K14-371-4	2014	H5N8	HPAI	야생조류 분변
17	K17-1893	2017	H5N6	HPAI	야생조류 분변
18	K18-3	2018	H5N6	HPAI	야생조류 분변

[표 . 제공 AIV RNA]

번호	균주명	분리년도	Subtype	병원성	유래
1	K09-652	2009	H5N2	LPAI	야생조류 분변
2	K12-94	2010	H7N1	LPAI	야생조류 분변
3	K040110	2010	H9N2	LPAI	토종닭
4	K10-483	2010	H5N8	HPAI	야생조류 분변
5	K14-363	2014	H5N8	HPAI	야생조류 분변
6	KU3-2	2015	H5N8	HPAI	야생조류 분변
7	K16-187-3	2016	H5N6	HPAI	야생조류 분변
8	K17-1817	2017	H5N6	HPAI	야생조류 분변
9	2406	2014	H5N8	HPAI	야생조류 분변
10	K17-1888	2017	H5N6	LPAI	야생조류 분변

2) 임상시료 적용

- 건국대학교 보유 swab 시료 및 분변시료 약 100건 이상 (양성 50건, 음성 50건)을 이용하여 키트의 민감도 및 특이도를 확인함.
- 임상시료의 바이러스 양을 real-time PCR을 통하여 정량 측정하여 최소검출한계농도를 측정함.
- SPF 닭을 이용하여 H9N2 바이러스 접종 후 2일 간격으로 swab시료에서 검출여부를 확인하여 kit의 detection 가능 시기를 측정함.

[표. 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 감염 닭 임상 시료 50건 시험 결과 (구강 및 분변)]

번호	시료 번호 ^A	시료 종류	Real-time PCR CT value ^B	log(EID ₅₀ /ml) 환산값 ^C	Bionote 키트 검사결과	비고
1	1-O 3d	구강	22.77	4.88	+++	
2	2-O 3d	구강	21.84	5.17	+++	
3	3-O 3d	구강	22.65	4.91	+++	
4	4-O 3d	구강	21.88	5.15	+++	
5	5-O 3d	구강	24.82	4.24	+++	
6	6-O 3d	구강	21.91	5.14	+++	
7	7-O 3d	구강	20.86	5.47	+++	

8	8-O 3d	구강	21.99	5.12	+++	
9	9-O 3d	구강	26.27	3.79	++	
10	10-O 3d	구강	20.09	5.71	+++	
11	11-O 3d	구강	21.64	5.23	++	
12	12-O 3d	구강	22.56	4.94	+++	
13	13-O 3d	구강	24.79	4.25	++	
14	1-V 3d	분변	17.64	6.47	+++	
15	2-V 3d	분변	34.27	1.30	(-)	
16	4-V 3d	분변	32.93	1.71	(-)	
17	5-V 3d	분변	31.88	2.04	(-)	
18	6-V 3d	분변	20.93	5.45	++	
19	7-V 3d	분변	18.63	6.16	+++	
20	8-V 3d	분변	21.99	5.12	++	
21	9-V 3d	분변	negative	0.00	(-)	
22	10-V 3d	분변	31.83	2.06	(-)	
23	11-V 3d	분변	38.06	0.12	(-)	
24	12-V 3d	분변	negative	0.00	(-)	
25	13-V 3d	분변	negative	0.00	(-)	
26	1-O 5d	구강	22.53	4.95	+++	
27	2-O 5d	구강	20.89	5.46	++	
28	3-O 5d	구강	22.57	4.94	+	
29	4-O 5d	구강	22.81	4.86	++	
30	6-O 5d	구강	25.59	4.00	+	
31	7-O 5d	구강	22.65	4.91	+++	
32	8-O 5d	구강	23.36	4.69	+++	
33	9-O 5d	구강	21.64	5.23	+++	

34	10-O 5d	구강	22.23	5.04	++	
35	11-O 5d	구강	23.55	4.63	+	
36	12-O 5d	구강	21.28	5.34	+++	
37	13-O 5d	구강	23.52	4.64	++	
38	1-V 5d	분변	18.63	6.16	+++	
39	2-V 5d	분변	15.41	7.17	+++	
40	3-V 5d	분변	32.56	1.83	(-)	
41	4-V 5d	분변	17.29	6.58	+++	
42	5-V 5d	분변	24.73	4.27	+	
43	6-V 5d	분변	26.19	3.81	(-)	
44	7-V 5d	분변	17.72	6.45	+++	
45	8-V 5d	분변	19.33	5.95	++	
46	9-V 5d	분변	22.22	5.05	++	
47	10-V 5d	분변	23.96	4.51	++	
48	11-V 5d	분변	18.27	6.28	+++	
49	12-V 5d	분변	16.96	6.68	+++	
50	13-V 5d	분변	14.35	7.50	+++	

^A 시료 고유번호

^B M gene target real-time PCR 결과 CT value

^C CT value를 standard curve를 이용하여 EID₅₀/mL역가로 환산값

^D Rapid kit 검사 결과 판정 기준: +++=Control signal과 유사하거나 강한 수준의 신호; ++= Control signal 보다는 약하나 분명히 양성 신호가 확인되는 경우; +=희미하게 양성 신호가 보이는 경우; (-)= 양성 신호 없음.

- 2010년 재래시장 토종닭 유래 저병원성 H9N2 (A/Korean native chicken/Korea/K040110/2010) 바이러스를 6주령 SPF 닭 13 수에 공격 접종 후 3일 및 5일 후 구강 및 분변 시료를 채취함.
- 25건의 분변 시료 중 4건에서는 real-time PCR 검사 결과 음성으로 확인됨 (CT value 36 이상)
- 음성시료(50건)는 키트 검사결과에서 모두 음성으로 확인됨.
- 46건의 양성 시료 중 40건에서 양성반응이 확인됨 (86.96%)
- 구강 시료의 경우 25건의 양성시료 중 25건 모두 (100%)의 시료를 양성으로 판정함
- 분변 시료의 경우 21건의 양성시료 중 15건 (71.43%)의 시료를 양성으로 판정함.
- 3d와 5d의 결과 비교 시 5d 째의 swab이 Kit를 사용하여 검출하기 용이함.

3) BL3 실험실 내 고병원성 조류인플루엔자 실험 진행

- HPAI 표준 바이러스를 이용하여 바이러스의 최소검출 한계농도를 측정함.

- 건국대학교 BL3 실험실 보유 HPAI 임상시료 (swab, 분변)를 이용하여 민감도 및 특이도를 측정함.
- BL3 실험실 내에서 SPF 닭을 HPAI 감염시킨 후 2일 간격으로 swab시료에서 검출여부를 확인하여 kit의 detection 가능 시기를 측정함.

[표. 고병원성 H5N8 감염 닭 임상 시료 50건 시험 결과 (구강 및 분변)]

번호	시료 번호 ^A	시료 종류	Real-time PCR CT value ^B	log(EID ₅₀ /ml) 환산값 ^C	Bionote 키트 검사결과	비고
1	1-10 O	구강	21.83	5.76	+++	
2	9-8O	구강	22.11	5.68	+++	
3	9-1 O	구강	22.50	5.56	+++	
4	9-9 O	구강	22.71	5.49	+++	
5	9-5 O	구강	22.96	5.42	+	
6	1-9 O	구강	23.15	5.36	++	
7	9-10 O	구강	23.54	5.24	+	
8	1-5 O	구강	23.78	5.17	+++	
9	9-6 O	구강	24.34	5.00	+++	
10	1-7 O	구강	24.45	4.97	++	
11	9-4 O	구강	24.90	4.83	++	
12	9-2 O	구강	27.31	4.11	+	
13	1-4 O	구강	27.39	4.08	++	
14	9-7 O	구강	27.71	3.99	+	
15	1-3 O	구강	28.97	3.61	(-)	
16	1-8 O	구강	29.60	3.42	(-)	
17	1-12 O	구강	29.96	3.31	(-)	
18	9-3 O	구강	34.40	1.97	(-)	
19	1-11 O	구강	36.24	negative	(-)	
20	2-7 O	구강	36.94	negative	(-)	
21	2-5 O	구강	38.23	negative	(-)	
22	2-3O	구강	negative	negative	(-)	
23	2-4 O	구강	negative	negative	(-)	
24	2-6 O	구강	negative	negative	(-)	

25	2-8 O	구강	negative	negative	(-)	
26	3-4 V	분변	20.51	6.16	+++	
27	1-11V	분변	23.89	5.14	++	
28	1-7 V	분변	25.60	4.62	++	
29	3-1 V	분변	25.66	4.60	+++	
30	1-9 V	분변	26.11	4.47	(-)	
31	3-2 V	분변	26.23	4.43	++	
32	1-5 V	분변	26.41	4.38	++	
33	1-10 V	분변	26.52	4.35	+	
34	3-6 V	분변	27.28	4.11	+	
35	9-5 V	분변	27.32	4.10	+	
36	3-7 V	분변	27.32	4.10	+	
37	3-8 V	분변	27.77	3.97	+	
38	9-1 V	분변	28.15	3.85	+	
39	3-5 V	분변	29.80	3.35	+	
40	9-6V	분변	29.81	3.35	+	
41	1-4 V	분변	31.37	2.88	(-)	
42	9-7V	분변	31.88	2.73	(-)	
43	1-3 V	분변	32.50	2.54	(-)	
44	9-4 V	분변	34.20	2.03	(-)	
45	9-2 V	분변	34.96	1.80	(-)	
46	3-10 V	분변	36.06	negative	(-)	
47	9-3 V	분변	37.46	negative	(-)	
48	1-8 V	분변	38.13	negative	(-)	
49	3-3 V	분변	38.51	negative	(-)	
50	1-12 V	분변	39.04	negative	(-)	

^A 시료 고유번호

^B M gene target real-time PCR 결과 CT value

^C CT value를 standard curve를 이용하여 EID₅₀/mL역가로 환산값

^D Rapid kit 검사 결과 판정 기준: +++=Control signal과 유사하거나 강한 수준의 신호; ++= Control signal 보다는 약하나 분명히 양성 신호가 확인되는 경우; +=희미하게 양성 신호가 보이는 경우; (-)= 양성 신호 없음.

- 2014년 야생조류 유래 고병원성 H5N8 바이러스 (A/Baikal teal/Korea/2406/2014)를 6주령 SPF

- 닭 13수에 공격접종 5일 후 구강 (25건) 시료를 채취함.
- 25건의 구강시료 중 7건, 25건의 분변 시료 중 5건에서는 real-time 검사 결과 음성으로 확인됨 (CT value 36 이상)
 - 음성 시료(50건)는 키트 검사결과에서 모두 음성으로 확인됨
 - 38건 양성 시료 중 28건에서 양성 반응이 확인됨 (73.68%)
 - 구강시료의 경우 18건의 양성시료 중 14건 (77.78%)이 양성으로 판정함
 - 분변시료의 경우 20건의 양성시료 중 13건 (65%)을 양성으로 판정함

[표. 고병원성 H5N6 감염 오리 임상 시료 50건 시험 결과 (구강 및 분변)]

번호	시료 번호 ^A	시료 종류	Real-time PCR CT value ^B	log(EID ₅₀ /ml) 환산값 ^C	Bionote 키트 검사결과	비고
1	2-25 O	구강	26.27	3.44	+++	
2	2-2 O	구강	26.41	3.40	+++	
3	1-9 O	구강	27.55	3.07	+++	
4	1-7 O	구강	28.17	2.89	++	
5	1-10 O	구강	28.64	2.75	++	
6	1-9 O	구강	28.71	2.73	++	
7	2-11 O	구강	28.88	2.68	++	
8	1-6 O	구강	29.35	2.55	+++	
9	2-25 O	구강	29.43	2.52	++	
10	1-14 O	구강	29.54	2.49	+	
11	2-1 O	구강	29.82	2.41	+	
12	1-13 O	구강	29.84	2.41	++	
13	2-2 O	구강	29.89	2.39	+	
14	1-16 O	구강	30.07	2.34	+	
15	2-11 O	구강	30.11	2.33	+	
16	2-19 O	구강	30.26	2.29	+	
17	2-8 O	구강	30.36	2.26	+	
18	1-7 O	구강	30.64	2.18	+++	
19	2-5 O	구강	30.71	2.15	+	
20	2-5 O	구강	30.83	2.12	+	
21	1-10 O	구강	31.08	2.05	+++	
22	1-6 O	구강	31.14	2.03	+	
23	1-21 O	구강	31.27	1.99	++	
24	1-14 O	구강	31.30	1.98	+	
25	1-13 O	구강	31.34	1.97	(-)	
26	1-12 O	구강	33.49	1.35	(-)	
27	1-21 O	구강	33.49	1.35	(-)	
28	2-1 O	구강	33.56	1.33	(-)	
29	1-20 O	구강	35.22	0.85	(-)	
30	1-17 O	구강	35.68	0.72	(-)	
31	2-27 O	구강	38.20	negative	(-)	
32	1-9 V	분변	25.59	3.64	+	
33	1-14 V	분변	30.91	2.10	+	
34	1-13 V	분변	30.97	2.08	+	
35	2-8 V	분변	31.21	2.01	+	
36	1-6 V	분변	31.96	1.79	+	
37	2-5 V	분변	32.94	1.51	(-)	
38	2-2 V	분변	33.84	1.25	(-)	
39	1-21 V	분변	34.21	1.14	(-)	
40	1-21 V	분변	34.63	1.02	(-)	
41	1-9 V	분변	35.62	0.73	(-)	
42	2-11 V	분변	36.79	negative	(-)	

43	2-8 V	분변	38.42	negative	(-)	
44	2-25 V	분변	39.37	negative	(-)	
45	1-13 V	분변	negative	negative	(-)	
46	1-10 V	분변	negative	negative	(-)	
47	1-15 V	분변	negative	negative	(-)	
48	1-7 V	분변	negative	negative	(-)	
49	2-1V	분변	negative	negative	(-)	
50	2-19 V	분변	negative	negative	(-)	

A 시료 고유번호
 B M gene target real-time PCR 결과 CT value
 C CT value를 standard curve를 이용하여 EID₅₀/mL 역가로 환산값
 D Rapid kit 검사 결과 판정 기준: +++=Control signal과 유사하거나 강한 수준의 신호; ++= Control signal 보다는 약하나 분명히 양성 신호가 확인되는 경우; +=희미하게 양성 신호가 보이는 경우; (-)= 양성 신호 없음.

- 2016년 야생조류 유래 고병원성 H5N6 바이러스 (A/Mandarin_Duck/Korea/K16-187-3/2016)를 2주령 오리에 공격접종 후 2일 및 4일 후 구강 (31건) 및 분변 (19건) 시료를 채취함.
- 31건의 구강 시료 중 1건, 19건의 분변 시료 중 9건에서는 real-time PCR 검사 결과 음성으로 확인됨 (CT value 36 이상)
- 음성시료는 키트 검사결과에서 모두 음성으로 확인됨.
- 40건 양성 시료 중 29건에서 양성 반응이 확인됨 (72.5%).
- 구강시료의 경우 30건의 양성시료 중 24건 (80%)의 시료를 양성으로 판정함.
- 분변시료의 경우 10건의 양성시료 중 5건 (50%)의 시료를 양성으로 판정함.

※ 민감도 및 특이도 확인 결과

닭 임상시험

임상 시료 (rRT-PCR 검사 결과)	AIV Ag detection kit		계
	양성	음성	
양성	68 28(고병원성) 40 (저병원성)	16 10 (고병원성) 6 (저병원성)	68/84 (81%) 28/38 (73.68%) 40/46 (86.95%)
음성	0	66	64 (100%)
계	68	82	150

오리 임상시험

임상 시료 (rRT-PCR 검사 결과)	AIV Ag detection kit		계
	양성	음성	
양성	29	11	29/40 (72.5%)
음성	0	60	60/60 (100%)
계	29	71	100

-임상 시험 결과 닭에서 81%의 민감도, 100%의 특이도가 확인되었고, 오리에서 72.5%의 민감도, 100%의 특이도가 확인됨.

[3차 년도]

1. 개발 Rapid kit 평가





1) AIV/NDV/IBV키트

- AIV/NDV/IBV키트 IBV 각 바이러스 Strain 별 최소검출한계 측정시험

[표. Strain 별 최소검출한계 측정시험에 사용된 IBV Strain 종류 및 최소한계 검출농도]

바이러스	균주명	원액농도 (logEID50/ml)	최소 검출한계 (logEID50/ml)
IBV	Qx	8.0	4.5
	M41	7.5	5.5
	B4	7.5	5.5
	KM91	7.5	5.5

[표. Strain 별 최소검출한계 측정시험 사진]

바이러스	균주명	사진
IBV	Qx	
	M41	
	B4	
	KM91	

- AIV/NDV/IBV키트 NDV 각 바이러스 Strain 별 최소 검출한계 측정 시험

[표. Strain 별 최소검출한계 측정시험에 사용된 NDV Strain 종류 및 최소한계 검출농도]

바이러스	균주명	원액농도 (logEID50/ml)	최소 검출한계 (logEID50/ml)
NDV	B1	9.0	4.0
	Kr005	9.5	4.5
	La Sota	9.5	5.0

[표 Strain 별 최소검출한계 측정시험 사진]

바이러스	균주명	사진
NDV	Kr005	
	B1	
	La Sota	

-AIV/NDV/IBV키트 AIV 표준 바이러스 최소 검출한계 측정 시험

[표. AIV MS 96 바이러스 최소 검출한계 측정 농도]

바이러스	균주명	원액농도 (logEID50/ml)	최소 검출한계 (logEID50/ml)
AIV	MS96	8.5	4.5

[표. AIV MS 96 바이러스 최소 검출한계 측정시험 사진]

바이러스	균주명	사진
AIV	MS96	

-AIV/NDV/IBV 키트 특이도 실험

[표. Bionote AIV/NDV/IBV 키트 특이도 측정 시험]

번호	시료 번호 ^A	시료 종류	Real-time PCR CT value (NDV)	Real-time PCR CT value (IBV)	Bionote 키트 검사결과	비고
1	1V	분변	37.41	Undetermined	-	
2	2V	분변	37.23	38.04	-	
3	3V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
4	4V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
5	5V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
6	6V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
7	7V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
8	8V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
10	9V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
10	10V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
11	11V	분변	39.01	Undetermined	-	
12	12V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
13	13V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
14	14V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
15	15V	분변	Undetermined	Undetermined	-	
16	10	구강	Undetermined	Undetermined	-	
17	20	구강	Undetermined	Undetermined	-	
18	30	구강	Undetermined	Undetermined	-	
19	40	구강	Undetermined	Undetermined	-	
20	50	구강	Undetermined	Undetermined	-	

21	60	구강	Undetermined	Undetermined	-	
22	70	구강	Undetermined	Undetermined	-	
23	80	구강	Undetermined	Undetermined	-	
24	90	구강	Undetermined	Undetermined	-	
25	100	구강	Undetermined	Undetermined	-	
26	110	구강	Undetermined	Undetermined	-	
27	120	구강	Undetermined	Undetermined	-	
28	130	구강	Undetermined	Undetermined	-	
29	140	구강	Undetermined	Undetermined	-	
30	150	구강	Undetermined	Undetermined	-	

^A 시료 고유번호

^B M gene target real-time PCR 결과 CT value

^C CT value를 standard curve를 이용하여 EID₅₀/mL 역가로 환산값

^D Rapid kit 검사 결과 판정 기준: +++=Control signal과 유사하거나 강한 수준의 신호; ++= Control signal 보다는 약하나 분명히 양성 신호가 확인되는 경우; +=희미하게 양성 신호가 보이는 경우; (-)= 양성 신호 없음.

- 닭 구강 및 분변 swab 샘플을 이용하여 NDV 및 IBV realtime PCR을 통해 음성을 확인한 후 각 시료를 이용하여 AIV/NDV/IBV rapid kit에 적용한 결과 30개의 음성 시료 중 30개 모두 음성으로 확인됨. (특이도: 100%)

2) Bionote AIV/H5/H7 키트

① Bionote AIV/H5/H7 키트 AIV subtype별 검출능 시험

[표. AIV Subtype 별 검출능 실험 시료 내역]

	Name	Subtype	Host	분리지역	분리날짜	농도(EID50/ml)
1	K18-485-1	H5N2	쇠기러기	서한해미천	20181129	7.5
2	K16-282	H2N8	야생조류	청주 미호천	20190311	6.5
3	K18-754-5	H3N8	흰뺨검둥오리	곡교천	20181219	7.0
4	K18-570-3	H3N4	청둥오리	충남서천 금강 하구	20181205	7.0
5	K19-69-4	H7N7	청둥오리	안성천	20190325	7.5
6	K17-1500	H5N2	야생조류	천안풍세천	20171121	8.0
7	K18-366-1	H6N2	쇠오리	안성청미천	20181106	7.0
8	K14-246	H5N2	야생조류	천수만	20141107	8.0
9	Q19-122	H8N4	청둥오리	안성천	20190409	6.5
10	K17-903	H7N7	야생조류	삼교천	20170328	7.0
11	K18-709	H11N2	큰기러기	충남서산간월호	20181206	6.5

[표. AIV Subtype 별 검출능 실험결과]




No.	Name	Subtype	AIV	H5	H7	결과 사진
1	K18-485-1	H5N2	+	+	-	
2	K16-282	H2N8	+	-	-	
3	K18-754-5	H3N8	+	-	-	
4	K18-570-3	H3N4	+	-	-	
5	K19-69-4	H7N7	+	-	+	
6	K17-1500	H5N2	+	+	-	
7	K18-366-1	H6N2	+	-	-	
8	K14-246	H5N2	+	+	-	
9	Q19-122	H8N4	+	-	-	
10	K17-903	H7N7	+	-	+	
11	K18-709	H11N2	+	-	-	

② Bionote AIV/H5/H7 키트 AIV subtype 별 최소검출한계 측정 시험

[표. AIV Subtype 별 최소 검출한계 측정 실험 시료 내역]

	Name	Subtype	Host	분리지역	분리날짜	농도(EID50/ml)
1	K19-69-4	H7N7	청둥오리	안성천	20190325	10 ⁹ EID50/ml
2	K17-1500	H5N2	야생조류	천안풍세천	20171121	10 ⁹ EID50/ml
3	MS96	H9N2	Chicken	검역본부 분양	검역본부 분양	10 ^{8.5} EID50/ml

[표. AIV Subtype 별 최소 검출한계 측정 실험 결과 사진]

No.	Name	Subtype	Limit of Dilution(log EID50/ml)			결과 사진
			AIV	H5	H7	
1	K19-69-4	H7N7	5		5.5	
2	K17-1500	H5N2	5	5	-	
3	MS96	H9N2	4.5	-	-	

③ Bionote AIV/H5/H7 키트 AIV 임상시료 적용 시험

번호	시료 번호 ^A	시료 종류	Real-time PCR CT value ^B	log(EID ₅₀ /ml) 환산값 ^C	Bionote 키트 검사결과	비고
1	5-2 5d	분변	18.71	6.7	+++	
2	5-6 5d	분변	19.92	6.33	+++	
3	5-2 3d	분변	19.98	6.32	+++	
4	3-3 5d	분변	20.28	6.23	++	
5	3-6 5d	분변	20.42	6.18	++	
6	3-5 3d	분변	20.53	6.15	++	
7	3-3 3d	분변	21.37	5.9	++	
8	5-8 5d	분변	21.39	5.89	+	
10	3-9 5d	분변	21.44	5.88	+	
10	3-10 5d	분변	22.48	5.56	+	
11	3-5 5d	분변	23.11	5.37	+	
12	5-1 5d	분변	23.39	5.29	+	
13	5-7 5d	분변	23.42	5.28	+	
14	5-6 3d	구강	25.22	4.74	+	
15	3-10 3d	구강	25.72	4.59	-	
16	5-3 5d	분변	25.86	4.54	+	
17	5-2 3d	구강	26.26	4.42	-	
18	5-1 3d	구강	26.47	4.36	-	
19	5-2 5d	구강	26.63	4.31	-	
20	5-1 5d	구강	27.29	4.11	-	
21	3-9 3d	구강	27.86	3.94	-	
22	3-5 5d	구강	28.55	3.73	-	
23	5-5 3d	구강	28.91	3.63	-	
24	3-4 5d	구강	30.4	3.18	-	
25	3-1 3d	분변	36.05	1.47	-	
26	3-7 3d	분변	36.12	1.45	-	
27	3-1 7d	구강	36.12	1.45	-	
28	5-7 3d	분변	36.56	1.32	-	
29	3-4 3d	분변	36.72	1.27	-	
30	3-9 3d	분변	36.88	1.22	-	
31	3-2 O 7d	구강	36.90	1.22	-	
32	3-2 5d	분변	37.14	1.14	-	
33	3-10 3d	분변	37.23	1.12	-	
34	5-9 3d	분변	37.41	1.06	-	
35	3-2 3d	분변	37.41	1.06	-	
36	3-8 3d	분변	Undetermined	0	-	
37	5-8 3d	분변	Undetermined	0	-	
38	3-3 O 7d	구강	Undetermined	0	-	
40	3-4 O 7d	구강	Undetermined	0	-	

^A 시료 고유번호

^B M gene target real-time PCR 결과 CT value

^C CT value를 standard curve를 이용하여 EID₅₀/mL역가로 환산값

^D Rapid kit 검사 결과 판정 기준: +++=Control signal과 유사하거나 강한 수준의 신호; ++= Control signal 보다는 약하나 분명히 양성 신호가 확인되는 경우; +=희미하게 양성 신호가 보이는 경우; (-)= 양성 신호 없음.

임상 시료 (rRT-PCR 검사 결과)	AIV Ag detection kit		계
	양성	음성	
양성	15	9	15/24 (62.5%)
음성	0	16	16/16 (100%)
계	13	25	40

- 2010년 토종닭 유래 저병원성 H9N2 바이러스 (A/Korean Native chicken/Korea/K040110/2010)를 3주령 SPF 닭에 공격접종 후 3일 및 5일 후 구강(17개) 및 분변 시료(12개)를 채취함.
- real-time PCR 검사 결과 1개의 시료가 음성으로 확인됨 (CT value 36 이상)
- 음성시료는 키트 검사결과에서 모두 음성으로 확인됨 (특이도: 100%)
- 29건 양성 시료 중 13건에서 양성 반응이 확인됨 (62.5%).
- log EID50 환산 값을 보았을 때 본 키트는 4.5 - 5 정도의 시료를 양성으로 측정할 수 있음.
- 기존 연구실험 결과 폐사체에서 약 105EID50/ml의 바이러스가 배출되는 것으로 알려져 있어 본 키트는 폐사체 검사 시 바이러스를 검출 가능한 것으로 확인됨.

(2) Rapid kit 및 유전자 chip 평가용 시료 및 시퀀스 제공

(가) 바이오노트 제공 항원

- Rapid Kit 개발 및 키트 평가를 위해서 아래의 목록의 바이러스를 바이오노트 측에 제공함

subtype	Name	기타	유래
H5N2	K09-652		2009년 경기 안산, 철새분변 유래, 자체분리
H5N9		RG virus 배양액	2014년, Baikal teal 유래, 고병원성 H5N8 바이러스의 MBCS 부분을 RG를 통해 제거
NDV	La Sota		병성감정 자체분리 (S-VR-415000-01470)
NDV	Kr005		수입 분양 (S-VR-415000-00124)
IBV	QX		병성감정 분리

[표. 바이오노트 제공 항원 목록]

(나) 한양대 제공 RNA 및 시퀀스

- 유전자 칩 제작 및 평가를 위한 RNA 시료 제공

[표. 한양대 제공 바이러스 RNA 목록]

바이러스 종류	바이러스 명	Subtype	Clade	기타
H5 HPAIV	K10-483	H5N1	clade 2.3.2.1	고병원성
H5 HPAIV	K16-187	H5N6	clade 2.3.4.4	고병원성
H5 HPAIV	VII42406	H5N8	clade 2.3.4.4	고병원성
H5 HPAIV	K17-1885	H5N6	clade 2.3.4.4	고병원성
H5 LPAIV	K09-652	H5N2	-	저병원성
H9 LPAIV	MS96	H9N2	-	저병원성
H9 LPAIV	K040110	H9N2	-	저병원성
H7	K19-277	H7N7	-	저병원성
H7	K10-286-5	H7N9	-	저병원성
AmPV	type A	-	-	-
APMV	N12-019	-	-	-
APMV	K19-280	-	-	-
NDV	K18-54	-	-	-
IBV	Qx	-	-	-
IBV	Qx	-	-	-

3. 개발 Rapid 키트의 현장 적용

1) 몽골 방문

- 본 과제를 통해 개발한 AIV/NDV/IBV rapid kit에 몽골 내 포획 조류에 대한 구강, 분변 swab 시료 적용 및 국내 도입가능한 조류인플루엔자 바이러스 예찰 (2018. 07. 30 - 2019. 08. 04)



- 본 과제를 통해 개발한 AIV/H5/H7 subtype rapid kit에 몽골 내 야생조류 서식지에 설치된 Sentinel bird의 분변, swab시료 적용 및 국내 도입가능한 조류인플루엔자 바이러스 예찰 (2019. 08. 01- 2019. 08.11)



○ 연구개발성과

1. 특허

1) 특허명: 조류 인플루엔자 바이러스 항원의 다중 검출용 스트립 및 이의 용도.

- 출원연도: 2019년
- 출원인: 바이오노트
- 출원국: 대한민국
- 출원등록번호: 10-2019-0106137

2) 특허명: 조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법

- 출원연도 : 2018년
- 출원인 : 한양대학교 에리카산학협력단
- 출원국 : 대한민국
- 출원등록번호 : 10-2018-0077052

2. 논문

1) 논문명 : Limited pathogenicity and transmissibility of Korean highly pathogenic avian influenza H5N6 clade 2.3.4.4 in ferrets

- 게재년도 : 2018년
- 저자명 : Noh, J.Y., Lee, D.H, Yuk, S.S., Kwon, J.H., Tseren-Ochir, E.O., Hong, W.T., Jeong, J.H., Jeong, S. Song, C.S.
- 학술지명 : Transboundary and Emerging Diseases
- Vol.(No.) : Vol.65 (p.p. 923~926)
- 국내외 구분 : 국외
- SCI 구분 : SCI (2018 Impact Factor 3.504)
- 등록번호 : DOI: 10.1111/tbed.12869

2) 논문명 : Rapid Subtyping and Pathotyping of Avian Influenza Virus using Chip-based RT-PCR

- 게재년도 : 2019년 12월 예정 (Submission & Accept 완료. 저널 번호, DOI 부여 대기 중.)
- 저자명 : 권나영, 안정진, 김지훈, 김설영, 이지호, 권정훈, 송창선, 황승용
- 학술지명 : 한국바이오칩학회 BioChip 저널
- Vol.(No.) : 미정
- 국내외 구분 : 국내
- SCI 구분 : SCI
- 등록번호 : BICJ-D-19-00037 (Manuscript Number)

3. 기술실시(이전)

1) “조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법”에 관한 기술이전

- 기술실시권 유형 : 통상실시권
- 실시기술 유형 : 특허출원
- 기술실시 형태 : 영리법인 직접 실시
- 기술실시일 : 2018년 10월 11일
- 기술실시 대상국가 : 대한민국
- 기술실시대상기관 : 바이오코아(주)생명공학사업부
- 기술료 구분 : 영리법인 정부납부기술료 경상
- 기술실시 내용 : 한양대학교 에리카산학협력단(이하 “갑”이라 한다)과 바이오코아(주) 생명공학사업부(이하 “을”이라 한다)은 (갑)이 개발한 “조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법”을(출원번호 10-2018-0077052)”를 (을)이 실시함.

2) “AIV/NDV/IBV Ag Rapid test kit 및 AIV/H5/H7/A Ag Rapid test kit 항원 제작 및 성능평가”에 관한 기술이전

- 기술실시권 유형 : 통상실시권
- 실시기술유형 : 노하우
- 기술실시 형태 : 영리법인 제3자 실시
- 기술실시일 : 2019년 8월 1일
- 기술실시 대상국가 : 대한민국
- 기술실시대상기관 : (주)바이오노트
- 기술료 구분 : 비영리법인 기술이전기술료 정액
- 기술실시 내용 : 건국대학교 산학협력단[이하 “갑”이라 함]과 주식회사 바이오노트[이하 “을”이라 함]은 “갑”이 하기 연구과제를 통하여 개발한 “AIV/NDV/IBV Ag Rapid test Kit 및 AIV/H5/H7/A Ag Rapid test kit 항원 제작 및 성능평가”에 관한 노하우를 “을”에게 이 전하여 실시.

4. 사업화 (2건)

1) 제품명: AIV/NDV/IBV Ag test kit

- 출시일: 2019.09.02.
- 농림축산검역본부 허가번호 제 109-111호
- 사업화 내용: 농림축산식품연구개발과제 가축질병대응기술개발 사업 참여 과제인 “현장 조류인플루엔자 subtype 감별용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 사업화”를 통해 개발된 기술을 적용함. 본 과제를 통해 본사(바이오노트)와 건국대학교는 공동연구 및 기술이전을 바탕으로 조류 인플루엔자(AIV), 뉴캐슬병바이러스(NDV), 전염성기관지염바이러스(IBV)에 대한 높은 반응성과 특이도를 가진 항체를 제작하였으며, 본사의 신속진단키트 개발 노하우와 새로운 기술을 함께 도입하여 단 한 번의 검체 적용만으로 세 가지 항원을 동시에 감별 진단할 수

있는 One-step 다중진단키트로 제품화함. 이 제품을 통해 가금류 및 야생 조류 등을 대상으로 조류에서의 주요 전염성 호흡기 질환인 조류 인플루엔자, 뉴캐슬병, 전염성기관지염의 바이러스에 대한 항원 보유 여부 및 항원의 종류를 감별할 수 있음. 해당 제품은 농림축산검역본부의 수출용 허가를 획득 및 출시함.

2) 제품명: AIV H5/H7/Pan Ag test kit

- 제품출시일: 2019.09.02.
- 농림축산검역본부 허가번호 제 109-112호
- 사업화 내용: 본 사업은 농림축산식품연구개발과제 가축질병대응기술개발 사업 참여 과제인 “현장 조류인플루엔자 subtype 감별용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화”를 통해 개발된 기술을 적용함. 본 과제를 통해 본사(바이오노트)와 건국대학교는 공동연구 및 기술이전을 바탕으로 본사는 조류 인플루엔자 A형(AIV type A) 및 이들의 아형인 H5와 H7에 대한 높은 반응성과 특이도를 가진 항체를 제작하였으며, 본사의 신속진단키트 개발 노하우와 새로운 기술을 함께 도입하여 단 한 번의 검체 적용만으로 A형 조류인플루엔자 및 H5, H7 바이러스의 아형 항원을 동시에 감별 진단할 수 있는 One-step 다중진단키트로 제품화함. 이 제품을 통해 가금류 및 야생 조류 등을 대상으로 조류 인플루엔자의 항원 보유 여부 진단 및 감염 바이러스의 H5 및 H7 아형의 종류를 감별할 수 있음. 해당 제품은 농림축산검역본부의 수출용 허가를 획득, 출시함.

5. 학술대회 발표

1) 건국대학교

- 발표제목 : Infectivity, Pathogenicity and Transmissibility of Korean H5N6 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Pekin ducks and Mallards
- 발표자 : 노진용
- 학술회의명 : The American Association of Avian Pathologists
- 개최장소 : Indiana Convention Center, Indianapolis, 미국
- 발표내용 : In November 2016, highly pathogenic avian influenza (HPAI) outbreaks were caused by novel reassortant H5N6 viruses in Korea. Because ducks are related to the spread of HPAI virus in some degree, we identified infectivity, pathogenicity and transmissibility of newly identified H5N6 HPAI virus in ducks. To evaluate susceptibility and pathogenicity, three week old and six week old Pekin ducks were inoculated with one of three doses (102, 104[n=5], 106[n=7] 50% egg infective doses [EID50] per bird) of A/Mandarin_duck/Korea/K16-187-3/2016 (H5N6) virus. 104 and 106 EID50 inoculated Pekin ducks showed viral shedding in oropharynx and cloaca. Contact-exposed ducks co-housed with 106 EID50 inoculated ducks (n=3) also showed viral shedding. In case of mallards, five mallards were inoculated with 106 EID50 of virus. Inoculated, contact-exposed (n=3), aerosol-exposed (n=2) mallards showed viral shedding.

2) 한양대학교

- 발표제목 : On-site Subtyping and Pathotyping of Avian Influenza Virus (AIV) Using

DNA Chip

- 발표자 : 권나영
- 학술회의명 : (사) 한국바이오택학회
- 개최장소 : 제주 KAL 호텔, 대한민국
- 발표내용 : All subtypes of AIV are infectious but their susceptibility and manifestations are various according to the bird species. Also, AIV is divided by degree of pathogenecity: highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) and low pathogenic avian influenza viruses (LPAIV). In this study, we aim to detect AIV, identify major subtype (H5,H7,H9) and HPAIV on the spot using a single chip. We designed 5 specific primers and probes sets. Using these primers and probes sets, we confirmed that AIV subtyping and pathotyping were possible from unknown samples. As a result, it is possible to quickly subtyping and pathotyping of AIV in the field, so that it can be expected to minimize economic and national damage through early response due to rapid diagnosis.

6. 타연구 활용

- 연구사업명 : 국내·외 환경 중 야생조류 인플루엔자 바이러스 거동예측 연구
- 연구제목 : 국내 외 환경 중 야생조류 인플루엔자 바이러스 거동예측 연구(III)
- 연구기관 : 건국대학교
- 발주처 : 국립환경과학원
- 발간등록번호 : 11-1480523-003569-01
- 연구기간 : 2018.09.06. ~ 2019.07.05.
- 본 연구와의 관계 : 본 연구 지원을 통해 개발된 Rapid test kit 시제품을 현장검사에서 적용하여 검체의 수집 및 분석에 활용함.

[그림. 타 연구과제 보고서 및 AIV/NDV/IBV rapid kit 활용 내용]



○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	108,000,000원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 40% 국외 : 15%

○ 과제 총괄 종합결론

[바이오노트]

- 현장에서 30분 이내 AIV subtype(H5, H7) 감별이 가능한 다중 진단 rapid kit 조건 및 조류 인플루엔자와 NDV, IBV 감별 다중 진단 rapid-kit 조건 확보함.
- AIV H5/H7/Pan Ag rapid kit의 경우 AIV A= $10^{4.5\sim 5}EID_{50}/ml$, H5= $10^5EID_{50}/ml$, H7= $10^{5.5}EID_{50}/ml$ 의 검출한계를 가짐
- AIV/NDV/IBV Ag rapid kit AIV A = $10^{4.5}EID_{50}/ml$, NDV= $10^{4.0\sim 5.0}EID_{50}/ml$, IBV= $10^{4.5\sim 5.5}EID_{50}/m$
- 민감도 62%, 특이도 100% 확인.
- 당초 목표 검출한계는 $10^{3\sim 4}EID_{50}/ml$ 였으나 연구개발 과정에서 다중 진단을 위해 하나의 스트립에 다중 검출선이 존재하는 구조로 인해 발생하는 교차 반응 및 비특이적 반응이 발생하였으며, 특이도 및 감도를 개선하기 위하여 신규 항체원료의 제조 및 재선별로 개발 일정이 다소 지체되기는 하였으나, 임상검체를 대상으로 AIV의 subtype 및 조류 호흡기 질환 바이러스의 감별이 충분히 가능한 rapid test kit의 조건을 확보하였음.
- 본 연구를 통해 획득한 다중 진단 rapid kit의 제조 조건과 새롭게 발굴한 원료를 기반으로 조류인플루엔자의 H5, H7의 subtype 감별이 가능한 test kit에 대한 특허를 1건 출원하였으며, 같은 기술방식을 적용한 AIV/NDV/IBV 감별이 가능한 제품을 추가로 개발하여 총 2건의 사업화(제품화 및 동물용 체외진단기기 허가 등록 획득)를 수행하였음.
- 바이오노트의 신속면역진단키트 개발, 생산기술과 노하우를 활용하여 성능이 향상된 원료로의 교체 적용 등의 방법으로 향후에도 제품의 성능을 지속적으로 개선하고 현장과 고객의 요구를 충족할 수 있을 것으로 예상됨.

[한양대학교]

- 계획 대비 특이도, 민감도 및 안정성 향상
- 10^5 copies/rxn까지 검출 가능 민감도
- 제품화를 진행하기에는 다소 미흡한 수준
- 각 혈청형 별, 고병원성 및 저병원성 감별 가능한 100% 특이도

- 기존 실험 대비 실험 준비 및 진행 시 소요되는 시간 단축(2시간 30분 이내)
- 현재 수립한 RT-qPCR 조건

Reverse transcription	50°C	5min	1cycle
Pre-denaturation	95°C	30sec	1cycle
Denaturation	95°C	3sec	30cycle
Annealing	63°C	30sec	

- 제품 허가등록을 위한 보완(민감도 향상)을 위한 Annealing 온도 조정 및 Denaturation-annealing cycle 수 조정 및 Primer, Probe 서열 일부 수정(LNA 서열 추가 혹은 서열 재 조정) 예정
- 논문 : 검사 시간 단축 및 현장형 RT-qPCR 유전자 칩을 개발 결과 (2시간 30분 이내 subtyping, pathotyping 가능) 및 감별 특이도 100%의 성능 결과를 바탕으로 한 연구결과를 한국 바이오칩학회(SCI급) 논문에 투고하여 수락되었으며, 현재 출간확정 상태임.
- Primer, Probe set에 대하여 특허 출원 1건 및 기술 이전 1건 완료.(독자적인 Primer, Probe 설계와 100% 이상의 특이도 성능)
- 기존의 RT-qPCR 방식이 아닌, 유전자 칩 기반의 RT-qPCR을 진행함으로써 현장형 RT-qPCR 유전자 칩을 개발함으로써 RNA 바이러스의(AIV의) subtyping 및 고병원성, 저병원성 감별 방식에 대해 새로운 방향성을 제시함.
- 신규 연구의 실험방법 및 조건 설정으로 인한 기초 연구 설계에 상당한 기간이 소요되어 당초 예정보다 제품등록이 늦어졌으나, 제품화를 위한 기술을 확보 및 제반 학술적 성과(논문) 및 사업적 성과(특허, 기술이전)을 달성할 수 있었음.

[건국대학교]

- (1) 본 연구과제를 통해 AIV/NDV/IBV rapid kit, AIV/H5/H7 subtype rapid kit, DNA chip을 개발함.
- (2) 건국대학교는 각 rapid kit 및 DNA chip 개발을 위한 항원, 유전자, 유전자 정보를 (주)바이오노트, 한양대학교에 제공함
- (3) 한양대학교 DNA chip 성능 평가를 위해 임상시료에서 추출한 바이러스 포함 유전자 시료를 전달함
- (4) (주) 바이오노트에서 개발한 AIV/NDV/IBV rapid kit, AIV/H5/H7 subtype rapid kit 에 대한 평가를 진행함
 - (가) AIV/NDV/IBV rapid kit
 - ① 최소검출한계
 - ㉠ AIV: 10^{4.5}EID50/ml
 - ㉡ NDV: 10^{4.0}EID50/ml
 - ㉢ IBV: 10^{4.5}EID50/ml
 - ② Subtype 별 검출능 시험
 - ㉠ AIV: H2N8, H3N4, H5N2, H6N2, H7N7, H8N4, H9N2, H11N2 검출 확인
 - ㉡ NDV: B1, Kr005, La Sota

㉔ IBV: Qx, KM91, B4, M41

(나) AIV/H5/H7 subtype rapid kit

① 최소검출한계

㉔ AIV: $10^{4.5}$ EID₅₀/ml

㉔ H5: $10^{5.0}$ EID₅₀/ml

㉔ H7: $10^{5.5}$ EID₅₀/ml

② Subtype 별 검출능 시험

㉔ AIV: H2N8, H3N4, H5N2, H6N2, H7N7, H8N4, H9N2, H11N2 검출 확인

③ 임상시료 적용 시험

㉔ 민감도: 62.5%

㉔ 특이도: 100%

(4) 본 연구를 통해 논문 작성 1건(추가 1건은 출간 예정), 기술이전 1건, 타연구과제에서의 활용 1건의 정량적 성과를 달성함.

(5) 결론: AIV/NDV/IBV rapid kit, AIV/H5/H7 rapid kit를 개발하여 평가한 결과 각 질병 별로 다양한 아형에 대한 검출이 가능하였고, 감염 폐사체 유래 시료를 검출 가능한 최소 검출한계 농도를 보여주었음. Raipd kit는 향후 임상 사용 및 피드백을 통한 개선으로 민감도를 높일 수 있을 것으로 예상되며, 유전자칩은 제공받은 검체를 바탕으로 향상된 감도의 제품을 개발할 수 있을 것으로 예상됨.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 최종목표

- 현장 조류인플루엔자 subtype 감별 용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화
 - 1) 현장에서 rapid kit의 경우 30분 내, 유전자칩의 경우 5~6시간 내 진단
 - 2) 최소검출한계농도 $10^{3-4}EID_{50}/ml$ 이하
 - 3) 기술이전 2건 이상, 산업화 2건 이상

나. 세부목표

○ 주요 제품

- 1) 조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 용 다중 rapid-kit
- 2) 조류인플루엔자 감별진단 용 (ND, IB) 다중 rapid-kit
- 3) 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별 용 현장형 유전자칩

○ 주요 기능

- 1) subtype 검출용 다중 rapid kit - H5, H7 감별 진단, 현장 진단
- 2) 감별진단 용 다중 rapid kit - AI, ND IB 감별 진단, 현장 진단
- 3) 유전자칩 - 스캐너 없이 육안으로 주요혈청형 (H5, H7, H9) 및 병원성 (LPAI, HPAI) 동시 감별 진단, 현장진단 가능

○ 주요 성능치

[다중 래피드 키트]

- 1) 현장형 다중 rapid kit을 통해, 필드 현장에서 30분 내 AI subtype 및 감별진단
- 2) 최소검출한계농도 $10^{3-4}EID_{50}/ml$ 이하 - 기존 키트 대비 10~100배 성능 향상
- 3) rapid kit 현장시료 적용 시 민감도 85% 이상, 특이도 95% 이상
- 4) 기존 단일 진단키트 대비 경제성 및 효율성 확보
 - 시중의 단일 진단 키트 1회 검사 비용 : 약 1만원

[유전자칩]

- 1) 현장형 유전자칩을 통해 AI subtype 및 병원성 현장에서 6시간 이내 진단
- 2) 종란접종법 대비 민감도 95%, 특이도 100% 이상
- 3) 유전자칩의 경우 LOD 10^4 copies/mL 이하 (10^3EID_{50} 이하)
 - 기존 단일 진단키트 대비 민감도, 특이도 동등 이상
- 4) 기존 단일 진단 키트 대비 경제성 및 효율성 확보
 - 시중의 단일 진단 키트 1회 검사비용 : 약 1.2 만원

3-2. 목표 달성여부

성과항목	성과목표	가중치	달성도
Rapid kit 개발	최소검출한계 농도 $10^{3-4}EID_{50}/ml$	10%	60%
	종란접종법 대비 민감도 85%, 특이도 95%	5%	75%
	검출시간 30분 내외	5%	100%
	AI 진단 용 항체 및 다중 rapid kit에 대한 특허 출원	10%	100%
	AI 진단 용 다중 rapid kit 시제품 개발	10%	100%
	AI 감단 용 다중 rapid kit 제품등록	10%	100%
유전자 칩 개발	최소검출한계 농도 $10^3EID_{50}/ml$ (10^4 copies/ μ L)	10%	60%
	종란접종법 대비 민감도 95%, 특이도 100%	5%	60%
	검출시간 6시간 내외	5%	100%
	현장형 AI 유전자칩 특허 출원	10%	100%
	AI 주요 혈청형 및 병원성 감별 용 유전자 칩 시제품 개발	10%	80%
	AI 주요 혈청형 및 병원성 감별 용 유전자 칩 제품등록	10%	70%
합계		100%	

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

○ 목표 미달성 원인

[Rapid kit 개발]

- 1) 최소검출한계농도 $10^{3-4}EID_{50}/ml$ 이하 - 기존 키트 대비 10~100배 성능 향상
 - 현재 최소검출한계 농도는 $10^{4-5}EID_{50}/ml$ 로 기존 수준.
 - 다중 검사선이 하나의 스트립 위에 있는 구조임.
 - 이로 인해 검체의 전개를 위해 사용하는 버퍼 및 샘플패드 처리 용액이 동일 조건으로 제한, 적용되며, 검사선 간 비특이 및 교차반응을 최소화하기 위하여 감도가 다소 감소된 조건을 사용하고 있음.
- 2) Rapid kit 현장시료 적용 시 민감도 85% 이상, 특이도 95% 이상
 - 현재 AIV subtype 다중진단 키트의 경우 민감도 62%, 특이도 100%로 민감도가 부족한 상황임.
 - 최소검출한계 농도와 마찬가지로 다중 검사선 구조로 인해 모든 검사선 간 교차, 비특이 반응이 최소화된 조건 적용으로 인해 감도 증대에 한계가 있음.

[유전자 칩 개발]

- 1) 종란 접종법 대비 민감도 95%, 특이도 100%이상
 - 현재 조건에서 특이도는 100% 적용되나, 민감도 부족.
- 2) 유전자칩의 경우 LOD 10^4 copies/mL 이하 ($10^3 EID_{50}/mL$ 이하)
 - 교차반응 발생을 최소화시키기 위한 조절로 인해 목표 대비 검출한계농도 높음.
- 3) 휴대용 기기의 형광 카메라를 이용한 칩 모니터와 증폭곡선 그래프 확인을 통한 민감도 향상하여 육안으로 확인 가능

-육안으로 확인 가능하나 민감도가 낮게 측정되어, 이를 향상시키기 위한 작업을 계속 진행하고 있음.

4) 제품 등록 및 산업화

-제품 등록을 위하여 Primer, Probe set의 최적화 진행 중. (2차년도 Primer, Probe와 PCR 조건이 교차 반응에서 양성을 나타내어 문제를 수정하기 위함.)

-PCR 조건을 수정하여 교차 반응에서 음성이 나오도록 하였으나, 민감도가 너무 낮은 문제가 발생하여 최적화가 더 필요한 상황임.

○ 차후 대책

[Rapid kit 개발]

1) 최소검출한계 농도 및 감도 향상

가) 제제화 방법 변경 적용

- 민감도와 특이도를 향상시킬 수 있는 신규 버퍼(검체 희석액) 제조 및 적용

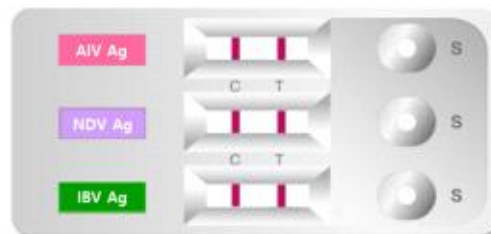
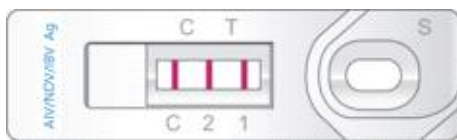
- Carboxyl coated color particle, Latex, Fluorescent particle, Avidin-biotin system 등 Gold particle 외 감도 향상 가능한 표지자 적용

- 신규 자재 적용(Nitrocellulose membrane 재질 변경, Plastic cassette 변경 등)

- 건국대학교로부터 최신 유행 바이러스 주에 대한 정보 공유

나) 감도 향상을 위한 신규 제품 형식 적용

- One-strip multi lines 형태 외 검출대상별 개별스트립 multi row 형태 고려(multi line에서 교차 반응 최소화를 위한 감도 저하 없이 개별 strip에서 최대 감도 구현 가능)



<그림. Multi line type과 Multi row type device>

2) 임상검증 진행

- 건국대학교 타 연구용액과제, 현장 예찰 등을 통한 추가 임상 검체 확보 진행

- 개선 Rapid test kit에 대한 건국대학교 내 BL3 시설에서 고병원성 시료 적용 및 민감도, 특이도 임상시험 실시 (임상 검체 확보에 따라 데이터 지속 누적)

[유전자칩]

1) 민감도 및 검출한계 향상

- M gene 검출용 Primer, probe set 서열 수정

- LNA(Locked Nuclear Acid) 추가 및 서열 조정을 통한 감도 향상

- H5, H7, H9, High Pathogenic AIV의 primer, probe set 추가 설계

- 민감도, 특이도 가장 우수한 RT-qPCR 조건 선별

2) 임상검증 진행

- 최적화 완료 시제품에 대한 건국대학교 BL2 시설 및 BL3 시설 내 인플루엔자 시료 적용
 - 건국대학교에서 매년 실시하는 해외 철새 도래지 예찰을 통한 최신 유행 바이러스 추출 RNA 적용 test 및 신규 primer, probe 추가 설계
 - 민감도, 특이도 시험 진행
- 2) 제품 등록 및 산업화 지속
- Primer, Probe 최적화 완료 후 제품 허가등록 및 사업화 진행 예정

4. 연구결과의 활용 계획 등

○ 활용분야 및 활용 방안

- 현장 방역 및 모니터링 시스템에 적용
- 기업체 자체 모니터링 시스템으로 활용
- 농림축산검역본부 및 지역 가축방역위생본부에 시범사업 건의
- 세스코에서 운영 중인 'Smart-farm' 등 농가에 현장 적용 제안
- 고병원성 조류 인플루엔자 발생 시 현장형 진단기기 지원

○ 추가연구의 필요성

1) Rapid test kit

- 민감도 향상 및 검출한계 향상을 위한 신규 항체 탐색 지속
- 임상검체 적용을 통한 민감도, 특이도 데이터 추가 확보

2) 유전자칩

- 민감도 개선을 위한 추가 연구 및 시험
- 현장에서의 시험 시간 단축 방안 연구 필요(현재 2시간 30분보다 더욱 단축 예정)
- 건국대학교를 통한 임상 시험 실시

○ 타연구에의 응용

1) Rapid test kit

- 건국대학교에서 매년 진행 중인 야생조류 조류인플루엔자 검사에 본 과제에서 개발된 시제품 적용(조류 인플루엔자의 유입 경로 등의 현장 예찰에 활용)

2) 유전자칩

- 현장형 조류인플루엔자 유전형 검사칩으로써 다른 종류의 현장형 유전형 검사가 필요한 타연구에 응용 가능.

○ 기술이전 및 제품화 방안

- Rapid-kit의 경우 생산시설을 기 확보하고 있는 바이오노트에서 제품화를 수행하였으며 수요처 탐색 및 홍보활동을 통해 제품 판매 실적을 발생시킬 예정임
- 유전자칩의 경우 (주)바이오코아에 기술이전을 실시하였으며, 최종 세부 조건 조정이 끝나면 제품 허가등록 및 제품 출시를 진행할 예정임

○ 제품 등록

- 바이오노트의 경우 동물용 의료기기 제조업 등록이 완료 되어 있음

- 유전자칩 생산업체 동물용 의료기기 제조업 신고 예정
- Rapid kit의 경우 농림축산검역본부에 제품 등록이 완료되었으며, 유전자칩은 등록 예정임

○ 산업화 방안

- 개발된 현장형 진단 장비는 농림축산검역본부, 지역 가축방역위생본부 및 각 수의과대학에 방역 및 예찰을 위한 진단기기로 판매 예정
- (주)하림, (주)목우촌 등 양계 농가 관리 업체에 예찰 위한 진단 기기로 판매 예정
- 세스코에서 운영중인 ‘Smart-farm’ 등 농가에 관리 및 예찰을 위한 진단 기기로 판매 예정
- 평가 자료 제출을 통하여 본 과제를 통해 개발된 유전자칩을 HPAI 확진용 진단기기로 이용하는 방안을 농림축산검역본부에 건의
- Rapid-kit의 성능 개선 및 평가자료 제출을 통하여 예찰 및 진단에 광범위하게 이용될 수 있도록 농림축산검역본부에 건의

○ 사업화 계획

[Rapid Test kit]

1) 단가 산출

- (주) 바이오노트의 기존 Rapid test kit 제조 공정을 이용할 경우 다음과 같은 비용으로 생산 가능함

a) AIV H5/H7/Pan Ag Rapid Test kit

구분	Test 당 단가 (원)
원재료비	1106.37
부자재	139.73
인건비	88.28
합계	1334.38

- 제조 단가 : 1 test 당 1,334원 / 1 kit (10 tests) 당 13,340원

b) AIV/NDV/IBV Ag Rapid Test kit

구분	Test 당 단가 (원)
원재료비	1022.86
부자재	139.7
인건비	88.28
합계	1250.84

- 제조단가 : 1 test 당 1,250원 / 1 kit (10 tests) 당 12,500원

2) 사업화 전략 및 매출 계획

- 바이오노트 기존 AIV Ag 및 NDV Ag 판매 국가 대상 해당국가 기존 거래 달러 및 유통망을 통한 개발 제품 프로모션을 통한 시장 형성 및 제품 판매
- AIV Ag 단일 제품의 경우 1 test 당 2.5 \$, NDV Ag 단일의 경우 1 test 당 3 \$인 점을 감안.
- AIV H5/H7/Pan Ag 제품은 Test 당 7 \$(약 8천 원) 가격에 판매
- AIV/NDV/IBV Ag 제품은 Test 당 8\$ (약 9천 원) 가격에 판매
- 2019년 AIV Ag, NDV Ag 판매량은 60,750 test로 수요량이 상당한 편임

국가	판매량 Test
인도네시아	13,500
중국	11,100
요르단	9,600
이란	7,910
오스트리아	5,600
사우디	2,350
필리핀	2,010
네팔	1,950
인도	1,560
터키	1,510
대한	1,100
튀르키예	800
가나	410
말레이시아	360
영국	210
프랑스	170
아프가니스탄	160
방글라데시	150
몽골	140
스위스	80
스리랑카	80
합계	60,750

- Rapaid test kit 매출 계획금액 6천만 원 달성을 목표로 향후 3년간 7,060 tests 판매 계획

국가	AIV H5/H7/Pan Ag	AIV/NDV/IBV Ag
인도네시아	1,000	1,000
중국	1,000	1,000
이란	500	500
태국	500	500
오스트리아	200	200
사우디	200	200
필리핀	130	130
합계	3,530	3,530

[유전자칩]

1) 단가 산출

- 1회당 시험 비용 (RT-qPCR Mix + Primer + Probe + Chip)

a) RT-qPCR Mix - 733원/rnx (rnx 당 10ul 사용 및 손실량 고려 여분 포함)

b) Primer(Forward + Reverse) - 약 9.21원/rnx

최대 20base로 산정 시 25mmole 당 10,600원 × 2 (Forward + Reverse) = 21,200원

약 2300회 사용 가능

Base Pricing	
합성스케일	가격
25 nmole (15-60 Bases)	530원 / Base

c) Probe - 433원/rxn

500회 당 195,000원 (실험 시 손실량 고려 여분 포함 약 450회 사용 가능)

	No. of Reactions (20 μ L)	Price (FAM-ZEN/Iowa Black FQ)
PrimeTime [®] Mini qPCR Assay	100	₩120,000
PrimeTime [™] Standard qPCR Assay	500	₩195,000

d) Chip - 1567.5원/rxn

384개 당 601,920원 (구매 단위 1 package 당 384 ea)

- 합계 : 3,527원/rxn (여분, 불량률 고려)
- 1 kit 당 48 test 포장 : $3,526.46 \times 48 = 169,270$ 원/kit
- 장비(GeneChecker+노트북) : 7,315,000원 (사용자 별도 구매)

2) 사업화 전략

항목	목표 및 계획	예상 소요 기간
검출한계 최적화	10^4 copies 검출 \rightarrow $10^3 \sim 10^2$ copies 검출	3-4개월
제품등록 시험 진행	시험 최적화 및 임상테스트 진행	6개월
제품등록 완료	임상테스트 완료 후 등록 진행 및 완료	2020년 12월까지 추진
제품등록 후 판매	제품화(제품등록) 후 판매 추진	2021년 1월부터 추진
판매 전략	해당 kit 전문 영업 사원 고용 국내/해외 학회 부스 참석 등	

3) 매출 계획

세부항목			목표성과
매출액	개발제품	향후 3년간 매출	약 4,800만원
시장점유율	개발제품	향후 3년간 매출	국내 : 15% 국외 : 5%

- Kit 단가, 제작비용 등 여러 요소 감안 시 1회 시험 당 10,000원, 1 kit 당 48만원의 가격으로 제품 판매 및 실험 서비스 가능 (1회 시험 당 제작 비용 + 인건비 = 약 6,473.54원, 1 kit 당 310,729원)

- 국내 판매 및 해외 수출(동남아시아 등)을 계획하고 있으며, 향후 3년 동안 약 100 kit (4,800만원) 판매 예상

붙임. 참고문헌

- (1) 한국동물약품협회
- (2) 지식경제부
- (3) 특허청
- (4) 인플루엔자 진단 특허분석 보고서, 한국보건산업진흥원
- (5) 세계의 동물 의료 및 진단 시장 보고서, BCC Research
- (6) Medical Equipment Market Analysis & Forecasts to 2015, GlobalData
- (7) 인플루엔자 진단 특허분석 보고서, 한국보건산업진흥원
- (8) CLIA(Clinical Laboratory Improvement Ammendments of 1988)
- (9) WHO(World health Organization)
- (10) 농림축산검역검사본부
- (11) Kwon et al., Emerging Infectious Diseases, 2015
- (12) OIE(Office international des epizooties, World Organization for Animal Health)
- (13) Bi Y et al., Virological Sinica, 2016

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 현장 조류인플루엔자 subtype.감별용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화				
	(영문) Development and industrialization of rapid kit and DNA chip for detection and subtyping of avian influenza virus				
주관연구기관	바이오노트		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 바이오노트	
참 여 기 업	바이오노트			(성명) 김선애	
총연구개발비 (1,200,000천원)	계	1,200,000,000원	총 연구 기간	2016.09. ~ 2019.09.(3년 0월)	
	정부출연 연구개발비	900,000,000원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	43명
	기업부담금	300,000,000원		내부인원	43명
	연구기관부담금	0		외부인원	0명

○ 연구개발 목표 및 성과

본 연구는 조류인플루엔자의 subtype 및 Newcastle Disease Virus(NDV), Infectious Bronchitis Virus(IBV)의 현장 내에서의 감별, 다중 진단이 가능한 Rapid kit 및 유전자칩의 개발 및 산업화를 목표로 하여 최소검출한계 $10^{3.4}EID_{50}/m$ 의 성능과 Rapid kit는 30분, 유전자칩은 6시간 이내에 AIV subtype을 감별, 진단할 수 있는 성능을 확보하고자 하였으며, 정량적인 성과로는 특허출원 2건, 기술이전 2건, 논문 게재 1건(추가 1건 게재 확정), 사업화(제품화) 2건, 타연구과제 활용 1건의 정량적 성과를 달성하고자 하였다.

○ 연구내용 및 결과

Rapid kit의 경우 조류인플루엔자 및 NDV, IBV에 대하여 반응성과 특이성이 높은 항체를 선별한 후 One step으로 다중 진단이 가능할 수 있도록 다중검사선 구조의 스트립 제작 및 디바이스 구조 결정, 최적의 버퍼 조건 확보 등의 연구를 수행하였으며, 유전자칩은 조류인플루엔자의 표적 염기서열 조사 및 확보, Probe의 설계 및 제작, 민감도와 특이도의 확보와 연관된 chip과 chemistry의 최적조건 탐색 연구가 수행되었다. 연구결과 Rapid kit는 $10^{4.5}EID_{50}/m$ 의 검출한계, 62%의 민감도, 100%의 특이도, 검출 시간 30분 이내의 성능을 구현하였으며, 유전자칩 역시 2시간 30분 이내 최소검출한계 10^5 copies/ μl 의 민감도로 subtype 및 병원성을 감별할 수 있는 특이도 100%의 성능을 확보하였다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

본 연구과제 수행을 통하여 조류인플루엔자 진단 kit와 관련된 2건의 특허가 출원되었으며, 관련 기술이전 2건, 동물용 체외진단기기 허가등록 2건, 논문 2건 발표(1건은 수락 확정되어 출간 예정), 타연구과제활용 1건의 연구성과 활용실적이 있다. 해당 성과물 및 연구결과를 기반으로, 향후에는 농림축산검역본부 등의 국가 기관과 양계사업 관련 기업 및 농가의 방역관리와 예찰을 위한 진단기기로 판매할 계획이며, 개발된 제품도 시장과 고객들의 요구와 피드백을 통해 지속적인 성능의 개선과 개량을 수행할 예정이다. 현재 허가등록이 완료된 Rapid test kit 2종 제품의 경우 동남아시아와 서아시아, 오세아니아를 중심으로 향후 3년 간 6천만 원의 매출을 계획하고 있으며, 유전자칩은 허가등록이 완료되면 동남아 등을 대상으로 5천만 원의 매출을 발생시킬 계획이다.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	116103-3		
사업구분	농식품개발사업				
연구분야	수의예방			과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 및 감별 진단용 (AIV, NDV, IBV) 다중 Rapid kit 개발			과제유형	개발
연구기관	바이오노트			연구책임자	김선애
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.09~2017.09	100,000	100,000	200,000
	2차연도	2017.09~2018.09	80,000	83,333	163,333
	3차연도	2018.09~2019.09	120,000	116,667	236,667
	4차연도				
	5차연도				
	계		300,000	300,000	600,000
참여기업	바이오노트				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019.10.01

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
바이오노트	대표이사	김선애

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I . 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

1회 시험으로 조류 인플루엔자의 H5, H7 subtype 및 AIV/NDV/IBV를 감별해낼 수 있는 One step-multiple diagnostics을 최초로 제작하였으며, 기존 3종의 병원체에 대한 개별 테스트 시에 소모되는 검체량 및 자재를 3분의 1수준으로 감소시키고 동시 진단이 가능한 점과 임상검체 대상으로도 충분한 유효성능을 나타냄을 확인한 바, 연구결과가 우수하다고 판단함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

기존 1종 병원체-1 test 방식과 달리 다중 병원체에 대한 동시 감별진단을 가능하게 하여 현장에서의 진단시간과 비용을 감소시키고 바이러스 병원체에 따른 적절한 방역정책 적용을 가능하도록 할 수 있으며, 조류인플루엔자 뿐 아니라 주요 조류 호흡기 질병인 ND, IB를 동시 진단 가능한 kit를 개발함으로써 국가 방역정책에 중요한 역학조사/원인체 파악을 효과적으로 가능하도록 하였다는 점에서 향후 방역 방침 및 방향에 변화를 줄 수 있는 큰 파급효과를 가졌다고 판단함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

현재 선별한 원료 및 조건을 바탕으로 기 개발 제품보다 향상된 성능의 개선품을 개발할 수 있으며, 본 연구를 통해 얻어진 다중진단 키트의 제조 노하우 및 기법을 조류인플루엔자 외에도 다른 질환을 진단할 수 있는 제품의 개발에 응용할 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

본 기관은 연구개발목표 및 성과를 달성하기 위하여 과제기간 동안 지속적인 연구개발활동을 수행하였으며, 과제기간 내에 설정된 정량적인 성과들(특허, 사업화)을 성실하게 이행함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

본 기관에 배분된 연구개발 목표인 특허출원 및 산업화와 관련하여 과제종료 전 특허 출원 1건이 완료되었으며, 마찬가지로 검역원 동물용체외진단기기 허가등록에 대하여 2건의 제품이 등록되어 출시까지 완료되었음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출용 다중 rapid-kit 개발	20	100%	AIV H5, H7의 감별이 가능한 다중진단 키트의 원료 및 제작 조건 확보
조류인플루엔자 감별진단용 (ND, IB) 다중 rapid-kit 개발	20	100%	AIV/NDV/IBV의 감별이 가능한 다중 진단 키트의 원료 및 제작 조건 확보
현장형 다중 rapid kit을 통해, 필드 현장에서 30분 내 AI subtype 및 감별진단	10	100%	검체 점적 후 결과 판독 시간 20분으로 30분 내 진단 가능.
최소검출한계농도 $10^{3\sim4}$ EID ₅₀ /ml 이하	10	60%	최소검출한계농도 $10^{4\sim5}$ EID ₅₀ /ml로 목표치 대비 낮은 민감도
민감도 85% 이상, 특이도 95% 이상	10	75%	임상검체 실험결과 민감도 62%, 특이도 100%로 향후 감도 향상 필요
기존 단일 키트 대비 경제성 및 효율성 확보	10	100%	단일 스트립-다중 진단 키트화하여 개별 품목 단일 키트 대비 단가 감소.
사업화 2건	20	100%	농림축산검역본부 동물용체외진단기기 허가 2건(AIV/NDV/IBV Ag test kit, AIV H5/H7/Pan Ag test kit)
합계	100점	93.5점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구의 최종적인 목표였던 조류 인플루엔자와 이의 subtype 감별이 가능한 rapid kit 및 조류인플루엔자와 뉴캐슬병 바이러스, 전염성기관지염을 감별할 수 있는 rapid kit의 원료와 제작 조건을 확보하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

현재 민감도가 목표 대비 다소 부족한 부분이 있으나, 기존의 단일 진단 제품보다는 동등, 혹은 이상 수준(검출한계농도 $10^{4\sim5}$ EID₅₀/ml)이며, 출시가 이루어진 제품인 만큼 향후에도 고객과 현장의 요구사항을 만족시키기 위해 지속적으로 제품의 성능을 개선해나갈 예정임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구를 통해 개발된 2종의 rapid kit는 제품화 및 허가등록까지 완료된 상태이며, 바이오토티의 자체적인 홍보활동을 통해 양계 농가 및 관리 업체 등을 대상으로 판매처 및 수요처를 확보하고 매출을 발생시킬 계획이며 또한 조류인플루엔자와 관련하여 농림축산검역본부 및 가축방역위생본부 등에 시범 사업을 건의하여 본 rapid kit를 적용할 예정임. 또한 향후에도 지속적인 제품 개선을 통하여 더욱 우수한 제품으로 거듭나 시장에서 확고한 자리를 잡을 수 있게 할 예정임.

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	116103-3		
사업구분	농식품개발사업				
연구분야	수의예방		과제구분	단위	
사업명	가축질병대응기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	현장 조류인플루엔자 subtype 감별용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화		과제유형	개발	
연구기관	한양대학교		연구책임자	황승용	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.09.05. - 2017.09.04	100,000	-	100,000
	2차연도	2017.09.05. - 2018.09.04	80,000	-	80,000
	3차연도	2018.09.05. - 2019.09.04	120,000	-	120,000
	4차연도				
	5차연도				
계			300,000	-	300,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019.09.06

3. 평가자(연구책임자) : 황승용

소속	직위	성명
한양대학교	교수	황승용

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별용 현장형 유전자칩을 개발함으로써, 실시간 중합 효소 연쇄반응을 이용한 유전형 검사의 현장화를 이루어 낼 수 있는 기반을 마련하였으며, 이에 대한 특허출원 및 기술이전을 통해 연구개발 결과의 우수성을 객관적으로 보여줌.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

현장에서 조류인플루엔자의 subtype 및 병원성에 대한 유전형 검사를 좀 더 정확하고 빠르게 할 수 있다는 점이 우수하며 실시간 중합효소 연쇄 반응의 현장진단 적용 가능성을 제시한 바는 향후 동일 방식의 진단장비들의 개발에 방향을 제시할 수 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

현장에서 신속하게 조류인플루엔자의 병원체 및 병원성 감별 할 수 있어 조류인플루엔자의 역학조사 및 병인 파악 등 국가방역정책 및 방역체계에 크게 활용될 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

본 기관은 현장형 유전자칩 개발을 위하여 다수의 실험 진행 및 결과를 획득하였으며, 제반 기술 및 이론적 배경을 확보하기 위하여 학술발표, 논문 투고, 특허 출원 등의 학술적인 연구활동 역시 활발히 수행함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

본 협동연구기관인 한양대학교에 배분된 과제 성과목표인 특허출원 1건 및 기술이전 1건, 학술발표 1건을 완료하였으며, 논문 1건이 SCI급 저널에 현재 출간 확정된 상태임.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
현장형 유전자칩을 통해 AI subtype 및 병원성 현장에서 6시간 이내 진단	15	100	6시간 이내 진단 가능. (2시간 30분 이내)
종란 접종법 대비 민감도 95%, 특이도 100%이상	10	60	특이도 100% 이상은 달성하였으나, 민감도 관련 지속 보완 중.
유전자칩의 경우 LOD 10 ⁴ copies/mL 이하 (10 ³ EID ₅₀ /mL 이하)	15	60	민감도 관련 지속 보완 및 수정 중.
기존 단일 진단 키트 대비 경제성 및 효율성 확보	10	90	경제성 및 효율성을 좀 더 최적화 하기 위한 작업 진행 중.
주요 혈청형(H5, H7, H9) 및 병원성(LPAI, HPAI) 마다의 특이적인 Primer, Probe를 사용하여 표적에 대한 특이도 향상	10	100	주요 혈청형 및 병원성에 대해 특이도가 100% 적용됨을 확인.
휴대용 기기의 형광 카메라를 이용한 칩 모니터와 증폭곡선 그래프 확인을 통한 민감도 향상하여 육안으로 확인 가능	10	80	민감도 관련 지속 보완 및 수정 중.
특허 출원 및 기술이전	10	100	특허 출원 및 기술이전 완료.
제품 등록 및 산업화	10	70	제품등록 시험 진행 중. (민감도 높이는 작업 및 최적화 진행 중.)
SCI 논문 게재	10	80	학술지 Submission & Accept 완료 및 게재 확정.
합계	100점	82점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구개발 결과 목표였던 2시간 30분 이내로 진단이 가능하며 특이도가 우수한 유전자 칩 조건을 확보하였으며, 해당 기술을 바탕으로 본 연구기관에 배분되었던 성과 목표였던 특허 출원 및 기술이전, 학술발표, 논문 게재(예정) 성과를 달성하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 세부 조건 조정으로 인한 동물용 체외진단기기의 검역원 허가 등록 준비 진행 중.
- SCI급 논문 1건 Accept 상태로 현재 학술지 2019년 12월 출간 예정

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

농림축산검역본부의 동물용 체외진단기기 제품 등록을 통한 출시 준비 지속 및 출시 농림축산검역본부, 가축방역위생본부 등의 조류인플루엔자 관련 사업 및 관련 기업, 농가를 대상으로 현장 적용을 통한 매출 발생 예정. 또한 등록, 출시와 별도로 지속적인 제품 민감도 개선을 통한 제품 성능 향상 연구 수행 예정

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		116103		
사업구분	농림축산식품 연구개발사업					
연구분야	수익예방			과제구분	단위	
사업명	가축질병대응기술개발사업				협동	
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	현장 조류인플루엔자 subtype 감별용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화			과제유형	(개발)	
연구기관	건국대학교			연구책임자	박승용	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계	
	1차연도	2016.09.05.-2017.09.04	100,000	-	100,000	
	2차연도	2017.09.05.-2018.09.04	90,000	-	90,000	
	3차연도	2018.09.05.-2019.09.04	110,000	-	110,000	
	계		300,000			300,000
참여기업	바이오노트					
상대국		상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망


2. 평가일 : 2019.10.03

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교	교수	박승용

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

국내 유입 가능한 주요 subtype의 바이러스를 선별하여 기존에 없던 2가지 AIV subtype (H5/H7) 항원에 대한 진단이 가능한 rapid kit와 H5, H7, H9 AIV subtype의 유전자에 대한 검출이 가능한 DNA chip을 개발한 점에서 매우 우수하다고 판단 됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

국내에서 거의 매년 발생하고 있는 고병원성 조류인플루엔자에 대한 예찰 및 인플루엔자 이외에도 국내 양계농장에 발생하는 바이러스에 대한 진단이 가능하여 농장 및 예찰에 적용이 가능할 것으로 사료됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

국내 조류인플루엔자 예찰 작업 및 검역소에서 rapid kit가 활용되고 있는 만큼, 해당 분야에서 본 연구 결과의 활용이 가능할 것으로 판단됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

연구 기간 내에 과제 초기에 목표한 성과를 모두 충족하였고 산업화 제품도 개발 완료하여 성실하게 과제가 수행되었음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

협동 연구기관인 건국대학교에 배정된 연구개발성과 목표 논문발표 1건 및 지적소유권 기술이전 1건, 학회 발표 1건을 기간 내에 성실하게 수행 및 완료하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
유입 가능 바이러스 분석	5%	100%	중국 및 주변국의 바이러스 유전자 분석을 통한 유입가능 바이러스를 분석함
rapid kit 개발 용 불활화 항원 제공	9%	100%	건국대에서 분리 및 보유한 바이러스 불활화 항원을 제공함
protein 항원 제공	9%	100%	Baculovirus를 이용한 단백질 발현 기술을 통하여 protein 항원을 제공함
유전자칩 개발 용 cDNA 제공	9%	100%	건국대학교에서 분리 및 보유한 바이러스의 유전자 및 유전자 정보를 제공함
개발 단계에서의 실험실 내 효능평가	5%	100%	기존 AIV 키트에 대한 실험실 내 효능 평가를 진행함
기존 시제품 및 개발 제품 효능 평가	10%	100%	기존 시제품 (AIV rapid kit)에 대한 평가 및 과제를 통해 개발된 제품 (AIV/NDV/IBV kit)에 대한 효능 평가를 진행함
시제품 임상시료 적용	14%	100%	기존 시제품에 건국대학교 내에서 동물실험을 통해 얻은 임상시료를 적용하여 평가함
기존 시제품 BL3 실험실 내 고병원성 조류인플루엔자 실험 진행	10%	100%	건국대학교 BL3 실험실에 있는 고병원성 조류인플루엔자 임상시료를 기존 Rapid kti에 적용
개발 제품 효능 평가	14%	100%	개발 제품에 대한 최소 검출한계 및 다양한 조류 바이러스를 활용하여 효능을 평가함
개발 시제품 임상시료 적용	10%	70%	저병원성 바이러스를 닭에 접종하여 얻은 임상시료를 적용하여 평가를 진행함. 고병원성 임상시료를 적용하지 못함
현장적용	5%	100%	조류인플루엔자 조기 진단 및 예찰을 위한 해외 방문 시 본 과제를 통해 개발된 키트를 적용하여 활용함.
합계	100%	97점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

과제 기간이내에 개발된 제품에 대한 개발참여 및 평가 목표가 성공적으로 달성되었음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

달성도가 100%에 미치지 못한 '개발 시제품의 임상시료'의 경우 임상시료 적용을 위한 모든 시험조건이 확립 되었으나 고병원성 조류인플루엔자 취급이 가능한 BL3 시설 이상 및 수리로 인해 출입이 불가하여 BL3 시설 수리 이후 평가할 예정임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

조류인플루엔자는 국내 상시 발병하고 고병원성 조류인플루엔자의 경우 2010년 이후 거의 매년 국내 발병하여서 진단기술의 수요가 높음에 따라 활용 가치도 높을 것으로 판단됨. 추후에도 본 과제를 통한 개발품에 대한 보완 및 개선을 통해 질병 예방에 크게 기여할 것으로 사료 됨.

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	수의예방
연구과제명	현장 조류인플루엔자 subtype 감별용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화			
주관연구기관	바이오노트		주관연구책임자	김선애
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	900,000,000원	300,000,000원	-	1,200,000,000원
연구개발기간	2016.09.05. - 2019.09.04. (36개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(산업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①현장 조류인플루엔자 subtype 감별 용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화 · 현장에서 rapid kit의 경우 30분 내, 유전자칩의 경우 5~6시간 내 진단 · 최소검출한계농도 10 ³ EID ₅₀ /ml 이하	Rapid kit는 개발 완료 및 제품의 허가등록 완료. 유전자 칩은 현재 제품허가 등록 예정. · Rapid kit 진단 시간 30분 이내, 유전자 칩 2시간 이내. · 최소검출한계농도 10 ^{4.75} EID ₅₀ /ml · 특이도 100%
② 기술이전 2건 이상, 산업화 2건 이상	기술이전 2건 및 산업화(제품화) 2건 완료.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
												논문	학술발표	정책 활용			홍보 전 시		
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치	SC I	비 SC I			논문 평균 IF				

단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	15%	15%		15%		15%								35%				5%
최종목표	2	1		2	6	2	108				2			2				1
연구기간 내 달성실적	2	종료 후 목표		2	10	2	종료 후 목표				1			2				0
달성율(%)	100%			100%	100%	100%					50%			100%				0%

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	조류 인플루엔자 바이러스 항원의 다중 검출용 스트립
②	조류 인플루엔자 바이러스 항원 및 뉴캐슬병 바이러스와 전염성 기관지염 바이러스의 다중 검출용 스트립
③	조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용한 검사 방법
④	AIV/NDV/IBV Ag Rapid test kit 및 AIV/H5/H7/A Ag Rapid test kit 항원 제작 및 성능평가

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에료 해결	정책 자료	기타
①의 기술	v	v				v	v			
②의 기술	v	v					v			
③의 기술	v	v				v	v			
④의 기술	v	v					v			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	제품 판매처 탐색 및 확보를 통한 수익 창출 및 향후 지속적인 민감도 개선작업을 수행할 계획이며, 향후 국가기관 및 축산 기업체, 농가 등과 연계하여 방역 관리 사업 수행 및 신규 정책 건의 예정
②의 기술	
③의 기술	제품화 및 허가 등록을 통한 제품 출시 및 수익 창출 계획과 함께 현장 진단 장비로 각종 방역 사업 및 시장의 활성화에 기여 기대.
④의 기술	해당 기술을 ① 및 ②의 기술 개발에 활용하였으며 기술의 응용을 통해 기존 개발 품에 대한 개선 (민감도 향상)이 가능 할 것으로 기대됨

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치		15%					15%												
최종목표		1					108												
연구기간내 달성실적																			
연구종료 후 성과창출 계획	종료 1차년도	1					24												
	종료 2차년도						36												
	종료 3차년도						48												

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 증합효소 연쇄 반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	(경상기술료, 매출액 3%) 0천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2개월	실용화예상시기 ³⁾	2020.02
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	유전자 칩 및 관련 시약 생산 설비		

연구개발결과 활용보고서

과제번호	116103-3				
사업명	가축질병대응기술개발				
연구과제명	현장 조류인플루엔자 subtype · 감별용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화				
주관연구기관	(주)바이오노트	주관연구책임자	김선애 (인) (전화: ██████████)		
참여기업	(주)바이오노트, 건국대학교 산학협력단, 한양대학교에리카산학협력단	총 연구기간	2016년 09월 ~ 2016년 09월		
연구개발비 (원)	계	1,200,000,000	총 참여연구원 수 (명)	총 인원	60
	정부출연 연구개발비	900,000,000		연구책임자 인원	9
	기업부담금	300,000,000		참여연구원 인원	51
	기타	0			
연구목표 (200자 이내)	○ 현장 조류인플루엔자 subtype 감별 용 rapid kit 개발 및 산업화 - 조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 용 다중 rapid-kit 개발 - 조류인플루엔자 감별진단 용 (ND, IB) 다중 rapid-kit 개발 - 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별 용 현장형 유전자칩 개발 - rapid-kit 및 유전자칩의 동물용진단기기 등록 - 현장형 진단기기의 현장적용				
주요 연구내용 (500자 이내)	Rapid kit의 경우 조류인플루엔자 및 NDV, IBV에 대하여 반응성과 특이성이 높은 항체를 선별한 후 One step으로 다중 진단이 가능할 수 있도록 다중검사선 구조의 스트립 제작 및 디바이스 구조 결정, 최적의 버퍼 조건 확보 등의 연구를 수행하였으며, 유전자칩은 조류인플루엔자의 표적 염기서열 조사 및 확보, Probe의 설계 및 제작, 민감도와 특이도의 확보와 연관된 chip과 chemistry의 최적조건 탐색 연구가 수행되었다. 연구결과 Rapid kit는 104-5EID50/m의 검출한계, 62%의 민감도, 100%의 특이도, 검출시간 30분 이내의 성능을 구현하였으며, 유전자칩 역시 2시간 30분 이내 최소검출한계 10^5 copies/ μ l의 민감도로 subtype 및 병원성을 감별할 수 있는 특이도 100%의 성능을 확보하였다. 또한 과제수행을 통하여 조류인플루엔자 진단 kit와 관련된 2건의 특허가 출원되었으며, 관련 기술이전 2건, 동물용 체외진단기기 허가등록 2건, 논문 2건 발표(1건은 수락 확정되어 출간 예정), 타연구과제활용 1건의 연구성과가 있다.				

연구결과 및 결과별 활용가능영역	* 주요활용가능영역(이 과제외의 주요활용기능 영역 1가지만 선택하세요.)	
	<input checked="" type="checkbox"/>	산업화활용 (사업화 완료(), 사업화 추진 중())
	<input type="checkbox"/>	교육, 지도 활용
	<input type="checkbox"/>	정책활용
	<input type="checkbox"/>	선행 및 기초 연구활용
	<input type="checkbox"/>	그 밖의 목적으로 활용 (※ 그 밖의 목적 활용을 선택한 경우 구체적 활용실적을 서술합니다.)
<input type="checkbox"/>	연구결과 활용 중단	

구체적 활용실적

	번호	연구결과	활용가능영역	활용년도

연구성과활용 총괄 (해당되는 모든 란 기재)

기술실시	사업화	교육·지도활용	정책활용	타연구에 활용 및 2단계연구에 활용	기타 활용
2 건	2 건	0 건	0 건	1 건	0 건
특허	논문	학술대회 발표	홍보실적	전시회참가	기타홍보
2 건 (국내 : 0 건) (국외 : 0 건)	1 건 (국내 : 0 건) (국외 : 1 건)	2 건 (국내 : 1 건) (국외 : 1 건)	0 건 (국내 : 0 건) (국외 : 0 건)	0 건 (국내 : 0 건) (국외 : 0 건)	0 건
수출계약	수출관련인증	농기계및 농자재 인증			
0 건	0 건	0 건			

연구성과 활용에 따른 예상 기대효과 (200자 이내)	<p><활용계획></p> <ul style="list-style-type: none"> - 지속적인 제품 성능 향상 - 현장 방역 및 모니터링 시스템에 적용 - 기업체 자체 모니터링 시스템으로 활용 - 농림축산검역본부 및 지역 가축방역위생본부에 시범사업 건의 - 세스코에서 운영중인 'Smart-farm' 등 농가에 현장 적용 제안 - 고병원성 조류 인플루엔자 발생 시 현장형 진단기기 지원 <p><기술적 측면></p> <ul style="list-style-type: none"> - 확진 소요시간 감소 및 병원체 분석 가능 - 현장진단기술 분야의 학술적 파급효과 - 타질환 진단기기 개발 응용 토대 <p><경제-산업적 측면></p> <ul style="list-style-type: none"> - 진단키트 제조 단가 감소
-------------------------------------	--

	<ul style="list-style-type: none"> - 동물용 진단기기 시장 활성화 - 제품 수출을 통한 국가 수익 창출 - 조기, 신속 진단 및 방역관리를 통한 축산업 피해 감소 - 산업체 등에서 자체진단 방법으로 이용가능 <p><사회적 측면></p> <ul style="list-style-type: none"> - 국가 및 산업체의 효율적인 방역관리를 통한 안전한 먹거리 확보 - 방역당국의 진단 및 예찰을 통한 신속한 질병전파 위험 차단 - 방역기술 향상을 통한 전세계 조류인플루엔자 피해 감소 - 동물용 체외진단기기 시장 활성화를 통한 농식품분야 일자리 창출
--	---

연구성과 활용시 애로사항 및 건의사항 (500자 이내)	없음
--------------------------------------	----

기술실시

번호	기술명	실시구분	실시유형	기술실시일	기술료
1	조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법"에 관한 기술이전	타기관실시	특허출원	2018-10-11	0
2	"AIV/NDV/IBV Ag Rapid test kit 및 AIV/H5/H7/A Ag Rapid test kit 항원 제작 및 성능평가"에 관한 기술이전	타기관실시	노하우	2019-08-01	0

기술료 징수(사업화 완료이거나 기술실시계약을 체결한 경우만 해당)

징수조건 (0원일경우 일시납)		징수현황 (전년도말/현재)	천원(전년도말)
			천원(현재)
징수조건 (0원일경우 일시납)		징수현황 (전년도말/현재)	천원(전년도말)
			천원(현재)

사업화

번호	사업화명	제품명	업체명	제품용도	사업화여부	사업화형태
1	AIV H5/H7/Pan Ag test kit 제품화	AIV H5/H7/Pan Ag test kit	(주)바이오노트		사업화 예정	기술이전 _기존업체- 상품화
2	AIV/NDV/IBV Ag test kit 제품화	AIV/NDV/IBV Ag test kit	(주)바이오노트		사업화 예정	기술이전 _기존업체- 상품화

교육 및 지도활용 내역

번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)

번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도

타 연구개발사업에의 활용

번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도
1	국내 외 환경 중 야생조류 인플루엔자 바이러스 거동예측 연구	국내 외 환경 중 야생조류 인플루엔자 바이러스 거동예측 연구(III)	송창선	국립환경과학원	2019

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격], 신종품, 프로그램개발 등으로 구분하고, 세부적으로 전부 (건별로) 기록하며, 국외의 경우 반드시 국명을 기록합니다]

구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원등록자명			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
특허출원	조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법	대한민국	-	2018-07-03	10-2018-0077052				
특허출원	조류 인플루엔자 바이러스 항원의 다중 검출용 스트립 및 이의 용도	대한민국	-	2019-08-28	10-2019-0106137				

논문(국내외 전문학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	게재일	SCI구분
1	Limited pathogenicity and transmissibility of Korean highly pathogenic avian influenza H5N6 clade 2.3.4.4 in ferrets	Transboundary and emerging diseases	-				2018-04-19	SCI

국내 및 국제 학술회의 발표(학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다. - 본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소, 국명
1	Infectivity, Pathogenicity and Transmissibility of Korean H5N6 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Pekin ducks and Mallards	노진용	2017-07-23	Indiana Convention Center, Indianapolis, 미국
2	On-site Subtyping and Pathotyping of Avian Influenza Virus (AIV) Using DNA Chip	권나영	2018-11-07	제주 KAL 호텔, 대한민국

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)

번호	홍보유형	매체명	제목	일시

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)								
번호	유형	행사명칭	전시품목	장소	활용년도			
기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)								
번호	일자	활용명칭	활용내역					
연구인력 활용/양성 성과								
번호	인력양성명		인력양성년도	인력양성 대상수				
국제화 협력성과								
번호	유치기간	국적	학위	전공	파견기간	파견국	학위	전공
기타 홍보실적(수상실적)								
번호	일자	홍보명칭	주요내용					
수출계약								
번호	수출명		수출내용	계약일	수출액			
수출관련인증								
번호	인증명		인증기관	인증일				
농기계 및 농자재 인증								
번호	등재번호	상표명	제조업체	구분	등재일자(공시기간)			

실적(1년 동안)

수입대체 효과 (백만원/년)	수출증대 효과 (백만원/년)	매출증대 효과 (백만원/년)	생산성향상 효과 (백만원/년)	고용창출 효과 (인력양성인원수)	그 밖의 효과

향후 기대효과

수입대체 효과 (백만원/년)	수출증대 효과 (백만원/년)	매출증대 효과 (백만원/년)	생산성향상 효과 (백만원/년)	고용창출 효과 (인력양성인원수)	그 밖의 효과

연구성과 활용중단 사유

--

국가연구개발사업의 연구개발결과 활용보고서를 제출합니다.

년 월 일

주관연구기관장 :

직인

농림수산식품기술기획 평가원장 귀하

기술이전 표준계약서(통상실시)

■ 계약 명칭 : "조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 증폭효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법(출원번호 10-2018-0077052)"에 관한 기술이전

2018년 10월 11일

계약사자

주소	경기도 [redacted]	'갑'	서울특별시 [redacted]	'을'
기관	한양대학교 산학협력단	기관	바이오코아(주) 생명공학사업부	
담당자	좌용호(인)	대표이사	황승용	
담당자	산학협력단 임정수	담당자	김승준	
연락처	[redacted]	연락처	[redacted]	
E-mail	[redacted]	E-mail	[redacted]	

한양대학교 에리카산학협력단(이하 "갑"이라 한다)과 바이오코아(주) 생명공학사업부 (이하 "을"이라 한다)은 (갑)이 개발한 "조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 증폭효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법(출원번호 10-2018-0077052)"를 (을)이 실시함에 있어 다음과 같이 계약을 체결한다.

제 1 조 (용어의 정의)

본 계약서에서 사용되는 다음 각호에 기재되어 있는 용어는, 다른 특별한 언급이 없는 한, 각각 다음의 의미를 갖는다.

1. "계약기술"이란 "계약특허"에 관한 기술을 말한다.
2. "계약특허"라 함은 (갑)이 기술원한 조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 증폭효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법(출원번호 10-2018-0077052) 기술을 말한다. 단, 출원중인 산업재산권이 등록되지 아니하는 경우에도 본 계약은 계속 유효하며, (을)은 본 계약상의 이행사항을 성실히 수행하여야 한다.
3. "계약제품"이라 함은 "계약기술"을 사용하여 생산되는 모든 제품(또는 장치, 설비 등)을 말하고, 중간체 또는 원료를 생산, 판매하는 경우 그 중간체나 원료를 말한다.
4. "생산개시"라 함은 (을)이 "계약기술"을 이용하여 "계약제품"을 최초로 생산한 것을 말하며, (갑)은 해당 일을 "생산개시일"이라 한다.

제 2 조 (기술이전의 내용)

- ① (갑)은 (을)이 본 계약의 조건에 따라 대한민국 내에서 "계약기술"을 실시하는 데 동의하여 (을)에게 국내 통상실시권을 허여한다. 단, 국외실시의 경우에는 제3조에 따른다.
- ② 본조 제①항의 통상실시권이라 함은 (을)이 정당하게 "계약제품"을 검증, 시제품 제작 등을 할 수 있는 권리를 말한다.
- ③ (을)은 본 계약 발효일 이후 "계약특허"에 대한 실시권 설정 및 명의이전 등에 소요되는 일체비용을 부담한다.
- ④ (을)은 (갑)의 사전 서면 동의 없이 제3자에게 등 실시권을 제공하거나 양도할 수 없다.

제 3 조 (국외실시)

"국외실시"는 대한민국 이외의 지역에 실시권을 대여하거나 기술을 수출하는 것 (동 지역에서 제품을 생산, 판매하는 행위 포함)을 말하며, (을)이 "계약기술"을 "국외실시"하고자 하는 경우, 사전에 (갑)과 협의하여 본 계약과 별도로 "국외실

시"에 관한 실시계약을 체결하여야 한다.

제 4 조 (계약기간 및 생산개시일 통보)

① 본 계약은 본 계약체결일에 효력을 발생하며, 제9조 제③항 또는 제13조 제①항의 각호 및 제②항에 의하여 종료되지 않는 한 2019년 11월 10일까지 효력을 유지한다.

② (을)은 본 계약체결일로부터 3년 이내에 "생산개시"를 하여야 하며, 생산개시일로부터 1개월 이내에 (갑)에 "생산개시일"을 서면으로 통보하여야 한다. 다만 "생산개시일"은 양 당사자의 합의하에 연기할 수 있다.

제 5 조 (기술이전의 대가)

① (경상기술료) (을)은 본 실시권에 대한 대가로서 "생산개시일"로부터 "계약특허"의 2019년 11월 10일까지 매년 본 "계약제품"에 대한 매출액의 3%를 제6조에 의거 (갑)에 현금으로 지급한다.(부가세 별도)

② 본 계약에 따라 행해진 모든 지불은 (갑)의 고의 또는 중대한 과실로 인해 (을)에게 손해가 발생하지 않는 이상 (을)에게 반환하지 않는다.

제 6 조 (경상기술료 계산)

① (을)은 제5조의 경상기술료를 매년 1월 1일부터 12월 31일까지를 분기로 하여 계산하여 당해 경상기술료를 익년도 3월말까지 (갑)에게 지급한다.

② (을)은 경상실시로 지급 시에 공인회계사에 의해 검증된 경상기술료 계산서와 매출액이 산출된 근거가 기술된 서면보고서를 (갑)에게 제공하여야 한다.

③ (갑)은 경상기술료 계산근거를 확인하기 위하여 직접 또는 대리인으로 하여금 회계 관련자료를 검사하게 할 수 있으며, 이 경우 (을)의 회계 상 오류 등으로 인하여 차액이 발생하는 경우 그 차액을 즉시 (갑)에게 지급하여야 한다. 또한, (갑)에게 지급한 금액과 비교하여 오류 등으로 발생한 차액이 5% 이상인 경우 검사를 위한 제반비용은 (을)이 별도로 부담한다.

제 7 조 (기술의 개량)

(을)이 본 계약의 기간 중 (갑)이 취득하는 "계약특허"의 개량기술에 대한 특허 또는 실용신안등록(출원 중인 것을 포함한다)에 대한 실시권을 취득할 것을 희망하는 때는 (갑) 및 (을)은 당해 개량특허 또는 실용신안등록의 본 계약의 추가 및 당해 추가에 따른 제5조에서 정한 대가 및 기타의 조건변경에 관하여 성실하게 협의하기로 한다.

제 8 조 (신의성실의 의무)

본 계약이 목적하는 바를 상호 충족시키기 위해 필요한 제반사항에 대하여 (갑)은 신의, 성실을 다하여 (을)에게 적극 협조하여야 하며, (을) 또한 본 계약을 성실히 이행하여야 한다.

제 9 조 (면책)

① (갑)은 (을)에 의한 "계약기술"의 실시가 제3자의 특허권 기타 산업재산권을 침해하지 않는 것을 보증하는 것은 아니다.

② 제3자가 "계약기술"을 침해하거나, 침해하려 하고 있는 것을 안 때에는 (갑)과 (을)은 상호간에 그 사실을 통보하며, 상호이익을 위해 협력한다.

③ (을)이 직접 또는 간접으로 "계약특허"의 효력을 다투는 경우에는 (갑)은 본 계약을 해지할 수 있다.

④ "계약특허"에 대한 무효심결이 확정된 경우, 또는 출원 중인 "계약특허"에 대하여 거절결정의 확정 등으로 (을)이 더 이상 "계약기술"을 사용할 수 없을 경우 본 계약은 해지되며, 이에 따라 해지되었을 경우에도 (갑)은 기지급 받은 금액을 환불하지 아니한다.

제 10 조 (비밀보장)

(을)은 "계약기술"이 타에 제공되거나 누설되지 않도록 보안에 유의하여야 하며 이 의무는 ~~근거~~ 원형 및 파용자나 그 승계인을 통하여 사실상 ~~원형의~~ 무단으로 하는 의무를 포함한다. 또한 본 조항은 본 계약이 해제 또는 해지되었을 경우에도 계속 유효하다.

제 11 조 (계약의 변경)

본 계약의 내용은 (갑)과 (을)의 서면합의에 의하여 유효하게 변경될 수 있다.

제 12 조 (불가항력)

본 계약의 어느 일방도 본 계약을 이행함에 있어 천재지변 또는 불가항력으로 발생하거나 기타 일방의 고의, 과실 또는 태만에 의하지 아니한 하자로 인하여 발생한 어떠한 성격의 손실 또는 손해에 대하여도 그 일방은 상대방에게 책임을 지지 아니한다.

제 13 조 (계약의 해지)

① (갑)과 (을)은 다음 각호의 경우에 30일의 기한을 두고 상대방에게 그 이행을 서면으로 최고함으로써 본 계약을 취소할 권리를 가지며 이에 따라 해지되었을 경우에도 (갑)은 기지급 받은 금액을 환불하지 아니하며, (을)은 기술자료를 (갑)

에 반환하고 본 계약상의 모든 권리를 포기하여야 한다.

1. 통보기한 내에 “생산개시일”을 통보하지 아니하거나, “생산개시일” 전이라도 (을)이 생산을 포기한 것으로 인정되는 경우.
2. “생산개시일” 이후 (을)이 조업중단 등으로 실시할 수 없다고 인정될 경우.
3. (을)이 제5조에 따른 실시료를 정당한 이유 없이 지급치 아니할 경우.
4. 기타 본 계약상의 의무를 위반할 경우.

④ 본 계약이 해지 또는 해제되었을 경우, (을)은 스스로 또는 제3자로 하여금 “계약기술”을 실시토록 하거나 “계약제품”의 생산을 행하지 아니한다.

제 14 조 (손해배상)

본 계약상의 의무를 위반한 당사자는 상대방에게 그로 인한 손해를 배상하여야 한다.

제 15 조 (명칭사용)

(을)은 (갑)의 사전 동의 없이는 본 계약과 관련하여 지득한 정보 및 (갑)이 (을)에게 제공한 보고서나 문서의 일부 또는 전부에 대한 그 원본이나 복제, 복사물을 광고 판매촉진, 기타 선전의 목적 및 쟁송상의 자료로 사용하지 아니할 것이며, 또한 상기의 목적으로 (갑)의 명칭을 암시하거나 사용하여서는 아니 된다.

제 16 조 (중요사항의 변경)

(을)이 본 계약체결 후 법인의 주소 등 중요사항을 변경하였을 경우에는 이를 지체 없이 (갑)에 통보하여야 하며, 그 불이행으로 인한 (갑)의 착오는 (을)의 항변으로부터 면책된다.

제 17 조 (분쟁해결)

본 계약과 관련하여 혹은 쌍방의 의무이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우 (갑)과 (을)은 이를 상호 협의하여 원만히 해결토록 노력하여야 하며, 이러한 분쟁이나 이견이 해결되지 않은 경우에는 사단법인 대한상사중재원의 중재규칙에 의하여 해결한다.

제 18 조 (계약의 효력)

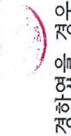
- ① 본 계약의 효력은 쌍방이 서명 날인한 날부터 유효하다.
- ② 본 계약은 (갑)과 (을)간 기술실시에 관한 기본적인 사항을 규정한 것으로 이 전에 (갑)과 (을)간의 모든 문서에 우선한다. 또한 본 계약과 관련 있는 다른 합의나 계약은 이 계약서에 언급되고 서면으로 작성되어 권한 있는 당사자의 서명이 없는 한 그 효력이 없다.

제 19 조 (해석)

본 계약에 명기되지 아니하거나 본 계약상의 해석상 이의가 있는 사항에 대하여는 쌍방의 합의에 의하여 결정한다.

본 계약의 체결을 증명하기 위하여 본 계약서 2통을 작성하여 양 당사자가 각 기명 날인한 후 각 1통씩 보유하기로 한다.

첨부 : 사업자등록증 사본 1부.



기술이전 계약서(노하우-통상실시권)

■ 계약명 : " AIV/NDV/IBV Ag Rapid test Kit 및 AIV/H5/H7/A Ag Rapid test Kit 항원 제작 및 성능평가"에 관한 기술이전



- 사 업 명 : 가축질병대응기술개발사업
- 연구과제명 : 현장 조류인플루엔자 진단용 rapid kit 및 유전자칩 개발 및 산업화
- (대학)연구책임자 : 박승용
- 연구지원기관 : 농림축산식품부
- 연구수행기관 : 농림식품기술기획평가원
- 연구수행기간 : 2016.09.05. ~ 2019.09.04.

제1조(용어의 정의) 본 계약서에서 사용되는 다음 각호에 기재되어 있는 용어는, 다른 특별한 언급이 없는 한, 각각 다음의 의미를 갖는다.

1. "계약기술"[이하 "기술"이라 함]이란 "감"이 보유하고 있는 "AIV/NDV/IBV Ag Rapid test Kit 및 AIV/H5/H7/A Ag Rapid test kit 항원 제작 및 성능평가"에 관한 노하우를 의미한다.
2. "계약제품"이라 함은 "기술"을 사용하여 생산되는 제품을 말하고, 중간체 또는 원료를 생산, 판매하는 경우 그 중간체나 원료를 말한다.
3. "계약기간"이라 함은 본 계약 체결일부터 5년으로 한다.

제2조(기술의 사용방법 및 조건) "기술"의 사용방법 및 조건에 대한 내용은 다음과 같다.

- ① "감"은 "올"에게 본 계약의 조건에 따라 "기술"을 사용할 권리(이하 "사용권"이라 한다)를 부여한다.
- ② 제1조에 기재된 "기술"의 개량, 보완 및 추가실험으로 특허가 출원된 경우는, "감"과 "올"의 협의에 의하여 추가 기술이전계약을 체결할 수 있다.

제3조(이전 및 실시기간) 본 계약의 이전 기간은 첨부된 "기술이전 수행계획서"의 기술이전 기간으로 하며, 기술실시 기간은 제12조에 의하여 헤쳐지

계약당사자
(감)

주소 : 서울시 [redacted]

기관 : 건국대학교 산학협력단
대표 : 단장 송 창 신 (인)

상호 : ㈜바이오노트
대표 : 대표이사 김 진 에 (인)



연구개발자 : 수의학과 송 광-선 교수
수의예과 박 승 용 교수

주소 : 경기도 [redacted]

담당자 : 기술이전팀 김인호 주임, 이동필 변리사
연락처 : [redacted]
이메일 : [redacted]

담당자 : 김동혁 과장, 박현 사원
연락처 : [redacted]
이메일 : [redacted]



2019년 8월 1일

않는 한 지속적으로 유효하다.

제4조(정액기술료) “을”은 “기술”의 이용, 실시의 대가로써 계약체결일 이후 2019년 8월 30일 이내에 “갑”에게 일시불로 금 일천만원정(₩10,000,000)과 부가세 금 일백만원정(₩1,000,000)을 아래와 같이 현금으로 지급한다.

- 기술료: ₩10,000,000원

- 부가세: ₩1,000,000원

- 입금계좌: [REDACTED]

- 예 금 주: [REDACTED]

제5조(신의성실 및 상호협조) ① 본 계약이 목적하는 바를 상호 증속시키기 위해 필요한 제반사항에 대하여 “갑”은 신의성실을 다하여 “을”에게 적극 협조하여야 하며, “을” 또한 본 계약을 성실히 이행하여야 한다.

② “갑”은 계약기간 동안 “을”의 요청이 있을 때에는 제공된 “기술”에 관하여 적극 협조하여야 하며, “을” 또한 “갑”의 요청이 있을 경우 필요한 사항을 “갑”에게 적극 협조하여야 한다.

③ “갑”과 “을”은 “갑”으로부터 본 “기술”의 사용권을 허여 받지 아니한 채3자가 “기술”을 실시하는 것에 대한 증거확보에 노력하여야 하며, 확보된 증거에 대하여는 상호 이를 서면으로 통지하고 필요한 조치를 위하여 협조하여야 한다.

제6조(비밀보장 및 기술보호) “갑”과 “을”은 상대방의 상호 동의 없이 본 계약과 관련하여 취득한 연구 활동 또는 경영상의 비밀을 외부에 누설하여서는 아니 된다.

제7조(기술사용 결과의 귀속) 본 계약을 통해 얻은 기술, 정보, 노하우(Know-How) 등 “기술”과 관련한 지적재산권에 대한 권리는 “갑”에게 귀속되며, 본 “기술”에 기초하여 “갑”과 “을”의 공동 연구에 의하여 도출된 결과물의 경우 “갑”과 “을”의 공동 소유로 할 수 있다.

제8조(권리의무 승계의 제한) “을”은 본 계약상 특약이 없는 한 “갑”의 사

진 서면 동의 없이 “기술”에 대한 사용권의 일부 또는 전부를 타인에게 제하여 또는 양도할 수 없다.

제9조(명칭의 사용 제한) “을”은 “갑”의 사전 동의 없이는 광고, 판매촉진, 기타 선전의 목적 등의 자로로 본 계약과 관련하여 취득한 정보 및 “갑”이 “을”에게 제공한 보고서나 문서의 일부 또는 전부에 대한 그 원본이나 복사물을 사용하여서는 아니 되며, 또한 상기의 목적으로 “갑”의 명칭을 암시하거나 사용하여서는 아니 된다.

제10조(불가항력) 본 계약의 이행에 있어 천재지변 또는 기타 불가항력인 사유로 인하여 발생한 손해 또는 손실에 대해서는 서로 책임을 지지 아니한다.

제11조(면책) 본 계약에 따라 행해진 모든 지불은 “갑”의 고의 또는 중대한 과실로 인해 “을”에게 손해가 발생하지 않는 이상 “을”에게 반환하지 아니한다.

제12조(계약의 해지) ① “갑” 또는 “을”은 다음 각 호의 경우 일정기간의 기한을 두고 상대방에게 시정을 요구한 후 상대방이 불이행하거나 또는 시정할 의사가 없다고 판단될 경우 본 계약을 해지할 수 있다.

- 1. “을”이 제4조의 비용 지급을 정당한 이유 없이 지연하는 경우.
2. “갑” 또는 “을”이 본 계약서상의 중대한 사항을 위반하는 경우.

② “을”이 파산선고를 받는 경우, 본 계약을 즉시 해지할 수 있다.

③ “갑”은 본 계약이 해지되는 경우 “을”이 본 계약과 관련하여 해지 시 까지 취득한 제반자료의 반환을 요구할 수 있다.

④ 본 계약이 해지된 후에도 “갑”과 “을”은 제7조의 책임을 진다.

제13조(기술사용 중지) 본 계약이 해지된 경우 “을”은 즉시 “기술”사용을 중지하여야 한다.

제14조(명칭의 변경) “을”은 본 계약 체결 이후 법인의 주소, 대표 등 주요 사항을 변경하였을 경우에는 이를 지체 없이 “갑”에 통보하여야 하며, 그

불이행으로 인한 “갑”의 손해는 “을”이 배상한다.

제15조(계약의 변경) “갑”과 “을”은 서면 합의에 의하여 본 계약의 내용을 변경할 수 있다.

제16조(계약의 효력) 본 계약은 쌍방이 기명날인한 날부터 효력이 발생한다.

제17조(해석) 본 계약에 명시되지 아니한 사항 및 본 계약의 해석상 이의가 있을 때에는 쌍방 협의 하에 일반적인 관례를 따른다.

제18조(분쟁해결) 본 계약의 이행 또는 쌍방의 의무 이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우에는 쌍방은 이를 원만히 상호협의로 해결하고자 노력하여야 하며, 이러한 분쟁이나 이견이 원만히 해결되지 않을 경우 쌍방은 “사단법인 대한상사중재원”의 중재결정에 따른다.

“갑”과 “을”은 위와 같이 합의하고 이를 증명하기 위하여 본 계약서 2부를 작성하고 각각 서명 날인 후 ‘갑’과 ‘을’이 각각 1부씩 보관한다.

- 첨부 : 1. 법인인감증명서 1부.
2. 사업자등록증 사본 1부.
3. 기술이전 수행계획서 1부.

출원번호통지서

【서지사항】

출원일자 2018.07.03
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(P201805150P)
 출원번호 10-2018-0077052 (접수번호 1-1-2018-0653850-44)
 출원인명칭 한양대학교 에리카산학협력단(1-2012-000855-1)
 대리인 성명 특허법인 다니(9-2008-100121-8)
 발명자 성명 황승용 권나영 김지훈 안정진
 발명의 명칭 조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 증합효소 연쇄 반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법

【서류명】

특허출원서

【참조번호】

P201805150P

【출원구분】

특허출원

【출원인】

【명칭】

한양대학교 에리카산학협력단

【특허고객번호】

1-2012-000855-1

【대리인】

【명칭】

특허법인 다니

【대리인번호】

9-2008-100121-8

【지정된변리사】

진희동, 이세진

【포괄위임등록번호】

2013-010750-7

【발명의 국문명칭】

조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법

【발명의 영문명칭】

A composition and RT-qPCR based chip for detecting avian influenza viruses and method for detecting avian influenza viruses using the same

【성명】

황승용

【성명의 영문표기】

HWANG, Seung Yong

【주인등록번호】

651117-1XXXXXX

【우편번호】

03022

특허허청장

<< 안내 >>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 - * 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 - * 특허료(patent.go.kr) 관속 > 민원서비스(문로드) > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
- 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
- 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 - * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허미팅-PCT/마드리드
 - * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 - * 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
- 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 - * 특허출원 10-2010-00000000, 상표등록출원 40-2010-00000000
- 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
- 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

【주소】 서울특별시 [redacted]
【발명자】
【성명】 권나영
【성명의 영문표기】 KWON, Na Young
【주민등록번호】 931220-2XXXXXX
【우편번호】 26386
【주소】 강원도 [redacted]
【발명지】 [redacted]
【성명】 김지훈
【성명의 영문표기】 KIM, Ji Hoon
【주민등록번호】 800612-1XXXXXX
【우편번호】 15621
【주소】 경기도 [redacted]
【발명지】 [redacted]
【성명】 안정진
【성명의 영문표기】 AN, Jeong Jin
【주민등록번호】 900109-1XXXXXX
【우편번호】 08392
【주소】 서울특별시 [redacted]
【출원언어】 국어

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 1545015687
【부처명】 농림축산식품부
【연구관리 전문기관】 (주)바이오노트
【연구사업명】 가속질병대응기술개발사업 / 가속질병대응기술개발 사업 / 가속질병대응기술개발사업
【연구과제명】 조류인플루엔자 subtype 및 병원성 감별용 현장형 유전자칩 개발 및 산업화
【기여율】 1/1
【주관기관】 농림식품기술기획평가원
【연구기간】 2017.09.05 ~ 2018.09.04
【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.
 대리인 특허법인 다나 (서명 또는 인)

【수수료】
【출원료】 0 면 46,000 원
【가산출원료】 19 면 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 0 항 0 원
【합계】 46,000원
【감면사유】 전담조직(50%감면)[1]
【감면후 수수료】 23,000 원

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

조류인플루엔자 바이러스 검사용 조성물 및 실시간 역전사 증폭효소 연쇄반응을 위한 칩 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법(A composition and RT-qPCR based chip for detecting avian influenza viruses and method for detecting avian influenza viruses using the same)

【기술분야】

【0001】 본 발명은 조류인플루엔자 바이러스를 검사하는 프라이머 조성물 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 조류인플루엔자 바이러스는 NP(nucleocapsid) 단백질과 M(matrix) 단백질의 항원성 차이에 의해 크게 A, B 및 C형으로 구분되고, 이중 A형은 다시 HA(hemagglutinin) 단백질의 항원 특성에 따라 H1형에서 H15형의 아형으로 분류되며 NA(Neuraminidase) 단백질의 항원 특성에 따라 N1형에서 N9형의 아형으로 분류된다. 일반적으로, HA 단백질과 NA 단백질은 조류인플루엔자 바이러스의 분류에 있어 혈청형을 결정하는 항원 단백질로서 이들 단백질을 각각 코딩하는 HA 유전자 및 NA 유전자의 아형 판별에 의해 조류인플루엔자 바이러스의 감별이 이루어진다.

【0003】 조류인플루엔자 바이러스 중 H5형과 H7형에서 나타나는 고병원성 조류인플루엔자 바이러스는 가끔류에 감염시 높은 폐사율을 보이며 국가적으로 많은

경제적 피해를 주는 것으로 알려져 있으며, 고병원성 조류인플루엔자 바이러스와 더불어 H9형 저병원성 조류인플루엔자 바이러스는 산란계 농가 등에서 많은 피해를 일으킬 뿐 아니라 사람으로의 감염에 대한 보고가 이루어지고 있다. 특히, 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 H5N1형은 아시아지역을 중심으로 인체감염이 이루어지고 있으며, 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 H9N2형도 인수공통감염의 보고가 있어 공중보건학적인 위해가 큰 것으로 알려져 있다.

【0004】 따라서, 조류인플루엔자 바이러스의 감염 확산 방지를 위해 조류인플루엔자 바이러스의 혈청형 및 병원성 여부를 조기에 신속하고 정확하게 검사할 수 있는 진단 시스템이 필요한 실정이다. 특히, 현재 국내 양계농장에는 많은 폐사를 동반하는 H9N2형 저병원성 조류인플루엔자 바이러스가 만연되어 있고 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 피해가 심각한 점을 고려할 때 이의 제발에 대비하여 조류인플루엔자 바이러스를 조기에 신속하게 진단할 수 있는 새로운 진단법 개발이 요구된다고 하겠다.

【0005】 이와 관련하여 종래의 조류인플루엔자 바이러스(avina influenza virus: AIV) 진단방법으로는 SPF 종란에서 바이러스 배양 후 혈구응집 반응으로 증식 여부를 확인하여 진단하는 방식, 또는 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction) 방법이나 NASBA 방법을 이용하여 조류인플루엔자 바이러스의 RNA를 증폭한 후 유전자 염기서열 분석을 실시하여 혈청형 및 병원성을 판별하는 방식을 들 수 있으나, 이들 진단방식을 사용할 경우 진단 소요시간이 최소 2일에서 길게는 7일 정도의 기간이 소요되어 공중보건학적인 위해가 큰 조류인플루

엔자 바이러스의 감염 확산을 조기에 차단하는 방역학적 요구에는 부응하지 못하는 한계가 있었다.

【0006】 한편, 대한민국 공개특허 제10-2011-0028188호에서는 실시간 다중 역전사 증합효소 연쇄반응에 의한 일반 인플루엔자 A와 신종 인플루엔자의 동시 검출방법을 개시하고 있고, 대한민국 공개특허 제10-2011-0114978호에서는 멀티플렉스 실시간 RT-PCR을 이용한 신종 및 계절 인플루엔자 바이러스 검출방법을 개시하고 있다. 이들 종래기술들은 리얼타임 방식의 RT-PCR 증폭방법을 이용하여 인플루엔자 바이러스의 RNA 유전자 증폭 및 아형 판별을 함으로써 비교적 단시간에 대량으로 분석이 가능하지만, 멀티플렉스 방식으로는 인플루엔자 바이러스의 다양한 아형 판별과 병원성 분석을 동시에 할 수 없는 한계와 확장성의 제한이 있었다. 특히, 리얼타임 PCR과 같은 분자생물학적 방법을 이용한 조류인플루엔자 바이러스 유전자 진단 방법은 프라이머 및 프로브 부좌부위에 변이가 발생시 위음성의 결과가 초래할 수 있는 단점이 있다.

【0007】 이에 본 발명자들은 고병원성 H5형 조류인플루엔자 바이러스를 특이적으로 진단할 수 있는 프라이머 세트를 개발하고 이를 휴대가능한 실시간 RT-PCR 장치 및 유전자 칩에 적용함으로써 보다 신속하고 비용 경제적인 조류인플루엔자 바이러스 검출이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

【0009】 본 발명의 목적은 조류 인플루엔자 바이러스(Avian Influenza Virus) 검출용 프라이머 세트를 제공하는데 있다

【0010】 또한, 본 발명의 다른 목적은 조류 인플루엔자 바이러스 진단용 조성물을 제공하는 데 있다

【0011】 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 키트를 제공하는 데 있다

【0012】 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 조류 인플루엔자 바이러스 검출 방법을 제공하는 데 있다

【과제의 해결 수단】

【0013】 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스 진단용 프라이머 세트를 제공한다.

【0014】 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 3의 프로브를 추가로 포함하는 RT-PCR수행가능한 조류 인플루엔자 바이러스를 진단용 조성물을 제공한다.

【0015】 또한, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트, 및 서열번호 3의 프로브로 RT-PCR을 수행하여 조류인플루엔자 바이러스 감염 여부에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

【0016】 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 키트를 제공한다. 보다 구체적으로, 상기 키트는 RT-PCR에 사용되는 유전자칩일 수 있다.

【0017】 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트, 및 서열번호 3의 프로브를 포함하는 조성물 및 휴대용 실시간 RT-PCR 장비에서 윈스텝 실시간 RT-PCR을 수행하는 단계를 포함하는 조류인플루엔자 바이러스 진단방법을 제공한다.

【발명의 효과】

【0018】 본 발명의 상기 방법은 조류인플루엔자 바이러스 진단을 장소에 구애됨이 없이 신속하게 수행할 수 있고 비용 경제적이며, 조류인플루엔자 바이러스 아형에 특이적인 프라이머 세트 및 프로브를 함께 이용함으로써 특정 조류인플루엔자 바이러스 진단의 민감도 및 특이도를 높였다.

【도면의 간단한 설명】

【0019】 도 1은 M 유전자 특이적인 프라이머 세트 및 프로브와 일반적인 RT-PCR장비를 이용한 M 유전자 증폭 및 표준곡선을 도시한다.

도 2는 H5형에 특이적인 프라이머 세트 및 프로브와 일반적인 RT-PCR 이용한 H 유전자 증폭 및 표준곡선을 도시한다.

도 3은 M 유전자 특이적인 프라이머 세트 및 프로브와 휴대용 실시간 RT-PCR 장비를 이용한 M 유전자 증폭 및 표준곡선을 도시한다.

도 4는 H5형에 특이적인 프라이머 세트 및 프로브와 휴대용 실시간 RT-PCR 장비를 이용한 H 유전자 증폭 및 표준곡선을 도시한다.

도 5 내지 7은 혈청형 샘플(H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H9, H10, H11, H12)에 대한 M 및 H5형 특이적 프라이머 세트로 휴대용 실시간 RT-PCR 장비를 이용하여 PCR을 수행하여 유전자를 증폭한 결과를 도시한다.

도 8은 휴대용 실시간 RT-PCR 장비에 사용되는 유전자칩을 도시한 것이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0020】 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다

【0021】 실시예 1. 조류 인플루엔자 바이러스 진단을 위한 프라이머 세트의 제작

【0022】 미국 국립생물정보센터의 진(gene)뱅크 데이터베이스의 염기서열과 분변 샘플에서 추출한 조류인플루엔자 바이러스를 종란 접종하여 얻은 시료로부터 차세대 염기서열분석을 통해 얻은 HA gene 염기서열을 BioEdit Sequence Alignment Editor의 ClustalW multiple alignment를 이용해 정렬하여 염기서열 변화가 적은 부위를 분석하고 기타 다른 혈청형의 바이러스와 선정부위의 염기서열을 비교 분석하여 H5형 조류인플루엔자 바이러스에 특이적인 프라이머와 프로브를 제작하였다

【표 1】.

【0023】 【표 1】

M 및 H5 아형에 특이적인 프라이머 세트 및 프로브

Gene	Primer	Primer Sequence (5'-3')	T _m (°C)	Amplicon Size (bp)	TaqMan Probe(5'-3')	T _m (°C)
H5	Forward	CCA GAA TAT GCM TAC AAA ATT GT (서열번호 1)	58-59	200	FAM-TTG TGG AAT GGC ATA CTA GAG TTT ATC GC-BHQ1 (서열번호 3)	66
	Reverse	CCA GTC GCA AGG ACT AAT (서열번호 2)	59			
M	Forward	TGA GTC TTC TAA CCG AGG T (서열번호 4)	59	97	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1 (서열번호 6)	70
	Reverse	CAA AAC ATC YTC AMG TCT CTG (서열번호 5)	58-59			

【0025】 실시예 2. 표준곡선의 설정 및 기초실험 실시

【0026】 제작된 프라이머 및 프로브를 이용하여 표준곡선 설정을 위해 합성 유전자 연속희석 (10⁶ ~ 10¹)을 이용한 기초실험 및 종관점종을 통해 얻은 실제 샘플의 cDNA를 이용한 검증 실험을 하기 표 2의 조건에서 실시하였다. 그 결과를 도 1 및 2에 도시하였다.

【0027】 【표 2】

	Amount	Quant Studio 3	Temp.(°C)	Time	Cycles
RR350A	10ul	Pre-denaturation	95	30sec	1
Primer	10pmole	Denaturation	95	3sec	45
Probe	5pmole	Annealing	56	30sec	
Template	10 ⁶ 10 ⁵ 10 ⁴ 10 ³ 10 ² 10 ¹				
Total	20ul				

【0029】 실시예 3. 휴대용 실시간 RT-PCR 장치를 이용한 테스트 실시

【0030】 실시예 1에서 제작된 H5형 조류인플루엔자 바이러스를 특이적으로 검출하는 프라이머 세트 및 프로브와 조류인플루엔자 바이러스에 공통적으로 존재하는 M(matrix)유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 프로브와 휴대용 실시간 RT-PCR 장비 Gene checker UF-150을 사용하여 다음 표 3의 조건에서 각각 특정 유전자 합성 여부를 확인하였다. 그 결과를 도 3 및 도 4에 도시하였다.

【0031】 【표 3】

- Gene Checker UF-150 TEST_M gene (Tm 56°C, 40 cycle)_10⁶_10⁴_10³_10²

	Amount	Gene checker UF-150	Temp.(°C)	Time	Cycles
Master Mix	5ul	Pre-denaturation	95	30sec	1
Primer	10pmole	Denaturation	95	3sec	40
Probe	5pmole	Annealing	56	30sec	
Template	10 ⁶ _10 ⁴ _10 ³ _10 ²				
Total	10ul				

【0033】 【표 4】

- Gene Checker UF-150 TEST_H5 (Tm 56°C, 40 cycle)_10⁶_10⁴_10³_10²

	Amount	Gene checker UF-150	Temp.(°C)	Time	Cycles
Master Mix	5ul	Pre-denaturation	95	30sec	1
Primer	10pmole	Denaturation	95	3sec	40
Probe	5pmole	Annealing	56	30sec	
Template	10 ⁶ _10 ⁴ _10 ³ _10 ²				
Total	10ul				

【0035】 실시예 4. 휴대용 실시간 RT-PCR 장치를 이용하여 H5형 조류인플루엔자 바이러스 특이적 진단 확인

【0036】 종관검증을 통해 얻은 혈청형별 샘플 (H1,H2,H3,H4,H5,H6,H7,H9,H10,H11,H12)을 이용하여 실시예 1에서 제조된 프라이머 세트 및 프로브(표 1)와 휴대용 RT-PCR 장비인 Gene checker UF-150을 이용하여 H5형 조류인플루엔자 바이러스를 특이적으로 검출하는지 여부를 하기 표 5에 개시된 조건에서 실시간 RT-PCR을 수행하였다.

【0037】 【표 5】

	Amount	Gene Checker UF-150	Temp.(°C)	Time	Cycles
Master mix 40007	5ul	Reverse Transcription	50	5min	1
Primer	10pmole	Pre-denaturation	95	30 sec	1
Probe	5pmole	Denaturation	95	3 sec	35
Total	10ul	Annealing	56	30 sec	

【0040】 그 결과를 도 5 내지 7에 도시하였고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 3으로 표시되는 프로브를 포함하는 홀수 번호 wellId에서는 다양한 아형의 조류인플루엔자 바이러스 중에서 오직 H5형 조류인플루엔자 바이러스에만 특이적으로 반응하여 진단할 수 있음을 확인하였다.

【0041】 또한, 모든 형칭의 조류인플루엔자 바이러스에 존재하는 M(matrix) 유전자를 검출하는 서열번호 4 및 서열번호 5로 표시되는 프라이머 세트와 서열번호 6으로 표시되는 프로브를 포함하는 짝수 번호 wellId에서는 모든 형칭 샘플에서 반응하여 모든 조류인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있음을 확인하였다.

【0042】 따라서, 서열번호 1 내지 6으로 표시되는 프라이머 세트 및 프로브를 이용함으로써 H5형 조류인플루엔자 바이러스에 대한 정확하게 신속한 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.

【0043】

【요약서】

【요약】

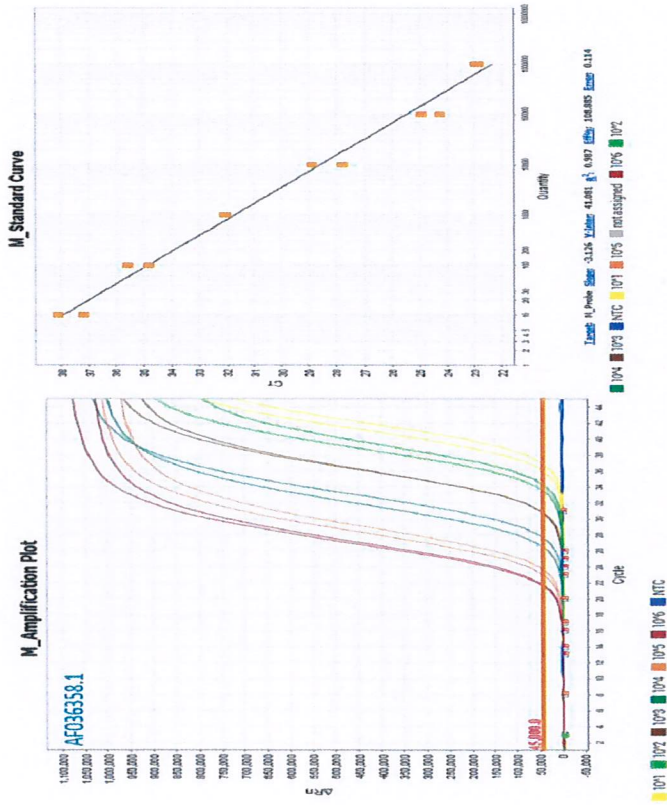
본 발명은 조류인플루엔자 바이러스를 검사하는 프라이머 조성물 및 이를 이용한 조류인플루엔자 바이러스 검사방법에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 조성물 및 휴대용 실시간 RT-PCR 장비를 함께 이용함으로써 보다 신속하고 정확한 비용 효율적인 조류인플루엔자 바이러스 진단 및 검출이 가능하다.

【대표도】

도 6

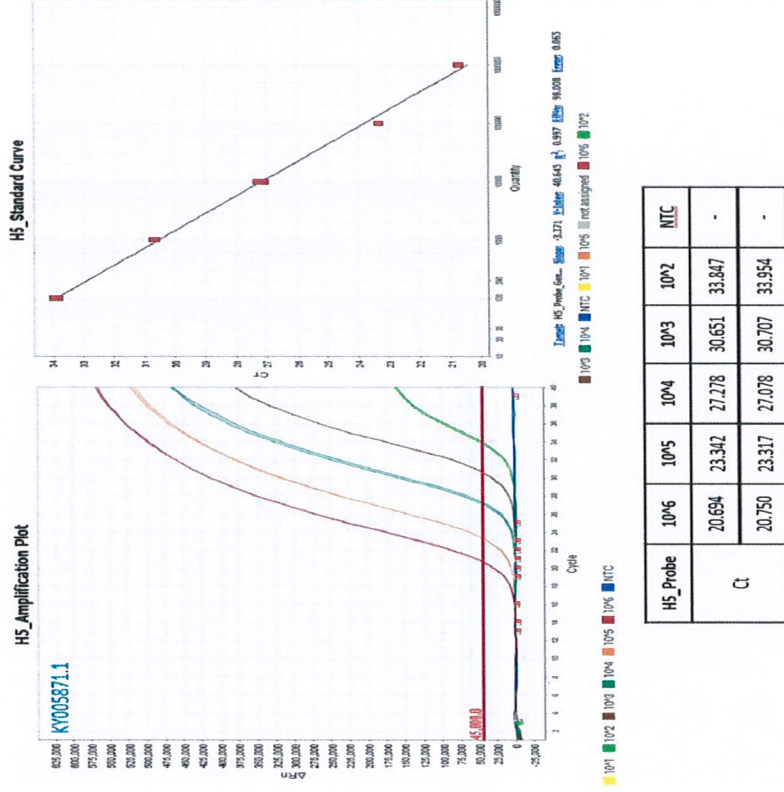
【도면】

【도 1】



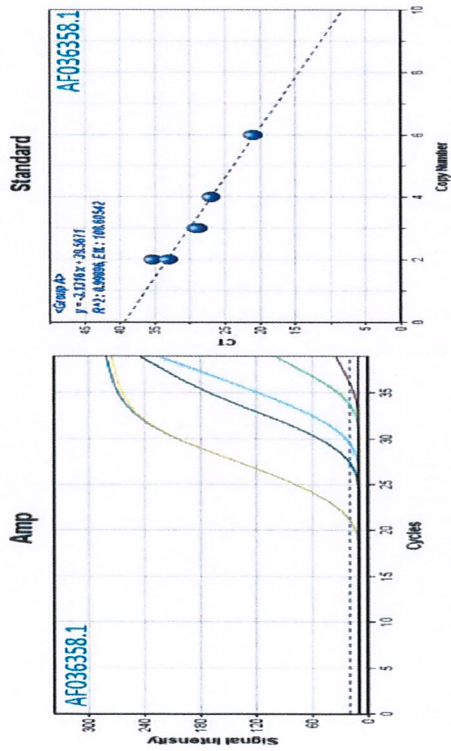
M_Probe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	NTC
Ct	22,844	24,938	27,773	32,100	35,583	37,231	-

【도 2】



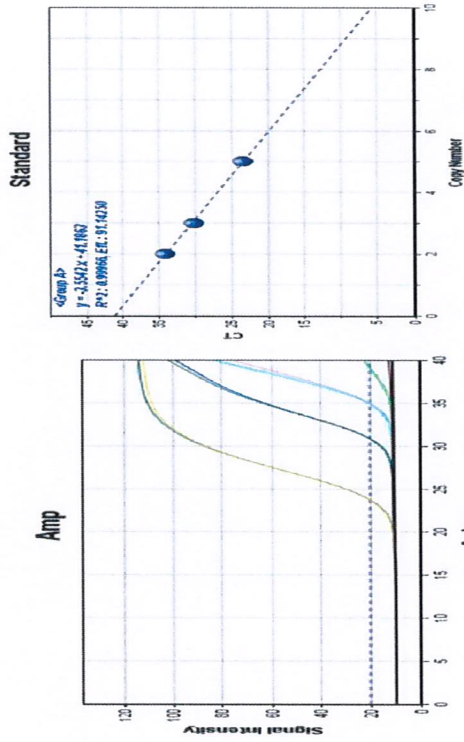
H5_Probe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	NTC
Ct	20,694	20,750	23,342	27,278	30,651	33,847	-

【도 3】



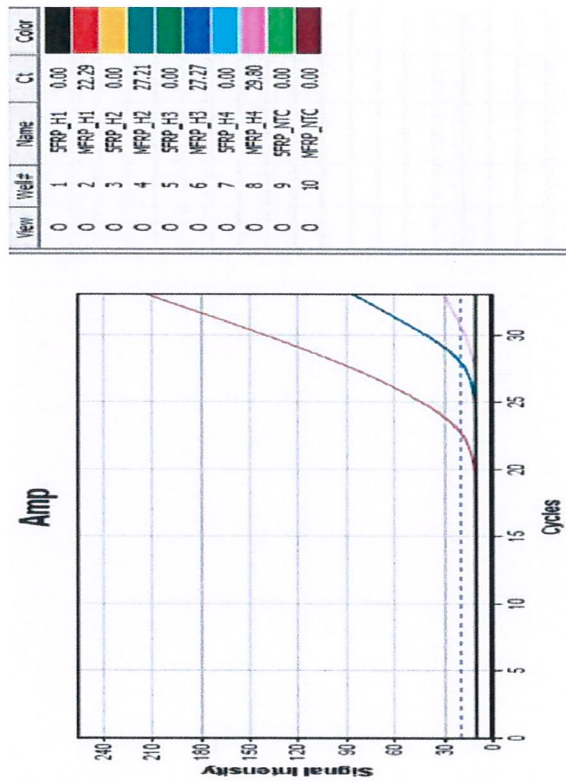
M_Probe	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	NTC
Ct	21.06	27.02	29.03	33.05	-
	21.07	27.04	29.06	35.26	-

【도 4】

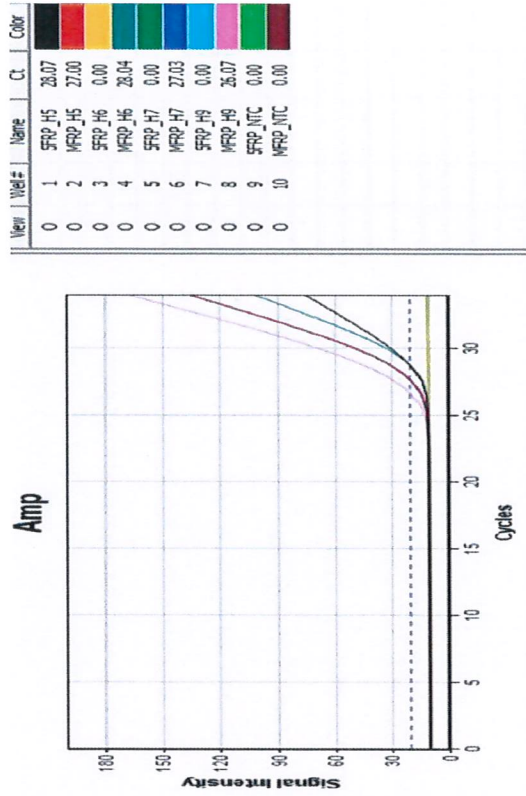


H5_Probe	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	NTC
Ct	23.48	30.26	34.14	-	-
	23.52	30.28	34.2	-	-

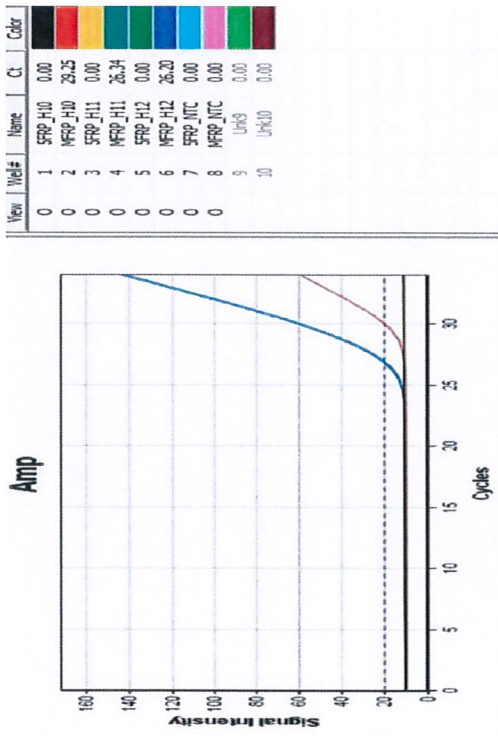
【도 5】



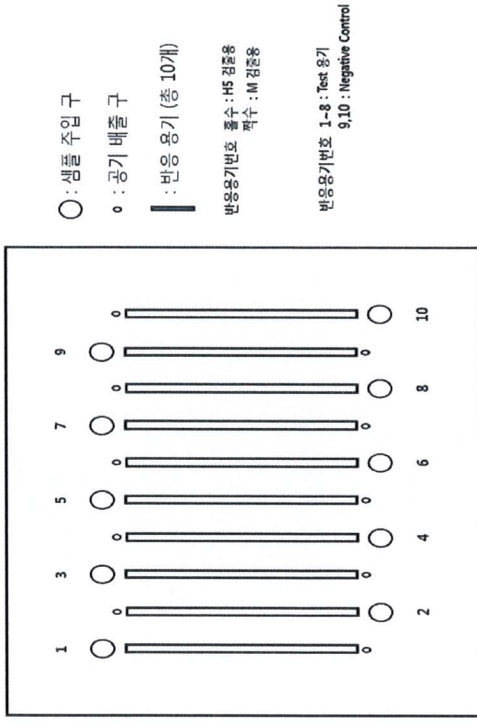
【도 6】



【도 7】



【도 8】



출원 번호 통지서

관인생략

2019-08-28

출원일자 2019.08.28

특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(3)

출원번호 10-2019-0106137 (접수번호 1-1-2019-0888789-78)

출원인명칭 주식회사 바이오노트(1-2003-015509-7)

대리인성명 리앤룩 특허법인(9-2005-100002-8)

발명자성명 조영식 김진애 김정호 김동혁 박현

발명의명칭 조류 인플루엔자 바이러스 항원의 다중 검출용 스트립 및 이의 용도

특허청장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입명수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 경정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patient.go.kr) 접속 > 민원서비스문의로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등특결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받지 못하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허마담-PCT/마드리드>
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 출원번호를 기초로 우리나라에 우선권주출원 시, 선출원이 미국개상태이면, 우선권일부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB439)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 중대한 이의무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등특이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【참조번호】 3

【출원구분】 특허출원

【출원인】 주식회사 바이오노트

【명칭】 1-2003-015509-7

【특허고객번호】 리앤룩 특허법인

【대리인】 9-2005-100002-8

【명칭】 이영필, 이해영, 김병재

【영칭】 2006-052077-1

【대리인번호】 조류 인플루엔자 바이러스 항원의 다중 검출용 스트립 및 이의 용도

【지정된변리사】 Strips for multi-detecting Avian influenza virus antigens and use thereof

【포괄위임등록번호】 조영식

【발명의 국문영칭】 CHO, Yong Shik

【발명의 영문영칭】 610630-1XXXXXX

【발명자】 17097

【성명】 조영식

【성명의 영문표기】 CHO, Yong Shik

【주민등록번호】 610630-1XXXXXX

【우편번호】 17097

【주소】 [Redacted]

【발명자】
【성명】 김선애
【성명의 영문표기】 KIM, Sun Ae
【주민등록번호】 710816-2XXXXXX
【우편번호】 05678
【주소】 [Redacted]
【발명자】
【성명】 김정호
【성명의 영문표기】 KIM, Jung Ho
【주민등록번호】 760908-1XXXXXX
【우편번호】 18477
【주소】 [Redacted]
【발명자】
【성명】 김동혁
【성명의 영문표기】 KIM, Dong Hyuk
【주민등록번호】 810624-1XXXXXX
【우편번호】 15594
【주소】 [Redacted]
【발명자】

【성명】 박현
【성명의 영문표기】 PARK, Hyeon
【주민등록번호】 880912-1XXXXXX
【우편번호】 18423
【주소】 [Redacted]
【출원언어】 국어
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】
【과제고유번호】 1545018057
【부처명】 농림축산식품부
【연구관리 전문기관】 농림식품기술기획평가원
【연구사업명】 가축질병대응기술개발사업
【연구과제명】 조류인플루엔자 H5, H7 subtype 검출 및 감별진단용(AIV, NDV, IBV) 다중 Rapid kit 개발
【기여율】 1/1
【주관기관】 ㈜바이오노트
【연구기간】 2018.09.05 ~ 2019.09.04
【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.
 대리인 리앤록 특허법인 (서명 또는 인)
【수수료】
【출원료】 0 면 46,000 원

【가산출원료】	26 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】	46,000 원	
【감면사유】	증기염(70%감면)[1]	
【감면후 수수료】	13,800 원	

【발명의 설명】**【발명의 명칭】**

조류 인플루엔자 바이러스 항원의 다중 검출용 스트립 및 이의 용도 (Strips for multi-detecting Avian influenza virus antigens and use thereof)

【기술분야】

【0001】 조류 인플루엔자 바이러스 항원의 다중 검출용 스트립 및 이의 용도에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)는 오르소믹소 계통(Family Orthomyxoviridae)에 속하는 RNA 바이러스로서, 혈청형은 A형, B형, C형 등 3가지로 구분된다. 이 중에서도 B형과 C형은 사람에서만 감염이 확인되고 있으며, A형은 사람, 말, 돼지, 기타 포유류 그리고 다양한 종류의 가금과 야생조류에서 감염이 확인되고 있다. 상기 A형 인플루엔자 바이러스의 혈청형은 바이러스 표면의 두 가지 단백질인 혈구응집소(Hemagglutinin; HA)와 뉴라미니다제(Neuraminidase:NA)의 종류에 따라 구분되는데, 지금까지 144종류(HA 단백질 16종과 NA 단백질 9종)가 존재한다. HA는 바이러스가 체세포에 부착하는 역할을 하며, NA는 바이러스가 세포 내로 침투할 수 있도록 하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 인플루엔자 바이러스는 매년 겨울이면 새로운 항원성을 지닌 인플루엔자 바이러스가 유행하여 큰 영향을 미치는 바, 이러한 인플루엔자 바이러스에 대한 검출 및 이를 통한 모니

터링은 매우 중요하다.

【0003】 이와 관련하여, 종래의 조류 인플루엔자 바이러스(avina influenza virus: AIV) 진단방법으로는 SPF 종란에서 바이러스 배양 후 혈구응집 반응으로 증식 여부를 확인하여 진단하는 방식, 또는 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction) 방법이나 NASBA 방법을 이용하여 조류 인플루엔자 바이러스의 RNA를 증폭한 후 유전자 염기서열 분석을 실시하여 혈청형 및 병원성을 판별하는 방식을 들 수 있으나, 이들 진단 방식을 사용할 경우 진단 소요시간이 최소 2일에서 길게는 7일 정도의 기간이 소요되어 공중보건학적인 위해가 큰 조류 인플루엔자 바이러스의 감염 확산을 조기에 차단하는 방역학적 요구에는 부응하지 못하는 한계가 있었다.

【0004】 한편, 대한민국 공개특허 제10-2011-0028188호에서는 실시간 다중역전사 증합효소 연쇄반응에 의한 일반 인플루엔자 A와 신종 인플루엔자의 동시 검출방법을 개시하고 있고, 대한민국 공개특허 제10-2011-0114978호에서는 멀티플렉스 실시간 RT-PCR을 이용한 신종 및 계절 인플루엔자 바이러스 검출방법을 개시하고 있다. 이들 종래기술들은 real-time 방식의 RT-PCR 증폭방법을 이용하여 인플루엔자 바이러스의 RNA 유전자 증폭 및 아형 판별을 함으로써 비교적 단시간에 대량으로 분석이 가능하지만, 멀티플렉스 방식으로는 인플루엔자 바이러스의 다양한 아형 판별과 병원성 분석을 동시에 할 수 없는 한계와 확장성의 제한이 있었다. 특히, 리얼타임 PCR과 같은 분자생물학적 방법을 이용한 조류 인플루엔자 바이러스 유전자 진단 방법은 프라이머 및 프로브 부착부위에 변이가 발생시 위음성의 결과

가 초래할 수 있는 단점이 있다.

【0005】 이러한 기술적 배경 하에서, 조류 인플루엔자 바이러스 항원의 주요 혈청형을 신속하게 검출할 수 있는 다중 검출용 스트림을 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있으나, 아직은 미비한 실정이다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

【0006】 일 양상은 신속 면역크로마토그래피법(Rapid immunochromatography)을 통하여, 조류 인플루엔자 바이러스 A형 공통 항원, 조류 인플루엔자 바이러스 H5 항원, 및 조류 인플루엔자 바이러스 H7 항원을 검출할 수 있는 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트림을 제공하는 것이다.

【0007】 다른 양상은 상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트림을 포함하는 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트를 제공하는 것이다.

【0008】 또 다른 양상은 상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트림의 샘플 패드 상에 생물학적 시료를 첨가하는 단계를 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러스 항원을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

【과제의 해결 수단】

【0009】 일 양상은 (a) 생물학적 시료가 흡수되는 샘플 패드(Sample pad); (b) 상기 샘플 패드 하단에 위치하며, 조류 인플루엔자 바이러스 항원에 결합하는 항체와 결합된 불용성 담체를 포함하는 복수 개의 접합 패드(Conjugation pad); 및

(c) 상기 접합 페드의 일측과 인접하여 위치하며, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원에 결합하는 항체가 고정되어 있는 복수 개의 검사선(Test Line) 및 대조군 항체가 고정되어 있는 대조선(Control Line)을 포함하는 멤브레인을 포함하고;

【0010】 상기 조류 인플루엔자 바이러리스 항원에 결합하는 항체는 조류 인플루엔자 바이러리스 A형 공통 항원에 결합하는 항체(Anti-AIV), 조류 인플루엔자 바이러리스 H5 항원과 특이적으로 결합하는 항체(Anti-AIV H5), 및 조류 인플루엔자 바이러리스 H7 항원과 특이적으로 결합하는 항체(Anti-AIV H7)이며;

【0011】 상기 접합 페드 및 검사선은 상기 조류 인플루엔자 바이러리스 항원에 특이적으로 결합하는 항체에 따라 개별적으로 구비되는 것인, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 스트립을 제공한다.

【0012】 본 명세서에서 사용된 용어, "조류 인플루엔자 바이러리스(Avian influenza virus, AIV)"는 NP(nucleocapsid) 단백질과 M(matrix) 단백질의 항원성 차이에 따라 크게 A, B 및 C형으로 구분된다. 최근 관심이 집중되고 있는 조류 인플루엔자 바이러리스(avian influenza virus, AIV)는 모두 A형에 속하는 바이러리스로서, 바이러리스의 외막에 있는 HA와 NA의 유전자에 따라 HA는 16종류, NA는 9종류로 나누어지는 등 그 혈청형이 다양하고, 다른 혈청형 간에 교차방어가 되지 않는다고 알려져 있는데, AIV의 다양한 혈청형 중 현재까지 발생한 고병원성 조류 인플루엔자(HPAI)는 모두 H5 또는 H7 혈청형에 의한 것으로 알려져 있다. 다만, 종래의 검출 기술으로는 H5형, 또는 H7형 고병원성 조류인플루엔자 바이러리스의 감염 여부를 현장에서 신속하고 정확하게 진단함에 한계를 보이고 있는 실정이며, 이에 대한 기

술 개발이 요구되고 있는 실정이다.

【0013】 본 명세서에 사용된 용어, "항체(antibody)"는 조류 인플루엔자 바이러리스 항원, 예를 들어, 조류 인플루엔자 바이러리스 A형 공통 항원, 조류 인플루엔자 바이러리스 H5 항원, 또는 조류 인플루엔자 바이러리스 H7 항원에 대한 특이적인 항체로서, 완전한 항체, 항체 분자의 항원 결합 단편, 합성 항체, 재조합 항체, 또는 항체 하이브리드(antibody hybrid)를 포함할 수 있다. 한편, 상기 조류 인플루엔자 바이러리스에 관한 서열 정보는 당업계에 이미 알려져 있다. 상기 항체는 단일클론 항체, 이특이적 항체, 비-인간 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fv (scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab')단편, 다이설파이드-결합 Fv(sdfv) 및 항-이디오타임 (항-Id) 항체, 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편을 포함할 수 있다.

【0014】 본 명세서에서 사용된 용어, "특이적으로 결합 (specifically binding)" 은 당업자에게 통상적으로 알려진 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 항원-항체 복합체를 형성할 수 있으며, 또한 면역학적 반응을 하는 것을 의미할 수 있다.

【0015】 상기 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이고, 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합(disulfide bond, SS-bond) 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나누어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타임을 가지고, 서브클래스로 감마1($\gamma 1$), 감마2($\gamma 2$), 감마3($\gamma 3$), 감마4($\gamma 4$), 알파1($\alpha 1$) 및 알

패2(a2)를 가질 수 있다. 경쇄의 분변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가질 수 있다.

【0016】 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립은 변역크로마토그래피법을 통하여, 조류 인플루엔자 바이러스 공통 A형 항원, H5 항원 또는 H7항원을 효과적으로 검출함으로써, 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 감염 여부를 간편하고 신속하게 확인할 수 있다.

【0017】 도 1은 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립의 구조를 개략적으로 나타낸 도이며, 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 스트립은 샘플 패드, 검체 패드, 및 멤브레인을 포함하여 구성될 수 있다.

【0018】 일 구체에 있어서, 상기 샘플 패드는 접합 패드 위에 겹쳐져 증첩 부분을 형성할 수 있으며, 예를 들어, 상기 증첩 부분은 접합 패드 중 가장 상부에 위치하는 제1 접합 패드와 겹쳐진 상태로 마련될 수 있다. 생물학적 시료가 샘플 패드 상에 점적되면, 생물학적 시료는 접합 패드, 우선적으로 제1 접합 패드로 전달되고, 뒤이어 제2 접합 패드, 및 제3 접합 패드로 전달될 수 있다. 여기서, 상기 생물학적 시료는 조류로부터 유래한 것으로서, 이에 제한되는 것은 아니나, 조류로부터 유래한 분변, 뇨, 타액, 콧물, 객담, 및 혈액 등의 가검물을 단독 또는 조합하여 사용할 수 있다.

【0019】 일 구체에 있어서, 상기 접합 패드는 조류 인플루엔자 바이러스 H7 항원과 특이적으로 결합하는 항체와 접합된 불용성 담체를 포함하는 제1 접합 패드, 조류 인플루엔자 H5 항원과 특이적으로 결합하는 항체와 접합된 불용성 담체

를 포함하는 제2 접합 패드, 및 조류 인플루엔자 A형 공통 항원에 결합하는 항체와 접합된 불용성 담체를 포함하는 제3 접합 패드가 순차적으로 적층되어 있는 것일 수 있다.

【0020】 상기 접합 패드는 예를 들어, 폴리에스에테르 또는 유리 섬유 소재로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0021】 상기 불용성 담체로는 금, 은, 백금과 같은 콜로이드상 금속 입자, 산화철과 같은 콜로이드상 금속 산화물 입자, 유황 등의 콜로이드상 비금속 입자 및 합성 고분자로 이루어지는 라텍스 입자, 그 밖의 것을 이용할 수 있다. 콜로이드상 금속 입자 및 콜로이드상 금속산화물 입자에는, 예를 들면, 콜로이드상 금 입자, 콜로이드상 은 입자, 콜로이드상 백금 입자, 콜로이드상 산화철 입자, 콜로이드상 수산화알루미늄 입자 등을 들 수 있다. 특히, 콜로이드상 금 입자는 적색(보라색), 콜로이드상 은 입자는 황색을 나타내는 점에서 바람직할 수 있다. 라텍스 입자로는, 예를 들어 스티렌과 메타크릴산의 공중합체, 스티렌과 이타콘산의 공중합체 등을 들 수 있다. 상기 불용성 담체는 금속 입자일 수 있고, 예를 들어, 콜로이드상 금 입자일 수 있다.

【0022】 상기 제1 접합 패드의 상면은 샘플 패드의 하면과 증첩 부분을 형성할 수 있고, 상기 제1 접합 패드의 하면은 제2 접합 패드의 상면과 증첩 부분을 형성할 수 있으며, 여기서, 상기 제1 접합 패드의 하면은 제2 접합 패드의 상면 중 일부와 증첩 부분을 형성하는 것일 수 있다. 또한, 제3 접합 패드의 상면은 제2 접합 패드의 하면과 증첩 부분을 형성할 수 있으며, 상기 제2 접합 패드의 하면은 제

3 접합 페드의 상면 중 일부와 중첩 부분을 형성하고, 상기 제3 접합 페드의 하면은 멤브레인과 중첩 부분을 형성할 수 있다. 상기와 같이 순차적으로 적층되어 있는 접합 페드는 생물학적 시료 내 존재하는 조류 인플루엔자 바이러스 공통 A형 항원, H5 항원 또는 H7 항원에 대하여, 순차적으로 항원-항체 반응이 유도될 수 있는 조건을 제공하는 역할을 할 수 있다.

【0023】 일 구체에 있어서, 상기 멤브레인은 조류 인플루엔자 바이러스 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 고정되어 있는 검사선(test line) 및 대조군 항체가 고정되어 있는 대조선(control line)을 포함할 수 있다. 상기 검사선 및 대조선은 순서대로 배열되는 것이 바람직하며, 이들 검사선 또는 대조선은 예를 들어, 15 내지 50 mm, 15 내지 45 mm, 15 내지 40 mm, 15 내지 35 mm, 15 내지 30 mm, 15 내지 25 mm, 또는 15 내지 20 mm의 간격으로 배열될 수 있다.

【0024】 상기 멤브레인은 예를 들어, 나이트로셀룰로오스 멤브레인일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0025】 상기 멤브레인에서 검사선 및 대선의 배열은 예를 들어, 접합 페드와 인접한 면으로부터 조류 인플루엔자 H7 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 고정되어 있는 제1 검사선, 조류 인플루엔자 H5 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 고정되어 있는 제2 검사선, 및 조류 인플루엔자 A형 공통 항원에 결합하는 항체가 고정되어 있는 제3 검사선, 및 대조군 항체가 고정되어 있는 대조선이 순차적으로 배열되어 있는 것일 수 있다. 여기서, 상기 대조군 항체는 마우스 IgG 항체 또는 인간 IgG 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0026】 일 구체에 있어서, 상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립은 상기 멤브레인에 구비된 대조선과 근접한 영역에서 검출되어 있으며, 상기 접합 페드 및 멤브레인에서의 항원-항체 반응 후 잔량의 생물학적 시료가 흡수되는 흡수 패드(Absorbent pad)를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 흡수 패드는 셀룰로오스 소재로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0027】 도 2는 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립의 멤브레인에서, 항원-항체 반응의 결과물에 대한 구조를 나타낸 도이며, 도 2에 나타낸 바와 같이, 멤브레인에 고정되어 있는 항체, 항원, 그리고, 불용성 담체와 결합되어 있는 항체를 포함하는 항체-항원-항체 복합체를 형성할 수 있다.

【0028】 일 구체에 따르면, 생물학적 시료에 조류 인플루엔자 바이러스 H7 또는 H5 항원이 존재하는 경우, 상기 멤브레인 상에 위치하는 제1 검사선 또는 제2 검사선, 제3 검사선, 및 대조선에서 각각 항원-항체-항원 복합체를 형성하며, 이에 따라, 상기의 위치에서 총 3개의 밴드가 검출될 수 있다. 또한, 생물학적 시료에 A형 조류 인플루엔자 바이러스로서, H5 및 H7 항원의 다른 혈청형의 항원이 존재하는 경우, 상기 멤브레인 상에 위치하는 제3 검사선, 및 대조선에서 각각 항원-항체-항원 복합체를 형성하며, 이에 따라, 상기의 위치에서 총 2개의 밴드가 검출될 수 있다. 따라서, 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립은 H5형, 및/또는 H7형 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 감염 여부를 현장에서 특별한 검사 장비 없이 간편하고 신속하게 확인 가능하게 할 수 있다.

【0029】 다른 양상은 상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립을 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트를 제공한다.

【0030】 상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트에서, 상기 "조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립", 및 "생물학적 시료" 등에 대해서는 상기한 바와 같다.

【0031】 일 구체예에 있어서, 상기 키트에 사용되는 항체와 불용성 담체, 예를 들어, 항체와 접합된 금 입자는 당업계에 잘 알려져 있는 방법에 의하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 골드 콜로이드 용액을 만들고, 상기 용액 중의 금 입자를 항체와 공유결합시킴으로써 제조될 수 있다. 항체와 접합된 금 입자는 예를 들어, 참조에 의하여 그 전체로서 본 명세서에 포함되는 미국 특허 제5,514,302호 및 제4,313,734호에 개시된 방법에 의하여 제조될 수 있다.

【0032】 또한, 상기 키트는 조류 인플루엔자 바이러스 항원 면역분석 방법에 따라 검출하여 A형 조류 인플루엔자 바이러스, H5형 조류 인플루엔자 바이러스, 및 H7형 조류 인플루엔자 바이러스의 감염 여부를 동시에 확인 및 진단하는데 이용될 수 있다.

【0033】 또 다른 양상은 상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립의 샘플 패드 상에 생물학적 시료를 첨가하는 단계를 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러스 항원을 검출하는 방법을 제공한다.

【0034】 상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원을 검출하는 방법에서, 상기 "조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립", 및 "생물학적 시료" 등에 대해서는 상기한 바와 같다.

【0035】 일 구체예에 있어서, 상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원을 검출하는 조건은 생물학적 시료의 종류, 검출의 목적, 검출 환경 등의 외부 요인에 따라 적의 변경될 수 있다.

【0036】 또한, 상기 방법은 조류 인플루엔자 바이러스 항원을 면역분석 방법에 따라 조류 인플루엔자 바이러스 A형 공통 항원, 조류 인플루엔자 바이러스 H5 항원, 및 조류 인플루엔자 바이러스 H7 항원을 동시에 검출하는데 이용될 수 있다.

【발명의 효과】

【0037】 일 구체예에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립 등에 따르면, 조류 인플루엔자 바이러스 공통 A형 항원, 조류 인플루엔자 바이러스 H5 항원 및/또는 H7항원을 효과적으로 검출해 낼 수 있다.

【0038】 또한, 일 구체예에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립 등에 따르면, 면역크로마토그래피법을 통하여 H5형, 및/또는 H7형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 감염 여부를 현장에서 특별한 검사 장비 없이 간편하고 신속하게 진단할 수 있는 유용한 검사 방법을 제공할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

【0039】 도 1은 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립의 구조를 개략적으로 나타낸 도이다.

도 2는 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립의 멤브레인에서, 항원-항체 반응의 결과물에 대한 구조를 나타낸 도이다.

도 3은 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트의 검출 한계를 평가한 것으로서, H5N3 항원을 포함하는 샘플을 적용한 결과이다.

도 4는 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트의 검출 한계를 평가한 것으로서, H7N2 항원을 포함하는 샘플을 적용한 결과이다.

도 5는 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트의 민감도 및 특이도 평가한 것으로서, 도 5의 (A)는 H1 항원을 포함하는 샘플을 적용한 결과이고, 도 5의 (B)는 H5 항원을 포함하는 샘플을 적용한 결과이며, 도 5의 (C)는 H7 항원을 포함하는 샘플을 적용한 결과이고, 도 5의 (D)는 H9 항원을 포함하는 샘플을 적용한 결과이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0040】 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

【0041】 실시예 1. 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립 및 키트의

제조

【0042】 본 실시예에서는 도 1에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립 및 이를 포함하는 검출용 키트를 제조하였으며, 구체적인 제조 공정은 하기와 같다.

【0043】 1-1. 멤브레인 코팅 공정

【0044】 정제된 Avian Influenza Virus에 대한 항체 중 H7 항원에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 0.75ug/strip의 농도로 PBS에 희석한 뒤, 상기 희석 용액을 나이트로 셀룰로오스 멤브레인 내 T1 검사선 위치에 코팅하였다. 또한, H5 항원에 대하여 특이적으로 결합하는 항체, 및 공통 A형 항원에 결합하는 항체를 각각 0.75ug/strip 농도로 PBS에 희석한 뒤, 상기와 마찬가지로, 각각의 희석 용액을 나이트로 셀룰로오스 멤브레인 내 T2 검사선 및 T3 검사선 위치에 각각 코팅하였다. 마지막으로 대조선(C) 위치에는 마우스 IgG 항체 또는 인간 IgG 항체를 0.75ug/strip의 농도로 코팅하였다.

【0045】 1-2. 금 접합체 제조 공정

【0046】 정제된 Avian Influenza Virus에 대한 항체 중 H7에 대하여 특이적으로 결합하는 항체, H5에 대하여 특이적으로 결합하는 항체, 및 공통 A형 항원에 결합하는 항체 각각을 금 콜로이드(Gold colloid)와 결합시켰다. 즉, 염화금을 아스코빅산 용액으로 환원 시켜 Plain gold 를 제조한 후 각각의 항체를 첨가하면서 40nm 크기의 항체가 결합된 골드 입자를 532nm 에서 흡광도가 10⁴/l이 되도록 제조하였다. 여기에 결합된 항체를 안정화시키기 위하여 BSA 용액을 첨가하였다.

상기 금 입자와 항체가 결합된 각각의 금 집합체를 각각 6.6ul/strip씩 혼합하고, 플리에스테르 또는 유리 섬유에 적서 건조시켜 집합 페드를 제조하였다.

【0047】 1-3. 흡습 페드 및 집합 페드의 제조

【0048】 흡습 페드 및 집합 페드는 반응 용액이 잘 흡수될 수 있도록 건조하여 제조하였다.

【0049】 1-4. 각 구성의 조립 공정

【0050】 상기에서 제조된 각각의 멤브레인 및 페드들을 오른쪽부터 샘플 페드, 집합 페드, 나이트로 셀룰로오스 멤브레인, 마지막으로 흡습페드를 각각 도 1에 나타낸 바와 같이, 중첩되게 결합하고 4.0mm/스트림 크기로 절단하였다. 이렇게 절단된 스트림을 최종 디바이스의 하판에 넣고 상판을 덮어 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트를 제조하였다.

【0051】 실시예 2. 조류 인플루엔자 바이러스 항원의 검출 실험

【0052】 본 실시예에서는 조류로부터 채취한 분변을 검체 회석액으로 회석하여 샘플을 제조한 후, 이를 상기 실시예 1에서 제조된 키트의 샘플 페드, 구체적으로 검체 적용홀에 적용하였다. 이때 샘플에 Avian Influenza Virus 항원이 일정량 이상 존재하면 집합 페드의 금 입자에 결합되어 있는 Avian Influenza Virus를 검출할 수 있는 특이 항체와 1차적으로 결합하게 된다. 이후, 상기 결합체는 면역 크로마토그래피법 원리에 의해 멤브레인을 따라 이동하게 되면서 멤브레인의 특정 위치에 있는 공통 A형, H5형 또는 H7형 항원에 특이적인 항체와 2차적으로 결합하

여 항체-항원-항체 복합체를 형성하게 된다. 상기 항체-항원-항체 복합체는 나이트로 셀룰로오스 멤브레인 상에서 대조 밴드와 함께 각각 T1 검사선(H7 항원 검출), T2 검사선(H5 항원 검출), T3 검사선(공통 A형 항원 검출) 위치에서 보라색 밴드로 관찰된다.

【0053】 2-1. 검출 한계 평가

【0054】 본 실시예에서는 2' HA unit의 H5N3항원 및 2' HA unit의 H7N2 항원을 대상으로, H5 항원 또는 H7 항원에 대한 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트의 검출 한계를 평가하였다. 상기 항원을 포함하는 검체를 2진 희석하면서, 이에 따른 샘플을 제조하였으며, 상기 각각의 샘플의 적용에 따른 T1 내지 T3 검사선에서의 검출, 즉 밴드의 형성을 관찰하였다.

【0055】 H5 항원 또는 H7 항원에 대한 검출 한계를 평가한 결과는 도 3 및 표 1에 나타낸 바와 같다.

【표 1】

검체 희석 배수	H5N3 (RP159503) (Titer : 2' HA unit)	
	AIV A (T1)	AIV H5 (T2)
2 ⁰	34	20
2 ⁻¹	30	14
2 ⁻²	20	7
2 ⁻³	12	1-3
2 ⁻⁴	7	1-3
2 ⁻⁵	5	1
2 ⁻⁶	1-3	trace
2 ⁻⁷	1	trace
2 ⁻⁸	trace	-
2 ⁻⁹	-	-

【0057】 그 결과, 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트를 사용하여 H5N3 항원을 검출한 결과, H7 항원과 관련된 T1 검사선에서는 어떠한 밴드도 관찰되지 않은 반면, 공통 A형 항원과 관련된 T3 검사선에서는 검체 희석배수가 2⁷인 수준의 샘플까지 밴드가 관찰되었다. 또한, H5 항원과 관련된 T2 검사선에서는 검체 희석배수가 2⁵인 수준의 샘플까지 검출할 수 있음을 확인하였다.

【0058】 H7 항원에 대한 검출 한계를 평가한 결과는 하기 도 4 및 표 2에 나타낸 바와 같다.

【0059】 【표 2】

검체 희석 배수	H7N2(RP150703) (Titer : 2 ⁸ HA unit)		
	AIV A (T1)	AIV H5 (T2)	AIV H7 (T3)
2 ⁰	40	-	20
2 ⁻¹	34	-	12
2 ⁻²	26	-	7
2 ⁻³	14	-	5
2 ⁻⁴	10	-	3
2 ⁻⁵	5	-	1-3
2 ⁻⁶	3	-	1
2 ⁻⁷	1-3	-	-
2 ⁻⁸	1	-	-
2 ⁻⁹	Trace	-	-

【0060】 그 결과, 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트를 사용하여 H7N2 항원을 검출한 결과, H5 항원과 관련된 T2 검사선에서는 어떠한 밴드도 관찰되지 않은 반면, 공통 A형 항원과 관련된 T3 검사선에서는 검체 희석배수가 2⁶인 수준의 샘플까지 밴드가 관찰되었다. 또한, H7 항원과 관련된 T1 검사선에서는 검체 희석배수가 2⁶인 수준의 샘플까지 검출할 수 있음을 확인하였다.

【0061】 2-2. 민감도 및 특이도 평가

【0062】 본 실시예에서는 H5, H7, H1, 또는 H9 항원을 포함하는 샘플 (H1N1, H5N3, H7N2, 또는H9N2)을 사용하여, H5 항원 또는 H7 항원에 대한 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트의 민감도 및 특이도 등을 확인하고자 하였다. 각각 샘플을 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트에 적용한 후, 검사선에서의 밴드 형성을 육안으로 확인하였다.

【0063】 한편, 본 실시예에서 사용한 샘플에 대한 정보는 하기 표 3에 나타낸 바와 같다.

【0064】 【표 3】

샘플	Titer
H1N1	2 ⁸ HA unit
H5N3	2 ⁷ HA unit
H7N2	2 ⁸ HA unit
H9N2	2 ⁸ HA unit

【0065】 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, H5 항원을 포함하는 샘플을 적용한 경우 대조선, T2 검사선, 및 T3 검사선 위치에서 총 3개의 밴드가 검출되었고 (도 5의 B), H7 항원을 포함하는 샘플을 적용한 경우 대조선, T1 검사선, 및 T3 검사선 위치에서 총 3개의 밴드가 검출되었다(도 5의 C). 또한, H1 항원 또는 H9 항원을 포함하는 샘플을 적용한 경우 대조선, 및 T3 검사선 위치에서 총 2개의 밴드만이 검출되었다(도 5의 A 또는 D). 즉, 이러한 실험결과는 일 구체에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트는 조류 인플루엔자 바이러스 H5 항원 및

/또는 H7항원을 효과적으로 검출해 낼 수 있음을 나타내는 것이다.

【정구범위】

【정구항 1】

- (a) 생물학적 시료가 흡수되는 샘플 패드(Sample pad);
- (b) 상기 샘플 패드 하단에 위치하며, 조류 인플루엔자 바이러스 항원에 결합하는 항체와 접합된 불용성 담체를 포함하는 복수 개의 접합 패드(Conjugation pad); 및

(c) 상기 접합 패드의 일측과 인접하여 위치하며, 조류 인플루엔자 바이러스 항원에 결합하는 항체가 고정되어 있는 복수 개의 검사선(Test line) 및 대조군 항체가 고정되어 있는 대조선(Control line)을 포함하는 멤브레인을 포함하고,

상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원에 결합하는 항체는 조류 인플루엔자 바이러스 A형 공통 항원에 결합하는 항체(Anti-AIV), 조류 인플루엔자 바이러스 H5 항원과 특이적으로 결합하는 항체(Anti-AIV H5), 및 조류 인플루엔자 바이러스 H7 항원과 특이적으로 결합하는 항체(Anti-AIV H7)이며,

상기 접합 패드 및 검사선은 상기 조류 인플루엔자 바이러스 항원에 특이적으로 결합하는 항체에 따라 개별적으로 구비되는 것인, 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립.

【정구항 2】

정구항 1에 있어서, 상기 불용성 담체는 항체와 접합된 금 입자인 것인, 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 스트립.

【청구항 3】

청구항 1에 있어서, 상기 복수 개의 접합 페드는 샘플 페드는 샘플 페드 하단에 적층되어 있는 것인, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 스트립.

【청구항 4】

청구항 3에 있어서, 상기 복수 개의 접합 페드는 조류 인플루엔자 H7 항원과 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 제1 접합 페드, 조류 인플루엔자 H5 항원과 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 제2 접합 페드, 및 조류 인플루엔자 A형 공통 항원에 결합하는 항체를 포함하는 제3 접합 페드가 순차적으로 적층되어 있는 것인, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 스트립.

【청구항 5】

청구항 1에 있어서, 상기 접합 페드는 폴리에스테르 또는 유리 섬유 소재로 이루어지는 것인, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 스트립.

【청구항 6】

청구항 1에 있어서, 상기 멤브레인은 상기 접합 페드와 인접한 면으로부터 조류 인플루엔자 H7 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 고정되어 있는 제1 검사선, 조류 인플루엔자 H5 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 고정되어 있는 제2 검사선, 및 조류 인플루엔자 A형 공통 항원에 결합하는 항체가 고정되어 있는 제3 검사선, 및 대조군 항체가 고정되어 있는 대조선이 순차적으로 배열되어 있는 것인, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 스트립.

【청구항 7】

청구항 1에 있어서, 상기 멤브레인은 나이트로셀룰로오스 멤브레인인 것인, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 스트립.

【청구항 8】

청구항 1에 있어서, 상기 멤브레인에 구비된 대조선과 근접한 영역에서 접촉되어 있으며, 상기 접합 페드 및 멤브레인에서의 항원-항체 반응 후 잔량의 생물학적 시료가 흡수되는 흡수 페드(Absorbent pad)를 추가로 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 스트립.

【청구항 9】

청구항 8에 있어서, 상기 흡수 페드는 셀룰로오스 소재로 이루어지는 것인, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 스트립.

【청구항 10】

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 따른 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 스트립을 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출용 키트로서,

상기 키트는 A형 조류 인플루엔자 바이러리스, H5형 조류 인플루엔자 바이러리스, 및 H7형 조류 인플루엔자 바이러리스의 감염 여부를 동시에 확인할 수 있는 것인, 키트.

【청구항 11】

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 따른 조류 인플루엔자 바이러리스 항원 검출

용 스트립의 샘플 페드 상에 생물학적 시료를 첨가하는 단계를 포함하는, 조류 인플루엔자 바이러스 항원을 검출하는 방법으로서,

상기 방법은 A형 조류 인플루엔자 바이러스, H5형 조류 인플루엔자 바이러스, 및 H7형 조류 인플루엔자 바이러스의 감염 여부를 동시에 확인할 수 있는 것인, 방법.

【요약서】

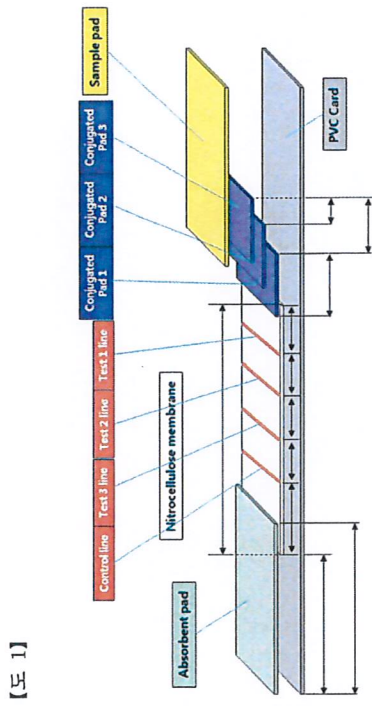
【요약】

조류 인플루엔자 바이러스 항원의 다중 검출용 스트립 및 이의 용도에 관한 것으로서, 조류 인플루엔자 바이러스 A형 공통 항원, 조류 인플루엔자 바이러스 H5 항원, 및 조류 인플루엔자 바이러스 H7 항원을 동시에 검출할 수 있는 검출용 스트립, 상기 검출용 스트립을 포함하는 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검출용 키트, 및 상기 검출용 키트를 이용하는 조류 인플루엔자 바이러스 항원을 검출하는 방법을 제공한다.

【대표도】

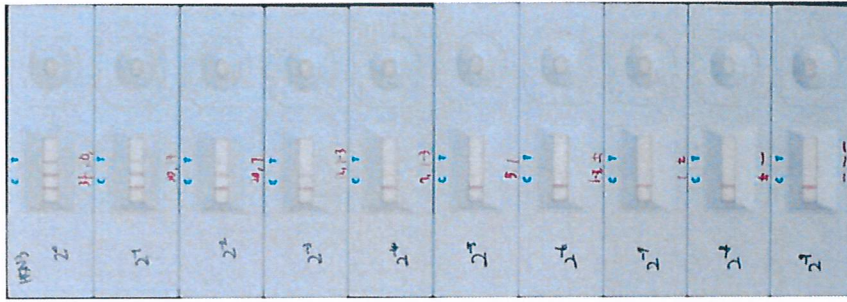
도 1

【도면】



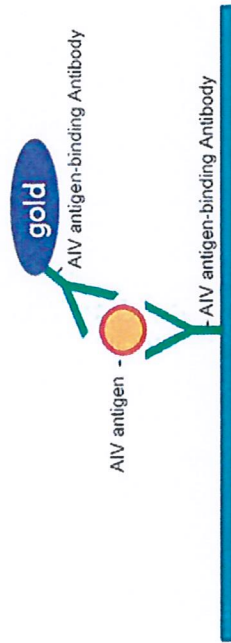
【도 1】

【도 3】

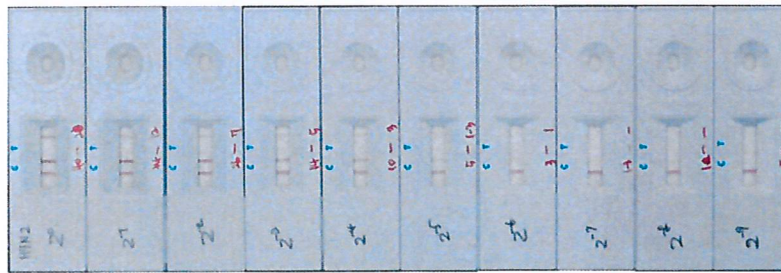


【도 2】

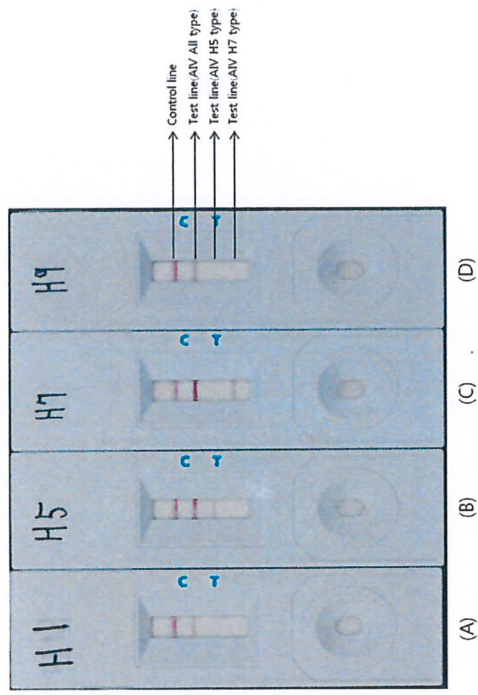
【도 2】



【도 4】



【도 5】



제 109 - 112 호


동물용의약품등 제조
 수입

품목 허가증

1. 업 체 명 : 주식회사 바이오노트
2. 업 종 : 동물용의약품등 제조업
3. 제 품 명 : 인수공통전염병면역검사시약(Anigen Rapid AIV H5/H7/Pan Ag Test Kit, 수출용)[3]
4. 구 분 : 동물용의료기기
5. 허 가 조 건 : _
6. 허가번호 : 제 109 - 112 호
7. 최초 허가 연 월 일 : 2019.08.27
8. 부 표 : 별 첨

동물용의약품등취급규칙 제 11 조 및 제 16 조 제 4 항 따라 위와 같이 허가 (조건부허가)합니다.

2019 년 8 월 27 일

농림축산검역본부장 

제 109 - 111 호

동물용의약품등 [■]제조
[]수입

품목 허가증

1. 업 체 명 : 주식회사 바이오노트
2. 업 종 : 동물용의약품등 제조업
3. 제 품 명 : 인수공통전염병면역검사시약(Anigen Rapid AIV/NDV/IBV Ag Test Kit , 수출용)[3]
4. 구 분 : 동물용의료기기
5. 허 가 조 건 : _
6. 허가번호 : 제 109 - 111 호
7. 최초 허가 연 월 일 : 2019.08.27
- 8.부 표 : 별 첨

동물용의약품등취급규칙 제 11 조 및 제 16 조 제 4 항 따라 위와 같이 허가 (조건부허가)합니다.

2019 년 8 월 27 일

농림축산검역본부장



Limited pathogenicity and transmissibility of Korean highly pathogenic avian influenza H5N6 clade 2.3.4.4 in ferrets

J.-Y. Noh¹ | D.-H. Lee² | S.-S. Yuk¹ | J.-H. Kwon¹ | E.-O. Tseren-Ochir¹ | W.-T. Hong¹ | J.-H. Jeong¹ | S. Jeong¹ | C.-S. Song¹

¹Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea

²US National Poultry Research Center, US Department of Agriculture, Athens, GA, USA

Correspondence

Chang-Seon Song, Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea.
Email: songcs@konkuk.ac.kr

Funding information

Korea Forest Service, Grant/Award Number: 1161020031H0000; Animal Disease Management Technology Development Program; the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs

1 | INTRODUCTION

The Asian H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 (Gs/GD) lineage of highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) has become widespread and evolved through antigenic shift and drift, affecting poultry, wild birds and humans (Neumann, Chen, Gao, Shu, & Kawaoaka, 2010). HPAIV has been a continued threat to public health, and there have been more than 800 confirmed human cases of Gs/GD lineage H5 HPAIV reported to the World Health Organization since 2003, nearly 60% of which were fatal. During the last two decades, the Gs/GD lineage of HPAIV has undergone genetic divergence into multiple hemagglutinin (HA) clades and subclades (Group, 2008). HPAIV bearing the HA gene of the H5 clade 2.3.4.4 in combination with several different neuraminidase (NA) segments from low-pathogenic avian influenza (LPAI) has been identified in China since 2008, followed by global dissemination of H5 clade 2.3.4.4 since 2014 (Lee et al., 2015). In particular, H5N6 HPAI viruses are of great concern to both the poultry industry and public health because they have led to at least 155 outbreaks, including 15 human infections and nine deaths in China (Li et al., 2017).

At least 94 genotypes of H5N6 clade 2.3.4.4 HPAIV were detected through surveillance of live poultry markets in China during

2014–2016 (Bi et al., 2016). In South Korea, five novel reassortant H5N6 viruses containing different polymerase acidic (PA) and non-structural (NS) genes of Eurasian LPAI viruses caused outbreaks in poultry and wild birds in late 2016, including the G1.1.9 genotype that seems to have originated from the H5N6 viruses circulating in the Guangdong Province of China (Bi et al., 2016; Jeong et al., 2017; Kwon et al., 2017; Lee, Torchetti, Killian, DeLiberto, & Swayne, 2017; Lee, Song et al., 2017). Although no human infections have been reported in Korea, previous cases of H5N6 virus human infections in China highlight the need for better understanding of the replication, pathogenesis and transmission of outbreak strains in mammalian models. Here, we experimentally infected ferrets with an H5N6 isolate for assessment of the potential risk of human infection (Lee, Song et al., 2017).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Viruses and cells

The index H5N6 virus used in this study was isolated from a faecal sample of a Mandarin duck (*Aix galericulata*) in South Korea on 28 October 2016. A/Mandarin duck/Korea/K16-187-3/2016 (H5N6)

[Md/Kr/2016 (H5N6)] (Kwon et al., 2017). The virus was propagated in 10-day-old embryonated specific pathogen-free eggs at 37°C, clarified by centrifugation and frozen in aliquots at -80°C before use. Viral stocks were titrated to the egg infectious dose 50% (EID₅₀) and tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀) by inoculating eggs and Marvin-Darby canine kidney (MDCK) cells with serially diluted virus.

2.2 | Animal experiment

To evaluate the pathogenesis and transmissibility of the Md/Kr/2016 (H5N6), nineteen 6-month-old female ferrets (Dooyeol Bio-tech, Seoul, Korea) were used. All animal procedures were performed in the animal biosecurity level 3 (ABL3) facilities at the Konkuk University, Korea. This study was reviewed, approved and supervised by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Konkuk University (permit number: KU162211). The ferrets were confirmed to be serologically negative for type A influenza by nucleoprotein (NP)-ELISA before the study, and baseline body weights and temperatures were measured before inoculation. Methods used to evaluate the pathogenicity and transmissibility are detailed in Appendix 1. Briefly, nine ferrets were inoculated with the virus and four ferrets were inoculated with phosphate-buffered saline as a mock control for the pathogenesis study. For the transmission study, three of nine virus-inoculated ferrets were randomly allocated in different cages. From the following day, each of virus-inoculated ferrets cohoused with a naive ferret and another naive ferrets were housed in a respiratory droplet (RD) transmission cage adjacent to them.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Inoculated ferrets exhibited no overt clinical signs of infection such as respiratory symptoms or weight loss. The mean maximum increase in body temperature was 1.3°C above baseline. Viral excretion titres from nasal washes were in the range of 10^{7.7} to 10^{8.3} EID₅₀/ml on 1, 3 and 5 days post-infection (dpi). The number of ferrets that shed the virus, as evaluated by oropharyngeal swabs, slowly increased from 1 dpi (3/9 on 1 dpi, 7/9 on 3 dpi individually) and shedding peaked at 5 dpi in the range of 10^{7.7} to 10^{2.9} EID₅₀/ml. The number of ferrets that shed the virus gradually decreased at 9 dpi (2/3) and 11 dpi (1/3), and no ferrets shed the virus after 13 dpi (Figure 1). All three inoculated ferrets showed seroconversion (HI = 512) at 14 dpi by hemagglutination inhibition assay. Virus was not detected in rectal swabs during the entire experimental period. From tissue homogenates, viruses were detected in the nasal turbinate and brain of all inoculated ferrets at titres ranging from 10^{1.7} to 10^{2.3} EID₅₀/ml. Virus was also detected in the trachea (1/3 at 3 dpi, 2/3 at 5 dpi) and lung (1/3 at 5 dpi) in the range of 10^{6.9} to 10^{2.3} EID₅₀/ml (Figure 2). Virus was not detected in intestinal tissue, spleen, or kidney, indicating that the virus did not induce systemic infection.

In the transmission study, direct contact animals and RD-contact animals did not show any clinical signs of infection, virus

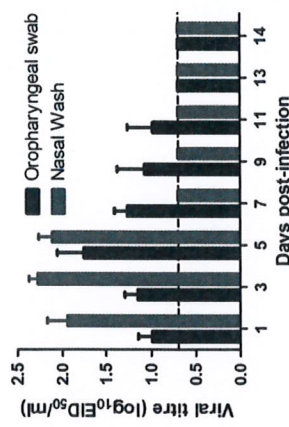


FIGURE 1 Viral shedding after inoculation on ferret model. On 3pi and 5dpi, three ferrets were euthanized for characterization of viral replication in tissues. (n=9 on 1, 3dpi; n=6 on 5dpi; n=3 on 7–14dpi)

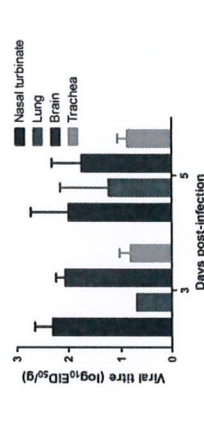


FIGURE 2 Viral replication in tissues on ferret model. Three ferrets were euthanized at 3 and 5 dpi. Virus was not detected in liver, intestine, spleen and kidney

shedding or seroconversion. According to the above observations, this H5N6 HPAIV was able to infect and replicate in the respiratory tract of ferrets, but it showed limited virulence in inoculated ferrets and was not transmissible to either the direct or RD-contact models. In contrast to this study, Sun et al. reported that the G1 genotype of H5N6 reassortant viruses was capable of contact transmission in ferrets (Sun et al., 2016). This might be due to the difference in receptor binding sites (RBS) of HA proteins, polymerase basic proteins PB2 and PB1, and NS proteins from different origins.

Although the polybasic cleavage site in the HA gene of Md/Kr/2016 (H5N6) implies high pathogenicity in poultry, this exhibited no virulence in ferrets. In detail, despite the presence of a 129 deletion (Δ) and H151T (H5 numbering) in the deduced HA protein, two mutations in the 130-loop (S133L and S137A) and one mutation in the 220-loop (Q227R) (H3 numbering), which are associated with increased α2,6 sialic acid (human-type receptor) binding, were not present in the RBS of the HA protein of Md/Kr/2016 (H5N6) (Yang et al., 2007) (Table 1). Additionally, mutations related to pan-demetic potential (glycosylation site at position 158–160 HA) and five

TABLE 1 Molecular characteristics analysis associated with viral pathogenicity, transmissibility and antiviral resistance

Virus	HA		133 ^a		NA		PB2 ^b		M2 ^c		NS1							
	Clavage site	129A	155	160	187	193	196	137	222	228	318	275	293	627	701	31	Deletion	92
Md/Kr/2016 (H5N6)	RERRRRK ^a	T	NDA	N	N	K	SGVSS	QVNGQGG	T	H	R	E	D	S	S	Yes	E	
Guangzhou/39715/2014 (H5N6)	RERRRRK ^a	L	T	NDI	N	N	K	LVGSA	QVNGQRG	T	H	R	K	D	S	Yes	E	
Yunnan/0127/2015 (H5N6)	RERRRRK ^a	S	T	NDA	N	N	K	LVGSA	QVNGQRG	T	H	R	K	D	N	No	E	
DK/EC/50908/2014 (H5N6)	RERRRRK ^a	L	I	NDA	N	N	K	LVGSA	QVNGQRG	T	H	R	E	D	S	Yes	E	
BDK/Korea/Gochoang/1/2014 (H5N8)	RERRRRK ^a	L	I	NDA	N	N	K	LVGSA	QVNGQRG	T	H	R	E	D	S	No	E	
BTU/Korea/Donglim3/2014 (H5N8)	RERRRRK ^a	L	I	NDA	N	N	K	LVGSA	QVNGQRG	T	H	R	E	D	N	No	E	

^aAmino acid difference between H5 clade 2.3.4.4 viruses are indicated by underline.

^bMutations related to mammalian adaptation of Avian H5 viruses.

^cMutations related to antiviral drug resistance in M2 protein.

amino acid substitutions (HA-H110Y-T160A-Q226L-G228S; PB2-E277K), which are consistently detected in airborne-transmissible virus isolates, were not present in this virus (Neumann & Kawoaka, 2015; Schrauwen & Fouchier, 2014). Mutations associated with oseltamivir (H275Y in NA) and amantadine resistance (G31N in M2) were also not present in the NA or matrix gene of Md/Kr/2016 (H5N6).

4 | CONCLUSION

In this study, we investigated the replication, pathogenesis and transmission of the Md/Kr/2016 (H5N6) influenza virus in a ferret model. Virus excretion was detected in the upper respiratory tract at a low titre, without causing any clinical signs or mortality. Transmission did not occur between either cohoused or respiratory droplet-contact ferrets. However, because different genotypes of clade 2.3.4.4 can replicate and be transmitted in ferrets, characterization of other novel genotypes of the H5N6 virus is required to elucidate its pathogenic potential.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Animal Disease Management Technology Development Program, the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea [grant number: 116103031HD0030]. We thank Junbeom Kim, Jiho Lee, Yujin Kim, and Kyujik Kim for excellent technical assistance.

APPENDIX 1

For the pathogenesis study in ferrets, nine ferrets were anaesthetized and inoculated intranasally (1 ml of 10⁷ TCID₅₀/ml) with Md/Kr/2016 (H5N6) virus in phosphate-buffered saline (PBS), and four ferrets were inoculated with sterile PBS as a mock control. Ferrets were monitored daily for clinical signs, body weights and rectal temperature. Nasal washes, oropharyngeal swabs and rectal swabs were collected every other day from 1 day post-infection (dpi) to 5 dpi to check for viral shedding. To collect nasal wash samples, 1 ml of minimum essential medium (MEM) containing antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B) was injected into each nostril and collected in a Petri dish once expelled by the ferret. Oropharyngeal and rectal swab samples were collected and suspended in 1 ml of MEM supplemented with antibiotics. Three infected and two mock-infected ferrets were humanely euthanized at 3 and 5 dpi, and tissue specimens (lung, trachea, nasal turbinate, spleen, kidney, liver, heart, intestine and brain) were collected in 10X volume of MEM containing antibiotics for measuring viral titres. The amount of virus in tissue homogenates, nasal washes, and oropharyngeal and rectal swabs was determined by matrix gene-based real-time polymerase chain reaction (Spackman et al., 2003) and converted into egg infectious dose 50% (EID₅₀) by a highly related standard curve ($r^2 > 0.99$).

To evaluate viral transmission, three of the nine inoculated ferrets were randomly allocated to different cages. Three naïve ferrets were cohoused with an inoculated ferret in pair, and other three naïve ferrets were cohoused in the respiratory droplet transmission cage adjacent to an inoculated ferret from the following day for the assessment of direct and indirect viral transmission. Monitoring and sample collection, except tissue samples, were performed for 2 weeks as was done in the pathogenesis study. Post-challenge sera were collected at 14 dpi from all ferrets, and seroconversion against H5N6 was evaluated by hemagglutinin inhibition assays using 1% turkey red blood cells following the World Organisation for Animal Health standard protocol.

Lee, D. H., Torchetti, M. K., Killian, M. L., Deliberto, T. J., & Swayne, D. E. (2017). Reoccurrence of Avian Influenza A(H5N2) Virus Clade 2.3.4.4 in Wild Birds, Alaska, USA, 2016. *Emerging Infectious Diseases*, 23, 365–367. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161616>

Lee, D. H., Torchetti, M. K., Winkler, K. Ip, H. S., Song, C. S., & Swayne, D. E. (2015). Intercontinental Spread of Asian-Origin H5N8 to North America through Migratory Birds. *Journal of Virology*, 89, 6521–6524. <https://doi.org/10.1128/JVI.00728-15>

Li, M., Zhao, N., Luo, J. L., Chen, L., Ma, J., ... He, H. (2017). Genetic characterization of continually evolving highly pathogenic H5N6 influenza viruses in China, 2012–2016. *Frontiers in Microbiology*, 8, 260.

Neumann, G., Chen, H., Gao, G. F., Shu, Y., & Kawoaka, Y. (2010). H5N1 influenza viruses: Outbreaks and biological properties. *Cell Research*, 20, 51–61. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.124>

Neumann, G., & Kawoaka, Y. (2015). Transmission of influenza A viruses. *Virology*, 479–480, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.009>

Schrauwen, E. J., & Fouchier, R. A. (2014). Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerging Microbes & Infections*, 3, e9. <https://doi.org/10.1038/em.2014.9>

Sun, H., Pu, J., Wei, Y., Sun, Y., Hu, J., Liu, L., ... Liu, J. (2016). Highly pathogenic avian influenza H5N6 viruses exhibit enhanced affinity for human type sialic acid receptor and in-contact transmission in model ferrets. *Journal of Virology*, 90, 6235–6243. <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-16>

Yang, Z. Y., Wei, C. J., Kong, W. P., Wu, L., Xu, L., Smith, D. F., & Nabel, G. J. (2007). Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity. *Science*, 317, 825–828. <https://doi.org/10.1126/science.1135165>

How to cite this article: Noh J-Y, Lee D-H, Yuk S-S, et al. Limited pathogenicity and transmissibility of Korean highly pathogenic avian influenza H5N6 clade 2.3.4.4 in ferrets. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65:923–926. <https://doi.org/10.1111/tbed.12869>

주 의

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