

322056-2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
가축질병대응기술고도화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004659-01

항콕시둡제에 대한 내성 조사 및 국산 콕시둡 백신 시제품 개발

2024.06.19.

주관연구기관 / 경상국립대학교 산학협력단
공동연구기관 / (주)혹스바이오

2023

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부

(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “항콕시뒰제에 대한 내성 조사 및 국산 콕시뒰 백신 시제품 개발”(개발기간 : 2022. 04. 01 ~ 2023. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.19.

주관연구기관명 : 경상국립대학교 산학협력단 (대표자) 정 재 우 (인)

공동연구기관명 : (주)혹스바이오 (대표자) 민 원 기 (인)



주관연구책임자 : 김 우 현

공동연구책임자 : 민 원 기

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

< 요약 문 >

사업명	2022년도 가축질병대응기술고도화지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		322056-2	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0704	50%	2순위 LB0710	40%	3순위 LB0701	10%
	농림식품 과학기술분류	1순위 RB104	50%	2순위 RB201	40%	3순위 RB299	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		항콕시듬제에 대한 내성 조사 및 국산 콕시듬 백신 시제품 개발					
전체 연구개발기간							
총 연구개발비		총 732,800 원 (정부지원연구개발비: 630,000 천원, 기관부담연구개발비 : 102,800 천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(4) 종료시점 목표(7)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		○ 콕시듬 저감을 위하여 양계농가의 항콕시듬제 내성 조사 및 국내 적용가능한 콕시듬 예방용 국산화 시제품 백신 개발				
	전체 내용		○ 국내 사용 중인 항콕시듬제(8-9종)에 대한 내성 조사 - 육계 농가(10농가) 및 종계 농장(2-3곳) 시료 채취 후 항콕시듬제 사용 현황 및 항콕시듬제 내성 파악 ○ 항콕시듬제 유효성 평가 - 항콕시듬제의 투여로 인한 체중 등 임상증상 및 장병변 등 병리학적 변수 파악 ○ 국내 기반 콕시듬 균주를 이용한 백신 시제품 제작 및 품질 평가 - 국내 야외 분리 콕시듬 균주 3종(<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i>)을 이용한 프로토 타입의 콕시듬 백신 시제품 제작 - 백신 시제품 품질 평가(항원 함량 시험 등) ○ 동물모델 활용 효능 및 안전성 평가 - 백신 후보물질의 접종 경로 및 유효 농도 결정 - 면역원성 및 방어 효과 조사를 통한 유효성 조사 - 과용량 투여에 따른 안전성 시험				
	1단계 (해당 시 작성)	목표					
		내용					
n단계 (해당 시 작성)	목표						
	내용						
연구개발성과		○ 국내 사용 중인 항콕시듬제를 이용하여 육계 14농가에서 분리한 균주에 대한 내성 조사 ○ 국내 사용 중인 항콕시듬제 유효성 평가					

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 기반 콕시듐 균주를 이용한 백신 시제품 제작 및 품질 평가 ○ 동물모델 활용 효능 및 안전성 평가 												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양계 농가의 항콕시듐제 사용 현황 및 항콕시듐제 내성 조사를 통하여 국내에서 감염되는 콕시듐에 효과적인 항콕시듐제 선택에 활용 ○ 국내 기반 콕시듐 백신 시제품 개발을 통하여 수입 백신 대체 효과 ○ 효과적인 항콕시듐제 및 백신 사용 유도로 인한 국내 양계 농가의 콕시듐 피해 저감 및 생산성 향상 ○ 예방용 백신 사용 유도로 항콕시듐제에 대한 콕시듐의 저항성 감소 ○ 생체를 사용하는 새로운 플랫폼의 백신 개발로 국내 양계 백신 시장의 양적·질적 성장 도모 ○ 콕시듐 백신 균주 확보 및 백신제조기술의 국산화 ○ 콕시듐 백신 관련 특허 등록, 논문(SCI) 게재 및 학술 발표 												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
								생명 정보	생물 자원		정보	실물	
	2	5/2											
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	닭		콕시듐		항콕시듐제		내성 조사		콕시듐 백신 시제품 제작				
영문핵심어 (5개 이내)	chickens		coccidiosis		anticoccidial agents		drug resistance		development of prototype coccidiosis vaccine				

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요.....	7
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용.....	12
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도.....	18
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성).....	71
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도.....	72
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획.....	72

별첨 자료

최종보고서

보안등급

일반[], 보안[]

중앙행정기관명	농림축산식품부				사업명	사업명	2022년도 가축질병대응기술고도화지원사업				
전문기관명 (해당 시 작성)					총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	내역사업명 (해당 시 작성)					
공고번호	농축 2022-17호					연구개발과제번호					
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0704	50%	2순위 LB0710	40%	3순위 LB0701	10%				
	농림식품과학기술분류	1순위 RB104	50%	2순위 RB201	40%	3순위 RB299	10%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문										
연구개발과제명	영문										
	국문	항콕시뒀제에 대한 내성 조사 및 국산 콕시뒀 백신 시제품 개발 Investigation of anticoccidial drug resistance and development of prototype coccidiosis vaccine									
주관연구개발기관	기관명	경상국립대학교			사업자등록번호		613-82-11653				
	주소	(우)52888 경남 진주시 진주대로 501			법인등록번호						
연구책임자	성명	김우현			직위		조교수				
	연락처	직장전화				휴대전화					
		전자우편				국가연구자번호		11162138			
연구개발기간	전체	2022. 04. 01 - 2023. 12. 31(1년 9개월)									
	단계	1단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)								
	(해당 시 작성)	n단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계	630,000	15,000	87,800					645,000	87,800	732,800	
1단계	1년차	270,000		33,800				270,000	33,800	303,800	
	2년차	360,000	15,000	54,000				375,000	54,000	429,000	
n단계	1년차										
	n년차										
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고					
						역할	기관유형				
공동연구개발기관	경상국립대학교	김우현	조교수			주관	대학				
	(주)혹스바이오	민원기	대표			공동	중소기업				
위탁연구개발기관											
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자	성명				직위						
	연락처	직장전화				휴대전화					
		전자우편				국가연구자번호					

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024 년 6 월 19 일

연구책임자:

김 우 현 (인)

주관연구개발기관의 장: 경상국립대학교 산학협력단 (직인)

공동연구개발기관의 장: (주)혹스바이오 (직인)

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발과제의 총괄 목표

- 국내 양계 농가에서 사용되고 있는 항콕시딴제 사용 현황 및 항콕시딴제 내성 조사
- 국내 분리 콕시딴 야외 균주를 이용한 국내 적용 가능한 국산 육계용 콕시딴 생백신 시제품 개발

최종 목표

- 국내 양계 농가에서 사용되고 있는 항콕시딴제 사용 현황 및 항콕시딴제 내성 조사
- 국내 분리 콕시딴 야외 균주를 이용한 국내 적용 가능한 국산 육계용 콕시딴 생백신 시제품 개발

주요 연구 내용

국내 사용 항콕시딴제 내성 조사 14 농가

- 육계 10 농가 + 육계 종계 4 농가
- 콕시딴 원충 및 감염 정도 파악
- 분리 콕시딴 공격 접종 시험

항콕시딴제 유효성 평가

- 항콕시딴제 투여에 따른 임상증상 및 병변 평가
- 백신 균주 병원성, 면역원성 유전적 특성 분석

콕시딴 예방용 생백신 시제품 개발

E. acervulina, *E. tenella*,
E. maxima

- 생백신 접종 경로 및 유효 농도 시험
- 생백신 균주 항원 함량 시험

예방용 생백신 효능 및 안정성 평가

- 생백신 면역원성 평가
- 생백신 방어 효과 분석
- 생백신 안정성 평가

참여기업

- 국내 항콕시딴제 및 백신 사용 현황 조사
- 해외 콕시딴 백신 시장 조사
- 콕시딴 백신 사업화 계획

2) 연구개발과제의 배경

○ 닭은 단백질(고기 및 계란)을 얻는 중요한 자원으로 돼지 및 소와 함께 3대 산업동물 중 하나이다. 또한 지방 함량이 적은 육류의 특성상 소비 비중이 점진적으로 증가하고 있다. 그러나 닭은 경제성의 이유로 인해 좁은 공간에 집단 사육되므로 사육환경이 매우 열악하여 육계 및 산란계에서 콕시듐증(coccidiosis)을 포함한 다양한 소화기 질병이 발생하고 있다(그림 1). 전 세계적으로 콕시듐증은 닭을 키우는 모든 국가에 만연해 있으며 이로 인한 경제적 피해는 2016년 기준 120억 달러(마리당 0.18 달러)에 달하는 것으로 보고되고 있다. 이를 2021년 3/4분기 국내에서 사육되고 있는 닭 약 1.66억 마리에 적용하면 약 1,400억 원의 연간 손실이 예상된다.



그림 1. 일반 양계 농장의 사육환경

○ 콕시듐증은 포자충아문 구충아강에 속하는 병원성 원충인 콕시듐(Genus *Eimeria*)의 감염에 의해 유발되며 1900년대 초 *E. tenella*가 발견된 이후 1920년대에 *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*의 존재가 확인되었다. 또한 1930년대에 *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. hageni* 그리고 1942년에 *E. brunetti*, 1964년에 *E. mivati* 등의 다양한 종(species)이 확인되었다. 콕시듐의 숙주 감염은 난포낭(oocyst)을 통해 일어나며 난포낭에서 유리된 포자소체(sporozoites)는 숙주의 장 상피세포에서 무성생식을 통해 증식하고 일부는 웅성생식모체(microgametes)와 자성생식모체(macrogametes)를 형성하여 접합체(zygote)를 생성하는 유성생식을 거치는 생활사를 형성한다. 접합체에서 형성된 난포낭은 숙주 체외로 배출되어 또 다른 숙주에 감염되어 생활사를 영위한다(그림 2). 닭에서 콕시듐증을 유발하는 7종의 콕시듐은 동일한 생활사를 영위하며 닭에 감염 후 난포낭의 배출기간, 난포낭의 형태, 크기, 내부구조, 포자형성시간 등은 매우 유사하다. 콕시듐은 숙주 특이성이 매우 높아서 닭에 감염되는 콕시듐은 닭에만 감염되어 증식하며 콕시듐 종에 따라 소장 또는 대장의 특정한 부위에만 기생한다.

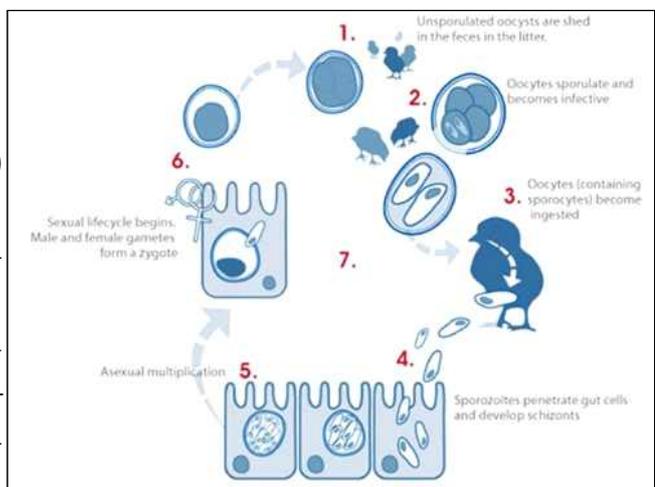


그림 2. 닭 콕시듐의 생활사

○ 조류 콕시듐증(avian coccidiosis)은 양계산업에 있어 경제적으로 매우 중요한 질병으로서 장 상피세포 내에 기생하는 콕시듐이 원인체이다. 감염된 닭에서는 설사와 장염, 혈변

등이 주요증상(그림 3)으로 나타나며, 닭의 심각한 장애를 유발하여 발육 저하와 사료효율 불균형 등의 경제적 손실을 유발한다. 육계에서 발육 저하는 일반적으로 20~40일령 사이의 병아리에서 가장 많이 발생한다. 또한 심한 경우 어린 병아리의 50%가 폐사할 수 있다. 일반적인 증세로는 사료/음수가 공급되어도 달려들어 섭취하지 않고 사육장 한쪽에 주저앉아 있거나 무기력해 보이는 등 운동성을 상실하고 사료 및 음수 섭취량이 눈에 띄게 줄어든다. 벼슬이 창백해지는 빈혈증세, 혈변, 거친 깃털, 총배설강 주변 오염도 나타나며 감염된 양계장에 들어가면 특유의 비릿한 냄새가 나며 체력 약화로 이환계끼리 무리를 이루고 서서히 회복하거나 폐사한다. 또한 감염된 계군의 장내 면역계 및 장벽 약화를 수반하기 때문에 *Clostridium perfringens*에 의해 일어나는 괴사성 장염 등을 포함하는 2차적 세균성 질병의 발생 증가로 피해가 가중된다.

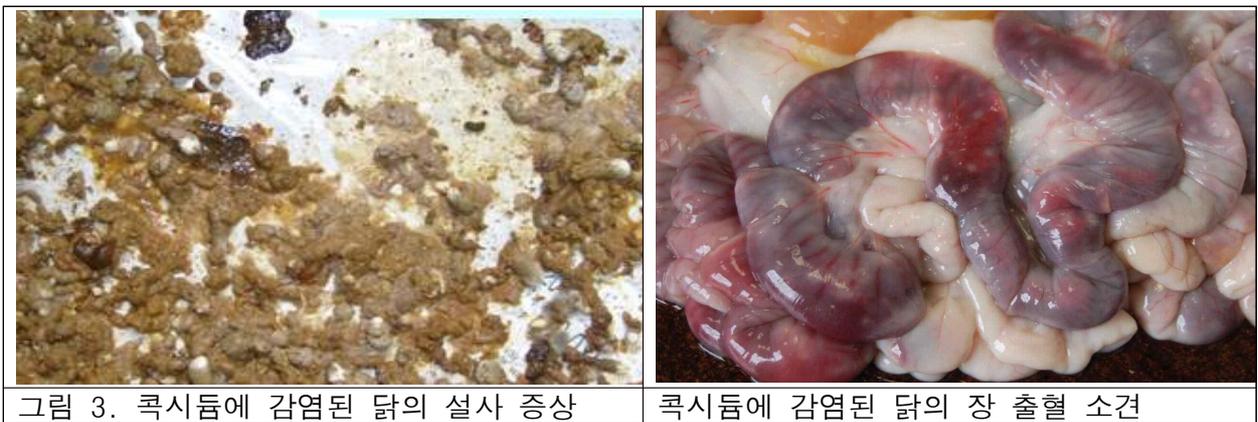


그림 3. 콕시듐에 감염된 닭의 설사 증상

콕시듐에 감염된 닭의 장 출혈 소견

○ 난포낭은 감염 후 약 6~10일 사이에 숙주의 분변으로 배출된다. 난포낭의 일반적인 형태는 아구형(subspherical) 또는 난형(ovoid)이며 적당한 조건에서 감염성 있는 포자소체를 형성한 난포낭(sporulated oocyst)이 된다. 성숙한 난포낭은 4개의 포자낭자(sporocysts)를 포함하고 있으며 각각의 포자낭자는 2개의 포자소체를 가지고 있어서 하나의 난포낭은 총 8개의 포자소체를 포함한다. 난포낭의 외벽은 2중으로 구성되어 있어 각종 화학약품 및 소독제에 대해서 강한 저항성을 나타내 쉽게 사멸되지 않는다. 포자낭자가 형성되지 않은 난포낭은 일반적인 자연 상태에서 약 1 개월 생존할 수 있다(그림 4). 포자소체 형성이 완성된 성숙 난포낭(sporulated oocyst)은 5℃에서 최대 2년까지 생존하기도 한다.

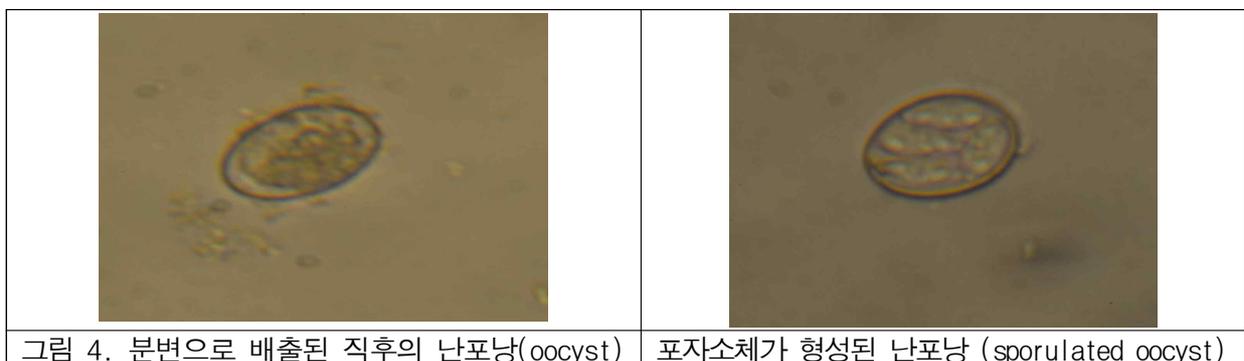


그림 4. 분변으로 배출된 직후의 난포낭(ooocyst)

포자소체가 형성된 난포낭 (sporulated oocyst)

○ 1970년대 ionophore 계열의 항콕시듐제가 개발된 이후 콕시듐증에 대한 주요 방제책으로써 지속적으로 사용돼오고 있다. 하지만 증가하는 항콕시듐제의 내성 문제와 국가 단위에서 이루어지는 제도적 규제 및 소비자의 요구로 인하여 양계산업에서의 효용성이 감소하고 있다. 2011년 국내에서 배합사료 내 항생제 첨가를 금지하면서 8종의 항콕시듐제(clopidol, diclazuril, maduramycin, monensin, salinomycin, narasin, lasalocid, semduramycin)는

그대로 유지가 되었지만, 유기 축산물 및 무항생제 사육 농가에서는 항콕시딴제 사용을 제한하고 있으며 국제적으로도 항콕시딴제의 사료 내 첨가를 금지하는 방향으로 가고 있다.

○ 최근 연구 결과(농림축산식품기술기획평가원 연구개발과제번호 320062-2, 연구책임자: 민원기, 연구기간: 2020-2021)에서 나타난 국내 양계 농가 콕시딴증 양성률은 75%로 나타났으며, 육계 농가의 경우는 82.4%로 나타났다. 농가의 감염은 여러 종의 콕시딴에 의한 혼합감염 형태를 보였으며 전체 농가 평균 4.2종의 콕시딴에 감염된 것으로 나타났다. 감염 콕시딴 종의 분포는 전체 농가에서 *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. brunetti*, *E. necatrix* 순으로 나타났으며 각 종별 감염률은 아래 표와 같다.

표 1. 국내 양계 농가 콕시딴 감염 현황(2020-2021)

종류	콕시딴 양성률 (%)	양성 농장의 종별 감염률(%)						
		<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. tenella</i>	<i>E. mitis</i>	<i>E. praecox</i>	<i>E. brunetti</i>	<i>E. necatrix</i>
육계 및 육계 종계	82.41 (n=290)	99.58	85.36	84.51	41.00	36.82	10.88	3.35
산란계 및 산란 종계	42.25 (n=71)	93.33	70.00	63.33	40.00	23.33	13.33	23.33
토종닭	81.48 (N=27)	95.45	81.82	90.91	72.73	50.00	50.00	36.36

○ 닭 콕시딴증 방제를 위하여 국내에서 가장 흔하게 사용되는 항콕시딴제는 사료에 첨가하는 ionophore계열(maduramycin, monensin, salinomycin, narasin, lasalocid, semduramycin) 과 clopidol, diclazuril이 있으며 음수에 투여하는 항콕시딴제로는 toltrazuril, diclazuril, sulfonimide, amprolium ethopabate 등이 있다. 항콕시딴제는 2012년 (68.9톤)을 기점으로 판매가 감소하여 2020년에 약 15.7톤이 판매되었으며 (표 2) 주요 항콕시딴제의 판매량은 아래 표와 같다.

표 2. 주요 항콕시딴제 판매량

성분	항콕시딴제 판매량 (kg)									
	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년	2016년	2017년	2018년	2019년	2020년
Clopidol	19,433	25,338	10,631	11,514	11,581	13,231	12,236	9,257	12,218	13,748
Diclazuril	398	411	386	450	549	640	712	719	882	876
Lasalocid	5,344	8,702	6,506	2,576	1,102	3,201	1,697	1,929	110	-
Maduramycin	2,224	1,135	1,280	667	1,635	865	831	429	273	42
Monensin	6,954	4,415	5,782	2,218	5,335	5,047	2,348	1,919	934	2,997
Narasin	818	3,558	1,288	3,588	88	883	13	-	-	-
Salinomycin	20,783	36,986	18,481	27,054	16,859	16,640	299	5,570	4,278	192
Semduramycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaquinoxaline	2,076	1,834	780	977	1,102	1,310	946	479	631	472

○ 2011년 항콕시딴제 첨가 금지 이후에 콕시딴 감염에 대한 구체적인 역학조사가 미흡하고 양계산업에 대한 영향 평가가 미흡한 점을 고려하면 콕시딴증 감염 실태 및 약제 내성

실태 조사, 분리 콕시듐 특성 조사가 필요하며 더 나아가 닭에서 콕시듐증으로 인한 막대한 경제적 피해를 줄이기 위해 국내 분리 균주를 이용한 국내 콕시듐 백신 개발이 절실하다.

○ 닭 콕시듐증 예방용 백신은 1950년대 생백신 형태로 처음 개발되고 이후 약독화 백신이 개발되면서 두 종류의 백신이 양계농가에서 사용되고 있다. 생백신과 약독화 백신은 각각 면역원성 및 안정성 면에서 대비되는 장점을 가지고 있다. 아래 표는 현재 전세계적으로 사용되고 있는 콕시듐 백신들이다 (표 3). 상용화된 백신들은 모든 타입의 양계를 타겟으로 할 수 있으며 주로 조숙화 시킨 콕시듐 원충을 이용한 약독화 백신(precocious line)이나 병원성이 낮은 균주를 선발하여 사용하는 비약독화 생백신이 주로 사용된다. 국가별, 지역별로 유행하는 균주에 따라 여러 종의 콕시듐 종을 섞은 혼합 백신 형태로 사용되며, *E. maxima*의 경우 같은 종에서도 면역원성에 차이를 나타낼 수 있어 복수의 균주가 사용되기도 한다.

표 3. 상용화된 닭 콕시듐증 예방용 생백신

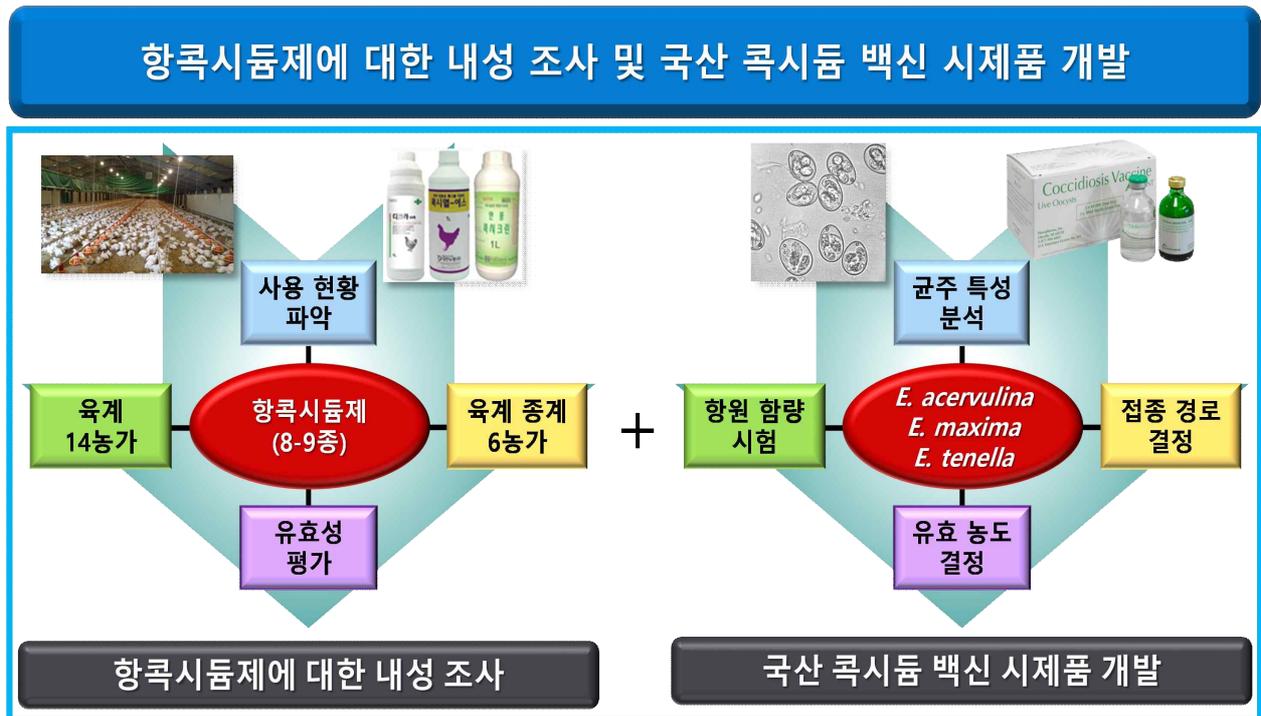
Company	Country	Type	Target species	No. of <i>Eimeria</i> species
Huvepharma	미국, 호주 등	생백신, 약독화	육계, 산란계, 종계	2-4
Bioproperties	호주	약독화	육계, 산란계, 종계	3
MSD	미국	생백신, 약독화	육계, 산란계, 종계	4, 6, 7
Nisseiken	일본	약독화	육계, 산란계, 종계	1, 3
Boehringer Ingelheim	독일	약독화	육계	3
Immuner	아르헨티나	생백신, 약독화	육계, 산란계, 종계	4, 5, 7
Biovet	브라질	약독화	육계	7
Biopharm Res. Inst.	체코	약독화	육계, 종계	3, 4
Hipra	스페인	약독화	육계, 산란계, 종계	5
Ceva	캐나다, 프랑스	생백신	육계, 산란계, 종계	3, 5
Foshan Standard	중국	생백신	육계, 산란계, 종계	3, 4

○ 현재 국내에서 생산되고 있는 콕시듐 예방용 백신은 없으며 2020년 10월 (주)한국 히프라에서 약독화 생백신을 스페인 본사로부터 수입하여 국내 판매 중이다. 하지만 콕시듐 원충 생존기간의 한계로 유통기한은 최대 10개월로 설정되었으며 수입 및 검역 단계에서 걸리는 시간을 포함하면 국내에서 사용할 수 있는 실제적 사용 기한은 그에 비해 매우 짧다.

● 현재 콕시듐 백신은 미국, 독일, 프랑스 등 많은 선진국을 포함하여 10여개 나라에서 생산되어 전세계적으로 사용되어 지고 있다. 특히 전세계 계육 생산량의 35% 이상을 생산하고 있는 아시아 대륙은 콕시듐 백신의 개발 및 도입이 아메리카 대륙, 유럽에 비해 상대적으로 늦어 다양한 콕시듐 백신 비즈니스를 위한 기업간의 치열한 각축장이 되고 있다. 본 연구과제를 통한 국내기반 콕시듐 백신 생산은 백신 제조기술의 국산화를 통해 국내 뿐 아니라 아시아를 비롯한 글로벌 콕시듐 시장에 진출할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

1) 연구개발과제의 내용



백신 사용 현황 조사
해외 콕시들택신 시장 조사
백신 사업화 계획 수립

면역원성 조사
방어 효과 조사
안정성 시험

< 전체 과제구성 >

○ 제1세부과제 (주관연구기관: 경상국립대학교):

▶ 육계 및 육계 종계 농장 콕시들택신 감염 실태 조사

- 육계 농가(10 농가) 및 종계 농장(4 농가) 시료 채취 후 콕시들택신 감염 증별 현황, 감염 정도 파악

▶ 국내 사용 중인 항콕시들통제(8-9종)에 대한 내성 조사

- 육계 농가(10 농가) 및 종계 농장(4 농가) 시료 채취 후 항콕시들통제 사용 현황 및 항콕시들통제 내성 파악

▶ 항콕시들통제 유효성 평가

- 항콕시들통제의 투여로 인한 체중 등 임상증상 및 장병변 등 병리학적 변수 파악

▶ 백신 균주 병원성, 면역원성 및 유전적 특성 분석

- 백신 균주 감염으로 인한 병리학적, 면역학적 변화 및 균주의 병원성 유전자 특성 파악

- 제2세부과제(공동연구기관: (주)혹스바이오):
 - ▶ 국내 기반 콕시듐 균주를 이용한 백신 시제품 제작 및 품질 평가
 - 국내 야외 분리 콕시듐 균주 3종(*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*)을 이용한 프로토 타입의 콕시듐 백신 시제품 제작
 - 백신 시제품 품질 평가(항원 함량 시험 등)
 - ▶ 동물모델 활용 효능 및 안전성 평가
 - 백신 후보물질의 접종 경로 및 유효 농도 결정
 - 면역원성 및 방어 효과 조사를 통한 유효성 조사
 - 과용량 투여에 따른 안전성 시험
- 참여기업(주)씨티씨백):
 - 국내 항콕시듐제 및 백신 사용 현황 조사
 - 해외 콕시듐 백신 시장 조사
 - 콕시듐 백신 사업화 계획

<1차년도>

1차년도 (2022)		
제1세부과제 경상국립대학교	제2세부과제 (주)혹스바이오	참여기업 (주)씨티씨백
콕시듐 감염 실태 조사	콕시듐 백신 시제품 제작	콕시듐제 및 백신 사용 현황 조사
항콕시듐제 내성 조사		
항콕시듐제 유효성 평가	콕시듐 백신 시제품 항원 함량 시험	해외 콕시듐 백신 시장 조사
백신 균주 병원성 및 면역원성 분석		

○ 연구개발 목표

- 제1세부과제(주관연구기관: 경상국립대학교):
 - ▶ 육계 및 육계 종계 농장 콕시듐 감염 실태 조사
 - 육계 농가(4 농가) 및 종계 농장(2 농가) 시료 채취 후 콕시듐 감염 종별 현황, 감염 정도 파악
 - ▶ 국내 사용 중인 항콕시듐제(8-9종)에 대한 내성 조사
 - 육계 농가(4 농가) 및 종계 농장(2 농가) 시료 채취 후 항콕시듐제 사용 현황 및 항콕시듐제 내성 파악
 - ▶ 항콕시듐제 유효성 평가

- 항콕시딴제의 투여로 인한 체중 등 임상증상 및 장병변 등 병리학적 변수 파악

▶ 백신 균주 병원성 및 면역원성 분석

- 백신 균주의 병원성 및 면역원성 파악

○ 제2세부과제(공동연구기관: (주)혹스바이오):

▶ 국내 기반 콕시딴 균주를 이용한 백신 시제품 제작

- 국내 야외 분리 콕시딴 균주 3종(*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*)을 이용한 프로토 타입의 콕시딴 백신 시제품 제작

▶ 백신 시제품 품질 평가(항원 함량 시험 등)

○ 참여기업(주)씨티씨백):

- 국내 항콕시딴제 및 백신 사용 현황 조사

- 해외 콕시딴 백신 시장 조사

○ 연구개발 내용 및 범위

가. 제1세부과제(주관연구기관: 경상국립대학교)

▶ 육계 및 육계 종계 농장 콕시딴 감염 실태 조사

- 국내 육계 4 농가, 육계 2 종계 농가 농가에서 분변 시료 수거한다. 분변 시료는 권역별(경기, 강원, 충청, 전라, 경상)로 구분하여 특정 지역에 국한되지 않도록 한다. 수거한 분변 시료에 존재하는 콕시딴 난포낭을 현미경 검사를 통해 계수하고 유전자를 분리하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하여 분변내 콕시딴 종을 파악한다. 콕시딴 종 구별을 위한 PCR 프라이머는 아래와 같다.

표 4. 닭 콕시딴 종 구별용 특이 PCR 프라이머

Species	Primer sequence (5' → 3')	Expected PCR size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>E. acervulina</i>	5'-GGGCTTGGATGATGTTTGCTG-3'	145	65
	5'-GCAATGATGCTTGCACAGTCAGG-3'		
<i>E. brunetti</i>	5'-CTGGGGCTGCAGCGACAGGG-3'	183	58
	5'-ATCGATGGCCCCATCCCGCAT-3'		
<i>E. maxima</i>	5'-GTGGGACTGTGGTGATGGGG-3'	205	65
	5'-ACCAGCATGCGCTCACAACCC-3'		
<i>E. maxima</i>	5'-TTGTGGGGCATATTGTTGTGA-3'	162	60
	5'-CWCACCACTCACAATGAGGCAC-3'		
<i>E. mitis</i>	5'-GTTTATTTCTGTCGTCGTCTCGC-3'	330	65
	5'-GTATGCAAGAGAGAATCGGGATTCC-3'		
<i>E. necatrix</i>	5'-AGTATGGGCGTGAGCATGGAG-3'	160	58

	5'-GATCAGTCTCATCATAATTCTCGCG-3'		
<i>E. praecox</i>	5'-CATCGGAATGGCTTTTTGAAAGCG-3'	215	65
	5'-GCATGCGCTAACAMCTCCCCTT-3'		
<i>E. tenella</i>	5'-AATTTAGTCCATCGCAACCCTTG-3'	278	65
	5'-CGAGCGCTCTGCATACGACA-3'		
<i>E. mivati</i> (18S rRNA)	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3''	1,790	57
	5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3'		
<i>E. mivati</i> (COI)	5'-GTTTGGTTTCAGGTGTTGGTTG-3'	810	55
	5'-ATCCAATAACCGCACCAAGAG-3'		

▶ 항콕시딴제 내성 조사

- 국내 육계 및 육계 종가 농가의 분번 시료에 존재하는 콕시딴의 항콕시딴제에 대한 내성을 파악하기 위하여 국내에서 사료첨가제 또는 치료용으로 사용되고 있는 항콕시딴제 6종(clopidol, diclazuril, maduramycin, monensin, salinomycin, totrazuril)을 제품 권장치에 준하는 농도로 사료에 혼합하여 실험기간 동안 무제한 급여한다. 이어서 분번에서 수거 분리된 콕시딴(혼합된 형태의 균주라면 혼합된 상태)을 공격 접종하고 배출되는 난포낭 수, 증체율, 장병변 등을 파악하여 항콕시딴제의 내성 실태를 조사한다.

▶ 항콕시딴제 유효성 평가

- 국내에서 사용중인 항콕시딴제의 유효성 평가를 위하여 실험용 육계에 항콕시딴제를 투여하고 체중을 비롯한 임상 평가와 장병변 등 병리학적 변수를 파악하여 항콕시딴제 사용이 육계에 미치는 영향을 분석한다.

▶ 백신 균주 병원성 및 면역원성 분석

- 백신 균주(*E. tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*) 들의 병원성 분석을 위하여 포자 형성된 10,000개의 난포낭을 각각의 종별로 닭에 단일 감염시킨 후 배출되는 난포낭 수, 증체율, 장병변 등을 파악하여 균주의 병원성을 분석한다. 동 실험에서 감염된 닭에서 채취한 시료들에서 면역원성을 콕시딴 특이 항체 및 사이토카인 분석을 통해 면역원성을 분석한다.

나. 제2세부과제(공동연구기관: (주)혹스바이오):

▶ 국내 기반 콕시딴 균주를 이용한 백신 시제품 제작

- 국내 야외 분리 콕시딴 균주 3종(*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*)을 이용한 프로토 타입의 콕시딴 백신 시제품 제작: 아래의 표와 같이 국내 분리 주들을 닭 1-2 주령의 병아리에 접종하여 신선한 총란을 약 27° C에서 포자형성 시킨 4° C에 정자하면서 사용한다. 본 과제를 통해 분리되는 균주들 또한 백신 균주로서의 가능성을 파악한다.

표 5. 국내 분리 균주의 특성

균주	유래	분리년도	Genbank Acc.	비고
<i>E. acervulina</i> (291-5)	경북 안동 (산란계)	2008	HQ338948	
<i>E. maxima</i> (310-4)	전남 완주 (산란계)	2008	HQ615990	
<i>E. tenella</i> (291-7)	경북 안동 (산란계)	2008	HQ338949	

▶ 백신 시제품 품질 평가(항원 함량 시험 등): 각각의 균주를 3가지 다른 용량으로 항원 함량 실험을 수행한다. 1 수당 3 종류의 함량을(1,500개, 1,000개, 500개) 아래의 표와 같이 구강접종 및 분무접종을 사용하여 백신한다. 21일 후에 항체 형성 및 방어 능력 등을 아래의 표와 같이 평가한다.

표 6. 구강접종 및 분무접종을 위한 항원 함량

균주	함량 1	함량 2	함량 3	비고
<i>E. acervulina</i> (291-5)	1,500	1,000	500	구강 접종 분무 접종
<i>E. maxima</i> (310-4)	1,500	1,000	500	
<i>E. tenella</i> (291-7)	1,500	1,000	500	

표 7. 항원의 효과 측정 방법

균주	접종 함량	측정 방법-1	측정 방법-2	측정 방법-3	측정 방법-4
<i>E. acervulina</i> (291-5)	1,500	분변상태 측정	총란 수 측정	장병변 측정	몸무게 변화 등의 임상 증상
	1,000				
	500				
<i>E. maxima</i> (310-4)	1,500	분변상태 측정	총란 수 측정	장병변 측정	몸무게 변화 등의 임상 증상
	1,000				
	500				
<i>E. tenella</i> (291-7)	1,500	분변상태 측정	총란 수 측정	장병변 측정	몸무게 변화 등의 임상 증상
	1,000				
	500				

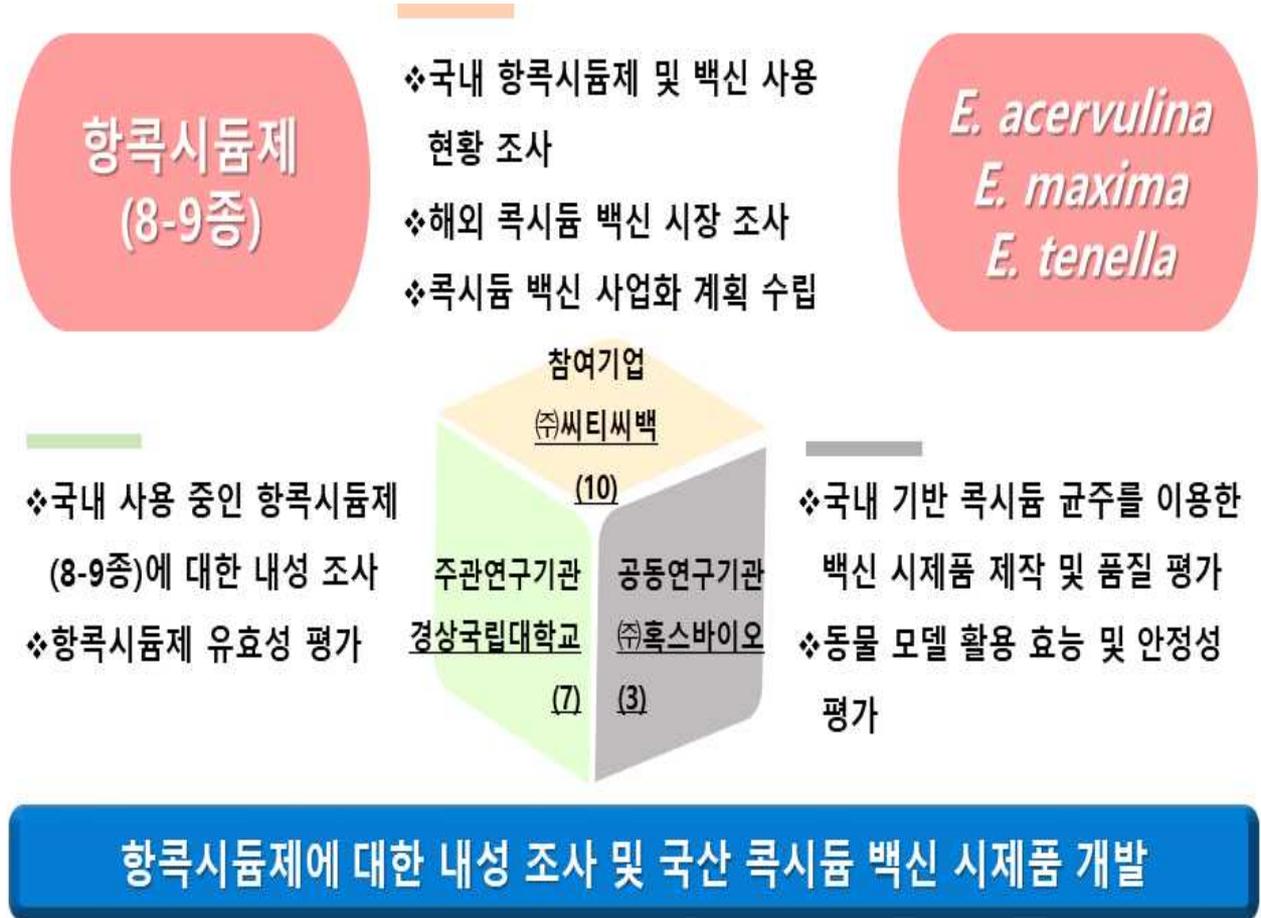
다. 참여기업(㈜씨티씨백):

- 국내 항콕시딴제 및 백신 사용 현황 조사 : 항콕시딴제 사용 현황을 조사하기 위하여 분변을 수거한 농가에서 사용 경험이 있는 항콕시딴제와 사용중인 항콕시딴제의 사용 실태를 조사한다. 실태 조사를 위한 항목은 항콕시딴제의 종류, 제품, 용법, 용량, 시기, 기간, 효능, 사용패턴 등을 포함한다.

- 해외 콕시딴 백신 시장 조사

2) 연구개발과제의 추진체계

○ 연구개발 추진체계



3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 정성적 연구개발성과

가. 제1세부과제 (공동연구기관: 경상국립대학교): 항콕시딴내성 조사 및 유효성 평가

▶ 육계 및 육계 종계 농장 콕시딴 감염 실태 조사

- 육계 농장 콕시딴 감염 실태조사에서 전국 41 개의 육계 농장의 분변 시료를 수집하여 분변 내 총란 수를 분석하였다. 또한 수집한 닭 분변 내 콕시딴의 종 감별을 위하여 콕시딴 종 특이적 primer set 을 이용한 nested-PCR 을 수행하였다. 콕시딴 종별 감염 현황 및 분변 내 총란 수는 표 8 과 같았으며 41 개의 육계 농장 중 31 개의 농장(75.6%)이 양성이었으며, 10 개의 농장(14.6%)은 음성이었다. 모든 종의 콕시딴이 검출되었고 분변 시료에 따라 다양한 종의 콕시딴 감염을 확인하였으며 모든 양성 시료에서 2 종 이상의 콕시딴 혼합 감염이 확인되었다. 31 개의 양성 시료 중 종별로 많이 검출된 순서는 *E. acervulina*(27/31), *E. tenella*(21/31), *E. maxima*-1(19/31), *E. mitis*(19/31), *E. maxima*-2(16/31), *E. brunetti*(14/31), *E. praecox*(5/31), *E. necatrix*(2/31)으로 평균 4.0 종의 콕시딴에 감염된 것으로 확인되었다. 양성 시료에 포함된 콕시딴 총란 수는 최소 133 개/g 에서 최대 74,666.7 개/g 이었으며 31 개 농장 평균 14,043.6 개/g 으로 확인되었다.

표 8. 육계 농장 콕시딴 분석

No.	채취일자	일령(일)	No. of oocyst/g	<i>E. acervulina</i>	<i>E. brunetti</i>	<i>E. maxima</i> -1	<i>E. maxima</i> -2	<i>E. mitis</i>	<i>E. necatrix</i>	<i>E. praecox</i>	<i>E. tenella</i>
1	2022.5	15	1,333.3	o	o		o	o			o
2	2022.5	17	-								
3	2022.5	2	-								
4	2022.6	35	-								
5	2022.6	26	-								
6	2022.6	20	-								
7	2022.6	30	500.0	o		o		o			o
8	2022.6	29	74,666.7	o	o	o	o	o			o
9	2022.6	30	7,733.3	o		o		o			o
10	2022.6	33	1,066.7	o	o	o	o	o			o
11	2022.6	27	-								
12	2022.6	39	1,600.0	o	o	o	o	o			o
13	2022.9	21	400.0					o	o		o

14	2022.10	30	800.0	o		o	o	o			o
15	2022.10	19	8,500.0	o				o			o
16	2022.10	14	1,600.0	o		o	o	o			o
17	2022.10	30	2,266.7	o		o	o	o			o
18	2022.10	31	1,200.0	o	o	o	o	o			o
19	2022.11	15	70,666.7	o	o	o	o	o	o	o	o
20	2023.1	21	20,333.3	o	o	o					o
21	2023.1	14	13,400.0	o				o			
22	2023.2	21	2,400.0	o	o						
23	2023.2	14	6,066.0	o						o	o
24	2023.3	28	73,000.0							o	o
25	2023.3	21	267.0	o				o			
26	2023.3	22	240.0	o		o					
27	2023.4	7	266.0	o	o						
28	2023.4	15	-								
29	2023.5	13	133.0		o					o	
30	2023.5	21	166.7	o	o	o	o	o			o
31	2023.5	25	3,600.0	o		o	o				
32	2023.6	7	-								
33	2023.6	11	12,866.7	o		o	o			o	
34	2023.6	14	-								
35	2023.7	7	933.3		o			o			o
36	2023.7	10	37,333.3	o	o	o	o				
37	2023.7	14	-								
38	2023.8	17	72,666.7	o		o	o	o			o
39	2023.8	8	480.0	o		o	o				o
40	2023.9	14	17,500.0	o				o			
41	2023.8	13	1366.7	o	o	o	o				o

▶ 항콕시딕제 내성 조사 및 유효성 평가

- 항콕시딕제 내성 조사 및 유효성 평가를 위하여 사료첨가제 또는 치료용으로 많이 사용되는 항콕시딕제 6종(clopidol, diclazuril, maduramicin, monensin, salinomycin sodium, tolturazuril)을 사용하였으며 동물 실험의 일정 및 세부적인 사항은 그림 5와 같다.

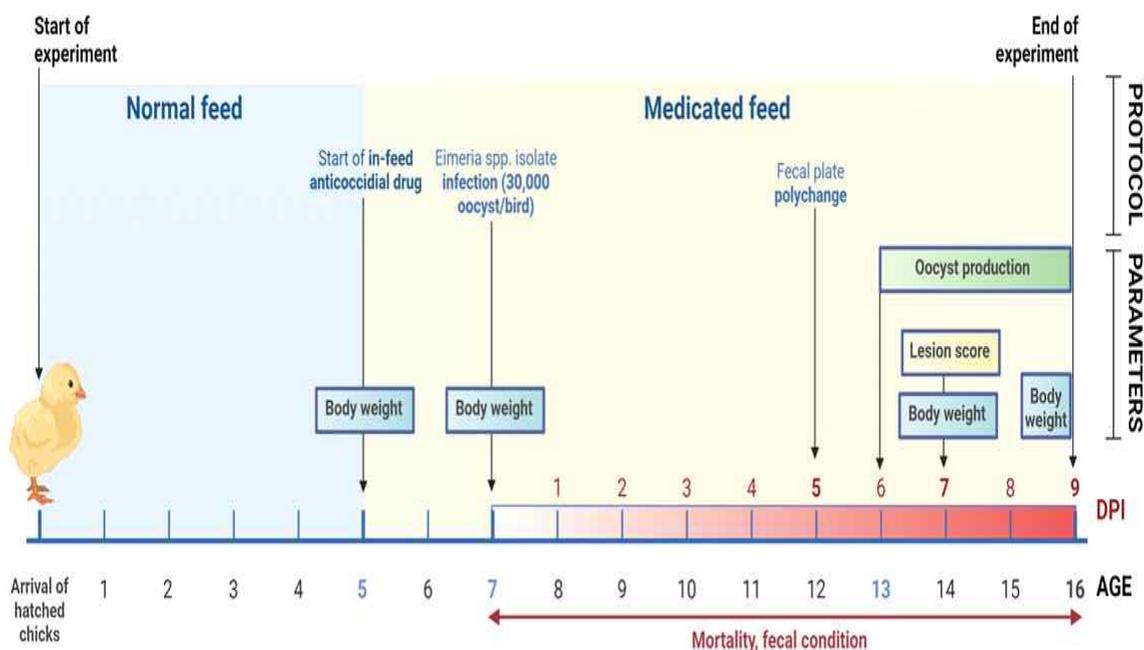


그림 5. 항콕시딕제 내성 조사 시험 일정 및 분석

<1차 실험>

- 4개의 농장 시료(시료 8, 시료 9, 시료 10, 시료 12)를 이용하여 항콕시딕제 내성 조사 및 유효성 평가를 진행하였다. 국내 양계 농장의 분변 시료에 존재하는 항콕시딕제의 내성을 조사하기 위하여 사료첨가제 또는 치료용으로 많이 사용되는 항콕시딕제 6종(clopidol, diclazuril, maduramicin, monensin, salinomycin sodium, tolturazuril)을 제품 권장치에 준하여 사료에 혼합한 후 실험 기간동안 무제한 급여하였다. 이어서 분변에서 분리한 콕시딕을 인공감염(원충 30,000개/마리)하고 배출되는 원충 수, 증체량, 장 병변 정도를 파악하여 항콕시딕제 내성 조사를 실시하였다.

- 콕시딕 양성으로 판정된 4개 농장에서 분리된 콕시딕의 항콕시딕제 내성 조사 결과는 그림 6와 같았다. 4개의 농장 시료 중 인공 감염시 음성대조군과의 비교에서 유의적인 증체 감소를 보인 시료는 시료 10과 시료 12였으며, 시료 9의 경우 대조군과 항콕시딕제 처리군 중 tolturazuril과 증체량에서 유의적인 차이를 나타내었다. 분변으로 배출되는 콕시딕 원충 수의 경우 양성대조군과의 비교에서 시료 8과 시료 9의 경우 대부분의 항콕시딕제 처리군에서 증가되는 경향을 나타내었으며 시료 10과 12의 경우 유의적인 차이를 나타내는 처리군은 확인되지 않았다. 장 병변 점수의 경우 양성대조군과의 비교에서 시료 8, 9, 12의 경우 대부분의 항콕시딕제 처리군에서 양성대조군에 비해 유의적으로 낮은 장 병변 점수를 나타냈지만 시료 10의 경우 monesis과 salinomycine sodium 처리군에서만 유의적으로 감소된 장 병변이 확인되었다.

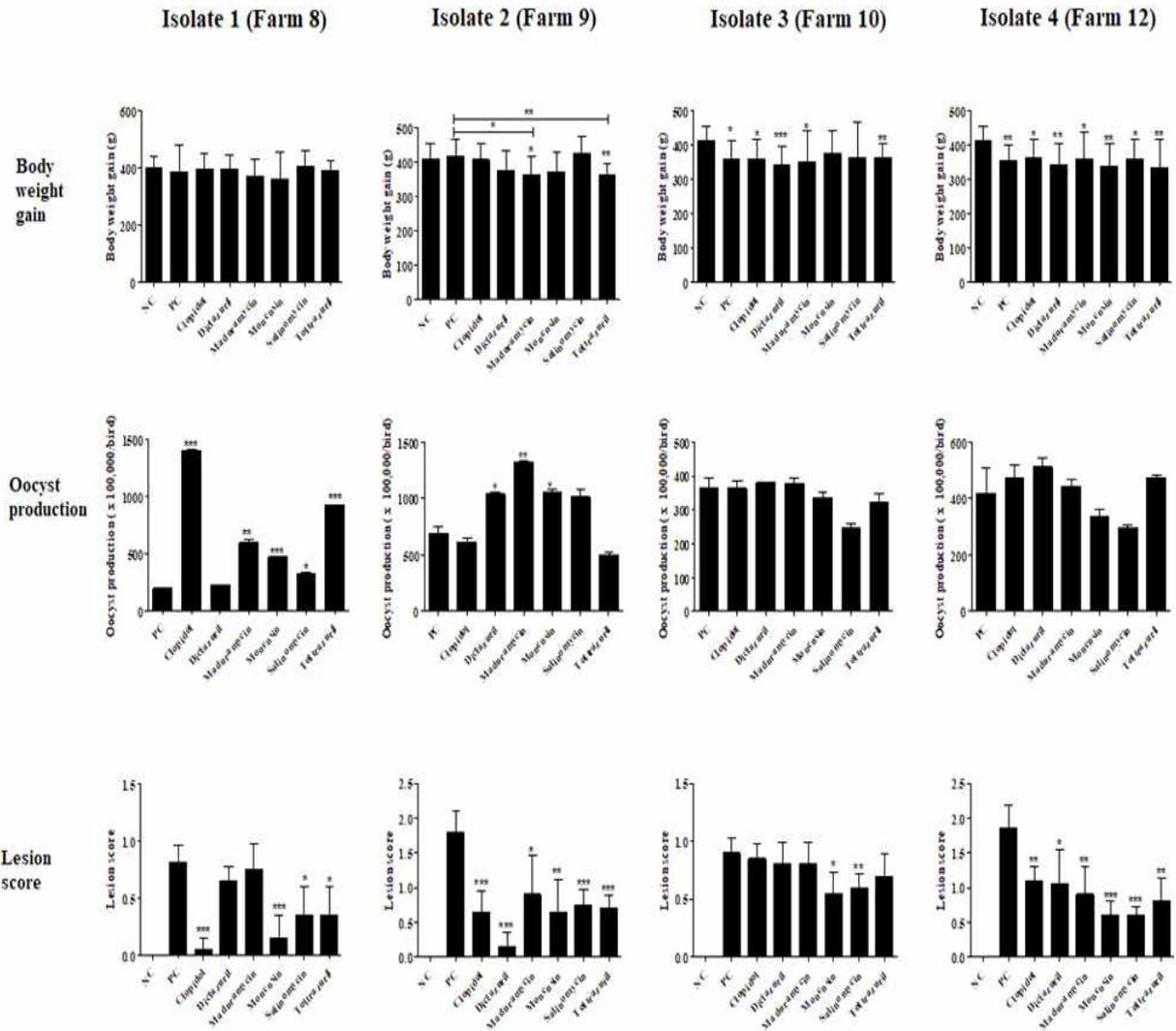


그림 6. 항콕시딕제 내성 조사 결과 (1차 실험)

- 다음으로 4가지 항콕시딕 지수인 anticoccidial index (ACI), percent optimum anticoccidial activity (POAA), relative oocyst production (ROP), and reduced lesion score (RLS) 지수를 체중 증가, 난포낭 생성, 병변 점수 및 생존율을 바탕으로 평가하였으며 각 지수의 계산식과 평가 결과는 표 9-12와 같았으며 종합한 내성 결과는 표 13에 나타내었다. ACI와 ROP의 경우 4개 시료 모두 처리된 모든 항콕시딕제에 대하여 내성을 나타내었다. POAA의 경우 salinomycin sodium에 대한 시료 8과 처리된 모든 항콕시딕제에 대한 시료 9를 제외한 모든 시료가 모든 항콕시딕제에 내성을 나타내었다. RLS의 경우 시료 10에서 모든 항콕시딕제에 대하여 내성을 보였으며 시료 8에서 diclazuril, maduramicin, 시료 12에서 clopidol, diclazuril에 대한 내성을 나타내었다. RLS로 분석시 시료 9에 대한 내성은 없는 것으로 확인되었다. 4가지 항콕시딕 지수를 종합하여 보면 조사된 6개의 항콕시딕제에 대하여 시료 10, 시료 12, 시료 8, 시료 9의 순서로 높은 내성을 나타내었으며 항콕시딕제별로 평균 지수를 계산해보면 diclazuril 3.5, clopidol과 maduramicin 3.25, monensin과 totulazuril 3, salinomycin sodium 2.75 순으로 높은 내성을 가진 것을 확인할 수 있었고 salinomycin sodium(보통 수준의 내성)을 제외하고는 모든 항콕시딕제에 대하여 높은 수준의 내성을 가진 것으로 판정되었다.

표 9. 항콕시들통제에 대한 농장 시료의 anticoccidial index (ACI)

Treatment \ 시료	시료 8	시료 9	시료 10	시료 12
NC	200.00	200.00	200.00	200.00
PC	92.51	92.65	79.60	84.80
Clopidol	-532.18	109.48	86.62	73.90
Diclazuril	78.65	27.75	78.50	53.59
Maduramicin	-118.24	-3.43	81.40	81.27
Monensin	-55.88	38.23	99.51	102.20
Salinomycin	33.38	49.44	120.72	115.84
Toltrazuril	-306.43	115.79	99.36	67.10

Formula
Anti-coccidial Index (ACI):
 (Relative BWG + Survival Rate) - (Lesion score + oocyst value)
 Where, oocyst value = (OPG output each group / OPG output of PC) X 100

Interpretation of result
 ≥160: sensitive
 ≤160: resistant

표 10. 항콕시들통제에 대한 농장 시료의 percent optimum anticoccidial activity (POAA)

Treatment \ 시료	시료 8	시료 9	시료 10	시료 12
NC	100.00	100.00	100.00	100.00
PC	0.00	0.00	0.00	0.00
Clopidol	30.32	271.52	-14.70	14.21
Diclazuril	11.89	875.99	-51.98	-0.63
Maduramicin	-20.26	874.98	-36.56	18.48
Monensin	-27.58	901.07	22.98	-2.37
Salinomycin	61.51	74.89	21.94	7.04
Toltrazuril	41.07	945.34	11.33	-11.60

Formula
Percent Optimum Anticoccidial Activity (POAA):

$$\frac{(\text{GSR in medicated group} - \text{GSR of PC group})}{(\text{GSR in NC group} - \text{GSR of PC group})} \times 100$$

Where, GSR = $\frac{\text{Cage weight at end of experiment} + \text{weight of dead birds}}{\text{Cage weight at start of infection}}$

Interpretation of result
 ≥ 50%: sensitive
 ≤ 50%: resistant

표 11. 항콕시들통제에 대한 농장 시료의 relative oocyst production (ROP)

Treatment \ 시료	시료 8	시료 9	시료 10	시료 12
NC	0.00	0.00	0.00	0.00
PC	100.00	100.00	100.00	100.00
Clopidol	728.57	88.86	99.34	112.93
Diclazuril	117.00	150.10	103.70	122.34
Maduramicin	307.97	190.76	103.19	105.15
Monensin	242.78	151.96	91.56	79.58
Salinomycin	164.97	146.45	66.71	70.86
Toltrazuril	481.40	72.20	88.00	113.46

Formula
Relative Oocyst Production (ROP):

$$\frac{\text{OPG in medicated group}}{\text{OPG in PC group}} \times 100$$

Interpretation of result
 ≤ 15%: sensitive
 ≥ 15%: resistant

표 12. 항콕시톱제에 대한 농장 시료의 reduced lesion score (RLS)

Treatment \ 시료	시료 8	시료 9	시료 10	시료 12
NC	100.00	100.00	100.00	100.00
PC	-	-	-	-
Clopidol	93.88	63.89	5.56	40.54
Diclazuril	20.41	91.67	11.11	43.24
Maduramicin	8.16	50.00	11.11	51.35
Monensin	81.63	63.89	38.89	67.57
Salinomycin	57.14	58.33	33.33	67.57
Toltrazuril	57.14	61.11	22.22	56.76

Formula	Reduction of Lesion Score (RLS) or AST (Anticoccidial Sensitivity test): (average LS in PC group - average LS in medicated group) ----- (average lesion score in PC group) x 100	Interpretation of result >50%: sensitive ≤ 50%: resistant
----------------	--	--

표 13. 항콕시톱제에 대한 전체적인 내성 결과

Treatment \ 시료	시료 8	시료 9	시료 10	시료 12	평균
Clopidol	3	2	4	4	3.25
Diclazuril	4	2	4	4	3.5
Maduramicin	4	2	4	3	3.25
Monensin	3	2	4	3	3
Salinomycin	2	2	4	3	2.75
Toltrazuril	3	2	4	3	3

Overall assessment:	0/4: no drug resistance 1/4: slight drug resistance 2/4: moderate drug resistance 3-4/4: severely drug resistant
--------------------------------	---

<2차 실험>

- 3개의 농장 시료(시료 14, 시료 15, 시료 16)를 이용하여 항콕시톱제 내성 조사 및 유효성 평가를 진행하였다. 국내 양계 농장의 분변 시료에 존재하는 항콕시톱제의 내성을 조사하기 위하여 사료첨가제 또는 치료용으로 많이 사용되는 항콕시톱제 4종(clopidol, diclazuril, maduramicin, tolturazuril)을 제품 권장치와 권장치 10배 용량을 사료에 혼합한 후 실험 기간동안 무제한 급여하였다. 이어서 분변에서 분리한 콕시톱을 인공감염(원충 30,000개/마리)하고 배출되는 원충 수, 증체량, 장 병변 정도를 파악하여 항콕시톱제 내성 조사를 실시하였다. 2차 실험에서는 1차 실험과의 차이점으로 1) 항콕시톱제의 처리 농도를 권장치 이외에도 10배 용량을 추가함으로써 권장치 용량 처리시 보였던 항콕시톱제에 대한 내성이 유지되는지 확인할 수 있도록 설계하였고, 2) 6종의 항콕시톱제 중 1차 실험에서 내성 수준이 상대적으로 낮았던 monensin과 salinomycin sodium을 제외한 4종의 항콕시톱제를 처리하였다.

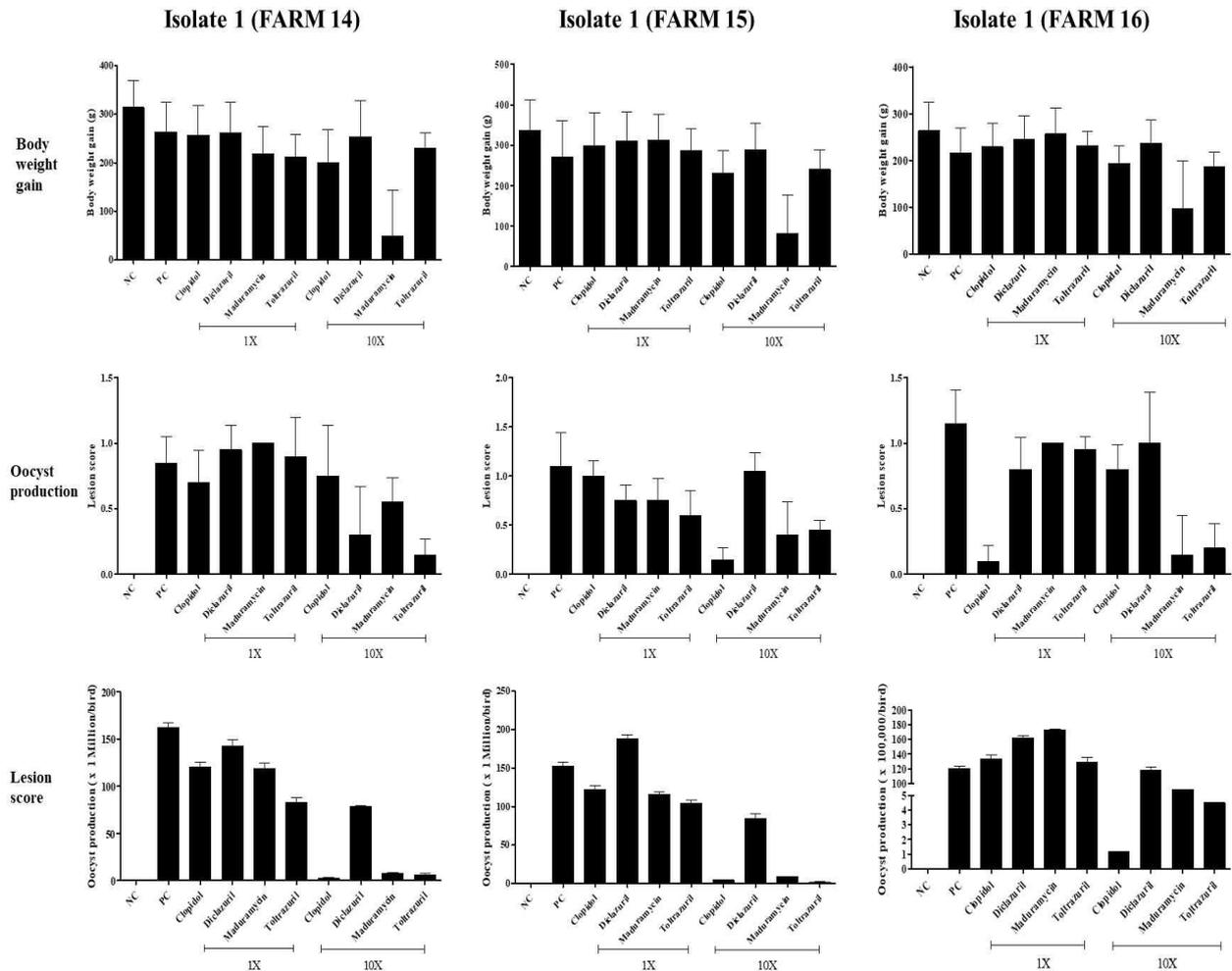


그림 7. 항콕시듐제 내성 조사 결과 (2차 실험)

- 콕시듐 양성으로 판정된 3개 농장에서 분리된 콕시듐의 항콕시듐제 내성 조사 결과는 그림 2와 같았다. 전체적으로 같은 항콕시듐제에서 감염 농도에 따른 증체량, 총란배출량, 장병변의 차이가 나타났다. 시료 14의 maduramicin, 시료 15, 시료 16의 clopidol, maduramicin의 경우에 감염 용량에 따른 차이가 크게 나타났다. 특히하게 시료 14의 clopidol의 경우 예상과 다르게 clopidol 처리후 10배 용량 감염에서 1배 용량보다 적은 분변내 총란배출을 보였다.

- 4가지 항콕시듐 지수인 anticoccidial index (ACI), percent optimum anticoccidial activity (POAA), relative oocyst production (ROP), and reduced lesion score (RLS) 지수를 체중 증가, 난포낭 생성, 병변 점수 및 생존율을 바탕으로 평가하였으며 각 지수의 계산식과 평가 결과는 표 14-17과 같았으며 종합한 내성 결과는 표 18에 나타내었다. ACI와 ROP의 경우 시료 14-10배용량에서 totrazuril에 대해, 시료 10-10배용량에서 clopidol, toltrazuril에서, 시료 16-10배용량에서 clopidol, totrazuril에서 감수성을 나타내었으며 나머지 시료들에서는 모든 항콕시듐제에 대하여 내성을 나타내었다. POAA의 경우 clopidol은 시료 15, 시료 16-10배용량, diclazuril에서는 시료 14, 시료 15, 시료 16, maduramicin에서는 시료 15, 시료 16, totrazuril에서는 시료 16에서 각각 감수성을 나타내었다. RLS의 경우 clopidol, maduramicin, totrazuril 3개의 항콕시듐제에 대하여 시료 14, 시료 15, 시료 16 모두 감수성을 나타내었다. RLS의 경우 시료 14와 시료 16는

clopidol, diclazuril, maduramicin, toltrazuril에 대해, 시료 15, 시료 15-10배용량, 시료 16-10배용량은 diclazuril에 대해 감수성을 나타내었다. 4가지 항콕시듬 지수를 종합하여 보면 조사된 6개의 항콕시듬제에 대하여 시료 10, 시료 12, 시료 8, 시료 9의 순서로 높은 내성을 나타내었으며 항콕시듬제별로 평균 지수를 계산해보면 diclazuril 3.5, maduramicin 2.83, clopidol과 toltrazuril 2.33 순으로 높은 내성을 가진 것을 확인할 수 있었다.

표 14. 항콕시듬제에 대한 농장 시료의 anticoccidial index (ACI)

Treatment \ 시료	시료 14-1x	시료 14-10x	시료 15-1x	시료 15-10x	시료 16-1x	시료 16-10x
NC	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00
PC	59.31	59.31	71.55	71.55	80.78	80.78
Clopidol	107.03	157.08	103.69	161.46	68.52	163.83
Diclazuril	139.43	123.88	68.01	125.24	57.69	91.31
Maduramicin	91.21	98.36	111.96	105.88	52.83	127.64
Toltrazuril	111.11	169.58	115.62	169.72	79.66	167.08

Formula

Anti-coccidial Index (ACI):
 (Relative BWG + Survival Rate) - (Lesion score + oocyst value)
 Where, oocyst value= (OPG output each group/OPG output of PC) X 100

Interpretation of result
 ≥ 160 : sensitive
 ≤ 160 : resistant

표 15. 항콕시듬제에 대한 농장 시료의 percent optimum anticoccidial activity (POAA)

Treatment \ 시료	시료 14-1x	시료 14-10x	시료 15-1x	시료 15-10x	시료 16-1x	시료 16-10x
NC	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
PC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Clopidol	-46.86	-57.90	52.04	23.32	39.94	88.22
Diclazuril	338.19	-107.96	59.27	21.60	66.58	26.79
Maduramicin	-161.20	-534.83	70.72	-255.65	91.60	-187.22
Toltrazuril	-191.75	-80.01	27.01	-25.80	74.48	-34.87

Formula

Percent Optimum Anticoccidial Activity (POAA):

$$\frac{(\text{GSR in medicated group} - \text{GSR of PC group})}{(\text{GSR in NC group} - \text{GSR of PC group})} \times 100$$

Interpretation of result
 $\geq 50\%$: sensitive
 $\leq 50\%$: resistant

Where,
 GSR= $\frac{\text{Cage weight at end of experiment} + \text{weight of dead birds}}{\text{Cage weight at start of infection}}$

표 16. 항콕시듬제에 대한 농장 시료의 relative oocyst production (ROP)

Treatment \ 시료	시료 14-1x	시료 14-10x	시료 15-1x	시료 15-10x	시료 16-1x	시료 16-10x
NC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PC	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Clopidol	74.17	1.79	80.04	2.82	110.42	0.97
Diclazuril	88.30	48.63	123.68	55.52	134.50	97.80
Maduramicin	73.41	4.83	76.28	5.80	143.77	9.15
Toltrazuril	51.44	3.73	68.80	1.08	107.27	3.73

Formula		Interpretation of result
$\frac{\text{OPG in medicated group}}{\text{OPG in PC group}} \times 100$		$\leq 15\%$: sensitive $\geq 15\%$: resistant

표 17. 항콕시듬제에 대한 농장 시료의 reduced lesion score (RLS)

Treatment \ 시료	시료 14-1x	시료 14-10x	시료 15-1x	시료 15-10x	시료 16-1x	시료 16-10x
NC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PC	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Clopidol	74.17	1.79	80.04	2.82	110.42	0.97
Diclazuril	88.30	48.63	123.68	55.52	134.50	97.80
Maduramicin	73.41	4.83	76.28	5.80	143.77	9.15
Toltrazuril	51.44	3.73	68.80	1.08	107.27	3.73

Formula		Interpretation of result
$\frac{(\text{average LS in PC group} - \text{average LS in medicated group})}{(\text{average lesion score in PC group})} \times 100$		$> 50\%$: sensitive $\leq 50\%$: resistant

표 18. 항콕시듬제에 대한 전체적인 내성 결과

Treatment \ 시료	시료 14-1x	시료 14-10x	시료 15-1x	시료 15-10x	시료 16-1x	시료 16-10x	평균 1x	평균 10x	전체 평균
Clopidol	3	3	3	1	2	2	2.67	2	2.33
Diclazuril	4	3	3	4	3	4	3.33	3.67	3.5
Maduramicin	4	3	3	2	2	3	3	2.67	2.83
Toltrazuril	4	1	4	1	2	2	3.33	1.33	2.33

Overall assessment: 0/4: no drug resistance 1/4: slight drug resistance 2/4: moderate drug resistance 3-4/4: severely drug resistant

<3차 실험>

- 4개의 농장 시료(시료 20, 시료 30, 시료 36, 시료 38)를 이용하여 항콕시딴제 내성 조사 및 유효성 평가를 진행하였다. 국내 양계 농장의 분변 시료에 존재하는 항콕시딴제의 내성을 조사하기 위하여 사료첨가제 또는 치료용으로 많이 사용되는 항콕시딴제 6종 (clopidol, diclazuril, maduramicin, monensin, salinomycin sodium, toltrazuril)을 제품 권장치에 준하여 사료에 혼합한 후 실험 기간동안 무제한 급여하였다. 이어서 분변에서 분리된 콕시딴을 인공감염(원충 30,000개/마리)하고 배출되는 원충 수, 증체량, 장 병변 정도를 파악하여 항콕시딴제 내성 조사를 실시하였다.

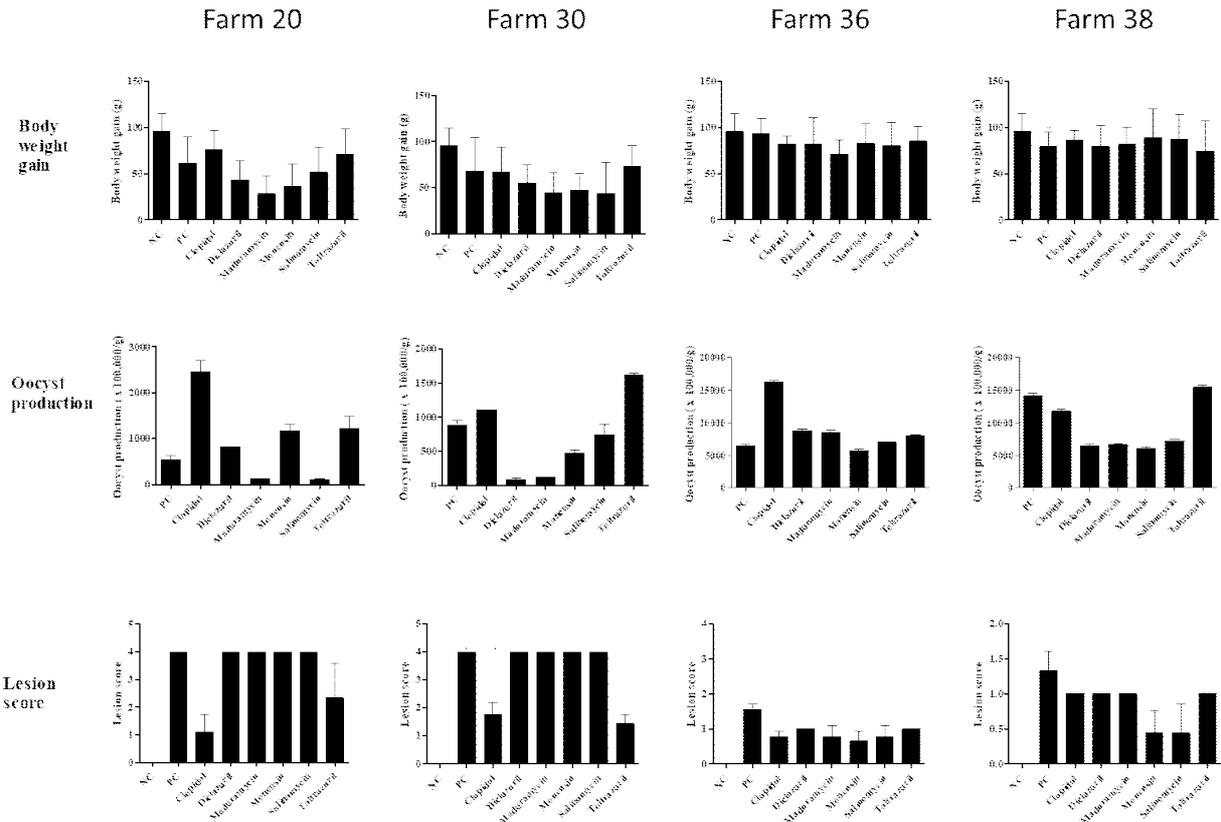


그림 8. 항콕시딴제 내성 조사 결과 (3차 실험)

- 콕시딴 양성으로 판정된 4개 농장에서 분리된 콕시딴의 항콕시딴제 내성 조사 결과는 그림 8와 같았다. 4개의 농장 시료 중 인공 감염시 음성대조군과의 비교에서 유의적인 증체 감소를 보인 시료는 시료 20과 시료 38이었다. 분변으로 배출되는 콕시딴 원충 수의 경우 양성대조군과의 비교에서 시료 38의 경우 대부분의 항콕시딴제 처리군에서 증가되는 경향을 나타내었으며 시료 36의 경우 유의적인 감소를 나타내는 처리군은 확인되지 않았다. 장 병변 점수의 경우 양성대조군과의 비교에서 시료 36, 38의 경우 대부분의 항콕시딴제 처리군에서 양성대조군에 비해 유의적으로 낮은 장 병변 점수를 나타냈지만 시료 20과 시료 30의 경우 clopidol과 toltrazuril 처리군에서만 유의적으로 감소된 장 병변이 확인되었다.

- 4가지 항콕시딴제 지수인 anticoccidial index (ACI), percent optimum anticoccidial activity (POAA), relative oocyst production (ROP), and reduced lesion score (RLS) 지수를 체중 증가, 난포낭 생성, 병변 점수 및 생존율을 바탕으로 평가하였으며 각 지수의 계산식과 평가 결과는 표 19-22와 같았으며 종합한 내성 결과는 표 23에 나타내었다.

ACI의 경우, 모든 농장의 시료에서 본 연구에 사용된 6개의 항콕시딕제에 대한 내성이 있는 것으로 확인되었으며, POAA의 경우에는 시료 20에서 maduramycin, salinomycin, 시료 30은 diclazuril, maduramycin, 시료 38은 diclazuril, maduramycin, monensin 항콕시딕제에 내성을 나타내었다. ROP의 경우, 시료 30의 diclazuril과 maduramycin을 제외한 모든 시료에서 항콕시딕제 내성이 확인되었으며, RLS의 경우에는 시료 20의 clopidol, 시료 30의 clopidol, toltrazuril, 시료 36의 clopidol, maduramycin, monensin, salinomycin, 시료 38의 monensin, salinomycin을 제외한 모든 시료가 항콕시딕제에 내성을 나타내었다. 농장 시료별로 살펴보면, 시료 20의 경우 clopidol이 총점 2점으로 가장 낮은 수준의 내성을 나타내었으며, 시료 30의 경우 clopidol, toltrazuril이 각 2점, 시료 36의 경우 clopidol, maduramycin, monensin, salinomycin이 각 2점, 시료 38의 경우 salinomycin이 2점으로 본 실험에 사용된 항콕시딕제 중 상대적으로 낮은 내성 수준을 보였다. 항콕시딕제별로 살펴보면 diclazuril 13점, maduramycin 13점, monensin, salinomycin, toltrazuril 각 11점, clopidol 9점으로 상대적으로 clopidol에 대한 내성이 낮은 것으로 확인되었다.

표 19. 항콕시딕제에 대한 농장 시료의 anticoccidial index (ACI)

Treatment \ 시료	시료 20	시료 30	시료 36	시료 38
NC	200.00	200.00	200.00	200.00
PC	18.59	42.05	96.61	81.67
Clopidol	-279.43	16.99	-69.48	106.11
Diclazuril	-42.01	77.01	47.17	136.37
Maduramicin	44.21	95.48	40.03	137.66
Monensin	-88.34	74.54	96.57	149.32
Salinomycin	96.73	41.30	73.69	140.09
Toltrazuril	-49.62	-8.95	62.44	67.91

Formula
Anti-coccidial Index (ACI):
 (Relative BWG + Survival Rate) - (Lesion score + oocyst value)
 Where, oocyst value= (OPG output each group/OPG output of PC) X 100

Interpretation of result
 ≥160: sensitive
 ≤160: resistant

표 20. 항콕시딕제에 대한 농장 시료의 percent optimum anticoccidial activity (POAA)

Treatment \ 시료	시료 20	시료 30	시료 36	시료 38
NC	100.00	100.00	100.00	100.00
PC	0.00	0.00	0.00	0.00
Clopidol	449.24	126.15	254.49	83.47
Diclazuril	150.02	10.30	137.88	45.54
Maduramicin	23.01	14.09	133.82	47.65
Monensin	214.02	54.14	89.25	43.17
Salinomycin	19.99	84.15	110.01	50.92
Toltrazuril	221.66	183.88	125.75	109.38

Formula
Percent Optimum Anticoccidial Activity (POAA):

$$\frac{(\text{GSR in medicated group} - \text{GSR of PC group})}{(\text{GSR in NC group} - \text{GSR of PC group})} \times 100$$

Interpretation of result
 ≥ 50%: sensitive
 ≤ 50%: resistant

Where,
 GSR= $\frac{\text{Cage weight at end of experiment} - \text{weight of dead birds}}{\text{Cage weight at start of infection}}$

표 21. 항콕시딴제에 대한 농장 시료의 relative oocyst production (ROP)

Treatment \ 시료	시료 8	시료 9	시료 10	시료 12
NC	0.00	0.00	0.00	0.00
PC	100.00	100.00	100.00	100.00
Clopidol	449.24	126.15	254.49	83.47
Diclazuril	150.02	10.30	137.88	45.54
Maduramicin	23.01	14.09	133.82	47.65
Monensin	214.02	54.14	89.25	43.17
Salinomycin	19.99	84.15	110.01	50.92
Toltrazuril	221.66	183.88	125.75	109.38

Formula	Relative Oocyst Production (ROP): $\frac{\text{OPG in medicated group}}{\text{OPG in PC group}} \times 100$	Interpretation of result
		$\leq 15\%$: sensitive $\geq 15\%$: resistant

표 22. 항콕시딴제에 대한 농장 시료의 reduced lesion score (RLS)

Treatment \ 시료	시료 20	시료 30	시료 36	시료 38
NC	100.00	100.00	100.00	100.00
PC	0.00	0.00	0.00	0.00
Clopidol	72.22	55.56	50.00	25.00
Diclazuril	0.00	0.00	35.71	25.00
Maduramicin	0.00	0.00	50.00	25.00
Monensin	0.00	0.00	57.14	66.67
Salinomycin	0.00	0.00	50.00	66.67
Toltrazuril	41.67	63.89	35.71	25.00

Formula	Reduction of Lesion Score (RLS) or AST (Anticoccidial Sensitivity test): $\frac{(\text{average LS in PC group} - \text{average LS in medicated group})}{(\text{average lesion score in PC group})} \times 100$	Interpretation of result
		$> 50\%$: sensitive $\leq 50\%$: resistant

표 23. 항콕시딴제에 대한 전체적인 내성 결과

Treatment \ 시료	시료 20	시료 30	시료 36	시료 38	평균
Clopidol	2	2	2	3	2.25
Diclazuril	3	3	3	4	3.25
Maduramicin	4	3	2	4	3.25
Monensin	3	3	2	3	2.75
Salinomycin	4	3	2	2	2.75
Toltrazuril	3	2	3	3	2.75

Overall assessment:	0/4: no drug resistance 1/4: slight drug resistance 2/4: moderate drug resistance 3-4/4: severely drug resistant
--------------------------------	---

<4차 실험>

- 3개의 농장 시료(시료 39, 시료 40, 시료 41)를 이용하여 항콕시딴제 내성 조사 및 유효성 평가를 진행하였다. 국내 양계 농장의 분변 시료에 존재하는 항콕시딴제의 내성을 조사하기 위하여 사료첨가제 또는 치료용으로 많이 사용되는 항콕시딴제 6종(clopidol, diclazuril, maduramicin, monensin, salinomycin sodium, toltrazuril)을 제품 권장치에 준하여 사료에 혼합한 후 실험 기간동안 무제한 급여하였다. 이어서 분변에서 분리한 콕시딴을 인공감염(원충 30,000개/마리)하고 배출되는 원충 수, 증체량, 장 병변 정도를 파악하여 항콕시딴제 내성 조사를 실시하였다.

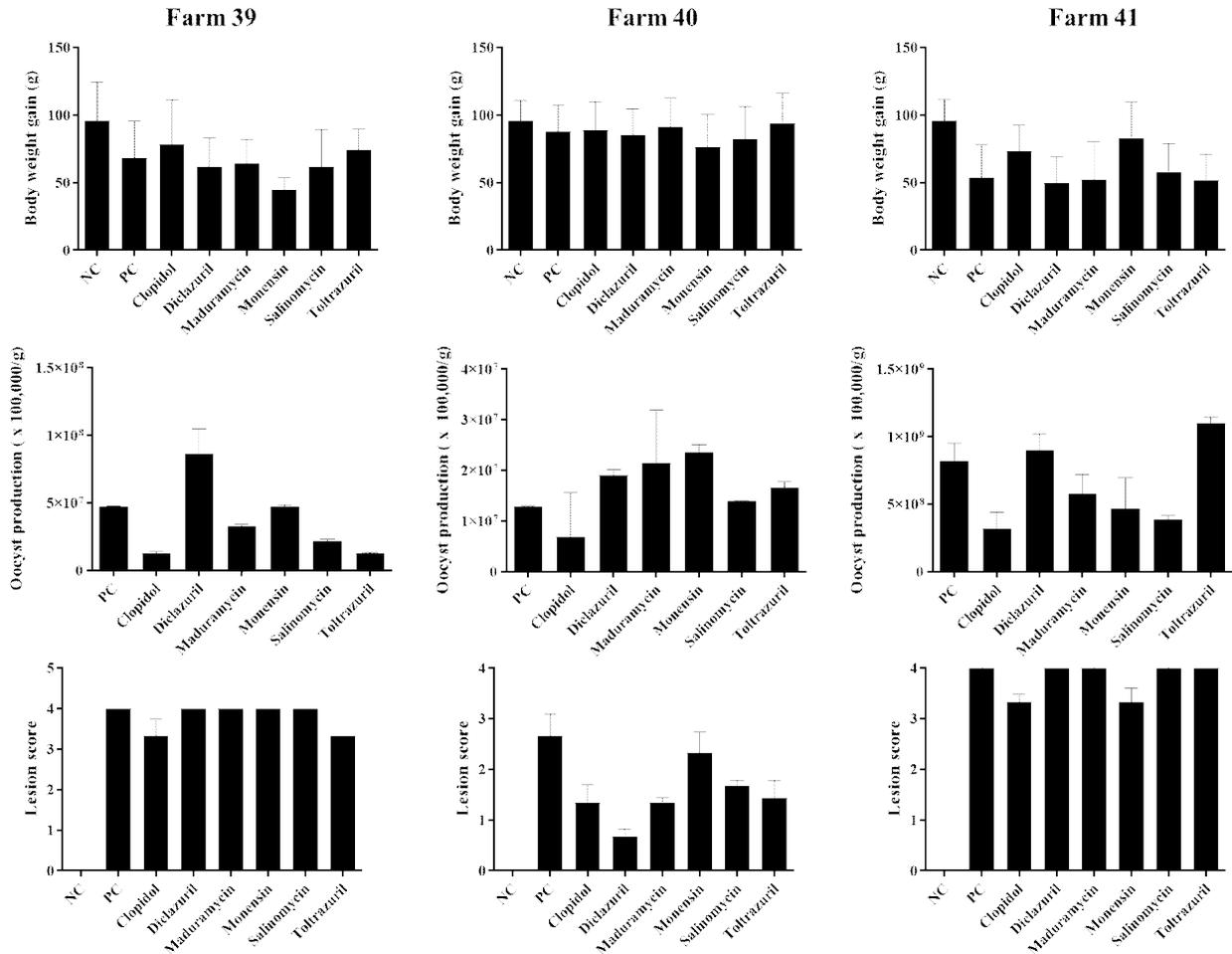


그림 9. 항콕시딴제 내성 조사 결과 (4차 실험)

- 콕시딴 양성으로 판정된 3개 농장에서 분리된 콕시딴의 항콕시딴제 내성 조사 결과는 그림 9와 같았다. 3개의 농장 시료 중 인공 감염시 음성대조군과의 비교에서 유의적인 증체 감소를 보인 시료는 시료 39과 시료 41였으며, 시료 40의 경우 대조군과 항콕시딴제 처리군 모두에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 분변으로 배출되는 콕시딴 원충 수의 경우 양성대조군과의 비교에서 시료와 상관없이 모든 농장 시료의 clopidol군에서는 감소된 것이 확인되었다. 장 병변 점수의 경우 양성대조군과의 비교에서 시료 40의 경우 대부분의 항콕시딴제 처리군에서 양성대조군에 비해 유의적으로 낮은 장 병변 점수를 나타냈지만 시료 39, 41의 경우 모든 항콕시딴제 처리군에서 유의적인 장병변의 감소가 나타나지 않았다.

- 4가지 항콕시듦 지수인 anticoccidial index (ACI), percent optimum anticoccidial activity (POAA), relative oocyst production (ROP), and reduced lesion score (RLS) 지수를 측정 증가, 난포낭 생성, 병변 점수 및 생존율을 바탕으로 평가하였으며 각 지수의 계산식과 평가 결과는 표 24-27와 같았으며 종합한 내성 결과는 표 28에 나타내었다. ACI의 경우, 모든 농장의 시료에서 본 연구에 사용된 6개의 항콕시듦제에 대한 내성이 있는 것으로 확인되었으며, POAA의 경우에는 시료 39에서 clopidol, 시료 40은 clopidol, toltrazuril을 제외하고 모든 처리군에서 콕시듦제에 내성을 나타내었다. ROP의 경우, 모든 농장의 시료에서 항콕시듦제에 대한 내성이 있는 것으로 확인되었으며, RLS의 경우에는 시료 39의 clopidol, 시료 40의 clopidol, toltrazuril, 시료 41의 maduramycin 제외한 모든 시료가 항콕시듦제에 내성을 나타내었다. 항콕시듦제별로 살펴보면 salinomycin 12점, diclazuril, maduramycin 11점, monensin, toltrazuril 각 10점, clopidol 8점으로 상대적으로 clopidol에 대한 내성이 낮은 것으로 확인되었다.

표 24. 항콕시듦제에 대한 농장 시료의 anticoccidial index (ACI)

Treatment \ 시료	시료 39	시료 40	시료 41
NC	200.00	200.00	200.00
PC	25.58	87.56	20.96
Clopidol	145.46	137.19	103.25
Diclazuril	-54.89	37.48	1.12
Maduramicin	35.79	25.82	62.70
Monensin	33.83	-6.91	95.27
Salinomycin	80.89	73.32	92.02
Toltrazuril	148.30	68.09	4.91

Formula	Interpretation of result
Anti-coccidial Index (ACI):	
$(\text{Relative BWG} + \text{Survival Rate}) - (\text{Lesion score} + \text{oocyst value})$	≥ 160 : sensitive
Where, oocyst value = $(\text{OPG output each group} / \text{OPG output of PC}) \times 100$	≤ 160 : resistant

표 25. 항콕시듦제에 대한 농장 시료의 percent optimum anticoccidial activity (POAA)

Treatment \ 시료	시료 39	시료 40	시료 41
NC	100.00	100.05	100.01
PC	0.00	0.00	0.00
Clopidol	59.66	166.84	70.55
Diclazuril	-29.47	-23.51	2.71
Maduramicin	-15.74	109.71	4.00
Monensin	-97.79	-115.25	76.75
Salinomycin	-33.06	-46.21	17.31
Toltrazuril	28.61	207.56	3.84

Formula	Interpretation of result
Percent Optimum Anticoccidial Activity (POAA):	
$\frac{(\text{GSR in medicated group} - \text{GSR of PC group})}{(\text{GSR in NC group} - \text{GSR of PC group})} \times 100$	$\geq 50\%$: sensitive
Where, $\text{GSR} = \frac{\text{Cage weight at end of experiment} + \text{weight of dead birds}}{\text{Cage weight at start of infection}}$	$\leq 50\%$: resistant

표 26. 항콕시딤제에 대한 농장 시료의 relative oocyst production (ROP)

Treatment \ 시료	시료 39	시료 40	시료 41
NC	0.000	0.000	0.000
PC	100.000	100.000	100.000
Clopidol	26.549	53.594	38.872
Diclazuril	181.840	147.302	109.751
Maduramicin	68.690	165.339	71.082
Monensin	100.314	182.492	57.216
Salinomycin	46.237	108.220	47.655
Toltrazuril	26.549	128.317	134.596

Formula	Relative Oocyst Production (ROP): $\frac{\text{OPG in medicated group}}{\text{OPG in PC group}} \times 100$	Interpretation of result
		$\leq 15\%$: sensitive $\geq 15\%$: resistant

표 27. 항콕시딤제에 대한 농장 시료의 reduced lesion score (RLS)

Treatment \ 시료	시료 39	시료 40	시료 41
NC	100.00	100.00	100.00
PC	0.00	0.00	0.00
Clopidol	72.22	55.56	50.00
Diclazuril	0.00	0.00	35.71
Maduramicin	0.00	0.00	50.00
Monensin	0.00	0.00	57.14
Salinomycin	0.00	0.00	50.00
Toltrazuril	41.67	63.89	35.71

Formula	Reduction of Lesion Score (RLS) or AST (Anticoccidial Sensitivity test): $\frac{(\text{average LS in PC group} - \text{average LS in medicated group})}{(\text{average lesion score in PC group})} \times 100$	Interpretation of result
		$>50\%$: sensitive $\leq 50\%$: resistant

표 28. 항콕시딤제에 대한 전체적인 내성 결과

Treatment \ 시료	시료 39	시료 40	시료 41	평균
Clopidol	3	2	3	2.67
Diclazuril	3	4	4	3.67
Maduramicin	4	3	4	3.67
Monensin	4	4	2	3.33
Salinomycin	4	4	4	4.00
Toltrazuril	4	2	4	3.33

Overall assessment:	0/4: no drug resistance 1/4: slight drug resistance 2/4: moderate drug resistance 3-4/4: severely drug resistant
----------------------------	---

<항콕시톱제 내성 조사 결론>

- 총 14개의 양계 농가의 야외 콕시톱 균주에 대하여 항콕시톱제 내성 조사를 실시한 결과 전반적으로 연구에 사용된 모든 항콕시톱제에 대한 높은 내성이 확인되었다. 항생제별 비교에서는 총 14농장의 결과를 종합하면 clopidol이 가장 낮은 내성을 보였고 반대로 diclazuril이 가장 높은 내성을 나타내었다(표 29). 이러한 결과는 현재 사용중인 항콕시톱제제의 한계와 백신 등 새로운 백신에 대한 대책에 대한 필요성을 말해준다.

내성지수	시료 8	시료 9	시료 10	시료 12	시료 14	시료 15	시료 16	시료 20	시료 30	시료 36	시료 38	시료 39	시료 40	시료 41	평균
Clopidol	3	2	4	4	3	3	2	2	2	2	3	3	2	3	2.71
Diclazuril	4	2	4	4	4	3	3	3	3	3	4	3	4	4	3.43
Maduramicin	4	2	4	3	4	3	2	4	3	2	4	4	3	4	3.29
Monensin	3	2	4	3	-	-	-	3	3	2	3	4	4	2	3.00
Salinomycin	2	2	4	3	-	-	-	4	3	2	2	4	4	4	3.09
Toltrazuril	3	2	4	3	4	4	2	3	2	3	3	4	2	4	3.07

표 29. 국내 분리 콕시톱 균주의 항콕시톱제 내성

▶ 백신 균주 병원성 및 면역원성 분석

결론: 육계에서 주로 감염되는 3종류의 콕시톱 원충을 (*Eimeria acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella*)을 육계에 감염 후에 체중증가(BWG), 장병변 점수(LS) 및 총란수 같은 매개 변수의 차이를 분석하였다. 첫째, *Eimeria* 감염의 경우는 2주령 및 3주령 닭은 약 3의 LS를 나타내었지만, 2주령 닭에서 더욱 높은 BWG와 LS와 상관관계를 나타내었다. 둘째, *Eimeria*를 접종한 육계 수컷과 암컷 육계 사이에서 BWG의 상당한 차이가 관찰되었습니다. 마지막으로, *Eimeria* 3종 중 *E. maxima*에 감염된 육계는 BWG와 LS 사이에 더 높은 상관관계를 나타내었다. 따라서 *Eimeria* 실험은 성별, 연령 및 *Eimeria* 종과 같은 최소한 세 가지 사항을 고려하여 실험을 진행할 필요성이 있다.

- BWG를 감염되지 않은 정상 암 육계와 수 육계 사이에서 비교하였다. 30 마리의 병아리를 이용한 실험에서는 BWG는 모든 평가 시점에서 정상 암과 수 병아리 사이에 유의성 있는 차이가 있었다 ($p < 0.01$) (Supplementary Table 1).

Supplementary Table 1. Body weight of normal ROSS 308 broiler chickens

Items	Body weight					
	Day 5		Day 13		Day 16	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Mean	109.3	114.9	416.6	449.6	610.3	654.9
SD	8.8	6.7	32.8	33.6	41.6	33.7
<i>p</i> value	0.0091		0.0004		0.0004	

Individual body weights, in grams, (n = 30) were measured on day 5, day 13 and day 16 after hatching.

- *E. tenella* 10,000를 감염한 암 및 수 육계에서는 감염 후 9일째에 암컷은(596.3 ±

47.2) 수컷과(654.4 ± 33.2) 비교하여 BWG가 현저히 낮았다. LS와 총란수 배출에서는 암탉과 수탉 사이에 유의미한 차이는 관찰되지 않았다. 감염된 암탉의 평균 LS은(2.2 ± 0.9) 감염된 수탉의 LS(2.2 ± 1.7)와 유사하였다. 감염된 암탉의 총란수는(656.4 × 10³ ± 111.9 × 10³ 총란수/수) 감염된 수탉의 총란수와(572.2 × 10³ ± 21.1 × 10³ 총란수/수) 비교하여 유사하였다(그림 10). 대조군으로 사용된 감염되지 않은 닭에서는 병변이나 총란은 관찰되지 않았다.

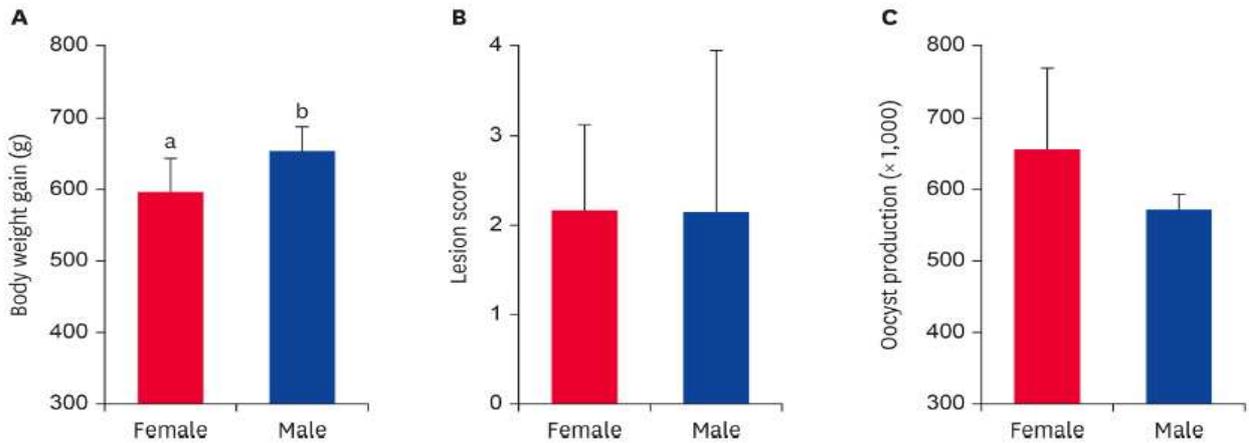


그림 10. *E. tenella* 감염 후 암수 육계의 임상 증상 비교. 1주령의 ROSS 308 병아리에 10,000개의 총란을 경구 감염시켰다. (A) 감염 후 9일째에 체중(n=20)을 측정하였다. (B) 감염 후 7일째에 장병변 점수를 위해 5마리의 닭을 무작위로 선택하였다. 병변에 따라서 0-4로 점수를 주었다. (C) 총란수 (n=30). 감염 후 6일부터 9일까지 수집된 분변 샘플에 존재하는 총란수를(총란수/ 분변 1 g) 표시하였다. 각 그래프 내에서 표시된 문자를 공유하지 않는 막대는 수컷 닭과 암컷 닭 사이에 유의한 차이가 나타난다(P<0.05). 데이터는 유사한 결과를 나타내는 두 개의 독립적인 실험 중 하나의 평균 ± SE이다.

- 저용량(10,000 총란수)의 *Eimeria*으로 감염된 수컷 육계에서 감염 후 6일과 9일에 측정된 BWG는 감염되지 않은 대조군과 비교하여 *E. maxima* 감염군에서는 유의성 있게 낮았지만, *E. acervulina* 또는 *E. tenella* 감염의 경우에는 유사하였다(그림 11A). LS는 *E. tenella* 감염군은(2.2 ± 1.8) *E. maxima* 감염군과(0.8 ± 0.4) 비교하여 유의성 있게 높았으나 *E. acervulina* 감염군과(1.8 ± 0.5) 비교할 경우에는 유사하였다(Fig. 11B). Oocyst shedding은 *E. acervulina* 감염군보다 *E. tenella* 감염군에서 유의성 있게 낮았으나 *E. maxima* 감염군보다는 높았다(Fig. 11C). 감염되지 않은 대조군 닭에서는 병변이나 총란수는 관찰되지 않았다. 실험전 BWG는 그룹 간에 유의한 차이를 보이지 않았다(p > 0.05).

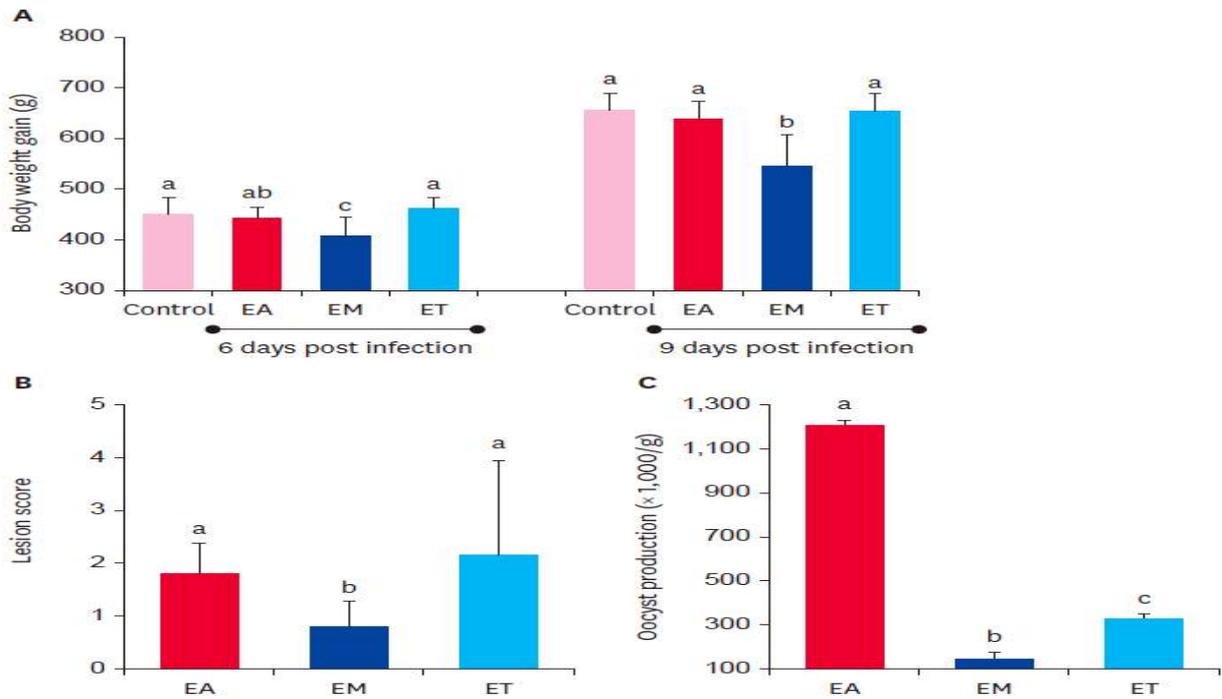


그림 11. 저용량 *Eimeria* 종에 감염된 육계 수컷의 임상증상 비교. 1주령 ROSS 308 수컷 닭을 EA, EM 또는 ET 10,000개의 총란수로 구강 감염시켰다. (A) 감염 후 6일 및 9일에 체중(n = 20)을 측정하였다. (B) 감염 후 7일째에 장병변 점수를 위해 5마리의 닭을 무작위로 선택하였다. (C) 닭의 총란수 생산(n = 20). 총란수를(총란수/분변 1g) 위해서 감염 후 6일부터 9일까지 분변 시료를 채취하였다. 각 그래프 내에서 표시된 문자를 공유하지 않는 막대는 유의성 있는 차이를 나타낸다(p < 0.05). 데이터는 유사한 결과를 나타내는 두 개의 독립적인 실험 중 하나의 평균 ± SE이다. EA, *E. acervulina*; EM, *E. maxima*; ET, *E. tenella*.

- 육계의 성별에 따른 차이가 있는지 확인을 위해 암컷 닭에 *E. acervulina*, *E. maxima* 또는 *E. tenella*의 총란 10,000개를 감염하였다. *Eimeria*에 감염된 암컷 닭에서 BWG, LS 및 총란수 등은 수컷 닭과 비교하여 유사한 결과를 나타내었다(그림 12). 이러한 관찰은 *E. maxima*가 *E. acervulina* 및 *E. tenella*에 비해 LS와 BWG 사이에 더 높은 상관관계를 또한 암탉에서도 관찰되었다.

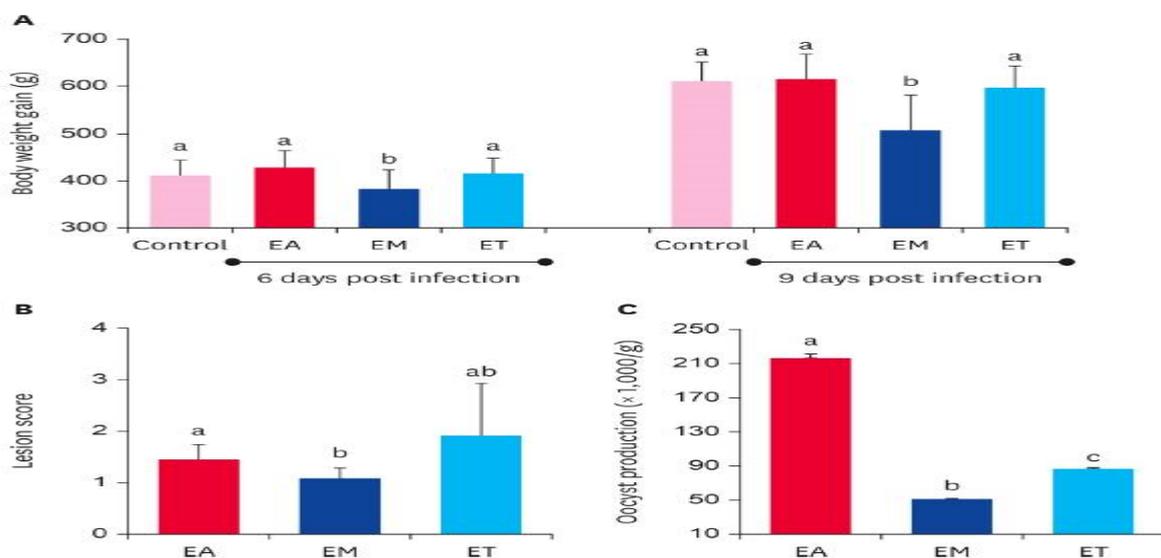


그림 12. *E. acervulina*, *E. maxima* 및 *E. tenella*에 감염된 암컷 육계의 임상 증상 비교. 1주령 ROSS 308 암컷 닭에 *E. acervulina*, *E. maxima* 및 *E. tenella*의 총란 10,000개를 구강 감염시켰다. (A) 감염 후 6일 및 9일에 체중($n=20$)을 측정하였다. 각 그래프 내에서 표시된 문자를 공유하지 않는 막대는 유의성 있는 차이를 나타낸다($P<0.01$). (B) 감염 후 7 일째의 장병변 점수를 위해 5마리의 닭을 무작위로 선택하였다. 병변의 상태에 따라서 병변 점수는 0-4로 구분하였다. 각 그래프 내에서 표시된 문자를 공유하지 않는 막대는 유의성 있는 차이를 나타낸다($P<0.05$). (C) 닭의 분변 총란수($n=20$). 총란수를(총란수/분변 1g) 위해서 감염 후 6일부터 9일까지 분변 시료를 채취하였다. 각 그래프 내에서 표시된 문자를 공유하지 않는 막대는 유의성 있는 차이를 나타낸다($p < 0.05$). 데이터는 유사한 결과를 나타내는 두 개의 독립적인 실험 중 하나의 평균 \pm SE이다. EA, *E. acervulina*; EM, *E. maxima*; ET, *E. tenella*.

- 증가된 LS가 BWG와 상관관계가 있는지 여부를 모니터링하기 위해 2주령 ROSS 308 수컷 닭에 EA 150,000, EM 70,000, ET 50,000개의 총란을 구강으로 감염시켰다. 감염 후 9 일째에 측정된 BWG는 감염되지 않은 그룹에 비해 모든 감염 그룹에서 유의성 있게 낮았다(그림 13A). 실험전 BWG는 그룹 간에 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). *E. tenella* 감염군(3.6 ± 0.5)의 평균 LS는 *E. maxima* 감염군(2.8 ± 0.4)보다 유의성 있게 높았으나, *E. acervulina* 감염군(3.1 ± 0.4)과 비교하면 유사하였다(그림 13B). *E. maxima* 및 *E. tenella* 감염 그룹의 총란수 배출은 *E. acervulina* 감염 그룹에 비해 유의성 있게 낮았다(그림 13C). 일령이 세 가지 매개변수에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 확인하기 위해 3주령의 수컷 닭을 위와 같은 조건으로 감염시켰다. 감염 후 9일째에 측정된 BWG는 감염되지 않은 그룹에 비해 *E. acervulina* 및 *E. maxima* 감염 그룹 모두에서 유의성 있게 낮았다. 그러나 *E. tenella* 감염군의 BWG는 비감염군의 BWG와 유사하였다(Fig. 13D). 평균 LS는 *E. maxima* 감염군(2.2 ± 0.5)에 비해 *E. tenella* 감염군(3.2 ± 1.1)에서 유의성 있게 높았으나, *E. acervulina* 감염군(3.6 ± 0.5)과 비교하면 유사하였다(그림 13E). 총란 배출은 *E. acervulina* 감염군에 비해 *E. tenella* 감염군에서 유의성 있게 낮았으나, *E. maxima* 감염군과 *E. tenella* 감염군 사이에는 유사하였다(그림 13F). 대조군으로 사용된 감염되지 않은 닭에서는 병변이나 총란은 관찰되지 않았다.

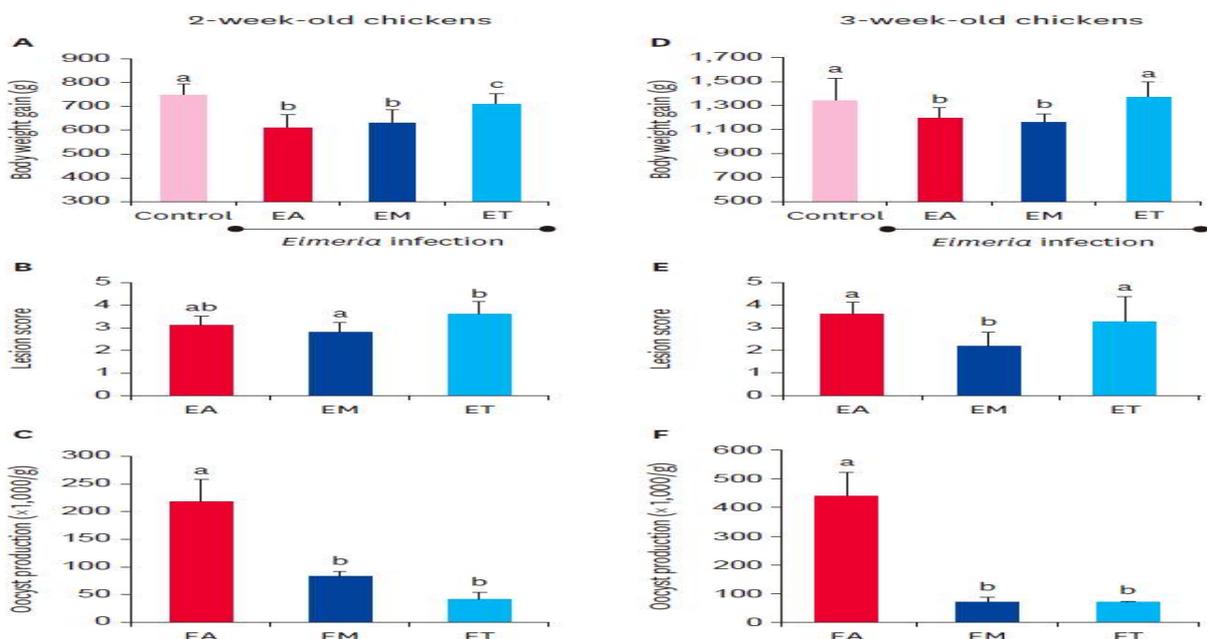


그림 13. 고용량의 *Eimeria* 종에 감염된 2주령과 3주령 육계의 임상증상 비교. 2주령 및 3주령 ROSS 308 수컷 닭에 EA 150,000, EM 70,000, ET 50,000개의 총란을 구강으로 감염시켰다. (A) 감염 후 6일 및 9일에 체중(n=20)을 측정하였다. (B) 감염 후 7일째의 장병변 점수를 위해 10마리의 닭을 무작위로 선택하였다. 병변의 상태에 따라서 병변 점수는 0-4로 구분하였다. (C) 닭의 분변 총란수(n=15). 총란수(총란수/분변 1g) 위해서 감염 후 6일부터 9일까지 분변 시료를 채취하였다. 각 그래프 내에서 표시된 문자를 공유하지 않는 막대는 유의성 있는 차이를 나타낸다($p < 0.05$). 데이터는 유사한 결과를 나타내는 두 개의 독립적인 실험 중 하나의 평균 \pm SE이다. EA, *E. acervulina*; EM, *E. maxima*; ET, *E. tenella*.

- 3주령 수컷 육계의 감염되지 않은 정상 대조군과 비교하여, 조직병리학적 관찰에서 *E. acervulina*에 감염된 십이지장에서 용모 길이가 약 11.5%(2,178 \pm 661 vs. 1,950 \pm 194), *E. maxima*에 감염된 공장에서 36.3%(1,392 \pm 284 vs. 888 \pm 277) 감소한 것으로 나타났다. *E. tenella* 감염 부위인 Ceca에는 용모가 없으므로 *E. tenella*의 용모 길이는 측정하지 않았다(그림 5 및 표 1). 크립트 깊이는 *E. acervulina*에 감염된 십이지장에서 약 188%(211 \pm 96 vs. 397 \pm 86), *E. maxima*에 감염된 공장에서 182%(210 \pm 55 vs. 382 \pm 32), *E. tenella*에 감염된 맹장에서 141% (353 \pm 51 vs. 499 \pm 151) 증가했다(그림 14 및 표 1).

Table 1. Villi length and crypt depth in *Eimeria* infected broilers

<i>Eimeria</i> species	Villi length (um)		Crypt depth (um)	
	Control	Infected	Control	Infected
<i>E. acervulina</i>	2,178 \pm 661	1,950 \pm 194	211 \pm 96	397 \pm 86
<i>E. maxima</i>	1,392 \pm 284	888 \pm 277	210 \pm 55	382 \pm 32
<i>E. tenella</i>	ND	ND	353 \pm 51	499 \pm 151

Data represent the mean \pm standard deviation (n = 5).

ND, not determined.

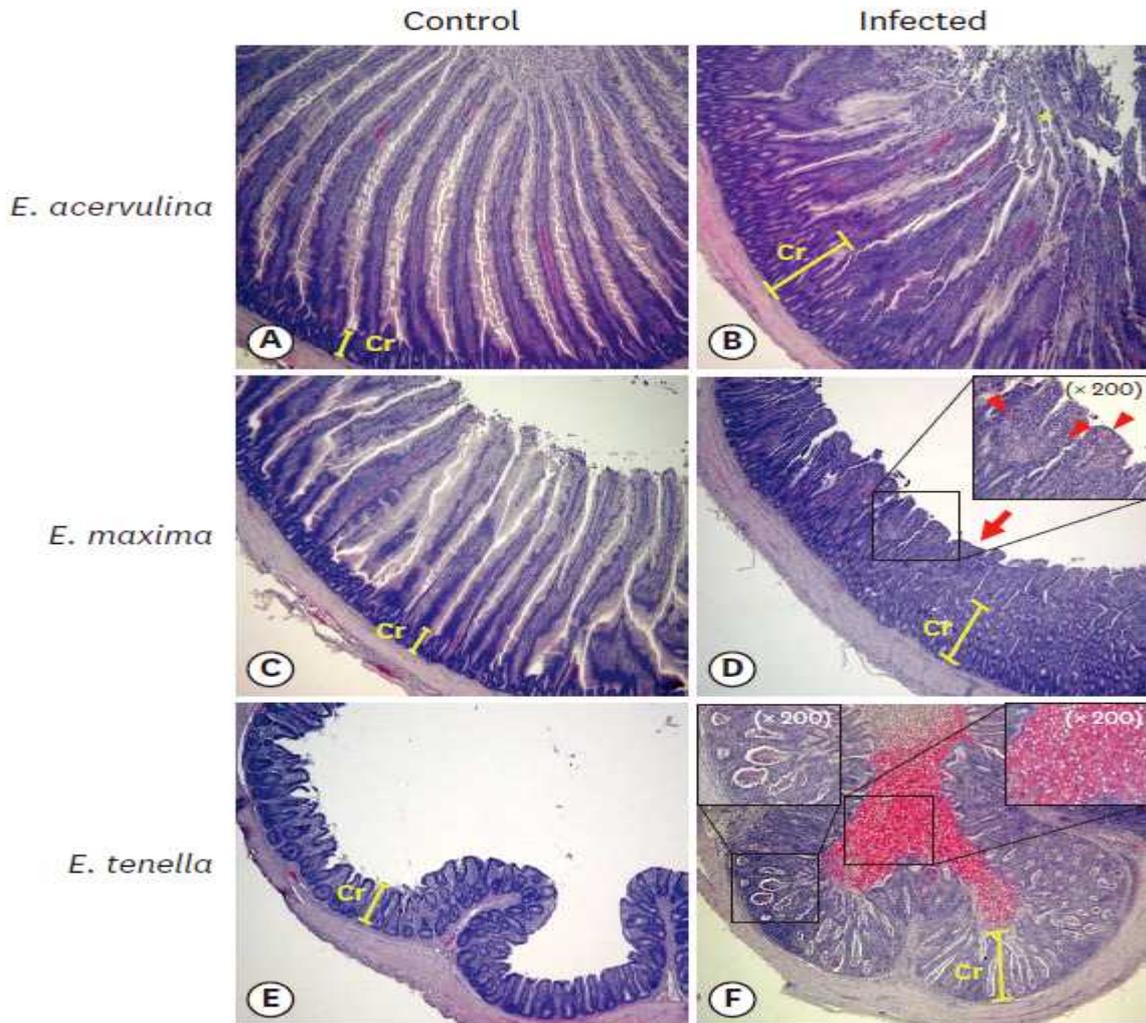


그림 14. Eimeria에 감염된 육계의 용모 길이와 crypt의 깊이. 닭 3주령에 EA 150,000, EM 70,000, ET 50,000개의 총란을 구강으로 감염시켰다. 대조군에게는 동량의 PBS(A, C, E)를 경구 투여하였다. Eimeria 감염 후 7일째에 EA의 십이지장(A, B), EM의 공장(C, D) 및 ET의 맹장(E, F) 부위를 10% 중성 완충 포르말린에 고정하였다. 조직절편을 hematoxylin과 eosin으로 염색하였으며, 용모 길이와 crypt의 깊이를 측정하기 위해 5개 지역을 무작위로 선택하여 현미경으로(400×) 관찰하였다. 노란색 별(B)과 화살표(D)는 용모의 끝이 떨어지고 있음을 나타냅니다. 조그만 사각형(D)와 (F)의 화살촉은 각각 EM과 ET의 총란을 나타낸다. EA, Eimeria acervulina; EM, E. maxima; ET, E. tenella; Cr, crypt.

▶ 해외 콕시듐 백신 시장 조사

스페인에 본사를 두고 있는 Hipra는 종계 및 산란계용 콕시듐 백신인 Evalon과 육계용 콕시듐 백신인 Evant를 유럽 EMA 사용 승인을 받아 판매 중이다. 최근 계란 내 접종 가능한 Evanovo에 대한 EMA 승인을 획득하여 시장 출시를 눈 앞에 두고 있다. Evalon과 Evant는 현재 국내에서 사용중이며 제한적인 유효기간으로 선주문 후 백신 수령 및 접종이 이루어지고 있다. Evanovo는 유럽에서 최초로 상용화되는 육계용 계란 내 접종 생백신으로 E. acervulina, E. maxima, E. praecox, E. tenella 4종의 콕시듐을 포함하고 있으며 동시간대에 정확한 양을 균일하게 접종할 수 있는 장점을 가지고 있다. 표 30은 히프라에서 생산하고 있는 사용 콕시듐 백신들을 나타내었으며, 국내에 기승인된 백신들처럼 Evanovo에 대한

국내 승인도 추후 이루어 질 것으로 생각된다.

표 30. 히프라 상용백신

	Evalon	Evant	Evanovo
백신 종류	생백신	생백신	생백신
백신 접종	스프레이	스프레이	계란 내 접종
타겟	종계 및 산란계	육계	육계
콕시듐 종	5종 (E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. necatrix, E. tenella)	5종 (E. acervulina, E. maxima, E. mitis, E. praecox, E. tenella)	4종 (E. acervulina, E. maxima, E. praecox, E. tenella)
해외 승인 (EMA 기준)	2016.04.	2019.02.	2022.07.
국내 승인	2020.01.	2022.02.	-

나. 제2세부과제 (공동연구기관: ㈜혹스바이오): 국내 기반 콕시듐 균주를 이용한 백신 시제품 제작

<1차 실험>

백신 시제품을 만들기 위한 기초 작업으로 항원 함량 시험을 3 균주를 3가지 다른 용량으로 산란계(male ROSS308)를 사용하여 실험을 수행하였다. 12 종류의 다양한 함량을 아래의 표와 같이 구강 접종 및 분무 접종을 통하여 백신을 접종하였다 (표 31). 1일령에 백신 접종 후 21일에 포자 형성된 150,000의 E. acervulina, 70,000의 E. maxima, 30,000의 E. tenella를 구강으로 공격 접종하여 백신의 효과를 측정하였다.

표 31. 구강 접종 및 분무 접종 항원 함량

균주	함량 1	함량 2	함량 3	함량 4	함량 5	함량 6	비고
E. acervulina(EA) (291-5)	1,500	1,000	500	1,500(EA) +	1,000(EA) +	500(EA) +	구강 접종 분무 접종
E. maxima(EM) (310-4)	1,500	1,000	500	1,500(EM) +	1,000(EM) +	500(EM) +	
E. tenella(ET) (291-7)	1,500	1,000	500	1,500(ET)	1,000(ET)	500(ET)	

1) 백신 접종 후 총란수 분석 결과

백신 접종 후에 백신의 접종을 확인하기 위하여 분변에서 총란수를(oocyst numbers / 1 gram) 21 일 동안 평가하였다. 대조군에는 PBS 용액을 투여하였으며, 항콕시듐제가 함유되지 않은 사료 급여를 실험기간 동안 급여하였다. 대조군의 분변에서 총란이 검출되지 않았다(표 32).

▶ E. acervulina 총란 500 개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (0 개), 6 일 (500 개), 7 일 (2,000 개), 8 일 (500 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (267 개), 14 일 (400 개), 21 일

(0 개)가 확인되었다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (0 개), 6 일 (12,000 개), 7 일 (17,000 개), 8 일 (1,300 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (4,200 개), 14 일 (1,400 개), 21 일 (3,800 개)가 확인되었다.

E. acervulina 총란 1,000개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (300개), 6일 (1,000개), 7일 (4,000개), 8일 (500개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (100개), 14일 (200개), 21일 (133개)가 확인되었다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (500개), 6일 (29,000개), 7일 (13,000개), 8일 (3,400개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (6,100개), 14일 (1,100개), 21일 (667개)가 확인되었다.

E. acervulina 총란 1,500개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (100개), 6일 (2,700개), 7일 (4,000개), 8일 (1,100개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (0개), 14일 (700개), 21일 (200개)가 확인되었다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (133개), 6일 (18,000개), 7일 (9,000개), 8일 (1,200개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (11,100개), 14일 (933개), 21일 (1,000개)가 확인되었다.

E. maxima 총란 500개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (1,000개), 7일 (2,000개), 8일 (2,600개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (2,500개), 14일 (67개), 21일 (867개)가 확인되었다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (22,000개), 7일 (29,000개), 8일 (1,000개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (12,200개), 14일 (533개), 21일 (2,933개)가 확인되었다.

E. maxima 총란 1,000개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (9,300개), 7일 (4,667개), 8일 (1,000개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (2,200개), 14일 (0개), 21일 (400개)가 확인되었다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (100개), 6일 (14,000개), 7일 (20,000개), 8일 (2,900개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (1,000개), 14일 (300개), 21일 (933개)가 확인되었다.

E. maxima 총란 1,500개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (23,500개), 7일 (18,667개), 8일 (4,400개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (9,600개), 14일 (200개), 21일 (467개)가 확인되었다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (32,000개), 7일 (33,333개), 8일 (2,400개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (3,000개), 14일 (1,000개), 21일 (400개)가 확인되었다.

E. tenella 총란 500개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (0개), 7일 (9,000개), 8일 (200개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (5,600개), 14일 (700개), 21일 (267개)가 확인되었

다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (4,000개), 7일 (16,667개), 8일 (23,100개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서 총란수는 7일 (4,500개), 14일 (800개), 21일 (1,133개)가 확인되었다.

E. tenella 총란 1,000개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (900개), 7일 (10,000개), 8일 (1,100개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (4,800개), 14일 (200개), 21일 (1,067개)가 확인되었다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (25,000개), 7일 (30,000개), 8일 (37,500개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (195,000개), 14일 (300개), 21일 (267개)가 확인되었다.

E. tenella 총란 1,500개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (68,000개), 7일 (69,000개), 8일 (3,500개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (6,300개), 14일 (1,000개), 21일 (1,800개)가 확인되었다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (7,000개), 7일 (45,000개), 8일 (8,300개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (71,000개), 14일 (800개), 21일 (333개)가 확인되었다.

표 32. 백신 접종 후 21일 동안의 총란 배출 현황

Species	Dose	Vaccine routes	Fecal oocyst shedding after vaccination (D, day) in fecal 1 gram								
			D0	D4	D5	D6	D7	D7 bedding	D8	D14 bedding	D21 bedding
E. acervulina (EA)	500	spray infection	0	0	0	500	2,000	267	500	400	0
		oral infection	0	0	0	12,000	17,000	4,200	1,300	1,400	3,800
	1,000	spray infection	0	0	300	1,000	4,000	100	500	200	133
		oral infection	0	0	500	29,000	13,000	6,100	3,400	1,100	667
	1,500	spray infection	0	0	100	2,700	4,000	0	1,100	700	200
		oral infection	0	0	333	18,000	9,000	11,100	1,200	933	1,000
E. maxima (EM)	500	spray infection	0	0	0	1,000	2,000	2,500	2,600	67	867
		oral infection	0	0	0	22,000	29,000	12,200	1,000	533	2,933
	1,000	spray infection	0	0	0	9,300	4,667	2,200	1,000	0	400
		oral infection	0	0	100	14,000	20,000	1,000	2,900	300	933
	1,500	spray infection	0	0	0	23,500	18,667	9,600	4,400	200	467
		oral infection	0	0	0	32,000	33,333	3,000	2,400	1,000	400
E. tenella (ET)	500	spray infection	0	0	0	0	9,000	5,600	200	700	267
		oral infection	0	0	0	4,000	16,667	4,500	23,100	800	1,133
	1,000	spray infection	0	0	0	900	10,000	4,800	1,100	200	1,067
		oral infection	0	0	0	25,000	30,000	195,000	37,500	300	267
	1,500	spray infection	0	0	0	68,000	69,000	6,300	3,500	1,000	1,800
		oral infection	0	0	0	7,000	45,000	71,000	8,300	800	333
Control	-	Unvaccinated group	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mixed (EA+EM+ET)	500+500+500	spray infection	0	0	33	18,400	51,967	2,950	5,175	1,900	5,333
		oral infection	0	0	433	199,916	127,750	139,500	101,750	26,983	5,333
	1000+1,000+1,000	spray infection	0	0	0	18,350	13,000	14,750	47,000	4,508	867
		oral infection	0	0	433	103,167	144,000	310,000	183,250	1,408	683
	1500+1,500+1,500	spray infection	0	0	75	8,883	13,250	10,500	65,500	27,700	833
		oral infection	0	0	2,567	162,000	300,000	73,333	57,500	1,117	9,633

▶ E. acervulina 500개, E. maxima 500개, E. tenella 500개의 총란을 혼합하여 총 1,500개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (33개), 6일 (18,400개), 7일 (51,967개), 8일 (5,175개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (2,950개), 14일 (1,900개), 21일 (5,333개)가 확인되었다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일

(433 개), 6 일 (199,916 개), 7 일 (127,750 개), 8 일 (101,750 개)가 확인되었다. 깔짚
분변에서의 총란수는 7 일 (139,500 개), 14 일 (26,983 개), 21 일 (5,333 개)가 확인되었다.

E. acervulina 1,000개, *E. maxima* 1,000개, *E. tenella* 1,000개의 총란을 혼합하여 총
3,000개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에
서는 4일 (0개), 5일 (0개), 6일 (18,350개), 7일 (13,000개), 8일 (47,000개)가 확인되었
다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (14,750개), 14일 (4,508개), 21일 (867개)가 확인되었
다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (433개), 6일 (103,167개), 7일
(144,000개), 8일 (183,250개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (310,000개),
14일 (1,408개), 21일 (683개)가 확인되었다.

E. acervulina 1,500개, *E. maxima* 1,500개, *E. tenella* 1,500개의 총란을 혼합하여 총
4,500개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에
서는 4일 (0개), 5일 (75개), 6일 (8,883개), 7일 (13,250개), 8일 (65,500개)가 확인되었
다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (10,500개), 14일 (27,700개), 21일 (833개)가 확인되었
다. 구강 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (2,567개), 6일 (162,000개), 7일
(300,000개), 8일 (57,500개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (73,333개), 14
일 (1,117개), 21일 (9,633개)가 확인되었다.

결론적으로 신선한 분변과 깔짚 분변에 존재하는 총란수를 분석하였다. 백신 접종 후 5-6일
부터 일반적으로 총란을 관찰할 수 있었다. 따라서 12 종류의 함량을 이용한 구강 접종 및
분무 접종이 올바르게 되었음을 알 수 있다.

2) 백신 접종 후 및 공격 접종 후 분변 상태 분석 결과

백신 접종 후 21일에 포자 형성된 150,000의 *E. acervulina*, 70,000의 *E. maxima*,
30,000의 *E. tenella*를 구강으로 공격 접종하여 백신의 효과를 장병변, 총란 배출, 개체별
체중 변화, 분변 상태 등으로 측정하였다 (표 33).

▶ 백신 접종 후 20 일간 분변 상태를 매일 관찰하고 분변 점수를 합하였다. *E. acervulina*
500 개, 1,000 개, 1,500 개를 구강 및 분무로 접종한 모든 접종군들은 6 으로 관찰되었다.
E. maxima 500 개, 1,000 개, 1,500 개를 구강 및 분무로 접종한 접종군들은 일반적으로
4-6 으로 관찰되었다. *E. tenella* 500 개, 1,000 개, 1,500 개를 구강 및 분무로 접종한
접종군들은 일반적으로 4-5 로 관찰되었다. PBS 를 접종한 대조군(normal)에서는 분변
상태의 합이 0.5 로 관찰되었다.

3 종류의 콕시듐 원충을 혼합한 백신 접종 후 20 일간 분변 상태를 매일 관찰하고 분변
점수를 합하였다. *E. acervulina* 500 개, *E. maxima* 500 개, *E. tenella* 500 개의 총란을
혼합하여 총 1,500 개를 접종한 경우, 분무 접종은 3.5, 구강 접종은 5.75 로 관찰되었다.
E. acervulina 1,000 개, *E. maxima* 1,000 개, *E. tenella* 1,000 개의 총란을 혼합하여 총
3,000 개를 접종한 경우, 분무 접종은 4.5, 구강 접종은 3.75 로 관찰되었다. *E. acervulina*
1,500 개, *E. maxima* 1,500 개, *E. tenella* 1,500 개의 총란을 혼합하여 총 4,500 개를

접종한 경우, 분무 접종은 5, 구강 접종은 5.25로 관찰되었다. PBS를 접종한 대조군(normal)에서는 분변 상태의 합이 0.5로 관찰되었다.

▶ 공격 접종 후 9일간 분변 상태를 매일 관찰하여 분변 점수를 합하여 표시하였다. E. acervulina 500개, 1,000개, 1,500개를 구강 및 분무로 접종하고 150,000의 E. acervulina로 공격 접종한 모든 접종군들은 1 또는 3으로 관찰되었다. PBS를 접종하고 150,000의 E. acervulina로 공격 접종한 대조군의 분변 상태는 합이 5로 관찰되었다. E. maxima 500개, 1,000개, 1,500개를 구강 및 분무로 접종하고 70,000의 E. maxima로 공격 접종한 모든 접종군들은 2로 관찰되었다. PBS를 접종하고 70,000의 E. maxima로 공격 접종한 대조군의 분변 상태는 합이 4로 관찰되었다. E. tenella 500개, 1,000개, 1,500개를 구강 및 분무로 접종하고 30,000의 E. tenella로 공격 접종한 모든 접종군들은 일반적으로 1-2로 관찰되었다. PBS를 접종하고 30,000의 E. tenella로 공격 접종한 대조군의 분변 상태는 합이 6으로 관찰되었다. PBS를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군(normal)에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다.

▶ 3종류의 콕시듐 원충을 혼합한 백신을 분무 및 구강으로 접종한 후 21일에 공격 접종하고 9일간 분변 상태를 매일 관찰하여 분변 점수를 합하여 표시하였다. E. acervulina 500개, E. maxima 500개, E. tenella 500개의 총란을 혼합하여 총 1,500개로 백신 접종한 그룹들의 경우는 다음과 같다. 150,000의 E. acervulina로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 1-2로 관찰되었으며, 70,000의 E. maxima로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 1-2로 관찰되었으며, 30,000의 E. tenella로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 2로 관찰되었다. E. acervulina 500개, E. maxima 500개, E. tenella 500개의 총란을 혼합하여 총 1,500개로 백신 접종하고 공격접종하지 않은 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다.

E. acervulina 1,000개, E. maxima 1,000개, E. tenella 1,000개의 총란을 혼합하여 총 3,000개로 백신 접종한 그룹들의 경우는 다음과 같다. 150,000의 E. acervulina로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 1-2로 관찰되었으며, 70,000의 E. maxima로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 1-2로 관찰되었으며, 30,000의 E. tenella로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 2 또는 4로 관찰되었다. E. acervulina 1,000개, E. maxima 1,000개, E. tenella 1,000개의 총란을 혼합하여 총 3,000개로 백신 접종하고 공격접종하지 않은 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다.

E. acervulina 1,500개, E. maxima 1,500개, E. tenella 1,500개의 총란을 혼합하여 총 4,500개로 백신 접종한 그룹들의 경우는 다음과 같다. 150,000의 E. acervulina로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 1-2로 관찰되었으며, 70,000의 E. maxima로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 1-2로 관찰되었으며, 30,000의 E. tenella로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 3 또는 5로 관찰되었다. E. acervulina 1,000개, E. maxima 1,000개, E. tenella 1,000개의 총란을 혼합하여 총 3,000개로 백신 접종하고 공격접종하지 않은 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다. PBS를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다.

결론적으로 백신의 다양한 용량을 접종하고 공격접종을 한 경우에는 백신을 하지 않고 공격접종한 대조군과 비교하여 분변 상태가 양호한 결과를 나타내었다.

3) 공격 접종 후 장병원 지수 분석 결과

주요평가항목인 장병원 지수는 D7(공격접종 후 7일)에 관찰하였다. PBS를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군에서는 장병원 지수는 0으로 관찰되었다.

▶ E. acervulina 500 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 0.4 ± 0.8 , 구강 접종은 0.2 ± 0.4 로 관찰되었다. E. acervulina 1,000 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 0.2 ± 0.4 , 구강 접종은 0.4 ± 0.4 로 관찰되었다. E. acervulina 1,500 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 0.6 ± 0.8 , 구강 접종은 0.2 ± 0.4 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 150,000 개의 E. acervulina로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 2.2 ± 0.98 로 관찰되었다.

E. maxima 500 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 1.4 ± 0.4 , 구강 접종은 1.0 ± 0.0 로 관찰되었다. E. maxima 1,000 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 1.2 ± 0.4 , 구강 접종은 1.0 ± 0.0 로 관찰되었다. E. maxima 1,500 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 1.0 ± 0.0 , 구강 접종은 1.0 ± 0.0 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 70,000 개의 E. maxima로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 1.8 ± 0.4 로 관찰되었다.

E. tenella 500 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 E. tenella로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 3.8 ± 0.4 , 구강 접종은 3.6 ± 0.4 로 관찰되었다. E. tenella 1,000 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 E. tenella로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 3.0 ± 1.2 , 구강 접종은 3.2 ± 1.6 로 관찰되었다. E. tenella 1,500 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 E. tenella로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 1.8 ± 0.9 , 구강 접종은 3.6 ± 0.8 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 30,000 개의 E. tenella로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 2.0 ± 1.26 로 관찰되었다.

▶ E. acervulina 500 개, E. maxima 500 개, E. tenella 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들의 장병원 지수는 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 0.4 ± 0.8 , 구강 접종은 0.2 ± 0.4 로 관찰되었다. 70,000 개의 E. maxima로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 0.6 ± 0.4 , 구강 접종은 1.0 ± 0.0 로 관찰되었다. 30,000 개의 E. tenella로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 분무 접종은 1.6 ± 1.6 , 구강 접종은 3.8 ± 0.4 로 관찰되었다. 혼합백신을 분무 및 구강으로 접종하고 공격접종을 하지 않은 대조군의 장병원 지수는 0로 관찰되었다.

E. acervulina 1,000 개, *E. maxima* 1,000 개, *E. tenella* 1,000 개의 총란을 혼합하여 총 3,000 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들의 장병변 지수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 장병변 지수는 분무 접종은 0.4 ± 0.8 , 구강 접종은 0.0 ± 0.0 로 관찰되었다. 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 장병변 지수는 분무 접종은 1.0 ± 0.0 , 구강 접종은 1.0 ± 0.0 로 관찰되었다. 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 장병변 지수는 분무 접종은 3.0 ± 1.5 , 구강 접종은 1.6 ± 1.9 로 관찰되었다. 혼합백신을 분무 및 구강으로 접종하고 공격접종을 하지 않은 대조군의 장병변 지수는 0 로 관찰되었다.

E. acervulina 1,500 개, *E. maxima* 1,500 개, *E. tenella* 1,500 개의 총란을 혼합하여 총 4,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들의 장병변 지수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 장병변 지수는 분무 접종은 0.4 ± 0.8 , 구강 접종은 0.0 ± 0.0 로 관찰되었다. 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 장병변 지수는 분무 접종은 1.2 ± 0.4 , 구강 접종은 0.8 ± 0.4 로 관찰되었다. 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 장병변 지수는 분무 접종은 2.4 ± 1.6 , 구강 접종은 2.2 ± 1.6 로 관찰되었다. 혼합백신을 분무 및 구강으로 접종하고 공격접종을 하지 않은 대조군의 장병변 지수는 0 로 관찰되었다.

결론적으로 주요평가항목인 장병변 지수는 *E. acervulina* 및 *E. maxima* 의 거의 모든 그룹들은 대조군(PBS)과 비교하여 유의성 있게 낮았다. 그러나 *E. tenella* 의 그룹들은 대조군(PBS)과 비교하여 차이가 없거나 또는 유의성 있게 높았다.

표 33. 공격 접종 후 분석 현황

	Dose		No. of birds		challenge at 3 weeks post vaccine	on 7 day post-infection (LS, n=5)		Oocyst production (6-9 days) (10 ³) / bird		body weight on day 9 post-infection (n=15)		Sum of fecal conditions after vaccine (during 20)		Sum of fecal condition after challenge (during 9)		
	No. of sporulated oocysts	spray inoculation	oral inoculation			spray inoculation	oral inoculation	spray inoculation	oral inoculation	spray inoculation	oral inoculation	spray inoculation	oral inoculation	spray inoculation	oral inoculation	
EA	500	20	20		150,000	0.4±0.8	0.2±0.4	215,166	363,827	958±125	1000±79	6	6	1	3	
	1,000	20	20			0.2±0.4	0.4±0.4	412,885	303,556	993±84	995±85	6	6	3	3	
	1,500	20	20			0.6±0.8	0.2±0.4	403,241	281,434	1031±100	1042±111	6	6	3	3	
				PC		2.2±0.98			524,756		1188±115			-	-	5
EM	500	20	20		70,000	1.4±0.4	1.0±0.0	41,251	14,814	997±129	869±125	4	5	2	2	
	1,000	20	20			1.2±0.4	1.0±0.0	48,395	9,844	1091±137	1071±140	5	6	2	2	
	1,500	20	20			1.0±0.0	1.0±0.0	14,366	3,100	1147±117	1071±127	5	6	2	2	
				PC		1.8±0.4			45,848		1180±109			-	-	4
ET	500	20	20		30,000	3.8±0.4	3.6±0.4	163,490	188,488	949±95	915±116	4	4	2	2	
	1,000	20	20			3.0±1.2	3.2±1.6	163,879	115,526	1104±85	926±143	4	5	1	2	
	1,500	20	20			1.8±0.9	3.6±0.8	63,650	171,612	1114±103	846±116	4	5	1	2	
				PC		2.0±1.26			86,886		1208±143			-	-	6
normal	no infection	80	80	20	EA	2.2±0.98		524,756		1188±115			-	-		
				20	EM	1.8±0.40		45,848		1180±109				-	-	
				20	ET	2.0±1.26		86,886		1208±143				-	-	
				20	normal	0±0		0		1178±87				0.5		0
EA+EM+ET	500+500+500	80	80	20	EA	0.4±0.8	0.2±0.4	639,532	219,467	1015±138	987±141	3.5	5.75	2	1	
				20	EM	0.6±0.4	1.0±0	29,787	9,271	1073±106	960±106			2	1	
				20	ET	1.6±1.6	3.8±0.4	147,533	228,072	1070±163	889±152			2	2	
				20	control	0±0		6,357	16,738	1076±109	1093±95			0	0	
				20	NC	0		0								
	1000+1000+1000	80	80	20	EA	0.4±0.8	0±0	71,789	215,655	1029±90	1157±87	4.5	3.75	1	2	
				20	EM	1.0±0	1.0±0	42,102	8,518	1068±96	1090±152			1	2	
				20	ET	3.0±1.5	1.6±1.9	194,923	141,461	1127±65	1131±88			2	4	
				20	control	0±0		14,561	10,718	1098±69	1154±112			0	0	
	1500+1500+1500	80	80	20	EA	0.4±0.8	0±0	287,217	9,048	1105±126	1170±119	5	5.25	2	1	
				20	EM	1.2±0.4	0.8±0.4	45,442	6,954	1024±76	1126±72			2	1	
				20	ET	2.4±1.6	2.2±1.6	237,936	25,773	1064±85	1127±124			3	5	
20				control	0±0		22,868	2,561	1086±75	1145±66	0			0		
20	NC	0		0												

Green and dark yellow colors indicated significant different compared to control group.

4) 공격 접종 후 분변으로 배출되는 총란수 분석

백신 접종 후에 공격 접종을 하였다. 공격 접종 후 6-9 사이에 분변을 수거하여 총란수를(총란수/마리) 관찰하였다(표 33). 대조군(PBS)에는 PBS 용액을 투여하였고 그룹에 따라서 각기 다른 콕시듐 원충으로 공격 접종하였다. 항콕시듐제가 함유되지 않은 사료를 실험기간 동안 급여하였다

▶ E. acervulina 500 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(215,166 천개), 구강접종(363,827 천개)로 관찰되었다. E. acervulina 1,000 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(412,885 천개), 구강접종(303,556 천개)로 관찰되었다. E. acervulina 1,500 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(403,241 천개), 구강접종(281,434 천개)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 총란수(524,756 천개)로 관찰되었다.

E. maxima 500 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(41,251 천개), 구강접종(14,814 천개)로 관찰되었다. E. maxima 1,000 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(48,395 천개), 구강접종(9,844 천개)로 관찰되었다. E. maxima 1,500 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무

접종(14,366 천개), 구강접종(3,100 천개)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 총란수(45,848 천개)로 관찰되었다.

E. tenella 500 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(163,490 천개), 구강접종(188,488 천개)로 관찰되었다. *E. tenella* 1,000 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(163,879 천개), 구강접종(115,526 천개)로 관찰되었다. *E. tenella* 1,500 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(63,650 천개), 구강접종(171,612 천개)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수(86,886 천개)로 관찰되었다.

▶ *E. acervulina* 500 개, *E. maxima* 500 개, *E. tenella* 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들에서 분변으로 배출되는 총란수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(639,532 천개), 구강접종(219,467 천개)로 관찰되었다. 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(29,787 천개), 구강접종(9,271 천개)로 관찰되었다. 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(147,533 천개), 구강접종(228,072 천개)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우에는 분무 접종(6,357 천개), 구강접종(16,738 천개)로 관찰되었다.

E. acervulina 1,000 개, *E. maxima* 1,000 개, *E. tenella* 1,000 개의 총란을 혼합하여 총 3,000 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들에서 분변으로 배출되는 총란수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(71,789 천개), 구강접종(215,655 천개)로 관찰되었다. 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(42,102 천개), 구강접종(8,518 천개)로 관찰되었다. 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(194,928 천개), 구강접종(141,461 천개)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우에는 분무 접종(14,561 천개), 구강접종(10,718 천개)로 관찰되었다.

E. acervulina 1,500 개, *E. maxima* 1,500 개, *E. tenella* 1,500 개의 총란을 혼합하여 총 4,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들에서 분변으로 배출되는 총란수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(287,217 천개), 구강접종(9,048 천개)로 관찰되었다. 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(45,442 천개), 구강접종(6,954 천개)로 관찰되었다. 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 분무 접종(237,936 천개), 구강접종(25,773 천개)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우에는 분무 접종(22,868 천개), 구강접종(2,561 천개)로 관찰되었다.

결론적으로 총란수는 *E. acervulina* 및 *E. maxima* 그룹들에서는 1,000 개의 *E. maxima* 을 분무 접종한 그룹만 제외하고는 대조군(PBS)과 비교하여 일반적으로 낮았다. 그러나 *E. tenella* 의 그룹들은 대조군(PBS)과 비교하여 일반적으로 총란수가 높았다.

5) 공격 접종 후 체중 분석

▶ 공격 접종 후 9일에 닭의 몸무게(g/마리)를 각각 측정하였다. E. acervulina 500 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(958 ± 125), 구강접종(1,000 ± 79)로 관찰되었다. E. acervulina 1,000 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(993 ± 84), 구강접종(995 ± 85)로 관찰되었다. E. acervulina 1,500 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,031 ± 100), 구강접종(1,042 ± 111)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 1,188 ± 115 로 관찰되었다. PBS 를 접종하고 공격 접종하지 않은 정상 대조군의 체중은 1,178 ± 87 로 관찰되었다.

E. maxima 500 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(997 ± 129), 구강접종(869 ± 125)로 관찰되었다. E. maxima 1,000 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,091 ± 137), 구강접종(1,071 ± 140)로 관찰되었다. E. maxima 1,500 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,147 ± 117), 구강접종(1,071 ± 127)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 체중은 1,180 ± 109 로 관찰되었다.

E. tenella 500 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(949 ± 95), 구강접종(915 ± 116)로 관찰되었다. E. tenella 1,000 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,104 ± 85), 구강접종(926 ± 143)로 관찰되었다. E. tenella 1,500 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,114 ± 103), 구강접종(846 ± 116)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 체중은 1,208 ± 143 로 관찰되었다.

▶ E. acervulina 500 개, E. maxima 500 개, E. tenella 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹의 체중은 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,015 ± 138), 구강접종(987 ± 141)로 관찰되었다. 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,073 ± 106), 구강접종(960 ± 106)로 관찰되었다. 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,070 ± 163), 구강접종(889 ± 152)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우의 체중은 분무 접종(1,076 ± 109), 구강접종(1,093 ± 95)로 관찰되었다. PBS 를 접종하고 공격 접종하지 않은 정상 대조군의 체중은 1,178 ± 87 로 관찰되었다

E. acervulina 1,000 개, E. maxima 1,000 개, E. tenella 1,000 개의 총란을 혼합하여 총 3,000 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹의 체중은 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,029 ± 90), 구강접종(1,157 ± 87)로 관찰되었다. 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,068 ± 96), 구강접종(1,090 ± 152)로 관찰되었다. 30,000 개의 E. tenella 로

공격 접종한 그룹의 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,127 ± 65), 구강접종(1,131 ± 88)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우의 체중은 분무 접종(1,098 ± 69), 구강접종(1,154 ± 112)로 관찰되었다.

E. acervulina 1,500 개, E. maxima 1,500 개, E. tenella 1,500 개의 총란을 혼합하여 총 4,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹의 체중은 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,105 ± 126), 구강접종(1,170 ± 119)로 관찰되었다. 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,024 ± 76), 구강접종(1,126 ± 72)로 관찰되었다. 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 접종한 그룹의 체중은 분무 접종(1,064 ± 85), 구강접종(1,127 ± 124)로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우의 체중은 분무 접종(1,086 ± 75), 구강접종(1,145 ± 66)로 관찰되었다.

결론적으로 체중의 변화는 콕시듐 원충을 각각 백신을 한 그룹에서는 대조군(PBS)과 비교하여 일반적으로 낮았다. 그러나 3 종의 콕시듐을 혼합한 백신 그룹에서는 비교적 양호하였다.

최종적으로 E. acervulina 와 E. maxima 의 경우에는 500 개, 1,000 개, 1,500 개를 각각 접종한 백신 그룹 및 혼합 백신을 한 거의 모든 그룹에서 대조군(PBS)과 비교하여 긍정적인 효과를 나타내었다. 그러나 E. tenella 을 이용한 백신 그룹에서는 대조군(PBS)과 비교하여 유사한 결과 또는 낮은 결과를 나타내었다. 구강 접종 및 분무 접종 사이에 차이는 없는 것으로 판단되었다. 따라서 차후 실험에서는 농장 현실에 맞는 분무 접종 방법으로 실험을 수행하고자 한다.

<2차 실험>

1차 실험의 결과와 분석을 바탕으로 균주를 다양한 용량으로 산란계(male ROSS308)을 사용하여 2차 항원 함량 실험을 수행하였다. 콕시듐 원충 함량을 아래의 표와 같이 분무 접종을 통하여 백신을 접종하였다(표 34). 그리고 1일령에 백신 접종 후 21일에 포자 형성된 150,000의 E. acervulina, 70,000의 E. maxima, 30,000의 E. tenella를 구강으로 공격 접종하여 백신의 효과를 측정하였다.

표 34. 분무 접종 항원 함량

균주	함량 1	함량 2	함량 3	함량 4	함량 5	함량 6	함량 7	비고
E. acervulina(EA) (291-5)	-	500	400	300	300(EA) +	400(EA) +	500(EA) +	분무 접종
E. maxima(EM) (310-4)	-	500	400	300	300(EM) +	400(EM) +	500(EM) +	
E. tenella(ET) (291-7)	1,000	500	400	300	300(ET)	400(ET)	500(ET)	

1) 백신 접종 후 총란수 분석 결과

백신 접종 후에 백신의 접종을 확인하기 위하여 분변에서 총란수를(총란수/1 gram) 21 일 동안 평가하였다. 대조군에는 PBS 용액을 투여하였으며, 항콕시딴제가 함유되지 않은 사료를 실험기간 동안 급여하였다. 대조군의 분변에서는 총란이 검출되지 않았다(표 35).

▶ E. acervulina 총란 300 개를 분무 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (900 개), 6 일 (700 개), 7 일 (133 개), 8 일 (600 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (400 개), 14 일 (147 개), 21 일 (22 개)가 확인되었다. 총란 400 개를 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (800 개), 6 일 (1,100 개), 7 일 (333 개), 8 일 (200 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (333 개), 14 일 (212 개), 21 일 (97 개)가 확인되었다. 총란 500 개를 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (200 개), 6 일 (300 개), 7 일 (467 개), 8 일 (133 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (333 개), 14 일 (707 개), 21 일 (39 개)가 확인되었다.

E. maxima 총란 300 개를 분무 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (0 개), 6 일 (400 개), 7 일 (800 개), 8 일 (667 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (2,000 개), 14 일 (255 개), 21 일 (16 개)가 확인되었다. 총란 400 개를 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (0 개), 6 일 (1,900 개), 7 일 (4,733 개), 8 일 (2,467 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (5,133 개), 14 일 (352 개), 21 일 (41 개)가 확인되었다. 총란 500 개를 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (00 개), 6 일 (12,900 개), 7 일 (7,400 개), 8 일 (3,667 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (8,733 개), 14 일 (205 개), 21 일 (43 개)가 확인되었다.

E. tenella 총란 300 개를 분무 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (0 개), 6 일 (100 개), 7 일 (3,333 개), 8 일 (2,533 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (5,200 개), 14 일 (332 개), 21 일 (90 개)가 확인되었다. 총란 400 개를 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (0 개), 6 일 (18,300 개), 7 일 (5,933 개), 8 일 (7,733 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (3,600 개), 14 일 (250 개), 21 일 (142 개)가 확인되었다. 총란 500 개를 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (0 개), 6 일 (4,900 개), 7 일 (28,667 개), 8 일 (2,533 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (4,400 개), 14 일 (4,500 개), 21 일 (100 개)가 확인되었다. 총란 1,000 개를 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (0 개), 6 일 (200 개), 7 일 (46,667 개), 8 일 (2,667 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (11,067 개), 14 일 (1,211 개), 21 일 (123 개)가 확인되었다.

▶ E. acervulina 300 개, E. maxima 300 개, E. tenella 300 개의 총란을 혼합하여 총 900 개를 분무 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (75 개), 6 일 (5,883 개), 7 일 (8,733 개), 8 일 (25,650 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (5,550 개), 14 일 (691 개), 21 일 (110 개)가 확인되었다.

E. acervulina 400개, E. maxima 400개, E. tenella 400개의 총란을 혼합하여 총 1,200개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (450개), 6일 (15,292개), 7일 (28,250개), 8일 (9,000개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (9,917개), 14일 (1,654개), 21일 (563개)가 확인되었다.

E. acervulina 500개, E. maxima 500개, E. tenella 500개의 총란을 혼합하여 총 1,500개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (350개), 6일 (31,000개), 7일 (19,167개), 8일 (21,750개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (12,500개), 14일 (2,085개), 21일 (776개)가 확인되었다.

결론적으로 신선한 분변과 깔짚 분변에 존재하는 총란을 분석하였다. 분무로 백신을 접종 후 5-6일부터 일반적으로 총란들을 관찰할 수 있었다. 따라서 13 종류의 함량을 이용한 분무 접종이 올바르게 되었음을 알 수 있다.

표 35. 백신 접종 후 21일 동안의 총란 배출 현황

Species	Dose	Vaccine route	Fecal oocyst shedding after vaccination (D, day) in fecal 1 gram								
			D0	D4	D5	D6	D7	D7 bedding	D8	D14 bedding	D21 bedding
E. acervulina (EA)	300	spray infection	0	0	900	700	133	400	600	147	22
	400	spray infection	0	0	800	1,100	333	333	200	212	97
	500	spray infection	0	0	200	300	467	333	133	707	39
E. maxima (EM)	300	spray infection	0	0	0	400	800	2,000	667	255	16
	400	spray infection	0	0	0	1,900	4,733	5,133	2,467	352	41
	500	spray infection	0	0	0	12,900	7,400	8,733	3,667	205	43
E. tenella (ET)	300	spray infection	0	0	0	100	3,333	5,200	2,533	332	90
	400	spray infection	0	0	0	18,300	5,933	3,600	7,733	250	142
	500	spray infection	0	0	0	4,900	28,667	4,400	2,533	4,500	100
	1,000	spray infection	0	0	0	200	46,667	11,067	2,667	1,211	123
Control	-	no vaccination	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mixed (EA+EM+ET)	300+300+400	spray infection	0	0	75	5,883	8,733	5,550	25,650	691	110
	400+400+400	spray infection	0	0	450	15,292	28,250	9,917	9,000	1,654	563
	500+500+500	spray infection	0	0	350	31,000	19,167	12,500	21,750	2,085	776

2) 백신 접종 후 및 공격 접종 후 분변 상태 분석 결과

백신 접종 후 21일에 포자 형성된 150,000의 E. acervulina, 70,000의 E. maxima, 30,000의 E. tenella를 구강으로 공격 접종하여 백신의 효과를 장병변, 총란 배출, 개체별 체중 변화, 분변 상태 등으로 측정하였다 (표 36).

▶ 백신을 분무로 접종 후 20 일간 분변 상태를 매일 관찰하고 분변 점수를 합하여 비교하였다. E. acervulina 300 개, 400 개, 500 개를 접종한 접종군들은 일반적으로 4-5 로 관찰되었다. E. maxima 300 개, 400 개, 500 개를 접종한 모든 접종군들은 5 로

관찰되었다. *E. tenella* 300 개, 400 개, 500 개, 1,000 개를 접종한 접종군들은 일반적으로 3-4 로 관찰되었다. PBS 를 접종한 대조군에서는 분변 상태의 합이 0 로 관찰되었다.

3 종류의 콕시듐 원충을 혼합한 백신 접종 후 20 일간 분변 상태를 매일 관찰하고 분변 점수를 합하였다. *E. acervulina* 300 개, *E. maxima* 300 개, *E. tenella* 300 개의 총란을 혼합하여 총 900 개를 접종한 경우는 5 로 관찰되었다. *E. acervulina* 400 개, *E. maxima* 400 개, *E. tenella* 400 개의 총란을 혼합하여 총 1,200 개를 접종한 경우는 6.5 로 관찰되었다. *E. acervulina* 500 개, *E. maxima* 500 개, *E. tenella* 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개를 접종한 경우는 5.25 로 관찰되었다. PBS 를 접종한 대조군에서는 분변 상태의 합이 0 로 관찰되었다.

▶ 공격 접종 후 9 일간 분변 상태를 매일 관찰하여 분변 점수를 합하여 표시하였다. *E. acervulina* 300 개, 400 개, 500 개를 분무로 접종하고 150,000 의 *E. acervulin* 로 공격 접종한 접종군들은 0 또는 1 로 관찰되었다. PBS 를 접종하고 150,000 의 *E. acervulin* 로 공격 접종한 대조군의 분변 상태는 합이 0 로 관찰되었다. *E. maxima* 300 개, 400 개, 500 개를 분무로 접종하고 70,000 의 *E. maxima* 로 공격 접종한 모든 접종군들은 0 로 관찰되었다. PBS 를 접종하고 70,000 의 *E. maxima* 로 공격 접종한 대조군의 분변 상태는 합이 3 로 관찰되었다. *E. tenella* 300 개, 400 개, 500 개, 1,000 개를 분무로 접종하고 30,000 의 *E. tenella* 로 공격 접종한 모든 접종군들은 2 로 관찰되었다. PBS 를 접종하고 30,000 의 *E. tenella* 로 공격 접종한 대조군의 분변 상태는 합이 3 으로 관찰되었다. PBS 를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군에서는 분변 상태의 합이 0 으로 관찰되었다.

▶ 3 종류의 콕시듐 원충을 혼합한 백신을 구강으로 접종한 후 21 일에 공격 접종하고 9 일간 분변 상태를 매일 관찰하여 분변 점수를 합하여 표시하였다. *E. acervulina* 300 개, *E. maxima* 300 개, *E. tenella* 300 개의 총란을 혼합하여 총 900 개로 백신 접종한 그룹들의 경우는 다음과 같다. 70,000 의 *E. maxima* 로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 1 로 관찰되었으며, 30,000 의 *E. tenella* 로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 2 로 관찰되었다. 혼합백신 접종하고 공격접종하지 않은 대조군에서는 분변 상태의 합이 0 으로 관찰되었다.

E. acervulina 400 개, *E. maxima* 400 개, *E. tenella* 400 개의 총란을 혼합하여 총 1,200 개로 백신 접종한 그룹들의 경우는 다음과 같다. 150,000 의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 0 로 관찰되었으며, 70,000 의 *E. maxima* 로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 2 로 관찰되었으며, 30,000 의 *E. tenella* 로 공격 접종 한 경우 분변 점수의 합은 2 로 관찰되었다. 혼합백신 접종하고 공격접종하지 않은 대조군에서는 분변 상태의 합이 0 으로 관찰되었다.

E. acervulina 500 개, *E. maxima* 500 개, *E. tenella* 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개로 백신 접종한 그룹들의 경우는 다음과 같다. 150,000 의 *E. acervulina* 로 공격 접종 한 경우 분변 점수의 합은 0 로 관찰되었으며, 70,000 의 *E. maxima* 로 공격 접종 한 경우 분변 점수의 합은 0 로 관찰되었으며, 30,000 의 *E. tenella* 로 공격 접종 한 경우 분변

점수의 합은 1로 관찰되었다. 혼합백신 접종하고 공격접종하지 않은 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다. PBS를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다.

결론적으로 백신의 다양한 용량을 접종하고 공격접종을 한 경우에는 백신을 하지 않고 공격접종한 대조군(PBS 접종군)과 비교하여 분변 상태가 전체적으로 양호한 결과를 나타내었다.

3) 공격 접종 후 장병원 지수 분석 결과

주요평가항목인 장병원 지수는 D7(공격접종 후 7일)에 관찰하였다. PBS를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군에서는 장병원 지수는 0으로 관찰되었다.

▶ E. acervulina 300개를 백신으로 분무 접종하고 150,000개의 E. acervulina로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 2.4 ± 1.0 로 관찰되었다. E. acervulina 400개를 백신으로 접종하고 150,000개의 E. acervulina로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 0.6 ± 0.8 로 관찰되었다. E. acervulina 500개를 백신으로 접종하고 150,000개의 E. acervulina로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 1.6 ± 1.0 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 150,000개의 E. acervulina로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 3.4 ± 0.5 로 관찰되었다.

E. maxima 300개를 백신으로 분무 접종하고 70,000개의 E. maxima로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 2.2 ± 0.4 로 관찰되었다. E. maxima 400개를 백신으로 접종하고 70,000개의 E. maxima로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 2.2 ± 0.7 로 관찰되었다. E. maxima 500개를 백신으로 접종하고 70,000개의 E. maxima로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 1.2 ± 1.0 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 70,000개의 E. maxima로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 2.6 ± 0.5 로 관찰되었다.

E. tenella 300개를 백신으로 분무 접종하고 30,000개의 E. tenella로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 2.6 ± 0.8 로 관찰되었다. E. tenella 400개를 백신으로 접종하고 30,000개의 E. tenella로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 3.2 ± 1.6 로 관찰되었다. E. tenella 500개를 백신으로 접종하고 30,000개의 E. tenella로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 3.0 ± 0.6 로 관찰되었다. E. tenella 1,000개를 백신으로 접종하고 30,000개의 E. tenella로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 3.6 ± 0.8 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 30,000개의 E. tenella로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 3.6 ± 0.8 로 관찰되었다.

▶ E. acervulina 300개, E. maxima 300개, E. tenella 300개의 총란을 혼합하여 총 900개로 백신을 분무 접종하고 공격접종한 그룹들의 장병원 지수는 다음과 같다. 70,000개의 E. maxima로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 3.0 ± 0.0 로 관찰되었다. 30,000개의 E. tenella로 공격접종한 그룹의 장병원 지수는 2.2 ± 1.3 로 관찰되었다. 혼합백신을 접종하고 공격접종하지 않은 대조군의 장병원 지수는 0로 관찰되었다.

E. acervulina 400 개, E. maxima 400 개, E. tenella 400 개의 총란을 혼합하여 총 1,200 개로 백신을 분무 접종하고 공격 접종한 그룹들의 장병원 지수는 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 1.2 ± 1.0 로 관찰되었다. 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 0.4 ± 0.5 로 관찰되었다. 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 2.6 ± 0.8 로 관찰되었다. 혼합백신을 분무 및 구강으로 접종하고 공격접종을 하지 않은 대조군의 장병원 지수는 0 로 관찰되었다.

E. acervulina 500 개, E. maxima 500 개, E. tenella 500 개의 총란을 혼합하여 총 4,500 개로 백신을 분무 접종하고 공격 접종한 그룹들의 장병원 지수는 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 1.0 ± 0.9 로 관찰되었다. 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 0.2 ± 0.4 로 관찰되었다. 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 3.0 ± 0.9 로 관찰되었다. 혼합백신을 분무 및 구강으로 접종하고 공격접종을 하지 않은 대조군의 장병원 지수는 0 로 관찰되었다.

결론적으로 주요평가항목인 장병원 지수는 E. acervulina 을 단독으로 접종한 경우는 400 개 및 500 개에서 유의성 있게 낮게 관찰되었다. E. maxima 을 단독으로 접종한 경우는 500 개에서 유의성 있게 낮게 관찰되었다. E. tenella 을 단독으로 접종한 경우는 대조군과 비교하여 낮거나 유사한 장병변을 나타내었다. 혼합 백신을 접종한 경우에는 400 개 및 500 개씩을 혼합한 그룹에서 유의성 있게 낮게 관찰되었다. 따라서 향후 백신 실험은 3 종류의 총란을 각각 400~500 개를 혼합하여 실험을 수행할 예정이다.

4) 공격 접종 후 분변으로 배출되는 총란수 분석

백신 접종 후에 21 일에 공격 접종을 하였다. 공격 접종 후 6-9 사이에 분변을 수거하여 총란수를(총란수/마리) 관찰하였다(표 4). 대조군(PBS)에는 PBS 용액을 투여하였고 그룹에 따라서 각기 다른 콕시듐 원충으로 공격 접종하였다. 항콕시듐제가 함유되지 않은 사료를 실험기간 동안 급여하였다

▶ E. acervulina 300 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $247,884 \times 10^3$ 개로 관찰되었다. E. acervulina 400 개를 백신으로 접종한 그룹의 총란수는 $250,800 \times 10^3$ 로 관찰되었으며, E. acervulina 500 개를 백신으로 접종한 그룹의 총란수는 $373,360 \times 10^3$ 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $608,594 \times 10^3$ 로 관찰되었다.

E. maxima 300 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $14,280 \times 10^3$ 개로 관찰되었다. E. maxima 400 개를 백신으로 접종한 그룹의 총란수는 $14,261 \times 10^3$ 로 관찰되었으며, E. maxima 500 개를 백신으로 접종한 그룹의 총란수는 $7,936 \times 10^3$ 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $13,752 \times 10^3$ 로 관찰되었다.

E. tenella 300 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $120,324 \times 10^3$ 개로 관찰되었다. E. tenella 400 개를 백신으로 접종한 그룹의 총란수는 $53,056 \times 10^3$ 로, E. tenella 500 개를 백신으로 접종한 그룹의 총란수는 $50,626 \times 10^3$ 로, E. tenella 1,000 개를 백신으로 접종한 그룹의 총란수는 $46,124 \times 10^3$ 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $58,640 \times 10^3$ 로 관찰되었다.

▶ E. acervulina 300 개, E. maxima 300 개, E. tenella 300 개의 총란을 혼합하여 총 900 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들에서 분변으로 배출되는 총란수는 다음과 같다. 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $44,969 \times 10^3$ 관찰되었다. 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $116,405 \times 10^3$ 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우에는 총란은 검출되지 않았다.

E. acervulina 400 개, E. maxima 400 개, E. tenella 400 개의 총란을 혼합하여 총 1,200 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들에서 분변으로 배출되는 총란수는 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $402,738 \times 10^3$ 로, 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $40,846 \times 10^3$ 로, 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $282,212 \times 10^3$ 개로 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우에는 총란수는 $1,989 \times 10^3$ 개로 관찰되었다.

	Dose		No. of birds		challenge at 3 weeks post vaccine	on 7 day post-infection (LS, n=5)	Oocyst production (6-9 days) (10^3) / bird (n=15)	body weight on day 9 post-infection (n=15)	Sum of fecal conditions after vaccine (during 20)	Sum of Fecal condition after challenge (during 9)
	No. of sporulated oocysts	spray inoculation								
EA	300		20		150,000	2.4±1.0	247,884	1062±68	4	1
	400		20			0.6±0.8	250,800	1168±113	4	0
	500		20			1.6±1.0	373,360	909±119	5	0
				PC		3.4±0.5	608,594	1153±173	-	0
EM	300		20		70,000	2.2±0.4	14,280	1031±71	5	0
	400		20			2.2±0.7	14,261	1040±85	5	0
	500		20			1.2±1.0	7,936	1097±112	5	0
				PC		2.6±0.5	13,752	968±103	-	3
ET	300		20		30,000	2.6±0.8	120,324	1051±78	3	2
	400		20			3.2±1.6	53,056	971±115	3	2
	500		20			3.0±0.6	50,626	1054±119	4	2
	1,000		20			3.6±0.8	46,124	1012±190	4	2
				PC		3.6±0.8	58,640	776±580*	-	3
Control	no vaccination		80	EA	20	3.4±0.5	608,594	1153±173	-	0
				EM	20	2.6±0.5	9,072	968±103	-	3
				ET	20	3.6±0.8	58,640	776±580*	-	3
				normal	20	0	0	1198±62	0	0
EA+EM+ET	300+300+300		80	EA	20	ND	ND	ND	5	ND
				EM	20	3.0±0.0	44,969	1002±159		1
				ET	20	2.2±1.3	116,405	1102±110		2
				control	20	0±0	0	1209±121		0
	400+400+400		80	EA	20	1.2±1.0	402,738	1124±70	6.5	0
				EM	20	0.4±0.5	40,846	1111±105		2
				ET	20	2.6±0.8	282,212	1138±110		2
				control	20	0±0	1,989	1160±82		0
	500+500+500		80	EA	20	1.0±0.9	443,320	1054±107	5.25	0
				EM	20	0.2±0.4	16,850	1092±157		0
				ET	20	3.0±0.9	163,548	973±176		1
				control	20	0±0	5,976	1120±116		0
			NC	20	0	0	0	0		

* 5 birds were dead

표 36. 공격 접종 후 분석 현황

Green and dark yellow colors indicated significant different compared to control group.

E. acervulina 500 개, *E. maxima* 500 개, *E. tenella* 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들에서 분변으로 배출되는 총란수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $443,320 \times 10^3$ 로, 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $16,850 \times 10^3$ 로, 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $163,548 \times 10^3$ 개로 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우에는 총란수는 $5,976 \times 10^3$ 개로 관찰되었다.

결론적으로 총란수는 단독 감염의 경우는 *E. acervulina*, *E. maxima* 및 *E. tenella* 에서는 대조군(PBS)과 비교하여 일반적으로 유의성 있게 낮거나 차이가 없었다. 그러나 혼합 그룹의 경우는 대조군(PBS)과 비교하여 다소 높게 나타나는 경향이 관찰되었다.

5) 공격 접종 후 체중 분석

▶ 공격 접종 후 9 일에 닭의 몸무게(g/마리)를 각각 측정하였다. *E. acervulina* 300 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,062 \pm 68$ 로 관찰되었다. *E. acervulina* 400 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,168 \pm 113$ 으로 관찰되었다. *E. acervulina* 500 개를 백신으로 접종하고 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 909 ± 119 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,153 \pm 173$ 로 관찰되었다. PBS 를 접종하고 공격 접종하지 않은 정상 대조군의 체중은 $1,198 \pm 62$ 로 관찰되었다.

E. maxima 300 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,031 \pm 71$ 로 관찰되었다. *E. maxima* 400 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,040 \pm 85$ 로 관찰되었다. *E. maxima* 500 개를 백신으로 접종하고 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,097 \pm 112$ 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 968 ± 103 로 관찰되었다.

E. tenella 300 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,051 \pm 78$ 로 관찰되었다. *E. tenella* 400 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 971 ± 115 로 관찰되었다. *E. tenella* 500 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,054 \pm 119$ 로 관찰되었다. *E. tenella* 1,000 개를 백신으로 접종하고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,012 \pm 190$ 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 776 ± 580 로 관찰되었다.

▶ *E. acervulina* 300 개, *E. maxima* 300 개, *E. tenella* 300 개의 총란을 혼합하여 총 900 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹의 체중은 다음과 같다. 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,002 \pm 159$ 로 관찰되었다.

30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 접종한 그룹의 체중은 $1,102 \pm 110$ 로 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우의 체중은 $1,209 \pm 121$ 로 관찰되었다.

E. acervulina 400 개, E. maxima 400 개, E. tenella 400 개의 총란을 혼합하여 총 1,200 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹의 체중은 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,124 \pm 70$ 로 관찰되었다. 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 접종한 그룹의 체중은 $1,111 \pm 105$ 로 관찰되었다. 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 접종한 그룹의 체중은 $1,138 \pm 110$ 로 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우의 체중은 $1,160 \pm 82$ 로 관찰되었다.

E. acervulina 500 개, E. maxima 500 개, E. tenella 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹의 체중은 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 $1,054 \pm 107$ 로 관찰되었다. 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 접종한 그룹의 체중은 $1,092 \pm 157$ 로 관찰되었다. 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 접종한 그룹의 체중은 973 ± 176 로 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우의 체중은 $1,120 \pm 116$ 로 관찰되었다. .

결론적으로 체중의 변화는 각각의 콕시듐 원충을 접종한 백신 그룹에서는 대조군(PBS)과 비교하여 일반적으로 유사하였다. 그러나 3 종의 콕시듐을 혼합한 백신 그룹에서는 낮거나 또는 유사하였다.

최종적으로 300, 400 및 500 개의 균주를 혼합하여 백신을 한 경우에는 장병변 기준으로 400 개 또는 500 개의 균주를 혼합한 그룹에서 양호한 결과를 나타내었다. 따라서 400 개 또는 500 개의 균주를 혼합한 그룹에 대한 실험으로 재검증이 필요하다.

<3 차 실험>

1차 및 2차 실험의 결과를 바탕으로 산란계를 사용하여 3차 항원 함량 실험을 수행하였다. 콕시듐 원충 함량을 아래의 표와 같이 분무 접종을 통하여 백신을 접종하였다(표 37). 그리고 1일령에 백신 접종 후 21일에 포자 형성된 150,000의 E. acervulina, 70,000의 E. maxima, 30,000의 E. tenella를 구강으로 공격 접종하여 백신의 효과를 측정하였다.

표 37. 분무 접종 항원 함량

균주	함량 1	함량 2	비고
E. acervulina(EA) (291-5)	400(EA)	500(EA)	분무 접종
E. maxima(EM) (310-4)	+	+	
	400(EM)	500(EM)	
	+	+	
E. tenella(ET) (291-7)	400(ET)	500(ET)	

1) 백신 접종 후 총란수 분석 결과

백신 접종 후에 백신의 접종을 확인하기 위하여 분변에서 총란수를(총란수/1 gram) 21 일 동안 평가하였다. 대조군에는 PBS 용액을 투여하였으며, 항콕시딴제가 함유되지 않은 사료를 실험기간 동안 급여하였다. 대조군의 분변에서는 총란이 검출되지 않았다(표 38).

▶ E. acervulina 400 개, E. maxima 400 개, E. tenella 400 개의 총란을 혼합하여 총 1,200 개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4 일 (0 개), 5 일 (30,800 개), 6 일 (20,950 개), 7 일 (8,267 개), 8 일 (32,550 개), 14 일 (1,032,500 개), 21 일(125,833 개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7 일 (30,467 개)가 확인되었다.

E. acervulina 500개, E. maxima 500개, E. tenella 500개의 총란을 혼합하여 총 1,500개를 접종한 후 분변에 배출되는 총란수는 다음과 같다. 분무 접종 후 신선한 분변에서는 4일 (0개), 5일 (7,700개), 6일 (12,450개), 7일 (26,267개), 8일 (151,833개), 14일 (885,800 개), 21일(73,333개)가 확인되었다. 깔짚 분변에서의 총란수는 7일 (26,533개)가 확인되었다.

결론적으로 신선한 분변과 깔짚 분변에 존재하는 총란을 분석하였다. 분무로 백신을 접종 후 5-6일부터 일반적으로 총란들을 관찰할 수 있었다. 따라서 분무 접종이 올바르게 되었음을 알 수 있다.

표 38. 백신 접종 후 21일 동안의 총란 배출 현황

Species	Dose	Vaccine route	Fecal oocyst shedding after vaccination (D, day) in fecal 1 gram								
			D0	D4	D5	D6	D7	D7 bedding	D8	D14	D21
Control	-	no vaccination	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EA+EM+ET	400+400+400	spray infection	0	0	30,800	20,950	8,267	30,467	32,550	1,032,500	125,833
	500+500+500	spray infection	0	0	7,700	12,450	26,267	26,533	151,833	885,000	73,333

2) 백신 접종 후 및 공격 접종 후 분변 상태 분석 결과

백신 접종 후 21일에 포자 형성된 150,000의 E. acervulina, 70,000의 E. maxima, 30,000의 E. tenella를 구강으로 공격 접종하여 백신의 효과를 장병원, 총란 배출, 개체별 체중 변화, 분변 상태 등을 측정하였다 (표 39).

▶ 3 종류의 콕시딴 원충을 혼합한 백신 접종 후 20 일간 분변 상태를 매일 관찰하고 분변 점수를 합하였다. E. acervulina 400 개, E. maxima 400 개, E. tenella 400 개의 총란을 혼합하여 총 1,200 개를 접종한 경우는 13로 관찰되었다. E. acervulina 500 개, E. maxima 500 개, E. tenella 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개를 접종한 경우는 12로 관찰되었다. PBS를 접종한 대조군에서는 분변 상태의 합이 0로 관찰되었다.

▶ 백신을 접종하지 않고 150,000의 E. acervulina로 공격 접종 한 경우 분변 점수의 합은 6로 관찰되었으며, 70,000의 E. maxima로 공격 접종 한 경우 분변 점수의 합은 5로

관찰되었으며, 30,000의 *E. tenella*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 8로 관찰되었다. PBS를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다.

3종류의 콕시듐 원충을 혼합한 백신을 구강으로 접종한 후 21일에 공격 접종하고 9일간 분변 상태를 매일 관찰하여 분변 점수를 합하여 표시하였다. *E. acervulina* 400개, *E. maxima* 400개, *E. tenella* 400개의 총란을 혼합하여 총 1,200개로 백신 접종한 그룹들의 경우는 다음과 같다. 150,000의 *E. acervulina*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 3로 관찰되었으며, 70,000의 *E. maxima*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 4로 관찰되었으며, 30,000의 *E. tenella*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 3로 관찰되었다. 혼합백신 접종하고 공격접종하지 않은 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다.

E. acervulina 500개, *E. maxima* 500개, *E. tenella* 500개의 총란을 혼합하여 총 1,500개로 백신 접종한 그룹들의 경우는 다음과 같다. 150,000의 *E. acervulina*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 3로 관찰되었으며, 70,000의 *E. maxima*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 5로 관찰되었으며, 30,000의 *E. tenella*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 3로 관찰되었다. 혼합백신 접종하고 공격접종하지 않은 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다. PBS를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다.

백신을 접종하지 않고 150,000의 *E. acervulina*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 6로 관찰되었으며, 70,000의 *E. maxima*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 5로 관찰되었으며, 30,000의 *E. tenella*로 공격 접종한 경우 분변 점수의 합은 8로 관찰되었다. PBS를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군에서는 분변 상태의 합이 0으로 관찰되었다.

결론적으로 백신의 다양한 용량을 접종하고 공격접종을 한 경우에는 백신을 하지 않고 공격접종한 대조군(PBS 접종군)과 비교하여 분변 상태가 전체적으로 양호한 결과를 나타내었다.

3) 공격 접종 후 장병원 지수 분석 결과

주요평가항목인 장병원 지수는 D7(공격접종 후 7일)에 관찰하였다. PBS를 접종하고 공격접종하지 않은 정상 대조군에서는 장병원 지수는 0으로 관찰되었다.

▶ 백신을 접종하지 않고 공격 접종한 그룹들의 장병원 지수는 다음과 같다. 150,000개의 *E. acervulina*로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 1.6 ± 1.8 로, 70,000개의 *E. maxima*로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 2.0 ± 0 로 그리고 30,000개의 *E. tenella*로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 3.4 ± 1.0 로 관찰되었다. 혼합백신을 분무으로 접종하고 공격접종을 하지 않은 대조군의 장병원 지수는 0로 관찰되었다.

▶ *E. acervulina* 400개, *E. maxima* 400개, *E. tenella* 400개의 총란을 혼합하여 총 1,200개로 백신을 분무접종하고 공격 접종한 그룹들의 장병원 지수는 다음과 같다.

150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 0 ± 0 로, 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 0.1 ± 0.3 로 그리고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 0.5 ± 1.3 로 관찰되었다. 혼합백신을 분무로 접종하고 공격접종을 하지 않은 대조군의 장병원 지수는 0 로 관찰되었다.

E. acervulina 500 개, *E. maxima* 500 개, *E. tenella* 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개로 백신을 분무접종하고 공격 접종한 그룹들의 장병원 지수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 0 ± 0 로, 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 0.4 ± 0.4 로 그리고 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 장병원 지수는 0.8 ± 1.6 로 관찰되었다. 혼합백신을 분무로 접종하고 공격접종을 하지 않은 대조군의 장병원 지수는 0 로 관찰되었다.

결론적으로 주요평가항목인 장병원 지수는 400 개 및 500 개씩을 혼합한 그룹에서 유의성 있게 낮게 관찰되었다.

4) 공격 접종 후 분변으로 배출되는 총란수 분석

백신 접종 후에 21 일에 공격 접종을 하였다. 공격 접종 후 6-9 사이에 분변을 수거하여 총란수를(총란수/마리) 관찰하였다(표 9). 대조군(PBS)에는 PBS 용액을 투여하였고 그룹에 따라서 각기 다른 곡시톱 원충으로 공격 접종하였다. 항곡시톱제가 함유되지 않은 사료를 실험기간 동안 급여하였다

▶ 백신을 접종하지 않고 공격 접종한 그룹들의 총란수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $73,710 \times 10^3$ 로, 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $32,799 \times 10^3$ 로, 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $86,093 \times 10^3$ 개로 관찰되었다. 대조군(PBS)의 분변에서는 총란이 검출되지 않았다

▶ *E. acervulina* 400 개, *E. maxima* 400 개, *E. tenella* 400 개의 총란을 혼합하여 총 900 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들에서 분변으로 배출되는 총란수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 874×10^3 로, 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $1,156 \times 10^3$ 로, 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $1,487 \times 10^3$ 로 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우에는 총란수는 696×10^3 이 관찰되었다.

E. acervulina 500 개, *E. maxima* 500 개, *E. tenella* 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹들에서 분변으로 배출되는 총란수는 다음과 같다. 150,000 개의 *E. acervulina* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 896×10^3 로, 70,000 개의 *E. maxima* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 $7,576 \times 10^3$ 로, 30,000 개의 *E. tenella* 로 공격 접종한 그룹의 총란수는 479×10^3 개로 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우에는 총란수는 830×10^3 개로 관찰되었다.

결론적으로 총란수는 혼합 그룹의 경우는 대조군(PBS)과 비교하여 유의성 있게 낮게 관찰되었다.

표 39. 공격 접종 후 분석 현황

Species	Dose		No. of birds		challenge at 3 weeks post vaccine	on 7 day post-infection (LS, n=10)	Oocyst production (6-9 days) (10 ³) / bird (n=20)	body weight on day 9 post-infection (n=20)	Sum of fecal conditions after vaccine (during 20)	Sum of Fecal condition after challenge (during 9)
	No. of sporulated oocysts	spray inoculation								
Control	no vaccination	80	20	EA, 150,000	1.6±0.8	73,710	338±36	-	6	
			20	EM, 70,000	2.0±0	32,799	329±85	-	5	
			20	ET, 30,000	3.4±1.0	86,093	323±37	-	8	
			20	normal	0	0	359±30	0	0	
EA+EM+ET	400+400+400	80	20	EA, 150,000	0±0	874	336±34	13	3	
			20	EM, 70,000	0.1±0.3	1,156	342±35		4	
			20	ET, 30,000	0.5±1.3	1,487	344±35		3	
			20	control	0±0	696	348±43		0	
	500+500+500	80	20	EA, 150,000	0±0	896	337±49	12	3	
			20	EM, 70,000	0.4±0.4	7,576	340±40		5	
			20	ET, 30,000	0.8±1.6	479	340±30		3	
			20	control	0±0	830	346±36		0	
			20	NC	0	0			0	
			20	NC	0	0			0	

Green and dark yellow colors indicated significant different compared to control group.

5) 공격 접종 후 체중 분석

▶ 공격 접종 후 9 일에 닭의 몸무게(g/마리)를 각각 측정하였다. 백신을 접종하지 않고 공격접종한 경우는 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 338 ± 36 으로, 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 체중은 329 ± 85 로, 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 체중은 323 ± 37 로 관찰되었다. PBS(대조군)을 접종하고 공격접종하지 않은 그룹의 체중은 359 ± 30 로 관찰되었다.

▶ E. acervulina 400 개, E. maxima 400 개, E. tenella 400 개의 총란을 혼합하여 총 1,200 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹의 체중은 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 336 ± 34 로, 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 체중은 342 ± 35 로, 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 체중은 344 ± 35 로 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우의 체중은 348 ± 43 로 관찰되었다.

E. acervulina 500 개, E. maxima 500 개, E. tenella 500 개의 총란을 혼합하여 총 1,500 개로 백신을 접종하고 공격 접종한 그룹의 체중은 다음과 같다. 150,000 개의 E. acervulina 로 공격 접종한 그룹의 체중은 337 ± 49 로, 70,000 개의 E. maxima 로 공격 접종한 그룹의 체중은 340 ± 40 로, 30,000 개의 E. tenella 로 공격 접종한 그룹의 체중은 340 ± 30 로 관찰되었다. 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 경우의 체중은 346 ± 36 로 관찰되었다. .

결론적으로 체중의 변화는 3 종의 콕시듐을 400 개씩 및 500 개씩 혼합한 백신 그룹에서는 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 그룹과 비교하여 유사하였다.

최종적으로 400 및 500 개의 균주를 혼합하여 백신을 한 경우에는 장병원 지수 및 총란 수는 유의성 있게 낮은 결과를 나타내었다. 또한 체중의 변화는 3 종의 콕시듐을 400 개씩

및 500 개씩 혼합한 백신 그룹에서는 백신(control)을 접종하고 공격 접종하지 않은 그룹과 비교하여 유사하였다. 따라서 400 - 500 개의 균주를 혼합한 백신이 효과가 있음을 나타내었다.

<과용량 실험 결과>

백신의 안정성을 확인하기 위하여 1일령 산란계 병아리에 과용량을(10배) 투여한 후 안전성을 21일동안 평가하였다. 대조군(B-PBS)에는 PBS용액을 투여하였으며, 항콕시딴제가 함유되지 않은 사료 급여를 실험기간 동안 급여하였다. 임상증상(동물외관, 폐사율, 분변상태), 신선한 분변과 깔짚에서 총란 수 측정, 장병변확인 그리고 사료섭취를 관찰하고 개체별 체중을 측정하였으며 결과는 다음과 같다 (표 41).

표 40. 실험실내 과용량 실험에 사용한 백신과 동물 수

그룹	백신 Batch	동물 수	투여물
A1	Vaccine-1	50	E.acervulina (3,990-4,980) +
A2	Vaccine-2	50	E. maxima (3,990-4,980) +
A3	Vaccine-3	50	E. tenella (3,500-4,000)
대조군 (PBS)	-	50	PBS

- 1) 동물외관 및 사료섭취는 접종군(A)과 대조군(B-PBS) 사이에 차이가 없었다.
- 2) 폐사는 백신접종군(A)과 대조군(B-PBS)에서 없었다.
- 3) 분변상태는 과용량접종군(A)의 A1 그룹에서 7,8,9,10,14,16,17,18,19일에 분변상태 1로 (25% 미만의 분변이 영향을 받음)로, 15일에는 분변상태 2 (25-50%의 분변이 영향을 받음)로 관찰되었다. A2 그룹에서 6, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18, 19일에 분변상태 1로 (25% 미만의 분변이 영향을 받음)로, 15일에는 분변상태 2 (25-50%의 분변이 영향을 받음)로 관찰되었다. A3 그룹에서 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16,17,18,19일에 분변상태 1로(25% 미만의 분변이 영향을 받음)로, 7, 8, 15일에는 분변상태 2 (25-50%의 분변이 영향을 받음)로 관찰되었다.관찰되었다. 대조군(B-PBS)는 실험기간 동안 정상적인 분변 상태를 보였다.
- 4) D7 (백신접종 후 7일)에 측정된 체중은 과용량접종군(A)의 A3 그룹은 대조군(B-PBS)과 비교하여 유의성 있게 낮았다. 그러나 과용량접종군(A)의 A1, A2 그룹과 대조군(B-PBS) 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다. D14 (백신접종 후 14일)에 측정된 체중은 과용량접종군(A)의 A1, A2, A3 그룹은 대조군(B-PBS)과 비교하여 유의성 있게 낮았다. D21 (백신접종 후 21일)에 측정된 체중은 과용량접종군(A)의 A1, A2, A3 그룹과 대조군(B-PBS) 사이에는 유의성 있게 낮았다.
- 5) 신선한 분변에서의 총란수는 과용량접종군(A)의 A1 그룹에서는 4일 (0개), 5일 (3,080개), 6일 (38,880개), 7일 (100,000개), 8일 (28,350개), 14일 (747,878개), 21일 (136,882개)가 확인되었다. A2 그룹에서는 4일 (0개), 5일 (2,640개), 6일 (77,560개), 7일 (138,666개), 8일 (72,436개), 14일 (738,410개), 21일 (111,041개)가 확인되었다. A3 그

룹에서는 4일 (0개), 5일 (9,500개), 6일 (37,833개), 7일 (116,000개), 8일 (33,818개), 14일 (770,000개), 21일 (112,000개)가 확인되었다. 생리식염수(PBS)를 접종한 대조군(PBS)에서는 총란이 검출되지 않았다. 결론적으로 대조군(PBS)에서는 총란이 검출되지 않았다. 따라서 과용량 백신접종이 올바르게 되었음을 알 수 있다.

6) 깔짚 분변에서의 총란수는 과용량접종군(A)의 A1 그룹에서는 7일 (25,000개), A2 그룹에서는 7일 (56,333개), A3 그룹에서는 7일 (47,000개)가 확인되었다. 생리식염수(PBS)를 접종한 대조군(B-PBS)에서는 총란이 검출되지 않았다.

7) 주요평가항목인 장병변지수는 백신접종 후 7일, 14일, 21일에 관찰하였다. D7 (백신접종 후 7일) 관찰한 장병변지수는 과용량접종군(A)의 A1 그룹에서 0.4 ± 0.4 로, A2 그룹에서 0.0 ± 0.0 , A3 그룹에서는 0.6 ± 0.4 로 관찰되었다. D14 (백신접종 후 14일) 관찰한 장병변지수는 과용량접종군(A)의 A1은 1.4 ± 1.4 , A2는 3.0 ± 1.5 , A3는 1.6 ± 0.8 로 관찰되었다. D21 (백신접종 후 21일) 관찰한 장병변지수는 과용량접종군(A)의 A1은 1.2 ± 1.4 , A2는 2.8 ± 0.7 , A3는 2.4 ± 1.2 로 관찰되었다. 대조군(PBS)의 장병변지수는 D7, D14, D21일 모두에서 장병변이 관찰되지 않았다.

실험실내 과용량 실험 결론: 1일령 산란계 병아리에 백신 과용량을(10배) 투여한 후 안전성을 21일동안 평가 결과를 요약하면 다음과 같다. 과용량을 투여한 상태에서도 폐사는 없었으며, 동물외관 및 사료섭취는 대조군과 유사하였다. 전체적으로 체중을 분석하면 과용량접종군에서 접종 후 D14, D21일에 측정된 체중은 대조군에 비하여 유의성 있게 낮았다. 임상 증상(동물외관, 폐사율, 분변상태), 신선한 분변과 깔짚에서 총란 수 측정, 장병변지수 그리고 사료섭취 등의 주요 평가항목들의 결과는 콕시듐에 의한 임상증상과 상응하는 결과를 보였다. 결론적으로 과용량 (10배)을 사용한 실험에서도 백신은 효과적이었다.

표 41. 실험실내 과용량 실험 전체 결과

A1: Vaccine-1	D0	D1-3	D4-6	D7	D8-13	D14	D15-20	D21
동물도착	+							
동물 배정	+							
백신접종	+							
장병원 지수 측정 (ceca, n=5)				0.4±0.4		1.4±1.4		1.2±1.4
총란 수 (신선한 분변)			D4-0 D5-3,080 D6-38,880	100,000	D8-28,350	747,878		136,822
총란 수 (갈짚)				25,000		-		-
개체별 체중 (n=50)	ND			76.4±6.9		134.9±18.1***		197.0±30.9***
사료섭취 확인	정상			정상		정상		정상
임상증상(동물외관, 분변상태, 폐사)	0	0	0	분변-1	D8,D9,D10- 분변-1	분변-1	D15-분변-2, D16,D17,D18, D19-분변-1	0
A2: Vaccine-2								
동물도착	+							
동물 배정	+							
백신접종	+							
장병원 지수 측정 (ceca, n=5)			-	0.0±0.0		3.0±1.5		2.8±0.7
총란 수 (신선한 분변)			D4-0 D5- 2,640 D6- 77,560	138,666	D8-72,436	738,410		111,041
총란 수 (갈짚)				56,333				
개체별 체중 (n=50)	ND			74.6±7.2		121.3±17.7***		181.0±32.4***
사료섭취 확인	정상			정상		정상		정상
임상증상(동물외관, 분변상태, 폐사)	0	0	D6-분변-1	0	D8,D9,D10, D13-분변-1	분변-1	D15-분변-2, D16,D17,D18, D19-분변-1	0
A3: Vaccine-3								
동물도착	+							
동물 배정	+							
백신접종	+							
장병원 지수 측정 (ceca, n=5)			-	0.6±0.4		1.6±0.8		2.4±1.2
총란 수 (신선한 분변)			D4-0 D5- 9,500 D6- 37,833	116,000	D8-33,818	770,000		112,000
총란 수 (갈짚)				47,000				
개체별 체중 (n=50)	ND			73.5±6.7*		125.7±16.6***		192.8±30.6***
사료섭취 확인	정상			정상		정상		정상
임상증상(동물외관, 분변상태, 폐사)	0	0	D5,D6-분변-1	분변-2	D8-분변-2, D9,D10, D13 분변-1	분변-1	D15-분변-2, D16,D17,D18, D19-분변-1	0
대조군 (PBS)								
동물도착	+							
동물 배정	+							
백신접종	+							
장병원 지수 측정 (ceca, n=5)				0		0		0
총란 수 (신선한 분변)			0	0	D8-0			
총란 수 (갈짚)				0				
개체별 체중 (n=50)	ND			76.7±7.0		148.8±14.8		232.0±43.6
사료섭취 확인	정상			정상		정상		정상
임상증상(동물외관, 분변상태, 폐사)	0	0	0	0	0	0	0	0

<실험 결과 요약>

▶ 3 번의 실험 및 과용량 실험 결과 E. acervulina 400~500 개, E. maxima 400~500 개, E. tenella 400~500 개의 총란을 혼합하여 총 1,200~1,500 개로 백신을 접종하는 경우가 공격접종에 가장 좋은 결과를 나타내었다(표 42). 대조군과 비교하여 장병변 지수 및 분변 총란 수는 유의성 있게 낮았다. 몸무게의 변화는 대조군과 비교하여 유의성 있는 차이는 없었다. 결론적으로 3 종의 콕시듐 균주를 400~500 개씩 혼합한 경우가 합리적인 결과를 나타내었다.

표. 22. 콕시듐 백신 실험 결과 요약

	균주	총란수 (1 dose), 분무접종	공격접종 (1 수)	백신 효능 측정					
				장병변(n=5)		분변총란수(X1,000)/마리(n=15)		몸무게(n=15)	
				백신군	대조군	백신군	대조군	백신군	대조군
혼합백신(A)	E. acervulina	1,500	150,000	0.4±0.8*	2.2±0.98	287,217**	544,756	1,105±126	1,188±115
	E. maxima	1,500	70,000	1.2±0.4	1.8±0.40	45,442	45,848	1,024±76***	1,180±109
	E. tenella	1,500	30,000	2.4±1.6	2.0±1.26	237,936*	86,886	1,064±85**	1,208±143
혼합백신(B)	E. acervulina	1,000	150,000	0.4±0.8*	2.2±0.98	71,789***	544,756	1,029±90***	1,188±115
	E. maxima	1,000	70,000	1.0±0*	1.8±0.40	42,102	45,848	1,068±96**	1,180±109
	E. tenella	1,000	30,000	3.0±1.5	2.0±1.26	194,923*	86,886	1,127±65	1,208±143
혼합백신(C)	E. acervulina	500	150,000	0±0***	1.6±0.8	896**	73,710	336±34	338±36
	E. maxima	500	70,000	0.4±0.4***	2.0±0	7,576*	32,799	342±35	329±85
	E. tenella	500	30,000	0.8±1.6***	3.4±1.0	479***	86,093	344±35	323±37
혼합백신(D)	E. acervulina	400	150,000	0±0***	1.6±0.8	874**	73,710	337±49	338±36
	E. maxima	400	70,000	0.1±0.3***	2.0±0	1,156**	32,799	340±40	329±85
	E. tenella	400	30,000	0.5±1.3***	3.4±1.0	1,487***	86,093	340±30	323±37
혼합백신(E)	E. acervulina	300	150,000	ND	3.4±0.5	ND	608,594	ND	1,153±173
	E. maxima	300	70,000	3.0±0.0	2.6±0.5	44,969*	9,072	1,002±159	968±103
	E. tenella	300	30,000	2.2±1.3	3.6±0.8	116,405*	58,640	1,102±110*	776±580

*p < 0.05, **p,0.001, ***p<0.001

<국산 콕시듐 백신 시제품 개발>

- 본 연구개발 결과를 바탕으로 국산 콕시듐 방제 백신 시제품이 공동연구개발기관인 (주)혹스바이오를 통해 출시되었다.

제품명	기능	성분 및 함량	사용법	출시일
혹스백-3	닭 콕시듐증 예방용 백신	E. acervulina, E. maxima, E. tenella 의 활성 원충 400-500개/수	생후 1일령 이상의 닭에 희석하여 분무 접종	2023. 07. 07
			닭콕시듐증 예방용 백신(혹스백-3) 사진	

- RFP상 제시된 핵심 목표 성능 중 안정성 평가/효능 및 타겟면역원성 유효성(방어율) 평가/효능 부문은 모두 달성되었다. 생산원가와 관련하여 현재 생체를 통한 동물용 백신 GMP 시설 기준이 존재하지 않아 정식 출시는 기준 설정 확립 후 완료 될 예정으로 생산원가가 확정될 수 없으나 100원/수 당 책정된 목표 달성은 무난할 것으로 생각됨.

<국산 콕시듐 백신 사업화 전략>

(1) 사업화 전략

○ 국내시장

- 제품의 지속적인 성장을 위해 철저한 유통질서관리: 유통질서 확립을 통한 제품, 거래선 및 소비자 보호

- 국내 거점시장의 판매 네트워크 확보: 거점 대리점 30~40개

○ 양계 전문 컨설팅 그룹의 활용

○ 사내 전문수의사 조직을 통해 대리점 및 소비자에 대한 전문기술지원과 판촉 활동

○ 내수시장

- 대규모 양계 농가 직접납품 및 국가 방역 정책상 수요 발생 시 조달청납품

(2) 생산 계획

○ 개발 종료 이후, 대량 양산 체제에 바로 진입할 수 없으나 기술이전이 완료된 이후, 품목허가를 위한 GMP 공장에서 시백신 제조 후, 야외임상시험 및 허가서 제출(약 2년 소요)을 추진하고 개발종료 2년 후부터 상용화를 위한 제품 생산을 진행함

(3) 해외시장 진출 계획

○ 해외시장

- 본 주관기관의 모회사 및 자회사(씨티씨바이오, 씨티씨글로벌)를 통해 확보된 해외시장 거래선으로 이용하여 해당 국가에 조속한 제품의 허가 등

- 양계 시장 규모가 큰 동남아 지역 외 중앙아시아 시장의 적극적인 신규개척

- 해외 전문 박람회 적극 참여/홍보 및 앞선 학술 / 마케팅 수단의 개발 및 지원

(4) 사업화에 따른 기대효과

○ 양계 콕시듐 국산 백신 상용화

- 국내 돼지 연쇄상구균 백신은 현재 다국적 기업인 히프라사에 출시한 “에발론”, 바이오팜사가 출시한 리바콕스T가 유일하며 국내 제조사에서는 아직 상용화된 제품이 없음

- 양계 농가에 심각한 경제적 피해를 일으키는 콕시듐증을 예방하는 백신을 상용화하고 사업화함으로써 국산 신제품을 확보

- 상기 신제품의 출시함으로 국내 양계 농가의 소득 개선에 이바지

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	(2022~2023)	연구개발 종료 후 5년 이내	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	특허출원	목표(단계별)	1	1	2	10
		실적(누적)	5		5	
	특허등록	목표(단계별)	1	1	2	5
		실적(누적)	2		2	
	논문(SCI)	목표(단계별)	1	1	2	
		실적(누적)	2		2	
	논문평균IF	목표(단계별)	1.5		1.5	10
		실적(누적)	3.15		3.15	
	학술발표	목표(단계별)	2		2	5
		실적(누적)	3		3	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)	1		1	20
		실적(누적)	1		1	
	기술료	목표(단계별)	10		10	20
		실적(누적)				
	제품화	목표(단계별)	1		1	20
		실적(누적)	1		1	
	매출액	목표(단계별)		100	100	5
		실적(누적)	13		13	
	고용창출	목표(단계별)	1		1	5
		실적(누적)	2		2	
계	목표(단계별)	19.5	103	122.5	100	
	실적(누적)	32.15		32.15		

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도, 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다
(연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Comparative analysis of evaluation parameters in <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> and <i>E. tenella</i> -infected broilers	journal of Veterinary Science	Rochelle A. Flores	23(6)	Korea	Korean Society of Veterinary Science	SCIE	2022.10.26	1976-555X	100
2	Comparative Analysis of	microorganisms	Namkyong Min	12	Switzerland	MDPI AG	SCIE	2024.02.29	2076-2607	100

	Hindgut Microbiota Variation in <i>Protaetia brevitarsis</i> Larvae across Diverse Farms									
3	Anticoccidial effects of a multicomplex mineral-based diet in <i>Eimeria acervulina</i> -infected broiler chickens	BMC Veterinary Research	Binh T. Nguyen		England	BioMed Central	SCIE	submitted in 2023.07(Submission ID b08631f3-f179-4d53-8883-9d56f9207fa0), revision 중	1746-6148	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022 한국가금학회 추계 학술발표회	Binh T. Nguyen	2022.11.03.-2022.11.04	대전 IBS 과학문화센터	대한민국
2	2022 한국가금학회 추계 학술발표회	Binh T. Nguyen	2022.11.03.-2022.11.04	대전 IBS 과학문화센터	대한민국
3	2023년 제45차 한국동물위생학회 학술발표대회	Rochelle A. Flores	2023.05.25.-2023.05.27	제주퍼시픽호텔	대한민국

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	마이크로파장을 이용한 닭 콕시듐 원충 저감 장치	대한민국	(주)혹스바 이오	2023.06.15	10-2023-0076602		(주)혹스바 이오	2023.08.16	10-2568825-0000	100	○
2	국내 분리 콕시듐 원충의 혼합물을 포함하는 닭 콕시듐증 예방용 백신 조성물	대한민국	(주)혹스바 이오	2023.07.05	10-2023-0086865		(주)혹스바 이오	2023.11.06	10-2600413-0000	100	○
3	마이크로파장을 이용한 닭 콕시듐 원충 저감 장치	PCT	(주)혹스바 이오	2023.09.20	PCT/KR2023/014228					100	○
4	마이크로파장을 이용한 닭 콕시듐 원충 저감 장치	중국	(주)혹스바 이오	2023.12.01	202380012120.0					100	○
5	마이크로파장을 이용한 닭 콕시듐 원충 저감 장치	미국	(주)혹스바 이오	2023.11.01	18/289,160					100	○

○ 지식재산권 활용 유형

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1										√
2	√									
3										√
4										√
5										√

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	혹스백-3	2023.07.07	(주)혹스바이오	(주)혹스바이오	양계백신	1년3개월		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	자체실시	마이크로파장을 이용한 닭 콕시듐 원충 저감 장치	(주)혹스바이오	2023.09.		
2	자체실시	국내 분리 콕시듐 원충의 혼합물을 포함하는 닭 콕시듐증 예방용 백신 조성물	(주)혹스바이오	2023.09.		

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	닭콕시듐 배양 및 분석 기술	국산 분리 균주를 활용한 닭콕시듐 증 예방 백신 개발	(주)혹스 바이오	13,000		2023	20년

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
항콕시듐제에 대한 내성 조사 및 국산 콕시듐 백신 시제품 개발	2023	13,000		13,000	
합계		13,000		13,000	자체 산정 (세금계산서 첨부)

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	항콕시듐제에 대한 내성 조사 및 국산 콕시듐 백신 시제품 개발	(주)혹스바이오	1	1	2
합계			1	1	2

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	
	개발 후	연구인력	2
		생산인력	

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	박사연구원	2022	√								√		
2	학사연구원	2023	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
					√						√		

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함), <u>품종보호권 등록증 또는 생산·판매 신고증명서</u>
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 국내 사용 중인 항콕시딴제에 대한 내성 조사	○ 국내 사용 중인 항콕시딴제에 대한 내성 조사를 통한 항콕시딴제 내성 확인	○ 100
○ 항콕시딴제 유효성 평가	○ 동물모델 활용한 항콕시딴제 유효성 평가 완료	○ 100
○ 국내 기반 콕시딴 균주를 이용한 백신 시제품 제작 및 품질 평가	○ 국내 기반 콕시딴 균주를 이용한 백신 시제품 제작 및 항원 함량시험 등을 통한 효능 및 품질 평가 완료	○ 100
○ 동물모델 활용 효능 및 안전성 평가	○ 동물모델 활용 효능 및 안전성 평가 완료	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

기술실시는 (주)혹스바이오 자체적으로 2023년 2건이 이루어져 농림식품기술기획평가원에 기술실기 보고서(2023.09.01 생산, 건당 기술료 5,000,000원)가 송부되었으나 농림식품기술기획평가원의 판단 결과 자체실시에 의한 기술료는 미발생으로 처리해야한다는 회신을 받음. 당초 2건의 기술실시로 10,000,000원의 기술료가 발생할 것으로 예상되었으나 예상치 못한 답변으로 기술료 징수가 이루어지지 않았음.

2) 자체 보완활동

징수되지 못한 기술료를 징수하기 위하여 (주)혹스바이오 이외의 타기관으로 국내 동물용 백신 생산업체들과 접촉 및 지속적인 협의 과정을 거치는 중임.

3) 연구개발 과정의 성실성

본 연구를 통해 이루어진 기술실시는 당초 계획(1건)보다 많은 2건이 이루어져 기술실시에 대한 성실성에는 문제가 없는 것으로 사료됨. 과제 종료가 3개월여 남은 9월에 농림식품기술기획평가원으로부터 자체 기술실시의 기술료 징수에 대한 답변을 받아 시간적으로 기술료 징수를 받지 못하였지만 이후 지속적으로 국내 동물용 백신 생산업체들과 본 연구를 통해 도출된 기술의 실시 및 기술료 징수에 관한 의견을 조율하는 중에 있음.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 본 연구개발의 타겟 질병인 닭 콕시들통증은 양계산업에 있어 경제적으로 매우 중요한 질병으로 국내에서도 콕시들통증 발생 농가가 75% 이상에 달하며 매우 큰 피해를 주고 있다. 닭 콕시들통증의 방제 대책으로 현재는 대부분 항콕시들통제와 적은 비율의 수입 콕시들통 백신이 사용되고 있는 실정이다. 항콕시들통제는 지속적인 사용으로 내성 정도가 높은 편이며 수입산 백신은 닭을 통해 생산된 살아있는 원충이 포함된 생백신으로 짧은 유통기한, 국내 발생 종의 특성을 고려하지 않는 등 여러 가지 문제를 안고 있다.
 - 본 연구개발을 통하여 조사된 국내 야외 콕시들통 균주의 항콕시들통제의 내성은 양계산업에서 사용되고 있는 항콕시들통제의 문제점을 여실히 보여주며 백신 등의 새로운 방제 대책으로의 전환이 필요함을 보여준다. 따라서 콕시들통 방제를 위한 방역 정책에 활용될 수 있다.
 - 본 연구개발을 통해 개발된 국산 항콕시들통 백신은 국내 야외 콕시들통 균주에 효과적으로 나타나 추후 양계 농장 콕시들통 질병 방제를 통한 양계 산업에의 기여가 상당할 것으로 기대된다.
 - 본 연구개발을 통해 개발된 국산 콕시들통 백신용 원충 배양, 관리 기술은 향후 백신 대량 생산 및 품질 관리 측면에서 국내 양계 백신 시장의 양적, 질적 성장을 도모하고 백신제조 기술의 국산화 등 산업적 발전에 기여할 것으로 기대된다.
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

당초 성과 계획에 따라 연구개발 종료 후 5년차에 100,000 천원의 매출액을 달성할 계획임. 연구개발 2년차에 13,000 천원의 매출액을 올렸고 추가적인 매출 발생을 위해 노력하여 100% 달성하겠음. 또한, 연구개발 종료 후 1년차로 계획되었던 SCI 논문 1건은 기달성됨.

미달성된 기술이전의 경우 자체실시로 기술료가 발생되지 않은 문제들을 보완할 수 있도록 자체실시 이외의 방법으로 타 기관 또는 업체와의 협의를 통한 기술이전을 완성할 수 있도록 관계기관들과 접촉 중에 있으며 추후 기술 이전을 위한 노력 중에 있음.

또한 추후 타 제품 생백신과 효능, 안전성 등의 비교 연구 수행이 예정되어 있으며, 백신 균주로 사용된 콕시들통 균주의 병원성 및 면역원성의 계대에 따른 지속적인 모니터링을 수행할 계획임.

백신의 환경 안전성과 관련하여 백신 야외임상 실험시에 환경 시료들을 수거하여 미노출된 계군에 감염하여 병원성 및 면역원성을 평가하는 방안을 고려 중에 있음.

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	1(달성완료)
	비SCIE	
	계	
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	
	국외	
	계	
특허등록	국내	
	국외	
	계	
인력양성	학사	
	석사	
	박사	
	계	
사업화	상품출시	
	기술이전	
	공정개발	
	매출액	
제품개발	시제품개발	100,000 천원
비임상시험 실시		
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상
		2상
		3상
	의료기기	
진료지침개발		
신의료기술개발		
성과홍보		
포상 및 수상실적		
정성적 성과 주요 내용		

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서
2.	1)
	2)

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	322056-2		
사업구분	2022년도 가축질병대응기술고도화지원사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	항콕시독제에 대한 내성 조사 및 국산 콕시독 백신 시제품 개발			과제유형	(개발)
연구개발기관	경상국립대학교			연구책임자	김우현
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2022.04.01 - 2022.12.31	270,000	33,800	308,800
	2차년도	2023.01.01 - 2023.12.31	360,000	69,000	429,000
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		630,000	102,800	732,800
참여기업	(주)혹스바이오				
상대국				상대국연구개발기관	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024. 02. 27

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경상국립대학교	조교수	김우현

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	
----	---

1. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

본 연구를 통하여 생산된 국산 콕시듐 백신 시제품은 국내에서 최초로 개발된 닭콕시듐증 예방용 백신으로 연구개발결과가 차후 실제 양계농가에 적용 가능한 백신 개발의 중요한 결과로 활용될 것으로 예상됨. 또한 항콕시듐제 내성을 조사하기 위하여 다양한 지표들을 사용하여 다각적으로 분석하는 창의성을 보였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

본 연구는 목적동물인 닭을 이용하여 효과적인 콕시듐 백신 시제품을 개발한 것으로 이를 이용하여 산업화한다면 국내 양계 산업의 큰 문제로 대두되고 있는 닭콕시듐증의 예방에 큰 효과를 볼 수 있을 것으로 사료됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

본 연구에서 개발된 콕시듐 백신은 국내 최초의 국산 백신으로 동물의 생체를 이용한 백신 생산 시설의 허가 등 제도적인 문제가 해결된다면 조기에 양계 산업에 활용가능함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

본 연구를 통해 출원된 특허는 당초 예상되었던 2건을 초과한 5건으로 국내 및 PCT 출원을 거쳐 미국, 중국에 순차적으로 출원을 진행하였으며, 고용창출도 성과도 초과 달성하는 등 연구개발을 성실히 수행하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

본 연구를 통해 특허출원 5건(당초 계획 2건), SCIE 논문 2건(평균 IF: 3.15, 당초 계획 IF: 1.5), 학술발표 3건(당초 계획 2건)을 초과 달성하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허출원 2건	10	250	특허출원 5건
특허등록 2건	5	100	특허등록 2건
기술실시 1건	20	100	기술실시 1건
기술료 10백만원	20	0	(미발생 기술료 10백만원)
제품화 1건	20	100	제품화 1건
매출액 100백만원	5	0	
고용창출 1명	5	200	고용창출 2명
SCI 논문 2건 (종료 1년 후 1건 포함)			SCI 논문 1건
논문평균 IF 1.5	10	210	논문평균 IF 3.15
학술발표 2건	5	150	학술발표 3건
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 국내 사용 중인 항콕시둌제 6종에 대한 내성 조사(당초 계획을 충족하는 14농가), 국내 적용가능한 콕시둌 예방용 국산 콕시둌 백신 시제품 개발에 관한 것으로 내성 조사 및 콕시둌 백신 시제품 개발이 완료되어 전반적으로 성공적으로 마무리되었다고 판단됩니다. 또한 이의 결과는 SCIE 학술지에 발표되어 콕시둌 예방에 관한 정보를 세계적으로 공유되었으며, 국내 사용가능한 국산 백신 제품 개발에 중추적인 토대로 작용할 것으로 판단됩니다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 본 연구의 사업화 성과 지표 중 기술료 대신 매출액 13백만원이 조기 발생되었음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구결과로 개발된 콕시둌 원충 배양 기법 및 국산 콕시둌 백신 시제품은 추후 국산 백신 제품의 허가 및 생산에 활용하여 양계 농가의 피해 방지 및 산업의 발전에 기여할 수 있습니다. 또한 수입 백신을 대체하는 국산 콕시둌 백신 개발로 이어져 국가 경쟁력 제고에 도움을 줄 수 있습니다. 따라서 향후 국산 콕시둌 백신 개발을 위한 동물을 이용한 백신 개발 시설 설비 확충 및 허가 등에 관한 제도적인 노력 및 백신의 고도화를 위한 연구 개발이 필요할 것으로 사료됩니다.

IV. 보안성 검토

- 해당 사항 없음

[별첨]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	항콕시듬제에 대한 내성 조사 및 국산 콕시듬 백신 시제품 개발			
주관연구개발기관	경상국립대학교		주관연구책임자	김우현
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	630,000	102,800		732,800
연구개발기간	2022. 04. 01 - 2023. 12. 31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 특허 출원 2건	특허 출원 5건
② 특허 등록 2건	특허 등록 2건
③ 기술실시 1건 및 기술료 10백만원	기술실시 1건 (자체 실시 2건, 미발생기술료 10백만원)
④ 제품화 1건 및 매출액 100백만원	제품화 1건 및 매출액 13백만원
⑤ 고용창출 1명	고용창출 2명
⑥ SCI 논문 2건(종료 1차년도 1건) 및 평균 IF1.5	SCI 논문 2건 및 IF 3.15
⑦ 학술발표 2건	학술발표 3건

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용예외)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
단위	건	건	건	평 균 값	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	5			20	20	20	5		5				10	5				
최종 목표	2	2			1	10	1	100		1		2		1.5	2				
당해 목표	1	1					1			1		1		1.5	1				

년도 실적	2	2			1		1	13		2			1		1.5	3				
달성률 (%)	100	100			100	0	100	13		200			50		100	150				

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	항콕시듬제 내성 조사 플랫폼 개발
②	국산 콕시듬 백신 시제품 개발
③	콕시듬 원충 배양 기술 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

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

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	양계 농장에 콕시듬 감염 및 종 확인, 항콕시듬제 내성 조사
②의 기술	국산 항콕시듬 백신 개발에 활용
③의 기술	콕시듬 백신 균주 생산 기반 마련

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용예)
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문	SCI			비SCI	논문평판 I F	
											건				건	건			건
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	5			20	20	20	5		5				10	5				
최종목표	2	2			1	10	1	100		1		2		1.5	2				

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술고도화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.