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

발간등록번호
11-1543000-004663-01

현장활용형 BVDV kit 개발을 통한 BVDV 근절방안 모색

2024. 06. 18.

주관연구기관 / ㈜보레다바이오텍
공동연구기관 / 경북대학교
전북대학교

농 림 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “현장활용형 BVDV kit 개발을 통한 BVDV 근절방안 모색”(개발기간 : 2022.04.01 ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024. 06. 18.

주관연구기관명 : ㈜보레다바이오텍 (대표자) 최 동 옥 (인)

공동연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (대표자) 공 성 호 (인)

공동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 손 정 민 (인)

주관연구책임자 : 최 동 옥
공동연구책임자 : 최 경 성
공동연구책임자 : 박 진 호

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

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

<table>
<tr><td colspan="2">사업명</td><td colspan="3">가축질병대응기술
고도화지원사업</td><td colspan="2">총괄연구개발 식별번호
(해당 시 작성)</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="2">내역사업명
(해당 시 작성)</td><td colspan="3">개발성과 현장 보급 기술</td><td colspan="2">연구개발과제번호</td><td colspan="2">122017-2</td></tr>
<tr><td rowspan="2">기술분류</td><td>국가과학기술 표준분류</td><td>LB0710</td><td>60 %</td><td>LB0708</td><td>30 %</td><td>LB0701</td><td>10%</td></tr>
<tr><td>농림식품 과학기술분류</td><td>RB0201</td><td>60 %</td><td>RB0299</td><td>30 %</td><td>RB0203</td><td>10%</td></tr>
<tr><td colspan="2">총괄연구개발명
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제명</td><td colspan="6">현장활용형 BVDV kit 개발을 통한 BVDV 근절방안 모색</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 연구개발기간</td><td colspan="6">2022.04.01 - 2023.12.31 (1년 9개월)</td></tr>
<tr><td colspan="2">총 연구개발비</td><td colspan="6">총 775,000 천원
(정부지원연구개발비: 700,000 천원, 기관부담연구개발비 : 75,000 천원,
지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발단계</td><td colspan="2">기초[ ] 응용[ ] 개발[√]
기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]</td><td colspan="2">기술성숙도
(해당 시 작성)</td><td colspan="2">착수시점 기준( )
종료시점 목표( )</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 유형
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 특성
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td rowspan="4">연구개발 목표 및 내용</td><td colspan="2">최종 목표</td><td colspan="5">소 바이러스 설사 바이러스(BVDV)를 현장에서 신속하게 진단할 수 있는 축산농가 현장 활용형의 소 바이러스 설사증 진단키트 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 내용</td><td colspan="5">○ 국내에서 소 바이러스 설사 바이러스(BVDV)의 유전형 조사, 바이러스 분리 및 배양
• 분변 및 혈액에서 소 바이러스 설사 바이러스(BVDV)의 유병율 조사
• BVDV의 유전적 특성 분석
• BVDV의 분리 및 배양
• BVDV 진단을 위한 유전자 재조합 항원 및 항체 개발

○ 소 바이러스 설사증 키트 개발 및 시제품 생산
• BVDV 진단키트의 실험실 내 효능 평가
• 개발키트의 야외 가검물을 통해 시제품에 대한 유효성 평가
• 제품 최적화를 통해 시제품 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">1차년도</td><td>목표</td><td colspan="5">소 바이러스 설사 바이러스(BVDV)를 현장에서 신속하게 진단할 수 있는 축산농가 현장 활용형의 소 바이러스 설사증 진단키트 개발</td></tr>
<tr><td>내용</td><td colspan="5">○ 국내에서 소 바이러스 설사 바이러스(BVDV)의 유전형 조사, 바</td></tr>
</table>

			이러스 분리 및 배양 • 분변 및 혈액에서 소 바이러스 설사 바이러스(BVDV)의 유병율 조사 • BVDV의 유전적 특성 분석 • BVDV의 분리 및 배양 • BVDV 진단을 위한 유전자 재조합 항원 및 항체 개발 ○ **소 바이러스 설사증 키트 개발 및 시제품 생산** • BVDV 진단키트의 실험실 내 효능 평가 • 개발키트의 야외 가검물을 통해 시제품에 대한 유효성 평가 • 제품 최적화를 통해 시제품 개발
	2차년도	목표	**BVDV 시제품 제작 및 신속진단키트 시제품 임상테스트, 진단키트의 최적화**
		내용	○ **BVDV 시제품 제작 및 최적화** • 항체 고정화조건 및 pair 조건 확립 • 항체골드 컨쥬게이션(Gold Conjugation) 조건의 확립 • 샘플패드, 검체희석액 및 멤브레인 최적화 ○ **BVDV 신속 진단 키트의 임상 실험 및 최적화** • 야외 가검물 수집 • 수집된 검체에서 BVDV 검출을 위한 PCR 진행 • BVDV 진단키트 시제품에 대한 임상적 유효성 평가 및 문제점 보완

연구개발성과

1. 주요 정량성과

주요성과명	단위	성과
특허출원	건	1
학술발표	건	4
기술실시	건	1
기술이전	건 (천원)	1 (10,000 천원)
인력양성	명	3
시제품개발	건	2
박람회 전시 홍보	건	1
매출:수출	건 ($)	2 ($ 600)

2. 정성성과
○ BVDV 진단용 신규 항원 항체 3종 개발
○ BVDV 항원 진단키트 성능 개선
○ BVDV1/BVDV2 항원 진단키트 개발
○ BVDV 항원 진단키트 제품화 추진
○ 국내 축산농가 BVDV 감염실태 분석

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과

1) 연구개발성과의 활용계획

- 본 연구를 통해 BVDV 신속 진단키트를 개발할 수 있어, 기존의 진단시간을 단축할 수 있고, 지속감염우를 근절함으로써 치료비 및 방역비 등으로 인한 농가의 경제적 손실을 최소화 함.
- 특히, 혈청분리를 통해 민감도 높은 진단이 가능한 전문가용 진단키트와 혈구분리 패트기술이 적용된 전혈사용가능한 현장용 진단키트를 개발함으로서 사

용자의 편리성을 크게 향상시킬 것이다.

- 신규 개발된 BVDV1/ BVDV2 유전형 선별 진단키트를 사용함으로서 BVDV 방역의 체계화가 가능함.
- 본 연구과제로 개발된 BVDV 항원 신속 진단키트를 BVD 방역사업에 활용하여 BVD 진단시스템의 구축에 기여.
- 본 연구를 통해 송아지 설사증과 관련 있는 다른 바이러스 질환과의 감별진단을 가능하게 할 수 있는 진단시스템 구축에 기여
- 본 연구에 사용된 항원단백질의 특성 및 항체단백질의 특성 분석을 통해 향후 BVDV 예방 백신을 개발에 기여함
- 무엇보다도 국내외 축산농가에서 BVDV의 확산방지 및 예방, 치료 등 방역에 활용될 것임.

2) 연구개발성과의 기대효과

(1) 기술적 측면

- 현장에서 조기진단 가능한 제품개발 기술력 확보
- BVD 전파 원인의 조기 제거가 가능하여 우군의 전파를 차단할 수 있다.
- 지속감염우(PI)를 색출하여 도태함으로써 양돈장에서 BVD 오염에 의해 혈청학적 교차반응에 의한 돼지열병 발생 오인을 방지하여 돼지열병 청정화 유지에 기여할 수 있음
- BVD를 조기에 진단할 수 있는 진단시스템을 구축하여 시간과 경비를 절감할 수 있다.
- 유효항원, 항체 선별 및 생산 기술력 확보를 통한 타 제품개발의 핵심요소 확보

(2) 경제적.산업적 측면

- 조기에 BVD을 진단하여 축산물의 경쟁력 제고에 이바지하고자 함.
- 조기진단/제어시스템을 통한 BVD 청정구역 실현 및 축우 산업 활성화
- BVD를 조기에 진단하고 예방책을 마련함으로써 송아지 설사 및 호흡기 질환에 의한 경제적 피해를 감소시켜 송아지의 생존율 및 생산성을 향상시키고, 젖소에서 유량생산 감소를 막으므로 농가의 소득 증대를 기대할 수 있다.
- 우수한 송아지 수정란 생산을 유도함으로써 한우의 경쟁력을 강화시킬 수 있다.
- 제품경쟁력 우위 확보를 통한 시장 우위 선점
- 본 연구과제를 통하여 다양한 실험 및 장비 숙지를 통하여 산업체에서 요구하는 우수하고 전문지식을 가진 인력을 양성할 수 있다.
- 수입대체 효과: 국산화를 통한 해외제품 대체효과
- 수출증대 효과: 해외 축우 산업의 needs를 만족하는 제품으로서 수출증대 기대

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명정보	생물자원		정보	실물
	4	1	1		1							

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

등록 현황									
국문핵심어 (5개 이내)	소 바이러스 설사 바이러스		재조합 항원단백질		단일클론항체		현장신속진단 키트		조기검출
영문핵심어 (5개 이내)	Bovine viral diarrhea virus		Recombinant protein		Monoclonal antibody		POCT		Early detection

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ---------- 1

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 ---------- 7

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 ---------- 26

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) ---------- 41

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 ---------- 41

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ---------- 42

별첨 자료 (참고 문헌 등) ---------- 45

최종보고서

보안등급
일반[√], 보안[ ]

중앙행정기관명	농림축산식품부	사업명	사업명	가축질병대응기술고도화지원사업
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)	개발성과 현장 보급 기술
공고번호	2022-17	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
		연구개발과제번호		122017-2

기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	60%	LB0708	30%	LB0701	10%
	농림식품과학기술분류	RB0201	60%	RB0299	30%	RB0203	10%

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문				
	영문				
연구개발과제명	국문	현장활용형 BVDV kit 개발을 통한 BVDV 근절방안 모색			
	영문	Control strategy of BVDV through development of POCT BVDV kit			
주관연구개발기관	기관명	㈜ 보레다바이오텍		사업자등록번호	[redacted]
	주소	(우)13200 경기도 성남시 중원구 사기막골로 45번길 14 B-505		법인등록번호	
연구책임자	성명	최 동 옥		직위	대표이사
	연락처 직장전화	[redacted]		휴대전화	[redacted]
	연락처 전자우편			국가연구자번호	

연구개발기간	전체		2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.(21 개월)
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2022. 04. 01. - 2022. 12. 31.(9 개월)
		n단계	2023. 01. 01. - 2023. 12. 31.(12 개월)

연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
					지방자치단체		기타( )					
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		700,000	7,500	67,500					707,500	67,500	775,000	
1단계	1년차	300,000	2,500	22,500					302,500	22,500	325,000	
	2년차	400,000	5,000	45,000					405,000	45,000	450,000	

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고 역할	비고 기관유형
공동연구개발기관	경북대학교	최경성	교수	[redacted]		공동	대학
	전북대학교	박진호	교수			공동	대학
위탁연구개발기관							
연구개발기관 외 기관							

연구개발담당자 실무담당자	성명		직위	
	연락처 직장전화		휴대전화	
	연락처 전자우편		국가연구자번호	

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

2024 년 02 월 27 일

연구책임자: 최 동 옥 (인)

주관연구개발기관의 장: ㈜ 보레다바이오텍 (직인)

공동연구개발기관의 장: 경북대학교 산학협력단 (직인)

공동연구개발기관의 장: 전북대학교 산학협력단 (직인)

농림축산식품부장관 · 농림식품기술기획평가원장 귀하

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발의 현황

❍ 2021년 9월 1일 가축 동향시장 조사에 의하면, **국내 소 (한·육우 및 젖소) 사육두수는 398만 4천 마리로 10만여 농가에서 소를 사육**하고 있으며, 전년 대비 4.8% 증가하였으며, 세계 소 사육두수 중 65위를 차지하고 있음

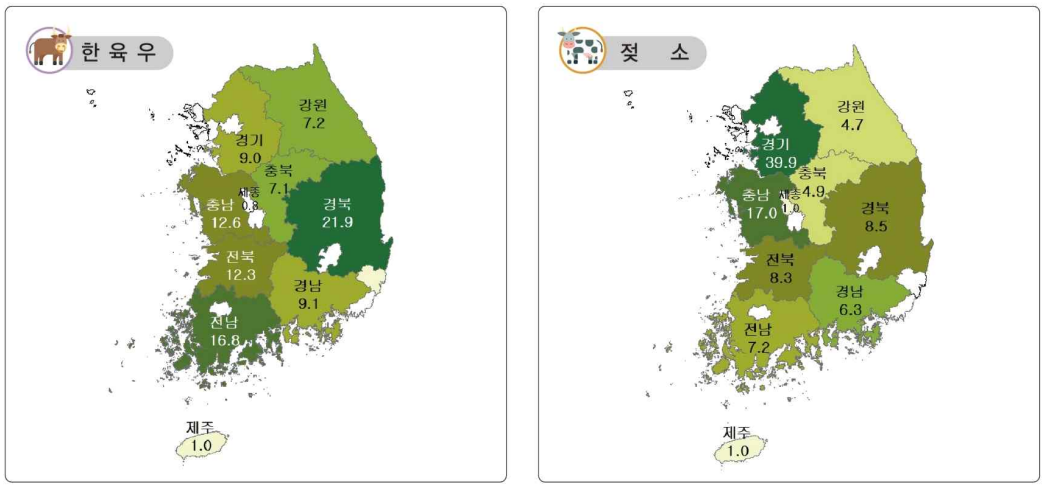


그림 1. 국내 한우 및 젖소 사육 분포

❍ 국내 축산농가의 규모가 전업화, 기업화, 대형화 등으로 관리인 1인당 관리 두수의 증가로 인하여 가축의 세밀한 관리가 어렵기 때문에 질병 발생 가능성이 현저하게 증가하고 있음.

❍ 송아지 설사는 신생송아지뿐만 아니라 이유 전 송아지에서 높은 빈도로 발생하며, 이로 인한 폐사율은 전체 송아지 폐사율의 50% 이상을 차지하고 있음

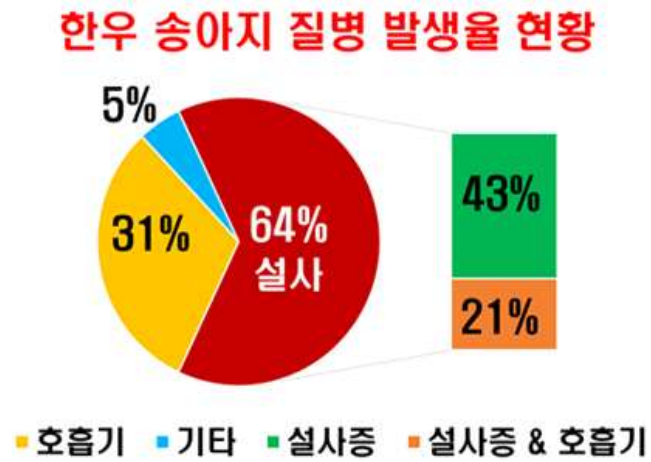


그림 2. 소 설사병 발병 빈도

❍ **송아지 설사에 의한 농가의 직접 손실액은 1,205억 원, 가축 폐사로 인한 축종별 농가 손실액은 1조 5천억 원, 축종별 사육 농가의 평균 방역치료비는 2,800억 원으로** 추산되고 있음

❍ 송아지 설사증은 여러 요인이 있으나 병원체 중에서도 **바이러스에 의한 설사**가 30일령 이전에 가장 많은 문제를 초래함

❍ 특히, 소 바이러스 설사증(Bovine viral diarrrhea; BVD)은 소 바이러스 설사 바이러스

(bovine viral diarrhea virus; BVDV)가 그 원인체로, 고열, 설사, 콧물, 기침, 백혈구감소증, 혈소판감소증, 소화기 점막의 궤양, 호흡기 증상, 출혈, 유량감소, 번식 장애(유산, 사산), 면역력 저하(immunosuppression), 심할 경우 폐사를 초래하며, **소 사육 농가에 막대한 경제적 손실**(년간 **천억 원 이상**)**을 초래하는 아주 심각한 바이러스성 질병으로**, 국내에서 BVD의 감염률은 농장에 따라 **20-60%의 발생률**을 보이며, 최근 그 발생이 급증함

❍ BVD는 모든 연령의 소에 감염되며, 이환율이 매우 높고, 폐사율 또한 계속 증가하고 있어, **BVD에 대한 연구**가 **절실히 요구**되고 있다. 특히, 최근 연구보고에 따르면 소에서 **유산** 원인의 대부분이 **BVD**라고 보고가 되고 있으며, 임신한 모우에 BVDV 감염 시 기형아 출산(소뇌형성부전, 기립불능, 안구형성장애 등)등이 야기되며, 이는 농가소득과 밀접하게 연관되어 있어, 이로 인하여 사육 농가에 막대한 경제적 손실을 끼치고 있음

그림 3. 소 설사병 바이러스 감염소의 증상. (좌) 안구형성장애, (우) 탈모증

❍ BVDV는 2가지 유전형(BVDV1과 BVDV2)을 가지고 있다. **BVDV1**은 22개 (1a-1u)의 subtypes, **BVDV2**는 4개 (2a-2d)의 subtypes형으로 나누어진다. BVDV2의 경우 1990년대에 북아메리카에서 설사와 소화관 내의 미란을 특징으로 하는 급성전염병으로 처음 보고된 이후 유럽, 일본, 한국, 남아메리카 등에서 발병하며 혈소판감소증, 혈액성 설사, 비출혈, 점상 및 반상출혈 등과 같은 **출혈성 증후군(hemorrhage syndrome); HS)을 동반하며 높은 폐사율**을 보이고 있음

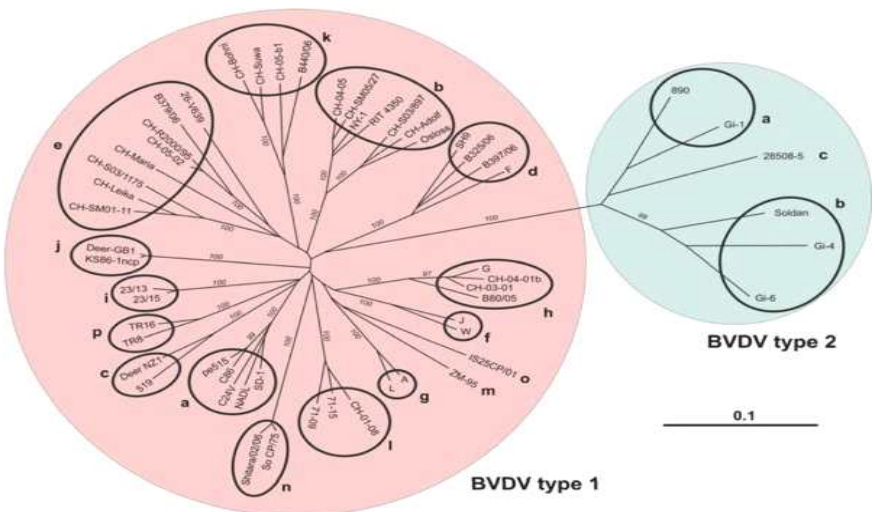


그림 4. BVDV 유전형 분석

❍ BVDV는 또한 배양세포에서의 세포변성 유무에 따라, **NCP (non-cytopathic; 비세포변성)형과 CP (cytopathic; 세포변성)형**의 two biotypes으로 나뉠 수 있다. NCP형의 감염은 유산, 호흡기증상, 대부분 **지속감염증상**을 보이고, **CP형은 점막병(mucosal disease; MD)**의 임상증상을 보이는 동물에서 주로 발견되고 구강 및 점막에서의 **출혈증상**을 나타내다가 결국은 폐사하게 되며, 항원적으로 유사한 NCP형과의 중복감염 (superinfection)이 이루어질 때는 그 임상증상이 훨씬 심각해지는 것으로 보고되고 있다.

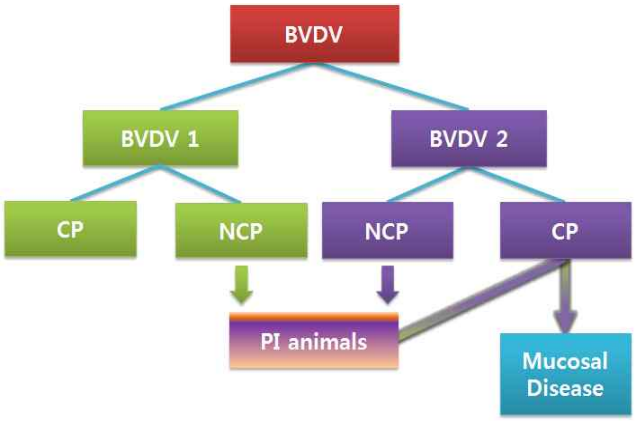


그림 5. 소 설사병바이러스 (BVDV)의 두 생물형 및 지속감염우 발생 모식도

❍ **지속감염우(persistentely infected (PI) cattle)**란, 임신 중인 소가 임신 120일령 이전에 **세포변성효과(CPE)를 일으키지 않는 NCP형의 BVDV에 감염되면** 절반 정도의 송아지는 폐사되어 유산 또는 미이라가 형성되지만, 죽지 않고 태어난 송아지는 **면역관용(immunotolerance)**이 일어나 항체가 형성되지 않고, 일생동안 바이러스를 배설하게 된다. 이 경우로, 임상증상은 대체적으로 위축우, 즉 발육불량이 되기도 하고, 또한 **정상적으로 발육하면서 많은 바이러스를 지속적으로 체외로 배설하여 다른 소에 전파시키는 주요 오염원으로 작용하고 있음**

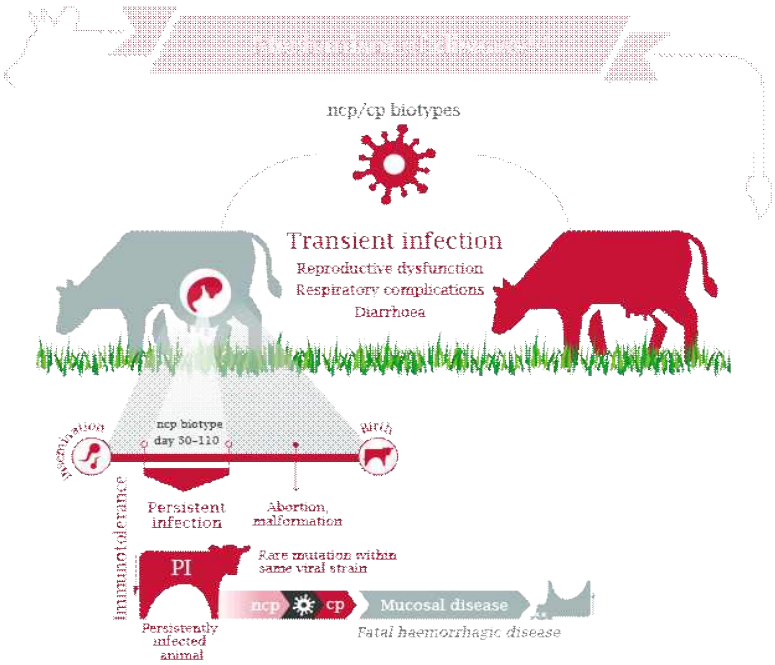


그림 6. 지속감염우 (PI) 성립 모식도

❍ 지속감염우(PI) 모우(cow)는 지속감염 송아지를 출산하므로 농가에 지속적인 문제를 야기하게 된다. 지속감염우(PI)는 백신을 접종하더라도 접종된 바이러스는 죽이지만 지속감염 바이러스를 죽일 수 있는 항체를 생산하지 못하여 지속적으로 바이러스를 배출한다.

❍ 따라서, **지속감염우(PI)를 조기에 색출하여 도태하는 것이 BVD 근절 및 방역의 열쇠가 될 수 있음**

❍ BVD는 **OIE-Listed disease** 중의 하나로, 동물 교역 시 검역질병으로 정해져 있을 만큼 매우 중요한 질병으로 분류되고 있음

❍ BVD는 임상증상이 다른 질병들과 유사한 증상이 많으며, 특히 **구제역(FMD)과 매우 유사하여 구제역 의심 신고축 사례 중에 BVD으로 진단되는 경우가 많다.**

❍ **실제로 최근에 국내 구제역 의심축으로 신고된 후 구제역 음성으로 판정된 시료 중 BVD로 진단된 것이 43.7%에 해당되었다. 따라서** 이는 그만큼 농가들이 BVD에 대한 정보가 없음을 단적으로 들어 내주는 결과라 할 수 있다.

나. 연구의 필요성

1) 산업, 경제적 측면

❍ **농림부 자료에 의하면 BVD로 인한 국내 축산농가의 경제적 손실은 600억~1000억원/연간으로 추산하고 있음**

❍ BVD로 인한 전 세계적인 경제적 피해규모는

- 미국의 경우, 연간 $1.54~2.59 Billion ($17-28/head)
- 유럽의 경우, 연간 €4.5 million (€137/head)

❍ 한편, 모우의 경우, 송아지 생산과 관련된 유산, 송아지 폐사, 기형아 출산 등과 관련된 손실 비용은

- 젖소의 경우: $199.50/head
- 육우의 경우: $174.60/head

❍ 2021년 농촌진흥청에서 BVD관련으로 국내·외에서 최근 10년간 발표된 연구논문을 분석한 결과 품종별 검출률이 다르게 나타났음. 한·육우에서 BVDV 검출률은 9.6%로 젖소의 2.1%보다 7.5% 높았으며, **한·육우의 소화기 및 생식기 질병의 원인체 중에서 BVDV가 2번째였음**

그림 7. 한우 및 젖소의 소화기 생식기 질병 발생빈도

2) 병리학적 측면

❍ 2018년 한 해 동안 농림축산검역본부 (http://www.qia.go.kr/viewwebQiaCom.do?id=46445&type=2_19jbzdsl)에 의뢰된 소화기 및 생식기 질병 의뢰 건수 중에 **BVD가 가장 많이 진단되었다**. 이는 BVD 발생빈도가 매우 높음을 단적으로 제시하고 있음.

❍ 최근 농가마다 BVD 감염률이 증가추세를 보이고, BVD 항체 양성률이 50~80%임을 감안해 보면, 농가에 이미 만연되어 있음을 알 수 있다. 무엇보다도 번식농가의 사육 규모가 증가함에 따라 BVD로 인한 유산 사례가 최근 급증하고 있음. 이에 농가에서 초유 섭취 전 송아지, 설사 증상이 있는 송아지, 증체불량의 송아지(소) 및 젖소 등을 대상으로 현장에서 BVD 검사 실시를 통해서 지속감염우를 신속하게 제거하기 위해 정확한 항원 및 항체 검사 키트가 절실히 필요함. **지속감염우의 경우는 항체생성을 하지 못하므로 3주 후에 항원검사를 통해 항원 양성으로 판정되면 지속감염우로 진단내림. 이는 우군의 강력한 전파체(reservoir)이므로 반드시 도태대상이 되어야 함.**

❍ 국내 BVD에 대한 연구는 다른 축우 질병과 비교하면 상대적으로 연구가 매우 부족한 실정임

3) BVDV 진단의 어려움

❍ 국내에서 시판되고 있는 BVDV 진단키트는 항체 진단키트와 항원 진단키트가 있음

- 현재 시판되고 있는 항원 진단키트는 PCR과 비교해 보았을 때 민감도가 낮은 단점이 있어, 이를 보강한 새로운 kit 개발이 절실히 필요하였다.
- 지속감염우(PI)의 경우는 항체생성을 하지 못해 항체 진단키트는 의미가 없으며, 항원 진단키트를 이용하여 검사를 진행해야 하며, PI는 농가의 주된 오염원이 되어 빠르게 검사하여 도태하는 것이 가장 중요함. 그러나 현재 국내에서는 PI에 대한 의무검사가 실시되지 않고 있음
- PCR을 이용한 진단키트가 현재 시판되고 되고 있으나, 현장에서 적용하기에는 애로점이 있음

- BVD 검출은 분변보다 혈액이나 혈청을 이용하는 것이 훨씬 진단효율이 높음
- 국내시판 중인 BVD 진단키트는 아래와 같음

LiliF BVDV RT-PCR Kit (Lilif)

VPDPro BVDV Ab ELISA (MEDIAN Diagnostics)

CIVTEST Bovis BVD/BD p80 (CIVTEST)

PrioCHECK BVDV (Prionics AG)

그림8. 국내 시판 중인 BVD 진단 키트

❍ 이처럼 축**산농가에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있음에도 불구하고 현재 BVD에 대한 정확한 역학조사가 되어 있지 않고, 무엇보다도 BVD에 대한 진단키트 및 백신 제조에 대한 기틀이 전혀 마련되어 있지 않음**

❍ 따라서, 국내 소 사육 농가에 막대한 경제적 손실을 입히고 있는 BVDV를 조기에 진단하여 **BVD-Zero를 실현하고자 하고자 하는 것**이 가장 큰 당면과제임

❍ 본 연구진이 개발하려고 하는 kit는 혈액 및 혈청, 분변 부유액 등에서 **BVD를 진단**하고자 하며, 소요시간을 10분 이내로 하여 신속하게 항원검사를 하고자 함. 따라서, 본 키트는 국내에서 분리된 **virus를 이용하여 제작하였으므로 신속하고 정확한(rapid and accurate) 것이 본 kit의 가장 큰 장점임.**

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

가. BVDV 신규 항원 단백질의 개발

1) BVDV capside protein 재조합 단백질의 개발

❍ 소 바이러스 설사병의 원인 virus인 BVDV는 single-strand RNA virus로서 N-pro, C, Erns, E1, E2, P7 domain으로 이루어진 구조단백질과 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B domain으로 구성된 비구조단백질로 이루어져 있음

❍ 앞선 연구를 통해, 구조단백질인 Erns 재조합 단백질 및 항체 단백질을 이용한 BVDV 진단 키트를 개발하였음

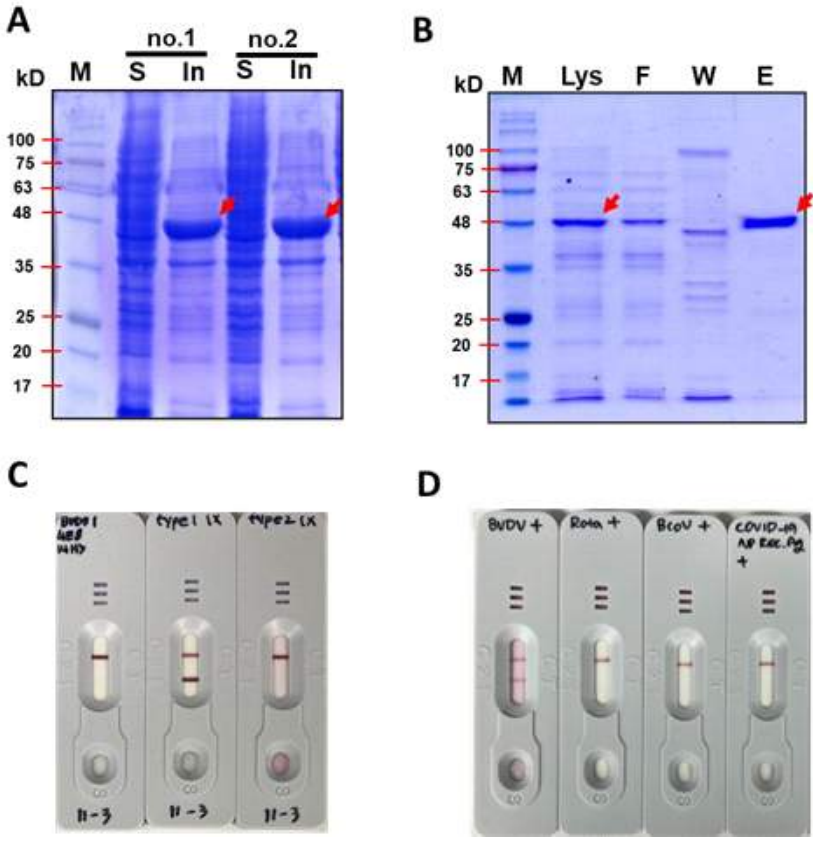


그림 9. BVDV Erns 재조합단백질의 발현 정제 (A, B) 및 개발된 BVDV 진단 키트 반응

❍ 개발한 BVDV 진단키트의 성능향상을 위해 새로운 항원 단백질 및 항체를 개발하고자, BVDV1과 BVDV2의 구조단백질의 염기서열을 비교 분석하였다. 염기서열 분석결과 구조단백질의 E2 domain을 제외한 BVDV1과 BVDV2의 구조단백질은 90% 이상의 상동성을 보였으며, Capsid protein domain인 C domain은 92%의 상동성을 나타냈다. 한편, BVDV1과 BVDV2의 E2 domain의 경우, C-말단의 200 aa는 80% 이상의 높은 상동성을 나타내지만 N-말단 150 aa 부근은 30% 이하의 낮은 상동성을 나타냈다. 이 E2 domain의 변이성은 같은 BVDV1 내에서도 50% 이상의 낮은 상동성을 보여 BVDV 유전형에 따라 다양성이 높음을 보여줌

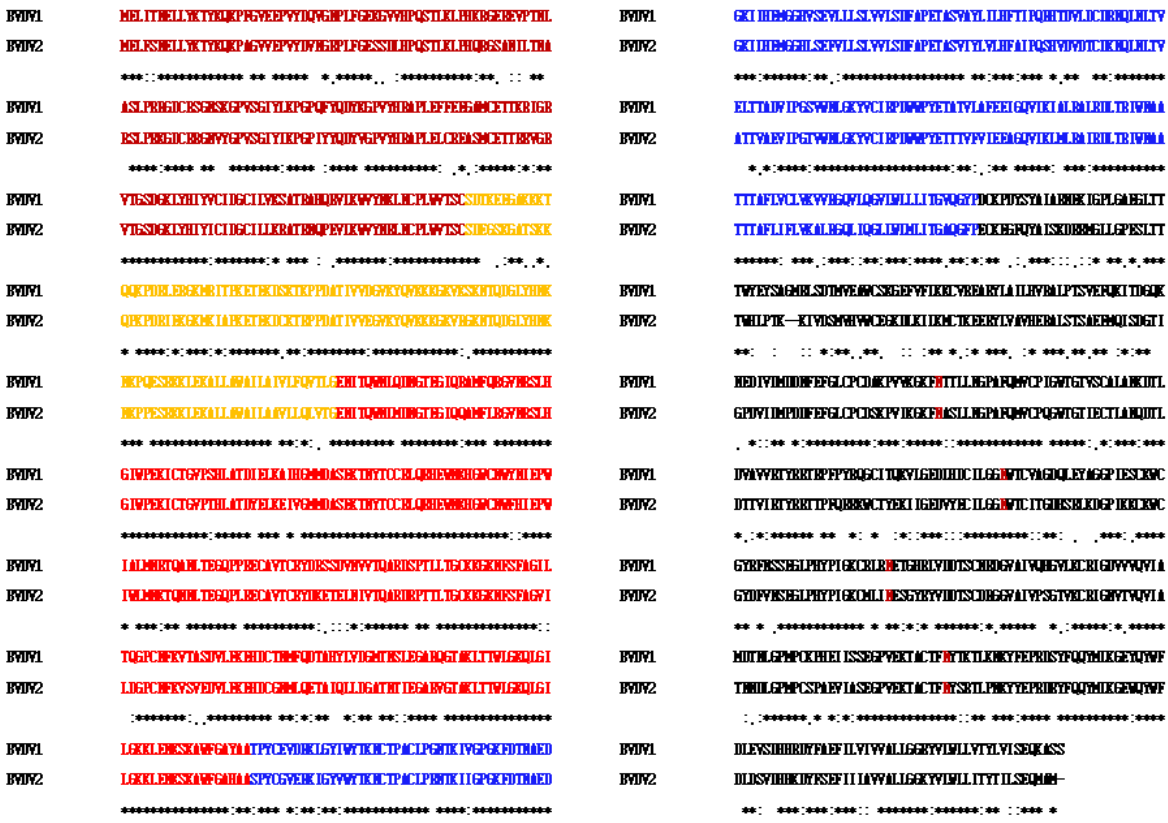


그림 10. BVDV1과 BVDV2 구조단백질의 아미노산 서열 비교. Brown sequences, N-pro domain; Orange sequences, C domain; Red sequences, Erns domain; Blue sequences, E1 domain; Black seqeunces, E2 domain.

❍ BVDV 감염의 효율적인 진단을 위해 상동성이 높은 BVDV1의 C domain의 재조합 단백질 발현 정제하여 대응 항체를 만들고자 함

❍ BVDV1의 아미노산 염기서열을 중심으로 미생물 발현에 맞게 codon을 최적화한 후, 유전자 합성을 통해 BVDV1-CP 유전자를 확보하였다. 효과적인 단백질 발현 및 정제를 위한 발현 vector plasmid를 설계한 후, 합성된 유전자를 삽입하여 BVDV1-CP 재조합 단백질 발현 vector를 제작하였다. 이들 BVDV1-CP 유전자를 대장균에 발현시킨 후, 친화성 크로마토그래피를 통해 정제하여 BVDV1-CP 재조합 항원 단백질을 생산함. 분리정제된 BVDV1-CP 재조합 단백질은 BVDV1-CP 단일클론 항체 생산을 위한 항원으로 사용함

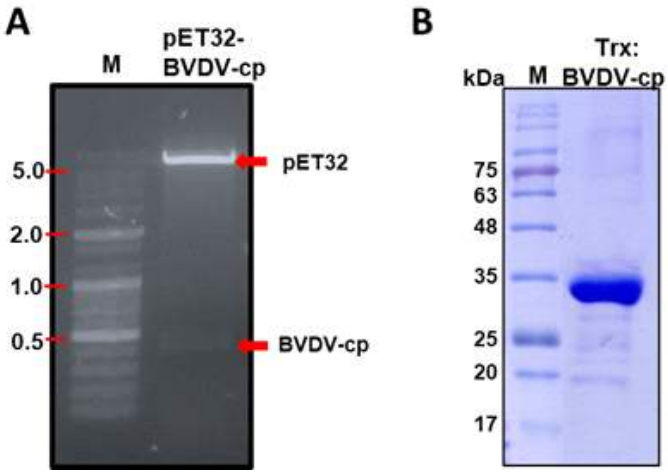


그림 11. BVDV-CP 재조합 단백질의 분리 정제

2) BVDV1과 BVDV2 envelop protein 재조합 단백질의 개발

❍ 한편, BVDV의 유전형인 BVDV1과 BVDV2를 면역학적 방법으로 구별 가능한 진단제의 개발을 위해 BVDV1과 BVDV2의 유전체를 비교 분석하였다. 그 결과, 구조단백질 중에서 E2 domain에 있어 아주 큰 변이성이 존재하였으며, 이들 E2 domain의 높은 변이성을 가진 N-말단 부분을 이용한 재조합 단백질을 제작하였다. Database 분석을 통해 BVDV1과 BVDV2의 E2 domain의 염기서열을 확보한 후, 대장균에서 재조합 단백질의 발현 정제가 가능하도록 염기서열을 최적화하였음

❍ 유전자 합성을 통해 BVDV1-ED2과 BVDV2-ED2 유전자를 확보하였으며, 이들 유전자들은 효과적인 재조합 항원 단백질 생산에 알맞게 설계된 vector에 삽입한 후, 단백질 발현 대장균 형질전환 함. 이들 형질전환 대장균으로부터 단백질 발현 및 정제를 통해 BVDV1-ED2 및 BVDV2-ED2 재조합 단백질을 분리 정제한 후, BVDV1-ED2, BVDV2-ED2 특이적인 단일클론 항체의 생산을 위한 항원으로 제공됨

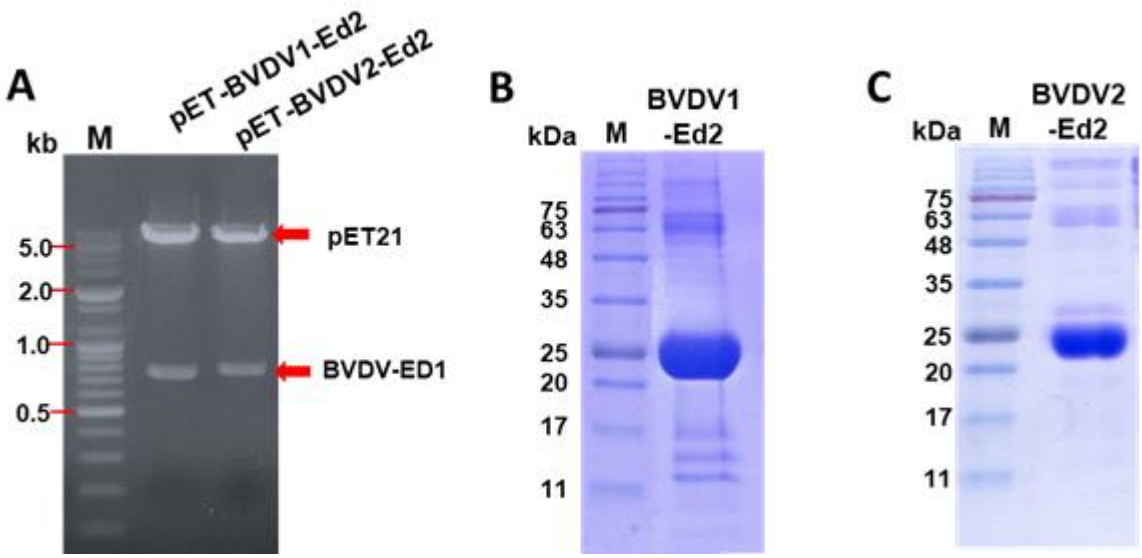


그림 12. BVDV1-Ed2와 BVDV2-Ed2 재조합단백질의 분리 정제

나. BVDV 신규 항체 단백질의 개발

1) BVDV 신규 항체 단백질의 생산

❍ BVDV 감염의 효율적인 진단을 위해 마우스를 이용한 상기 BVDV1-CP, BVDV1-ED2, BVDV2_ED2 재조합 단백질의 특이적 항체를 생산하고자 하였음. 이를 위해 상기 재조합 단백질을 1 mg/mL 농도로 희석한 후, Freund's complete adjuvant (FCA, Sigma 사)와 혼합하여 에멀젼을 제조하였으며, BALB/c 마우스의 foot pad에 주입함으로서 면역화를 유도하였다. 항원 단백질과 Freund's incomplete adjuvant (FIA, Sigma 사)를 혼합한 에멀젼을 2주 간격으로 3회 추가 면역시킴으로서 면역화의 상승을 유도함

❍ 한편, 단일클론 항체 생성을 위해 면역화가 최종 완료된 후, 면역화된 마우스로부터 슬와 림프절을 적출하여 림프절 세포를 회수하였음. 회수된 림프절 세포와 단일클론 항체 개발에 널리 사용되고 있는 SP2/0 골수종 세포주를 PEG 1500 (Invitrogen 사)과 함께 혼합하여 세포융합을 유도함

❍ 융합된 세포주로부터 단일클론 항체 생성 세포주를 선발하기 위해 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용한 융합 세포의 선별을 시행하였다. 각각의 재조합 항원 단백질을 1 μg/mL 농도가 되도록 50 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9.6)에 희석하여 96 well immune-plate에 분주한 후, 융합 세포주 배양액을 첨가하여 반응시킴. HRP (horseradish peroxidase)가 부착된 anti-mouse IgG 항체와 TMB 기질을 처리하여 반응시킨 후, ELISA reader를 통해 250 nm 파장에서의 흡광도를 측정함으로써 반응결과를 분석하였음. 이들 반응에서 단일클론 항체를 생성하는 융합 세포주는 상대적으로 강한 흡광도를 나타냄

❍ ELISA 분석을 통한 단일클론 항체를 생성하는 세포주를 선발한 후, 선발된 세포주는 각 항원농도별 2차 ELISA 분석을 시행하여 강한 반응성을 나타내는 세포주들을 각 병원체에 대한 단일클론 항체 생성 세포주로 최종 선발

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.072	0.066	0.078	0.068	0.068	0.069	0.072	0.068	0.07	0.067	0.068	0.074	450
B	0.06	0.054	0.051	0.051	0.059	0.077	0.055	0.05	0.053	0.054	0.051	0.058	450
C	0.063	0.056	0.052	0.052	0.055	0.055	0.054	0.054	0.051	0.058	0.052	0.059	450
D	0.082	0.058	0.061	0.055	0.056	0.054	0.055	0.058	0.054	0.052	0.053	0.06	450
E	0.145	0.059	0.053	0.068	0.058	0.057	0.064	0.063	0.053	0.055	0.054	0.057	450
F	0.068	0.059	0.052	0.051	0.054	0.057	0.056	0.053	0.059	0.098	0.057	0.07	450
G	0.063	0.054	0.055	0.055	0.053	0.128	0.057	0.053	0.055	0.056	0.066	0.057	450
H	0.074	0.06	0.057	0.057	0.061	0.055	0.077	0.059	0.062	0.108	0.054	0.066	450

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.107	0.093	0.137	0.094	0.095	0.066	0.085	0.071	0.085	0.101	0.077	0.105	450
B	0.091	0.088	0.075	0.079	0.079	0.071	0.055	0.063	0.073	0.072	0.067	0.076	450
C	0.082	0.087	0.071	0.058	0.15	0.157	0.236	0.07	0.084	0.06	0.055	0.082	450
D	0.073	0.081	0.08	0.114	0.069	0.076	0.073	0.054	0.067	0.06	0.067	0.074	450
E	0.078	0.08	0.06	0.072	0.069	0.067	0.061	0.105	0.135	0.077	0.063	0.068	450
F	0.083	0.06	0.065	0.075	0.067	0.065	0.064	0.19	0.175	0.06	0.065	0.096	450
G	0.076	0.068	0.063	0.075	0.064	0.056	0.058	0.052	0.066	0.054	0.069	0.075	450
H	0.092	0.073	0.079	0.058	0.099	0.057	0.071	0.061	0.057	0.071	0.063	0.076	450

그림 13. EILISA 분석을 통한 단일 클론항체 형성 세포주의 선발

2) BVDV 신규 항체 단백질의 분리 정제

❍ 선발된 단일클론 세포주는 단계별 증식배양법에 따라 T-25, T-75, T-175 flask에 순차적으로 배양하여 세포주를 증식 배양하고 세포배양이 완료된 세포주는 filtering, 원심분리 등 일련의 처리 과정을 거쳐 배양액과 세포주를 분리한다. 추출된 세포배양액은 protein A/G를 이용한 친화성 크로마토그래피를 통행 생성된 항체 단백질을 분리 정제하였다.

❍ 분리 정제된 단일클론 항체들은 항원 단백질 및 BVDV 바이러스 배양액과 함께 ELISA 분석을 통해 추가 반응성을 분석하였으며, 최종 BVDV-CP의 경우 48 mAb 항체 clone을 선발하였으며, BVDV1-ED2의 경우 46 mAb clones, BVDV2의 경우 12 mAb clone을 선발하였다.

BVDV-CP

4E1	5D10	A1D11	A8F5
1E12	5H12	A1E6	C3B2
5E12	6D12	A4D1	C3D4
6E12	6D3	A4F5	C4F9
1G4	6D8	A5A11	D1B10
2A1	6F12	A5B3	D2G7
2D1	7G8	A5E6	D3B11
2D10	A10H5	A5H11	D3B2
2F9	A11A11	A6B5	D3F7
4B3	A11H2	A7F1	D4D2
5B6	A12A2	A7G4	D6C11
5C9	A12H3	A7G6	D8B1

BVDV1-E2

12E1	4F7	A2D3	A4B8	A7E6
2E2	6C2	A2G12	A4D1	A8A12
1E6	6D5	A2H11	A5A8	A8D7
6E7	6G7	A2H4	A5E7	A8E9
4E8	7B3	A2H7	A5G6	C8D1
10D6	A1D12	A3A4	A5H6	Y5A5
11D4	A1E5	A3E1	A6E10	
2B10	A1E8	A3F1	A6H10	
2H2	A1G12	A3F9	A7A4	
3D4	A2C6	A3H10	A7B1	

BVDV2-E2

1D3
1F4
3D11
4C11
6G5
7C6
8C11
C2D5
C4A1
C4G4
14H3
4B33

그림 14. 새로 선발된 BVDV 단일클론 항체 목록

다. BVDV 항원 진단을 위한 신규 항체쌍 선발

1) 금 나노입자 제작 및 금 나노입자-항체 접합

❍ 금 나노입자를 Frens (1973)의 방법을 준용하여 제작하였으며, 금 나노입자 용액을 100 mM K2CO3 용액을 이용하여 pH 9.0으로 맞춤

❍ 금 나노입자 (50 nm) 용액 10 uL를 1 mg의 단일클론 항체와 혼합 후 반응시킨 후, 1% BSA가 포함된 PBS로 3회 세척하여 금 나노입자-항체 축합제를 준비

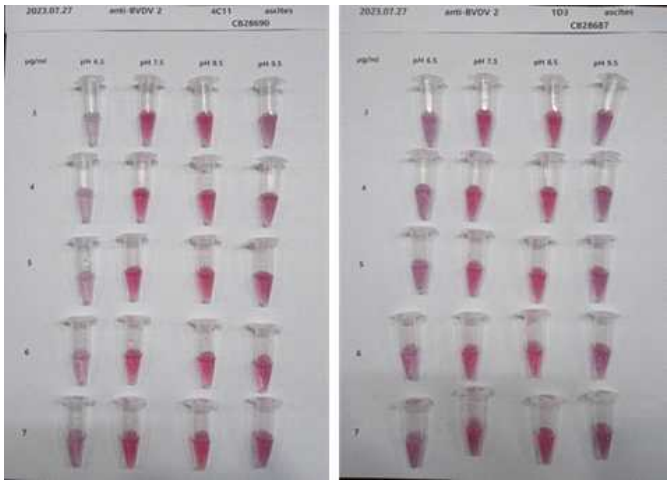


그림 15. GNP-BVDV2 mAb Conjugation

2) 항체 pair test

❍ 항체 선별을 위한 pair test는 1차적으로 lateral flow immunoassay 액상 테스트로 진행

❍ Nitrocellulose membrane (Nupore 사, 10 μm)의 control line에는 goat anti-mouse IgG를, test line에는 BVDV mAb 항체를 분주한 후 하룻밤 동안 건조 시킨 후, 흡수패드를 부착하고 4 mm 크기로 절단하여 pair test를 위한 스트립을 제작

❍ 96 well plate에 금 나노입자-BVDV mAb 축합체를 5-10 uL 분주한 후, BVDV 재조합 항원 단백질이 100 ng/mL 첨가된 phosphate buffer (1% Tween-20) 45 μL를 분주하였다. 음성 대조구에는 항원 단백질 대신 phosphate buffer만 대신 분주

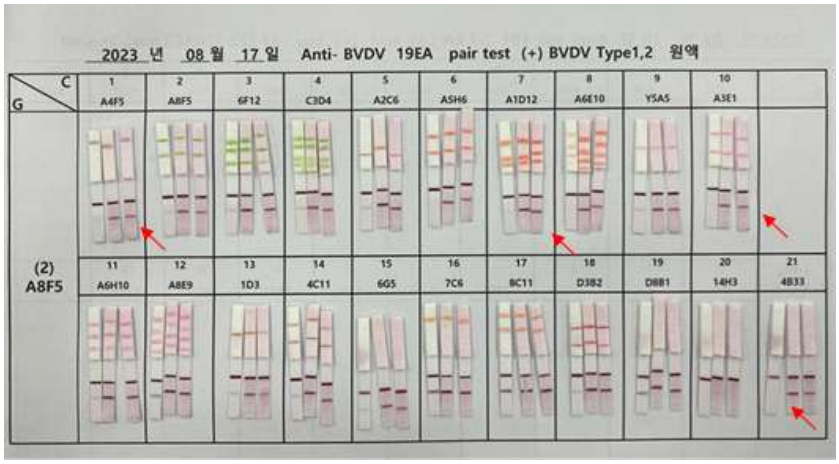


그림 16. Harf test 통한 BVDV 항체쌍의 선별

❍ 상기 pair test를 위한 스트립을 음성대조군, 테스트 군에 각각 한 개씩 주입한 다음 10 분 뒤 검출 신호를 확인하였으며, 음성대조군에서는 테스트 라인에 밴드가 관찰되지 않고, 테

스트군에서는 테스트 라인에 밴드가 관찰되는 항체 쌍 중 신호가 강한 것을 1차적으로 21 항체쌍을 선별

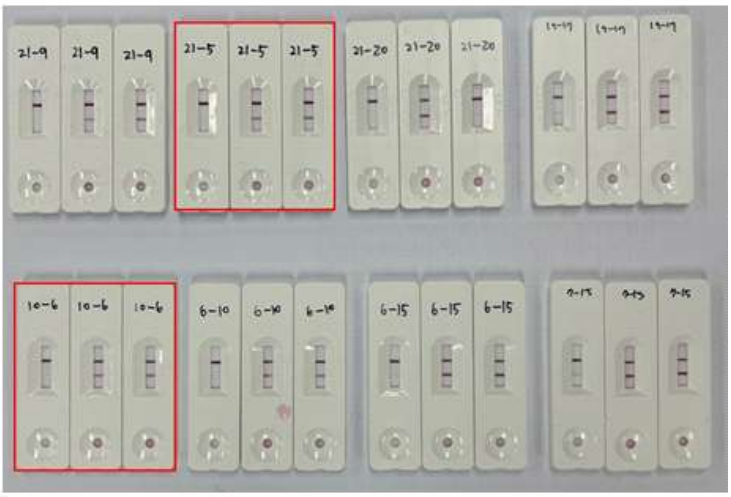
6F12	A4F5	A8F5	C3B2	C3D4	D8B1	6D12	14H3
A1D12	A2C6	A3E1	A5H6	A6E10	A6H10	A8E9	Y5A5
1D3	4C11	6G5	7C6	8C11	4B33		

그림 17. 1차 pair test를 통해 선발된 항체쌍 목록

3) 최적 항체 pair 쌍 선별

❍ 액상 lateral flow 분석을 통해 1차적으로 선별한 21 항체 pair 쌍들 중에서 비특이 반응이 없으면서 검출 신호가 강한 항체쌍을 선별하기 위해 nitrocellulose membrane, sample pad, absorbent pad 들이 결합된 스트립 카세트를 이용하여 2차 항체쌍 선별을 실시하였다. 이를 통해 7쌍의 항체쌍이 아주 양호한 양상을 보였으며, 그중 6F12/ A5H6, A3E1/Y5A5가 항체쌍이 최고의 항체쌍으로 선발됨

A



B

mAb	1	2	3	4	5	6	7
Capt. mAb	A4F5	C3D4	6G5	14H3	6F12	A3E1	Y5A5
Det. mAb	Y5A5	A5H6	8C11	4B33	A5H6	Y5A5	6G5

C

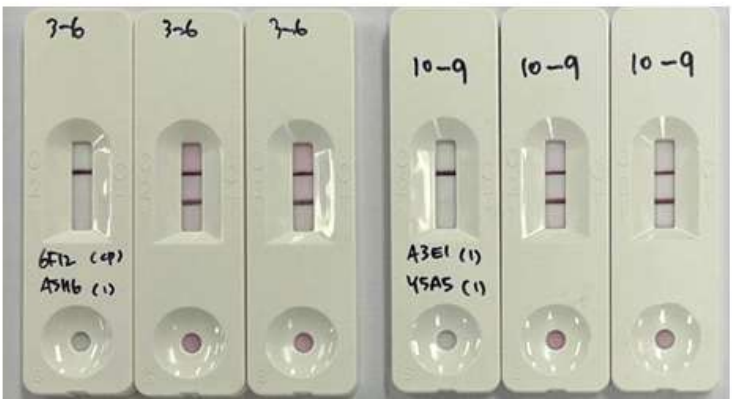


그림 18. BVDV 항체쌍 선발. A; Full-strip test를 통한 항체쌍 선발, B; 최고의 성능을 보인 7종의 항체쌍 목록, C:최종 선발된 항체쌍 2종

라. BVDV1 및 BVDV2 선별 항원진단 키트 개발

1) BVDV1, BVDV2 선별 항체쌍의 선발

❍ 면역학적 방법으로 BVDV1 및 BVDV2 감염을 특이적으로 구분할 수 있는 항체 단백질의 선발을 위해 위에서 선발된 106종 항체 단백질을 이용하여 BVDV1과 BVDV2에 특이적으로 반응하는 항체들을 선발함

❍ BVDV1 바이러스 배양액과 BVDV2 바이러스 배양액을 이용하여 106 항체 단백질에 대해 ELISA 분석을 실시한 결과, BVDV2보다 BVDV1에 특이적으로 반응하는 16종의 mAb를 선발하였고, BVDV1보다 BVDV2에 더 높은 반응을 보이는 6종을 선발함

Antigen	Clone #	BVDV1	BVDV2
anti-BVDV-CP	A4F5	0.629	0.158
anti-BVDV-CP	A8F5	0.708	0.082
anti-BVDV CP	D3B2	0.585	0.129
anti-BVDV-1	A2C6	0.741	0.242
anti-BVDV-1	A5H6	0.525	0.283
anti-BVDV-1	A1D12	0.634	0.09
anti-BVDV-1	A3A4	0.449	0.155
anti-BVDV-1	A6E10	0.753	0.275
anti-BVDV-1	Y5A5	1.117	0.144
anti-BVDV-1	A8E9	0.733	0.139
anti-BVDV 2	1D3	1.565	0.155
anti-BVDV 2	4C11	2.241	0.123
anti-BVDV 2	7C6	2.037	0.173
anti-BVDV 2	8C11	1.708	0.098
anti-BVDV-CP	A4D1	0.218	0.207
anti-BVDV-CP	6F12	0.144	1.116
anti-BVDV-CP	C3D4	0.113	1.204
anti-BVDV-1	4F7	0.057	0.441
anti-BVDV-1	A3E1	0.097	0.324
anti-BVDV-1	A5H6	0.525	0.283
anti-BVDV-1	A6E10	0.753	0.275
anti-BVDV-1	A6H10	0.43	1.311
anti-BVDV 2	6G5	0.386	0.836

그림 19. BVDV1 및 BVDV2 특이적인 항체 선발

❍ 이들 선발된 항체들을 중심으로 half-test 및 full-strip test를 통해 BVDV1과 BVDV2에 서로 특이적으로 반응하는 항체쌍을 선발함. 그 결과, 1차적으로 6종의 항체가 선발되었으며, 최종 BVDV1에 좀 더 강하게 항체쌍 1종과 BVDV2에 특이적인 항체쌍 2종을 최종 선발함

A

A1D12	Y5A5	6D12	14H3
A2C6	1D3	6F12	4B33
A3E1	4C11	A4F5	
A5H6	6G5	A8F5	
A6E10	7C6	C3B2	
A6H10	8C11	C3D4	
A8E9	8C11	D8B1	

B

mAb	BVDV1	BVDV2	
Capt. mAb	14H3	A3E1	Y5A5
Det. mAb	4B33	A5H6	6D12

그림 20. BVDV1 및 BVDV2 구별 항체쌍

2) BVDV1, BVDV2 항원 진단키트의 제작

- ❍ 위에서 선발된 BVDV1 항체쌍 (14H3)과 BVDV2 항체쌍 1쌍을 중심으로 capture mAb로 선정된 항체 단백질을 이용하여 금나노입자인 colloidal gold와의 최적의 접합조건을 확립하였으며, 항체-GNP 축합체를 형성
- ❍ 선정된 항체쌍을 중심으로 최적화된 조건에 따라 Nitrocellulose membrane에 goat anti-mouse IgG을 C선에 그리고 선발된 BVDV1 detector 항체 (4B33)를 T1선, BVDV2 detector 항체 (A5H6 또는 6D12)를 T2선에 각각 분주한 후, 건조시켜 검출 membrane을 제작하고, 준비된 GNP-BVDV 축합체를 이용하여 BVDV1, BVDV2 항원 검출 키트를 제작
- ❍ BVDV1/BVDV2 항원진단 키트는 BVDV1 virus에 대해서는 T1선 T2선 모두 나타나며, BVDV2의 T2선보다 BVDV1의 T1선이 강하게 반응하였다. 한편, BVDV2 바이러스에 대해서는 BVDV2의 T2선만 반응하여 나타난다. 따라서, BVDV1에 감염된 소의 경우, T1, T2등 2개의 반응선이 나타나고, BVDV2 감염우의 경우는 T2선 하나만 반응선이 나타나게 됨

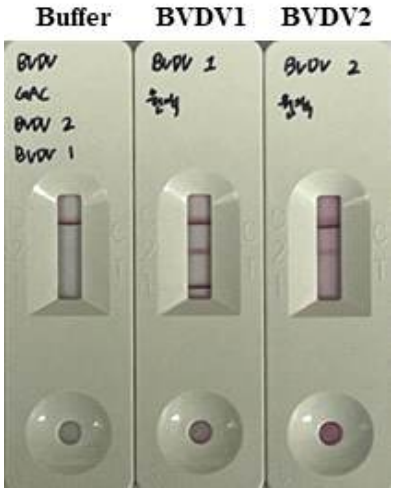


그림 21. BVDV1/BVDV2 항원 진단키트의 반응성

- ❍ 제작된 진단키트의 성능 최적화을 위해 BVDV1과 BVDV2 바이러스 배양액을 이용 하였으며, 비특이적 반응 및 특이성 향상을 위해 반응 Buffer 조건, 항체농도, blocking agents, detergent 등을 분석하여 최적의 반응조건을 확립

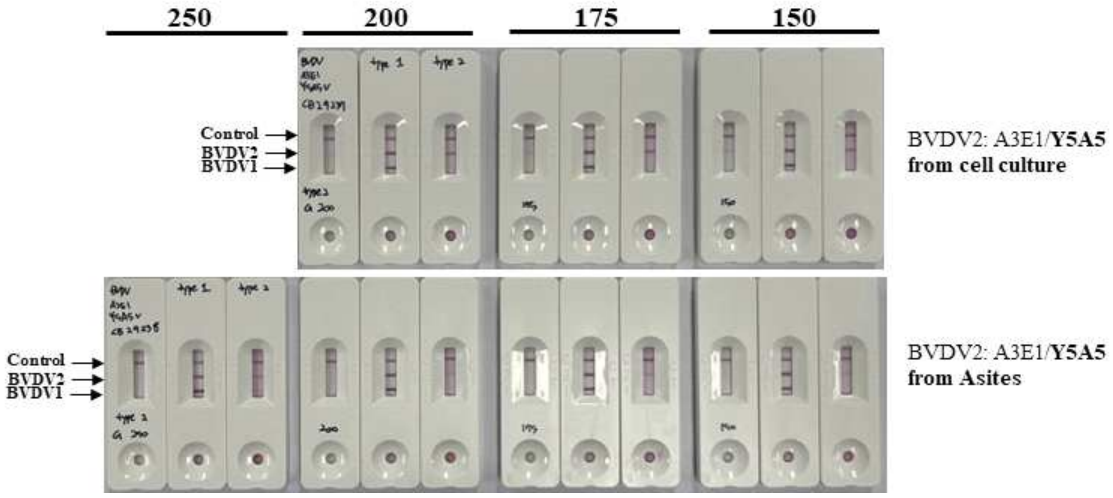


그림 22. BVDV1/BVDV2 항원진단키트의 반응최적화

❍ 개발된 키트의 민감도를 확인하기 위해 Bovine coronavirus, bovine rotavirus, canine coronavirus를 이용하여 교차 반응성을 확인한 결과, 제작된 진단키트는 BVDV 바이러스에만 반응을 하였으며, BVDV1 virus에는 2개선 검출선이 나타나고 BVDV2 virus에는 한 개의 검출선이 나타남

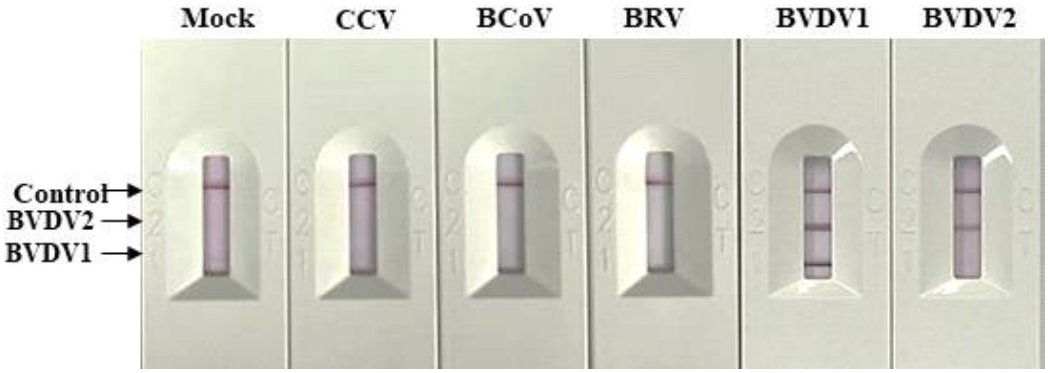


그림 23. BVDV1/BVDV2 항원 진단키트의 반응특이성

❍ BVDV1/BVDV2 항원 진단키트의 성능을 비교하기 위해 기존 회사에서 개발된 BVDV 항원 진단키트와 비교 test를 진행한 결과, 새로 개발된 BVDV1/BVDV2 항원 진단키트는 BVDV1과 BVDV2를 정확히 구별하여 검출하는 데 비해, 타 회사제품의 경우 BVDV1은 검출하였지만, BVDV2 바이러스에는 반응하지 않았음

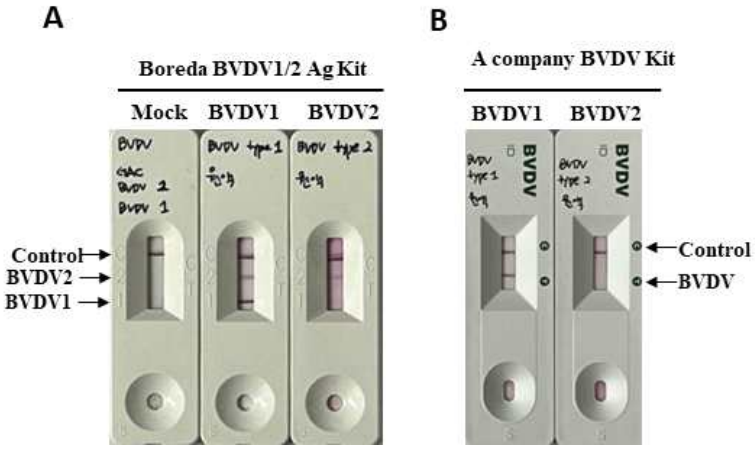


그림 24. BVDV1/BVDV2 항원 진단키트의 성능비교

마. 국내 BVDV 감염실태 조사

❍ 본 과제 연구 기간 동안 국내 농가 및 가축위생시험소에서 분변, 혈청 및 혈액 시료를 받아 송아지 설사증의 원인체인 BVDV에 대한 조사를 진행

❍ 1차년도: 총 1,130개의 분변과 160개의 혈액, 3,833개의 혈청을 받아 RT-PCR 및 real-time RT-PCR 기법을 이용해 BVDV의 항원을 검출하였음(표 1)

① 분변에서 12.3% (139/1,130)가 양성, 혈액에서 13.1% (21/160), 혈청에서 36.9% (1,414/3833)의 유병률을 확인

② 검사 결과를 종합했을 때, 현재 국내에서 BVDV의 발생률은 30.7%에 달하며 **혈청이 BVDV 감염 조사에 있어 효과적인 검체가 될 수 있음을 확인하였음**

표 1. 1차년도 검체 종류별 BVDV 양성률

검체 종류	총 검체 수	BVDV 양성률(%)
분변	1,130	139 (12.3)
혈액	160	21 (13.1)
혈청	3,833	1,414 (36.9)
총합	**5,123**	**1,574 (30.7)**

❍ 2차년도: 분변, 혈액, 혈청 샘플 총 342개 수령하여 1차년도와 동일하게 BVDV PCR 수행하였고, 13개 (3.8%) 샘플 양성 확인함

① 분변에서는 1.7% (1/60), 혈액은 1% (2/191), 혈청 샘플에서는 11% (10/91)가 BVDV 양성으로 검출됨 (표 2)

② 따라서, 1차년도 결과와 동일하게 BVDV 진단에 있어서 가장 좋은 효율을 보인 샘플 종류는 **혈청**으로 판단됨

③ 전체 연구기간 동안 5,465개의 샘플 중 1,587개가 양성으로 나타나 29.04%의 유병률이 확인됨(표 3)

표 2. 2차년도 검체 종류별 BVDV 양성률

검체 종류	총 검체 수	BVDV 검출률(%)
분변	60	1 (1.7)
혈액	191	2 (1.0)
혈청	91	10 (11.0)
총합	**342**	**13 (3.8)**

표 3. 1~2차년도 검체 종류별 BVDV 양성률

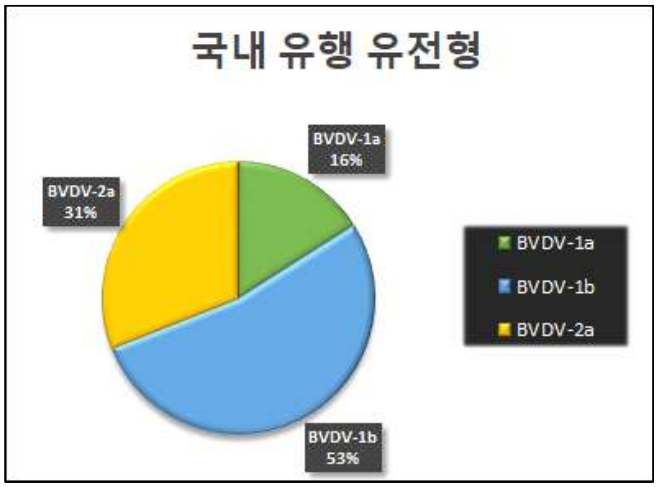
샘플	1차년도		2차년도		총괄	
	검체 수	양성 수 (%)	검체 수	양성 수 (%)	검체 수	양성 수 (%)
분변	171	23 (13.5%)	60	1 (1.7%)	231	**24 (10.4%)**
혈액	111	3 (2.7%)	191	2 (1.0%)	302	**5 (1.7%)**
혈청	3,948	1,346 (34.1%)	91	10 (11.0%)	4,039	**1,356 (33.6%)**
합계	4,230	1,372 (32.4%)	342	13 (3.8%)	4,572	**1,385 (30.3%)**

❍ 염기서열분석을 통한 BVDV 유전형 확인

① 41

② BVDV의 유전형은 5'-UTR 유전자를 이용한 염기서열분석을 통해 확인되었으며, BVDV-1a가 16개, BVDV-1b가 53개, BVDV-2a가 31개 발견됨

③ 그 결과, 국내 축산농가 BVDV감염은 BVDV-1b가 dominant 함이 확인되었음



유전형	검출 수
BVDV-1a	16
BVDV-1b	53
BVDV-2a	31

그림 25. 국내 소 설사병바이러스 감염 BVDV의 유전형 분석

바. BVDV 항원 진단키트의 성능 평가

❍ 개발된 진단 키트 시제품의 유효성을 평가하기 위해 본 기관에서 진행한 PCR 결과와 진단 키트의 결과를 비교함

❍ 2년간 총 387개의 샘플을 비교 평가하여 그중 169개(43.7%) 샘플이 키트에 검출됨

❍ 진단키트 시제품은 PCR 양성 분변 302개 중 142개 (47.0%)를 양성 진단하였고 PCR 음성 분변 85개 중 27개 (31.8%)를 위양성 진단(표 4)

표 4. 연차별 BVDV 항원 진단키트 성능 평가 결과

PCR 결과	키트 양성 수/검사 샘플 수 (검출률)		
	1차년도	2차년도	총괄
양성	119/246 (48.4%)	23/56 (41.1%)	142/302 (47.0%)
음성	17/44 (38.6%)	10/41 (24.4%)	27/85 (31.8%)
합계	**136/290 (46.9%)**	**33/97 (34.0%)**	**169/387 (43.7%)**

❍ 1차년도와 2차년도 가검물을 이용한 평가에서 1차년도 결과와 2차년도의 결과에 있어 양성 및 음성의 차이가 크게 나타난다. 이는 가 검체의 종류에 따른 변이로 보인다. 즉 상기 검체 실험은, 검체채취 지역, 시기, 보관상태가 각각 서로 다르며, 채취자의 방법, 검체의 종류 또한 서로 다른 것이 포함되어 있다. 이에 검체의 다양성에 따라 1차년도와 2차 년도의 차이가 크게 나타난 것으로 보인다. 또한, 좀 더 정확한 검증을 위해서는 검체의 종류 및 채취, 검체량, 이동 및 보관방법 등에 있어 체계화된 검체를 확보가 필요할 것으로 보인다. 상기의 결과를 살펴볼 때, BVDV 발병의 동향이 지역에 따라 다양함을 알 수 있으며, 또한, 검체의 채취 등 방법에 따라 달라질 수 있음을 알 수 있다.

사. BVDV 항원 진단 키트의 제품화

- ❍ 앞선 연구과제 수행을 통해 새로 선발된 BVDV 항체를 이용하여 BVDV 항원진단 키트의 제품화를 추진하여 동물진단키트 전문회사인 ㈜바이오인더스트와 ㈜동방과 함께 BVDV 항원 진단키트의 제품화를 위한 MOU 체결함
- ❍ 최적의 항체쌍을 선발하고, BVDV 항체 단백질과 금나노 입자의 최고의 결합조건을 분석하여 가장 효율적인 결합조건을 선발
- ❍ 다양한 검체로부터 효과적인 BVDV 감염 진단을 위한 최적의 검체 채취 및 체계적 분석방법을 확립하고, 효율적인 검체 희석용액 및 반응조건 등을 확립
- ❍ BVDV 진단의 효율성 및 민감도 향상을 위해 진단키트의 sample pad, 흡수 pad, 항체처리 농도, pad 처리조건, 온습도 조건, 반응 및 희석용액 물리화학적 조건을 최적화함
- ❍ 최적의 조건에서 시제품을 제작하고, 다양한 환경 조건에서의 안정적인 반응성을 검증
- ❍ 제작된 시제품의 제품 등록을 체계적 절차를 진행하고 CRO 업체를 통한 BVDV 항원진단 키트의 임상검사를 추진함

1) BVDV 진단키트의 성능 개선

- ❍ **BVDV 항체-colloidal gold 접합조건 확립**
  - 위에서 새로 선발된 7쌍의 신규 BVDV 항체쌍 중에서 가장 반응성이 큰 3쌍(6F12/A5H6, A3E1/Y5A5, 14H3/4B33)을 중심으로 금나노입자인 colloidal gold와의 접합조건을 확립하였다.
  - 50 nm gold와 BVDV mAb을 10 mM PB 용액에서 반응시켜 항체-gold 중합체를 형성하고 색상변화 및 응집현상 등을 분석하여 최적의 반응조건을 선별하였다.

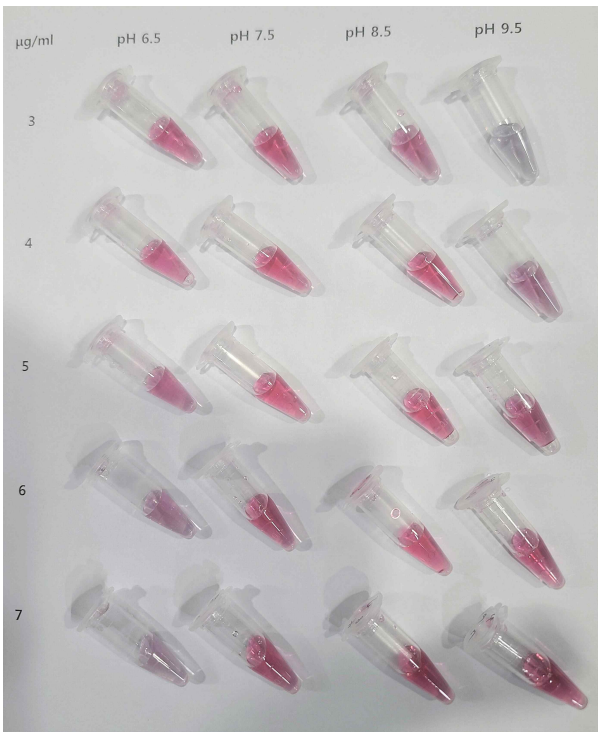


그림 25. 금나노입자-BVDV mAb 접합조건의 확립

- 혈액 및 혈청에서 BVDV을 효과적으로 검출할 수 있는 최적의 분석용액 조건을 설정하기 위해 분석용액의 salt 농도, pH조건, 계면활성제 조건 등 변화를 분석하였다. 그 결과, 알칼리 pH조건, 낮은 농도의 계면활성제가 포함된 CCV buffer (30 mM Sodium carbonate, 70 mM Sodium bicarbonate, 1% Triton-X100, 40 mM EDTA, 250 mM $NaCl_2$, 15 mM NaN_3, pH 9.5)이 최적의 분석용액으로 선정하였다.

❍ **BVDV Lateral Flow Immunoassay kit 제작**

- BVDV 검출용 strip test는 sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane, absorbent pad 4가지의 패드로 구성되며 검출 신호의 표지자로는 50 nm GNP를 사용하였다.
- 먼저 GNP와 detector 항체로 선정된 BVDV 항체를 결합시킨 GNP-BVDV mAb conjugates를 detector로 사용하였으며, BVDV 항원 단백질을 다양한 농도를 희석 처리한 후, sample pad에 주입시켜 주어 capture antibody와 결합하여 검출 신호를 나타내도록 설계하였다.
- 새로 선정된 3쌍의 항체쌍을 중심으로 최적화된 조건에 따라 Nitrocellulose membrane에 goat anti-mouse IgG와 선발된 BVDV mAb capture 항체쌍 (6F12, A3E1, 14H3)을 C선과 T선에 각각 분주하여 검출용 membrane을 제작하였다.
- 금나노입자가 결합된 BVDV 항체쌍 (A5H6, Y5A5, 4B33)의 GNP-BVDV mAb conjugates를 중합체 패드에 분주하여 건조함으로써 중합체 패드를 제작하였다.
- 먼저 건조된 Nitrocellulose membrane에 중합체 패드를 부착시킨 후, 흡수 패트와 시료 공급 패드를 부착하였으며, BVDV 항원 검출을 위한 검체패드 un-cut sheet를 제작하였다.
- 제작된 un-cut sheet를 각 0.6 mm로 절단한 후, 진단 키트 스트립에 각각 삽입하여 조립함으로서 소 혈액내 BVDV의 존재를 검출할 수 있는 "면역크로마트그래피를 이용한 혈청내 BVDV 항원 검출 키트"의 제작을 완료하였다.

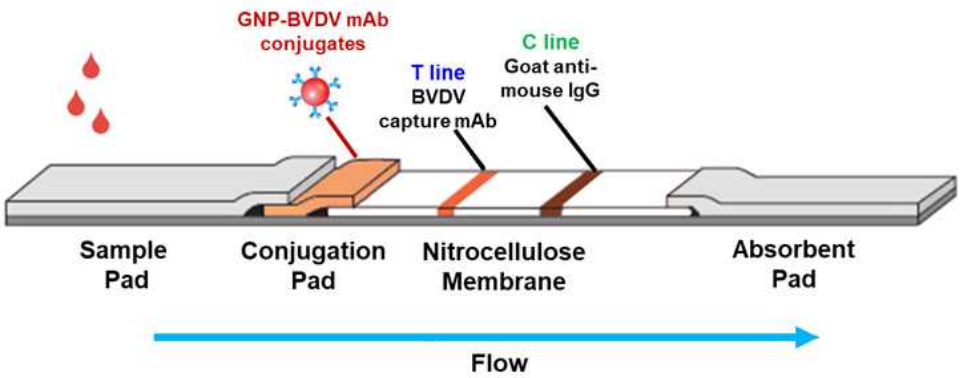


그림 26. 개량된 BVDV 항원 검출 키트

2) BVDV 항원 진단키트의 성능 최적화

❍ **BVDV 검출한계 검증**

- 앞서 선발된 3쌍의 항체쌍을 이용하여 BVDV 검출 진단키트를 제작하여 기존 BVDV 진

단키트와 검출성능을 비교 분석하였다.

- 그 결과, BVDV1과 BVDV2 바이러스 배양추출액을 반응액에 희석하여 기존 진단키트와 새로운 제작된 kit에 점적하여 비교 분석한 결과에 새로 제작된 BVDV 진단 kit에서 두드러진 반응성을 보여주었다.

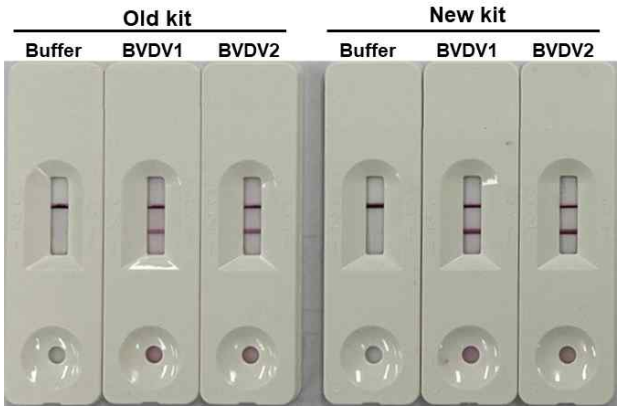


그림 27. 새로운 BVDV 검출 kit 성능 비교

❍ 민감도 검증

- 항체 별 검출성능 비교에서 나타난 결과에 따라 최적의 반응 결과을 보인 항체쌍을 중심으로 민감도를 분석하였다.
- 혈액내 BVDV 검출을 위해 capture mAb로 상기의 6F12를, 금나노중합 mAb로 A5H6로 BVDV 항원 진단 키트를 제작하고 BVDV 항원 단백질에 대한 민감도를 분석하였다.
- 본 BVDV 검출키트의 성능분석을 BVDV1 바이러스 배양액의 농도를 측정한 후 ($TCID_{50}$/mL), 10배씩 희석하여 검출성능을 분석하였다. 그 결과, 10^5TCID_{50}/mL에서부터 약하게 반응하는 것으로 나타났다. 일반적으로 qRT-PCR의 검출한계가 10^3TCTD_{50}/mL인 것을 고려할 때 상당한 민감도를 나타냈다.

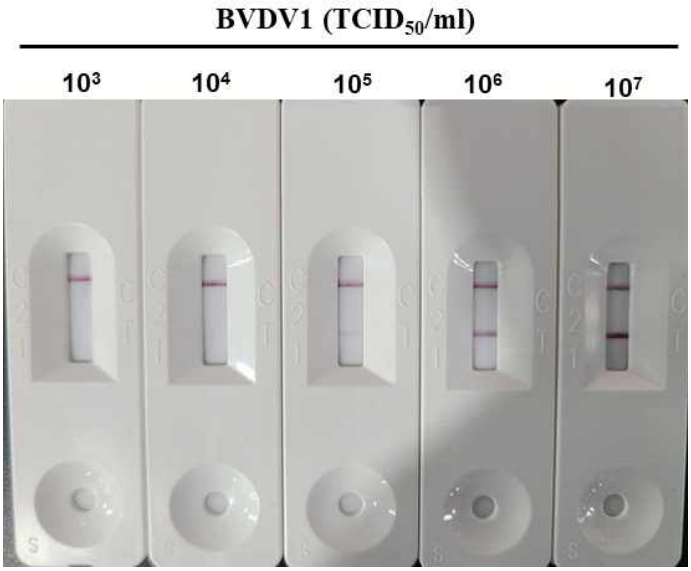


그림 28. 표준 BVDV 단백질을 이용한 BVDV LFI kit의 검출 한계 검증

❍ 특이성 검사

- 한편 제작된 BVDV 항원 진단키트의 BVDV 바이러스 항원 특이성 검증을 위해 Bovine

coronavirus, bovine rotavirus, canine coronavirus 배양추출액을 이용하여 반응 특이성을 확인하였다.

- 그 결과, 그 다른 바이러스 배양추출액에는 반응하지 않고 오직 BVDV1 및 BVDV2 배양액에만 반응하는 것으로 나타나 본 BVDV 항원 진단키트의 특이성이 높은 것으로 나타났다.

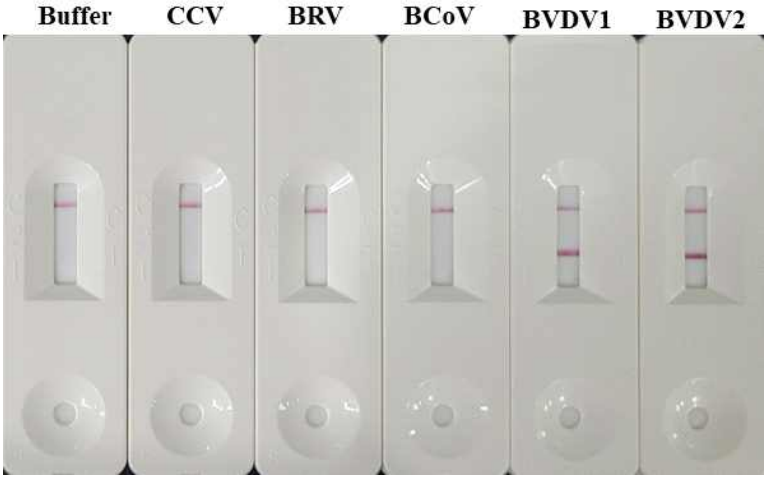


그림 29. 다양한 바이러스 배양추출액을 이용한 BVDV 항원 진단키트의 반응 특이성 검증

❍ **교차반응물질 검증**

- 또한, 각종 생체 물질인 Bilirubin (BR), Albumin (AL), Acetaminophen (AA), Ibuprofen (IB), Ampicillin (Amp), Acetylsalicylic acid (SA), Ascorbic acid (Asc), Li-heparin (LP) 등 각종 교차물질을 이용하여 교차물질들에 의한 간섭 효과를 분석하였으나, 어떤 물질들의 간섭 효과도 나타나지 않았음을 확인하였다.

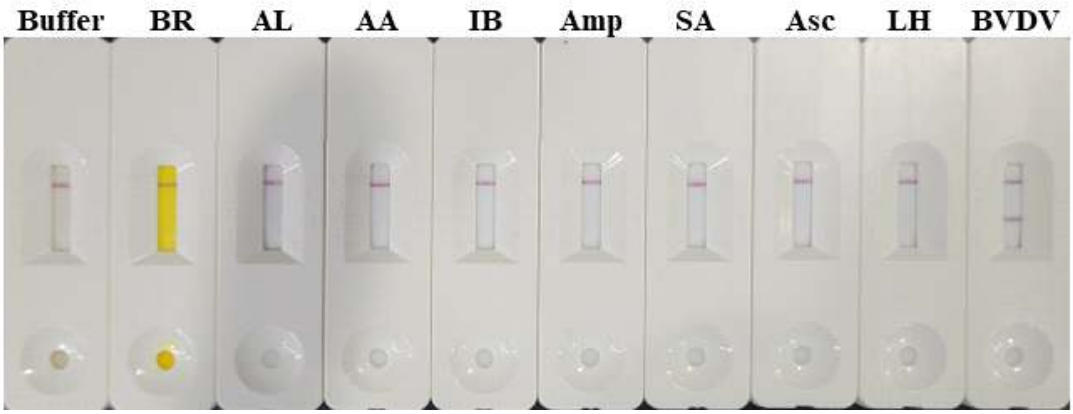


그림 30. BVDV 항원 진단 키트의 교차반응 검증

❍ **효율적인 혈액검체 분리 시스템 개발**

- 다른 소 바이러스 병원체와 달리, BVDV 바이러스 감염 진단은 분변이나 타액 등 환경 검체에서는 정확한 진단이 어렵고 위음성이 나올 가능성이 매우 높다. 따라서, 지금까지 개발된 대부분 BVDV 진단키트는 감염소의 혈액내에 존재하는 바이러스 병원체를 진단할 수 있도록 개발되고 있다. 혈액에 존재하는 병원체 바이러스의 효과적인 진단을 위해서는 응집을 일으키는 혈구세포를 분리하여 바이러스가 포함된 혈장 또는 혈청을 사용하는 것이 가

장 좋다. 하지만, 혈액에서 혈장 및 혈청을 분리하기 위해서는 전문적인 공간 및 기술 장비가 필요하다.

- 우리는 혈액검체를 체취하자마자 현장에서 즉시 바이러스 진단할 수 있는 시스템을 위해 소 혈구세포 항체 및 고분자물질, 화합물들을 이용한 전혈분리 pad를 자체개발하였다. 이 전혈분리 pad을 이용할 경우, 혈장이나 혈청의 분리과정 없이 즉시 BVDV 감염을 분석가능하다. 수의 병원에서 전달받은 감염우을 혈액을 이용하여 실험한 결과, 소 혈청은 효과적으로 혈구세포로부터 이동되었으며, BVDV의 감염 진단이 가능하였다.

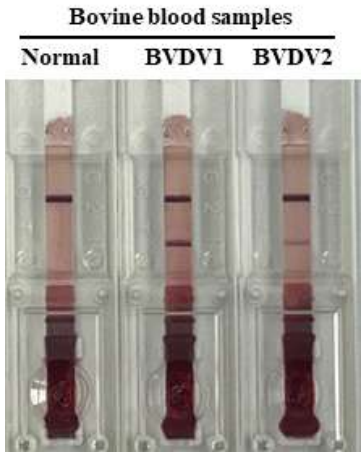
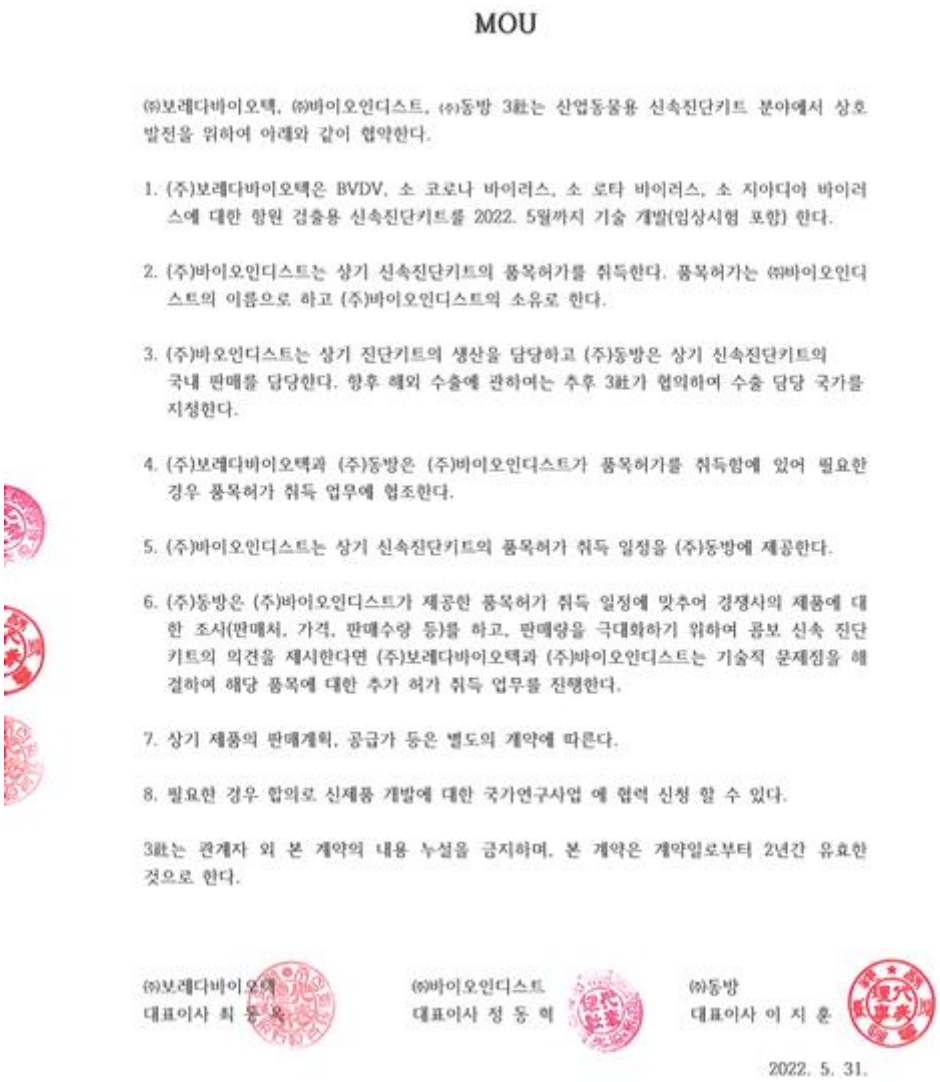


그림 31. 소 전혈 검체를 이용한 BVDV 진단키트의 반응성

3) BVDV 항원 진단키트의 임상시험

❍ BVDV 진단키트의 제품화 추진

- **㈜보레다바이오텍의 자회사인 동물 진단키트 및 영양제의 전문회사 "(주)바이오인디스트를 통한 제품화 추진**
- **개발된 진단제품의 시장확대를 위해 ㈜보레다바이오텍, ㈜바이오인디스트, ㈜동방은 BVDV 진단키트의 제품화를 위해 MOU를 체결하고 제품화 추진함.**
- **㈜보레다바이오텍은 항원, 항체 및 제품을 개발하고, ㈜바이오인디스트는 임상시험 및 제품허가를 담당하며, ㈜동방은 제품판매 및 수출을 담당하기고 합의함.**



MOU

㈜보레다바이오텍, ㈜바이오인디스트, ㈜동방 3社는 산업동물용 신속진단키트 분야에서 상호 발전을 위하여 아래와 같이 협약한다.

1. (주)보레다바이오텍은 BVDV, 소 코로나 바이러스, 소 로타 바이러스, 소 지아디아 바이러스에 대한 항원 검출용 신속진단키트를 2022. 5월까지 기술 개발(임상시험 포함) 한다.

2. (주)바이오인디스트는 상기 신속진단키트의 품목허가를 취득한다. 품목허가는 ㈜바이오인디스트의 이름으로 하고 (주)바이오인디스트의 소유로 한다.

3. (주)바오인디스트는 상기 진단키트의 생산을 담당하고 (주)동방은 상기 신속진단키트의 국내 판매를 담당한다. 향후 해외 수출에 관하여는 추후 3社가 협의하여 수출 담당 국가를 지정한다.

4. (주)보레다바이오텍과 (주)동방은 (주)바이오인디스트가 품목허가를 취득함에 있어 필요한 경우 품목허가 취득 업무에 협조한다.

5. (주)바이오인디스트는 상기 신속진단키트의 품목허가 취득 일정을 (주)동방에 제공한다.

6. (주)동방은 (주)바이오인디스트가 제공한 품목허가 취득 일정에 맞추어 경쟁사의 제품에 대한 조사(판매처, 가격, 판매수량 등)를 하고, 판매량을 극대화하기 위하여 공보 신속 진단키트의 의견을 제시한다면 (주)보레다바이오텍과 (주)바이오인디스트는 기술적 문제점을 해결하여 해당 품목에 대한 추가 허가 취득 업무를 진행한다.

7. 상기 제품의 판매계획, 공급가 등은 별도의 계약에 따른다.

8. 필요한 경우 합의로 신제품 개발에 대한 국가연구사업 에 협력 신청 할 수 있다.

3社는 관계자 외 본 계약의 내용 누설을 금지하며, 본 계약은 계약일로부터 2년간 유효한 것으로 한다.

㈜보레다바이오텍
대표이사 최 동 욱

㈜바이오인디스트
대표이사 정 동 혁

㈜동방
대표이사 이 지 훈

2022. 5. 31.

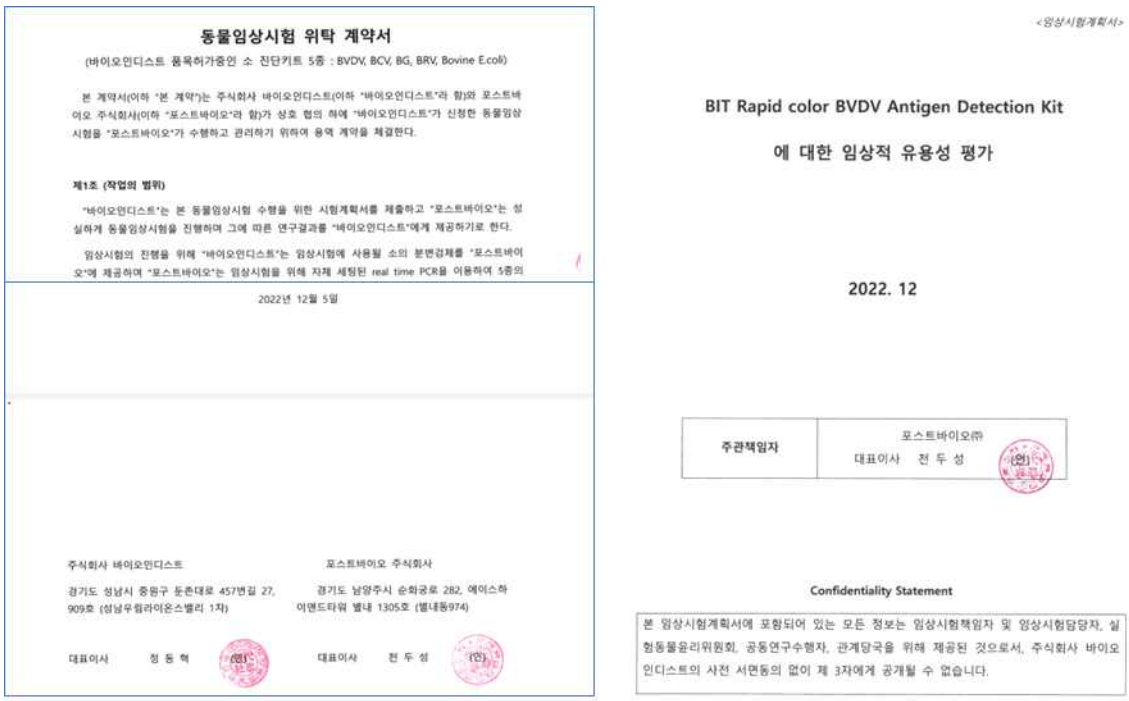
그림 32. BVDV 진단 키트의 시제품 및 임상진단 test

❍ **시제품 임상시험을 위한 동물 임상시험업체의 선정:**

- ㈜바이오인디스트와 함께 DVDV 항원 진단키트의 제품화를 위한 시제품의 개발하여 임상시험을 준비함

그림 33. ㈜보레다바이오텍, ㈜바이오인디스트, ㈜동방이 공동개발한 BIT Rapid Color BVDV 진단 키트

- 효과적인 BVDV 임상시험을 위해 동물의료기기 임상시험을 전문으로 담당하는 시험기관인 ㈜포스트바이오를 선정하여 동물임상시험을 위한 위탁계약서를 작성하였으며 동물임상시험을 실시하고자 함.
- ㈜포스트 바이오에서 임상시험을 위한 임상시험계획서를 수립하여 농림축산검역본부에 BVDV 진단키트의 임상시험 허가신청서를 제출함



동물임상시험 위탁 계약서

(바이오인디스트 품목허가중인 소 진단키트 5종 : BVDV, BCV, BG, BRV, Bovine E.coli)

본 계약서(이하 "본 계약")는 주식회사 바이오인디스트(이하 "바이오인디스트"라 함)와 포스트바이오 주식회사(이하 "포스트바이오"라 함)가 상호 협의 하에 "바이오인디스트"가 신청한 동물임상시험을 "포스트바이오"가 수행하고 관리하기 위하여 용역 계약을 체결한다.

제1조 (작업의 범위)

"바이오인디스트"는 본 동물임상시험 수행을 위한 시험계획서를 제출하고 "포스트바이오"는 성실하게 동물임상시험을 진행하며 그에 따른 연구결과를 "바이오인디스트"에게 제공하기로 한다.

임상시험의 진행을 위해 "바이오인디스트"는 임상시험에 사용될 소의 분변검체를 "포스트바이오"에 제공하며 "포스트바이오"는 임상시험을 위해 자체 세팅된 real time PCR을 이용하여 5종의

2022년 12월 5일

주식회사 바이오인디스트 — 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 457번길 27, 909호 (성남우림라이온스밸리 1차) — 대표이사 정 동 혁 (인)

포스트바이오 주식회사 — 경기도 남양주시 순화궁로 282, 에이스하이엔드타워 별내 1305호 (별내동974) — 대표이사 전 두 성 (인)

<의상시험계획서>

BIT Rapid color BVDV Antigen Detection Kit

에 대한 임상적 유용성 평가

2022. 12

주관책임자	포스트바이오㈜ 대표이사 전 두 성 (인)

Confidentiality Statement

본 임상시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 임상시험책임자 및 임상시험담당자, 실험동물윤리위원회, 공동연구수행자, 관계당국을 위해 제공된 것으로서, 주식회사 바이오인디스트의 사전 서면동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

그림 34. BVDV 진단 키트의 시제품 동물임상 위탁계약서 및 임상계획서 제출

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

❍ BVDV 진단을 위한 새로운 항원 및 항체 단백질 3종 개발 완료

- BVDV capsid protein의 재조합 단백질 및 단일클론 항체 단백질의 개발 완료
- BVDV1 특이적인 envelop protein 재조합 단백질 및 단일클론 항체 단백질의 개발 완료
- BVDV2 특이적인 envelop protein 재조합 단백질 및 단일클론 항체 단백질의 개발 완료

❍ **BVDV 항원 진단키트의 성능 개선**

- 신규개발된 항체 단백질을 이용하여 기존 BVDV 진단키트에 비해 반응성이 큰 새로운 항체쌍 7종을 개발완료 함
- 새로운 항체쌍을 이용하여 기존 시제품에 비해 민감도 특이도 크게 향상된 BVDV 항원 진단키트를 개발완료 함.
- 새로운 BVDV 항원 진단키트의 성능 분석에서 검출 한계 및 민감도, 성능에 있어 크게 개선된 결과분석을 완료함.

❍ **새로운 BVDV1/BVDV2 항원 진단키트의 개발 완료**

- BVDV는 유전형에 따라 BVDV1과 BVDV2로 구분되지만, 현재 BVDV1 및 BVDV2를 구분할 수 있는 진단키트는 없는 실정임.
- 새로 개발된 BVDV-CP, BVDV1-ED2 및 BVDV2-ED2의 특이적인 단일클론 항체 단백질을 이용하여 BVDV1과 BVDV2를 구별할 수 있는 항원 진단키트를 개발 완료함.
- 새로 개발된 BVDV1/BVDV2 항원 진단키트는 타 회사제품과 달리 정확하게 BVDV1과 BVDV2의 감염을 구별함

❍ **BVDV 항원 진단키트의 제품화 추진**

- 개발된 BVDV 항원 진단키트의 제품화를 위해 동물진단기기 전문업체인 ㈜바이오인디스트, ㈜동방과 MOU를 체결하고 BVDV 항원 진단키트의 제품화를 추진함.
- 3사가 공동으로 "BIT Rapid Color BVDV 진단 키트"시제품을 만들고 ㈜바이오인디스트를 통해 임상시험을 진행함
- 임상시험업체인 ㈜포스트바이오와 임상시험을 위한 위탁계약을 하고 임상시험계획서를 농림축산검역본부에 BVDV 진단키트의 임상시험허가신청을 하였으나, 아직 임상허가를 얻지 못함.

❍ **국내 BVDV 감염실태 분석**

- 각 검역원들로부터 5000 검체를 분양받아 국내 축산농가의 BVDV 감염실태를 분석함
- 국내 분석한 검체의 29%에서 BVDV양성 반응을 확인함
- 양성반응을 보인 검체들의 유전형을 분석한 결과, 국내 BVDV감염은 BVDV-1a가 16%, BVDV-1b 53%, BVDVD-2a가 31%로 조사되었음.

❍ **BVDV 항원 진단키트의 성능 평가**

- ㈜보레다바이오텍에서 개발한 BVDV 진단키트의 유효성을 평가를 위해 각 검역원으로부터 분양받은 검체들을 대상으로 RT-PCR과 진단키트의 반응성을 비교 분석함.
- 그 결과, 양성검체에 대해서는 RT-PCR과 46.9%의 일치성을 보인 반면, 음성검체에 대해

서는 34.7% 내외의 일치성을 나타냈으며 전체적으로 43.7%의 일치성을 보임

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

성과지표명 \ 단계			1단계(22~23)	n단계 (yy~yy)	계	가중치(%)
전담기관 등록·기탁지표						
연구개발과제 특성 반영 지표	진단키트 제품화		1			40
	기술실시	실시	1		1	10
		이전	1		1	
	특허출원		1		1	30
	SCI 논문		3		3	-
	비SCI 논문		1		1	-
	학술발표		4		4	10
	인력양성		3		3	10
계			13		13	100

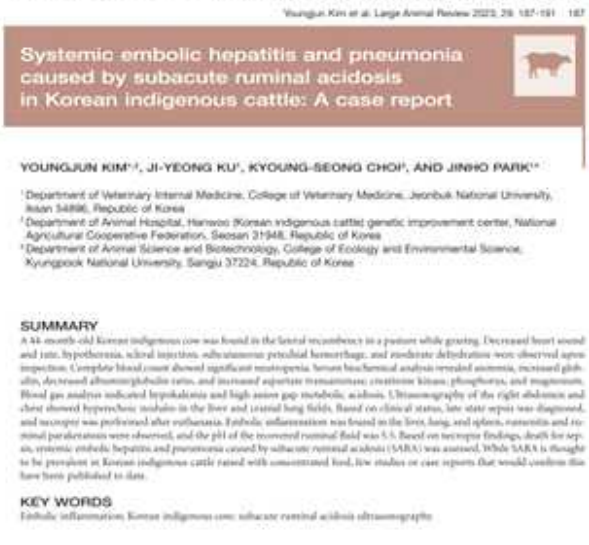
(3) 세부 정량적 연구개발성과 (해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 함)

[과학적 성과]

☐ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Hemorrhagic disease caused by bovine viral diarrhea virus-2a in Korean Indigenous Cattle: case reports	Korean Journal of Veterinary Research	Hyung-Chul Cho	63(1)	대한민국	사단법인대한수의학회	국내학술지	2023. 03.31	2466-1384	100
2	Successful treatment of idiopathic tetanus using metronidazole, magnesium, and acepromazine in Hanwoo (Korean indigenous cattle) yearling bull	Frontiers in Veterinary Science	Youngjun Kim	10	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2023. 03.23	2297-1769	100
3	First report of Cryptosporidium andersoni and risk factors associated with the occurrence of Cryptosporidium spp. in pre-weaned native Korean calves with diarrhea	Frontiers in Veterinary Science	Dong-Hun Jang	10	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2023. 03.21	2297-1769	50
4	Systemic embolic hepatitis and pneumonia caused by subacute ruminal acidosis in Korean indigenous cattle: A case report	Large Animal Review	Youngjun Kim	29(4)	이탈리아	SIVAR-SOC ITALIANA VETERINARI ANIMALI REDDITO	SCIE	2023. 08.02	1124-4593	50

Successful treatment of idiopathic tetanus using metronidazole, magnesium, and acepromazine in Hanwoo (Korean indigenous cattle) yearling bull



Systemic embolic hepatitis and pneumonia caused by subacute ruminal acidosis in Korean indigenous cattle: A case report

First report of *Cryptosporidium andersoni* and risk factors associated with the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned native Korean calves with diarrhea

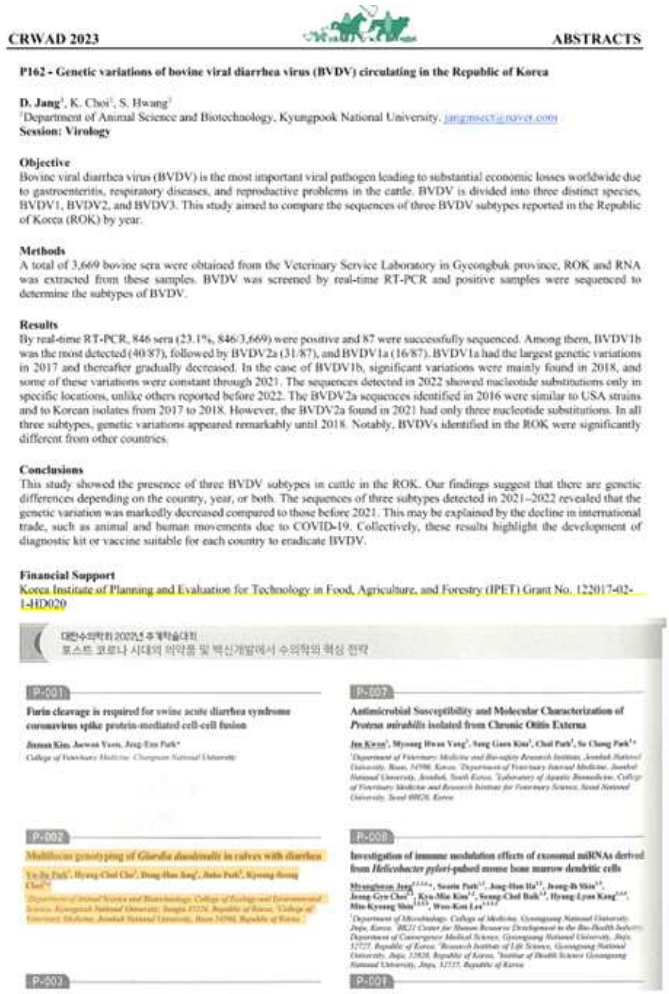
KJVR

Case Report

Hemorrhagic disease caused by bovine viral diarrhea virus-2a in Korean Indigenous Cattle: case reports

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	Severe hemorrhagic disease associated with bovine viral diarrhea virus 2a in Korean native cattle, CRWAD 2023,	Dong-Hun Jang	1.21-1.24	Chicago, USA	미국
2	Genetic variations of bovine viral diarrhea virus (BVDV) circulating in the Republic of Korea, CRWAD 2023	Hyung-Chul Cho	1.21-1.24	Chicago, USA	미국
3	Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from pre-weaned Korean native calves with diarrhea	Dong-Hun Jang	22.11.17	Jeju, Republic of Korea	대한민국
4	Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in calves with diarrhea in the Republic of Korea	Yu-Jin Park	22.11.17	Jeju, Republic of Korea	대한민국



CRWAD 2023 ABSTRACTS

P162 - Genetic variations of bovine viral diarrhea virus (BVDV) circulating in the Republic of Korea

D. Jang[1], K. Choi[2], S. Hwang[1]
[1]Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, jangmsect@naver.com
Session: Virology

Objective
Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is the most important viral pathogen leading to substantial economic losses worldwide due to gastroenteritis, respiratory diseases, and reproductive problems in the cattle. BVDV is divided into three distinct species, BVDV1, BVDV2, and BVDV3. This study aimed to compare the sequences of three BVDV subtypes reported in the Republic of Korea (ROK) by year.

Methods
A total of 3,669 bovine sera were obtained from the Veterinary Service Laboratory in Gyeongbuk province, ROK and RNA was extracted from these samples. BVDV was screened by real-time RT-PCR and positive samples were sequenced to determine the subtypes of BVDV.

Results
By real-time RT-PCR, 846 sera (23.1%, 846/3,669) were positive and 87 were successfully sequenced. Among them, BVDV1b was the most detected (40/87), followed by BVDV2a (31/87), and BVDV1a (16/87). BVDV1a had the largest genetic variations in 2017 and thereafter gradually decreased. In the case of BVDV1b, significant variations were mainly found in 2018, and some of these variations were constant through 2021. The sequences detected in 2022 showed nucleotide substitutions only in specific locations, unlike others reported before 2022. The BVDV2a sequences identified in 2016 were similar to USA strains and to Korean isolates from 2017 to 2018. However, the BVDV2a found in 2021 had only three nucleotide substitutions. In all three subtypes, genetic variations appeared remarkably until 2018. Notably, BVDVs identified in the ROK were significantly different from other countries.

Conclusions
This study showed the presence of three BVDV subtypes in cattle in the ROK. Our findings suggest that there are genetic differences depending on the country, year, or both. The sequences of three subtypes detected in 2021–2022 revealed that the genetic variation was markedly decreased compared to those before 2021. This may be explained by the decline in international trade, such as animal and human movements due to COVID-19. Collectively, these results highlight the development of diagnostic kit or vaccine suitable for each country to eradicate BVDV.

Financial Support
Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) Grant No. 122017-02-1-HD020

대한수의학회 2022년 추계학술대회
포스트 코로나 시대의 의약품 및 백신개발에서 수의학의 혁신 전략

P-001
Furin cleavage is required for swine acute diarrhea syndrome coronavirus spike protein-mediated cell-cell fusion
Jiseon Kim, Jaewon Yoon, Jong-Eun Park*
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

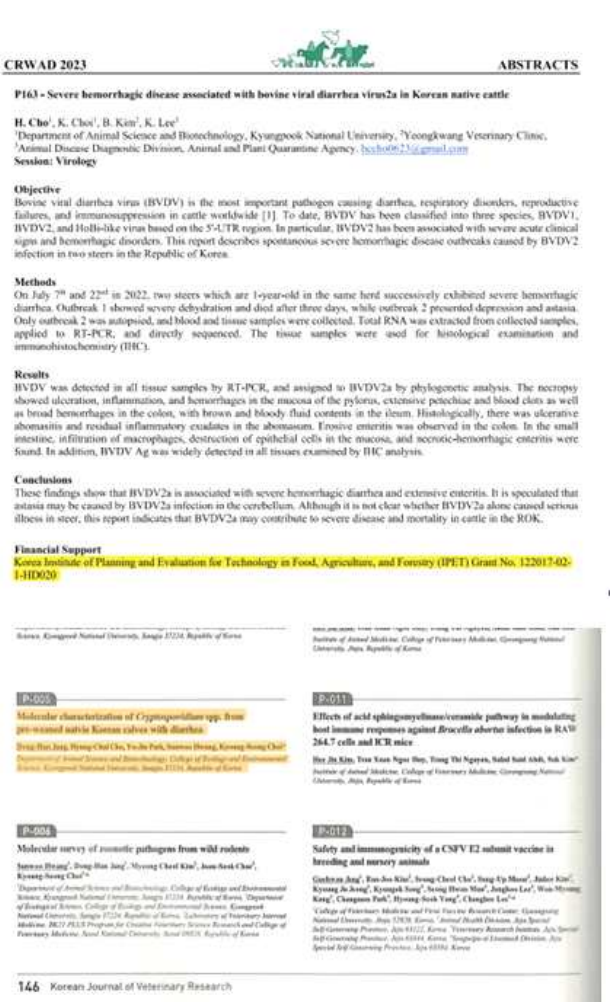
P-002
Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in calves with diarrhea
Ye-Ju Park[1], Hyung-Chul Cho[2], Dong-Hun Jung[1], Jinho Park[2], Kyoung-Seong Choi[1]*
[1]Department of Animal Science and Biotechnology, College of Ecology and Environmental Science, Kyungpook National University, Sangju 37224, Republic of Korea, [2]College of Veterinary Medicine, Konkuk National University, Seoul 34986, Republic of Korea

P-003

P-007
Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of *Proteus mirabilis* isolated from Chronic Otitis Externa
Jin Kwon[1], Myoung Hwan Yang[2], Sung Gun Kim[2], Chul Park[2], Su Chong Park[1]*
[1]Department of Veterinary Medicine and Bio-safety Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan, 54596, Korea, [2]Department of Veterinary Internal Medicine, Jeonbuk National University, Jeonbuk, South Korea, [3]Laboratory of Aquatic Biomedicine, College of Veterinary Medicine and Research Institute for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

P-008
Investigation of immune modulation effects of exosomal miRNAs derived from *Helicobacter pylori*-pulsed mouse bone marrow dendritic cells
Myunghoon Jung[1,2,3,4], Seorin Park[1,2], Jong-Hun Ha[1,2], Jeong-Ih Shin[1,2], Jeong-Gyu Choi[1,2], Kyu-Min Kim[1,2], Seung-Chul Baik[1,2], Hyung-Lyun Kang[1,2,3], Min-Kyoung Shin[1,2,3], Woo-Kon Lee[1,2,3,4]
[1]Department of Microbiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Korea, [2]BK21 Center for Human Resource Development to the Bio-Health Industry, Department of Convergence Medical Science, Gyeongsang National University, Jinju, 52727, Republic of Korea, [3]Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Republic of Korea, [4]Institute of Health Science (Gyeongsang National University), Jinju, 52727, Republic of Korea

P-009



CRWAD 2023 ABSTRACTS

P163 - Severe hemorrhagic disease associated with bovine viral diarrhea virus2a in Korean native cattle

H. Cho[1], K. Choi[1], B. Kim[2], K. Lee[3]
[1]Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, [2]Yeongkwang Veterinary Clinic, [3]Animal Disease Diagnostic Division, Animal and Plant Quarantine Agency. bcho0923@gmail.com
Session: Virology

Objective
Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is the most important pathogen causing diarrhea, respiratory disorders, reproductive failures, and immunosuppression in cattle worldwide [1]. To date, BVDV has been classified into three species, BVDV1, BVDV2, and HoBi-like virus based on the 5'-UTR region. In particular, BVDV2 has been associated with severe acute clinical signs and hemorrhagic disorders. This report describes spontaneous severe hemorrhagic disease outbreaks caused by BVDV2 infection in two steers in the Republic of Korea.

Methods
On July 7th and 22nd in 2022, two steers which are 1-year-old in the same herd successively exhibited severe hemorrhagic diarrhea. Outbreak 1 showed severe dehydration and died after three days, while outbreak 2 presented depression and astasia. Only outbreak 2 was autopsied, and blood and tissue samples were collected. Total RNA was extracted from collected samples, applied to RT-PCR, and directly sequenced. The tissue samples were used for histological examination and immunohistochemistry (IHC).

Results
BVDV was detected in all tissue samples by RT-PCR, and assigned to BVDV2a by phylogenetic analysis. The necropsy showed ulceration, inflammation, and hemorrhages in the mucosa of the pylorus, extensive petechiae and blood clots as well as broad hemorrhages in the colon, with brown and bloody fluid contents in the ileum. Histologically, there was ulcerative abomasitis and residual inflammatory exudates in the abomasum. Erosive enteritis was observed in the colon. In the small intestine, infiltration of macrophages, destruction of epithelial cells in the mucosa, and necrotic-hemorrhagic enteritis were found. In addition, BVDV Ag was widely detected in all tissues examined by IHC analysis.

Conclusions
These findings show that BVDV2a is associated with severe hemorrhagic diarrhea and extensive enteritis. It is speculated that astasia may be caused by BVDV2a infection in the cerebellum. Although it is not clear whether BVDV2a alone caused serious illness in steer, this report indicates that BVDV2a may contribute to severe disease and mortality in cattle in the ROK.

Financial Support
Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) Grant No. 122017-02-1-HD020

P-005
Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from pre-weaned native Korean calves with diarrhea

P-011
Effects of acid sphingomyelinase/ceramide pathway in modulating host immune responses against *Brucella abortus* infection in RAW 264.7 cells and ICR mice

P-006
Molecular survey of zoonotic pathogens from wild rodents

P-012
Safety and immunogenicity of a CSFV E2 subunit vaccine in breeding and nursery animals

146 Korean Journal of Veterinary Research

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 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	소 설사병 유발 바이러스 진단 키트	대한민국	㈜보레다 바이오텍	2023년 12. 27일	10-2023-0192582					100	계획

ㅇ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2023.12.27
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2023-0192582 (접수번호 1-1-2023-1461309-58)
(DAS접근코드8E98)
출원인 명칭 주식회사 보레다바이오텍(1-2013-016900-0)
대리인 성명 위병갑(9-2004-000155-3)
발명자 성명 최동옥 신동호 박진호 최경성
발명의 명칭 소 설사병 유발 바이러스 진단 키트

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : https://www.kipo.go.kr-지식재산제도

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

(23쪽 중 8쪽)

□ 표준화

ㅇ 국내표준

번호	인증구분[1]	인증여부[2]	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류[3]	제안/인증일자

ㅇ 국제표준

번호	표준화단계구분[1]	표준명	표준기구명[2]	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식[3]	제안자	표준화 번호	제안일자

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	BIT Rapid color BVDV Detection Kit	2022. 12. 05	㈜보레다바이오텍 ㈜바이오인디스트	㈜바이오인디스트	체외진단기기	1년		
2	BVDV1/BVDV2 Antigen Detection Kit	2023년 11월 10일	㈜보레다바이오텍	㈜보레다바이오텍	체외진단기기	2년		

BIT Rapid Color BVDV Detection kit

BVDV1/BVDV2 Antigen Detection kit

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과 제 명	현장활용형 BVDV kit 개발을 통한 BVDV 근절방안 모색		
주관연구기관	㈜보레다바이오텍	참여기관	경북대학교, 전북대학교
연구책임자	최 동 욱	연구기간	22년 04월~ 23년 12월(총 1년 9개월)
총 정부출연금	700,000,000 원		
해당 기술의 제품출시 유형			
시제품(제품출시 예정)	(O)	기존 제품 공정개선	(O)
신제품(제품출시 완료)	( )	기 타	( )
제품 출시 실적			

제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
BIT 빠른 탐색 BVDV 진단 키트 (BIT Rapid Color BVDV Detection Kit)		소 바이러스성 설사증을 유발시키는 병원체인 소설사바이러스(BVDV)를 빠르게 진단할 수 있는 진단키트로 소 설사병을 일으키는 병원체 감염을 조기에 진단할 수 있음	2023년12월 04	30

* 첨부 : 담배번도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등)
**식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수

상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.

2024년 02 월 23 일

연구책임자 : 최 동 욱 (서명 또는 인)

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과 제 명	현장활용형 BVDV kit 개발을 통한 BVDV 근절방안 모색		
주관연구기관	㈜보레다바이오텍	참여기관	경북대학교, 전북대학교
연구책임자	최 동 욱	연구기간	22년 04월~ 23년 12월(총 1년 9개월)
총 정부출연금	700,000,000 원		
해당 기술의 제품출시 유형			
시제품(제품출시 예정)	(O)	기존 제품 공정개선	( )
신제품(제품출시 완료)	( )	기 타	( )
제품 출시 실적			

제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
BVDV I/BVD V2 항원 진단 키트 (BVDV1/BVD V2 Antigen Detection Kit)		소 바이러스성 설사증을 유발시키는 병원체인 소설사바이러스(BVDV)와 유전형인 BVDV1 및 BVDV2의 감염을 구별하여 진단할 수 있는 진단키트로서 소 설사병 유발 바이러스의 유전형에 따른 방역대책을 강구할 수 있다	2023년11월 04	30

* 첨부 : 담배번도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등)
**식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수

상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.

2024년 02 월 23 일

연구책임자 : 최 동 욱 (서명 또는 인)

□ 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	전용실시	BVDV 면역학적 진단기술	㈜보레다바이오텍	2023년 12월 01일		
2	기술이전	신생송아지 혈청 단백질 지표를 이용한 건강상태 판별 방법	전북대학교 산학협력단	2023년 10월 06일	10,000 천원	

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

BORE DA BIOTECH

(주)보레다바이오텍

경기도 성남시 중원구 사기막골로 45번길 14 B-505 TEL : 031-8018-2880 FAX : 031-624-3436

문 서 번 호 : 제 2312201 호
시 행 일 자 : 2023 년 12월 26일
수 신 자 : 농림식품기술기획평가원장 귀하
제 목 : 기술실시 보고(확인)서 제출

귀사의 무궁한 발전과 번창함을 기원합니다.

가축질병대응기술고도화지원사업의 하나인 "현장활용형 BVDV kit 개발을 통한 BVDV 근절방안 모색" 과제의 연구 성과에 대한 기술 실시사항을 보고 드립니다.

- 아 래 -

✓ 기술실시 보고(확인)서 1부

감사합니다.

주 식 회 사 보레다바이오텍
대 표 이 사 최 동 옥

■ 농림축산식품연구개발사업 관리기준 [별지 제27호 서식] <제35조제4항 관련> (2쪽 중 1쪽)

기술실시 보고(확인)서

(단위 : 원)

연구개발과제 현황	사업명	가축질병대응기술고도화지원사업		연구과제번호	122017-2	
	연구과제명	현장활용형 BVDV kit 개발을 통한 BVDV 근절방안 모색				
	연구개발기관명	㈜ 보레다바이오텍	연구책임자	최동욱	참여기업명	㈜보레다바이오텍
	연구협약일	2022.04.01	연구기간	2022.04.01. - 2023.12.31		
	연구개발비	정부지원연구개발비	기관부담연구개발비	기타 ( )	계	
		70,000,000	91,700,000		466,700,000	
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(기술)명	BVDV 면역학적 진단기술				
	계약(확인)일	2023. 12. 01	실시(활용)기간	매출발생일로부터 5년간		
	지재권 종류		실시권 유형	직접실시		
	* 지재권이 특허(출원,등록)인 경우	명 칭				
		번 호		일 자		
	실시(활용)기관	기관명	㈜보레다바이오텍	기관유형	중소기업	
		주 소	[redacted] 14	대 표 자	최동욱	
		사업자번호	[redacted]	전화번호	[redacted]	
		부서(담당자)	신 동 호	e-mail	[redacted]	
기 술 료	정액기술료		경상기술료		기타 조건	
	징수(예정)일	징수(예정)금액	착수기본료	징수(예정)일	징수(예정)금액	
				징수시작(예정)일	결산월	
			매출에 따른 기술료	2025.01.01	12	
				징수종료(예정)일	기여도	
	계			2029.12.31	30 %	
기타특기사항						

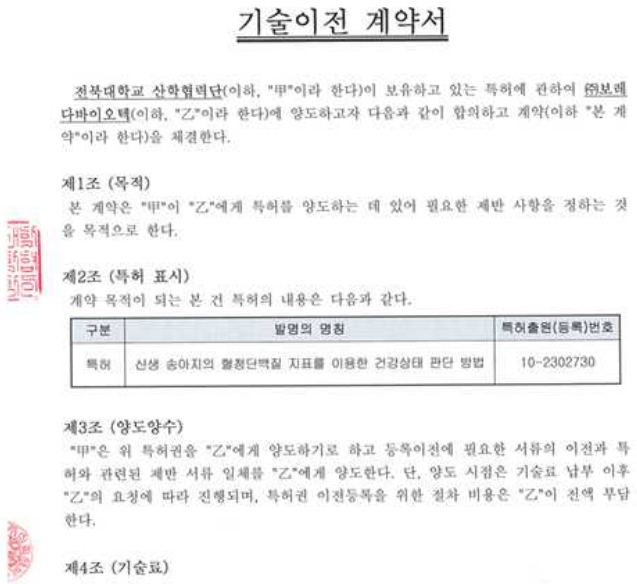
「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고(확인)합니다.

붙임 1. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).

2023 년 12 월 01 일

㈜ 보레다바이오텍 대표이사 최 동 옥 (직인)

농림식품기술기획평가원장 귀하



기술이전 계약서

전북대학교 산학협력단(이하, "甲"이라 한다)이 보유하고 있는 특허에 관하여 ㈜보레다바이오텍(이하, "乙"이라 한다)에 양도하고자 다음과 같이 합의하고 계약(이하 "본 계약"이라 한다)을 체결한다.

제1조 (목적)

본 계약은 "甲"이 "乙"에게 특허를 양도하는 데 있어 필요한 제반 사항을 정하는 것을 목적으로 한다.

제2조 (특허 표시)

계약 목적이 되는 본 건 특허의 내용은 다음과 같다.

구분	발명의 명칭	특허출원(등록)번호
특허	신생 송아지의 혈청단백질 지표를 이용한 건강상태 판단 방법	10-2302730

제3조 (양도양수)

"甲"은 위 특허권을 "乙"에게 양도하기로 하고 등록이전에 필요한 서류의 이전과 특허와 관련된 제반 서류 일체를 "乙"에게 양도한다. 단, 양도 시점은 기술료 납부 이후 "乙"의 요청에 따라 진행되며, 특허권 이전등록을 위한 절차 비용은 "乙"이 전액 부담한다.

제4조 (기술료)

① (정액기술료)

"乙"은 본 계약에 따른 정액기술료로 금10,000,000원(금일천만원정 VAT별도)을 계약 체결 후 1개월 이내에 "甲"이 지정한 계좌로 현금 지급한다.

② 본 계약에 따라 행해진 모든 지불은 여하한 이유라도 "乙"에게 반환하지 않는다.

제5조 (지식재산권에 대한 보증)

① "甲"은 본 기술을 현재 있는 상태로 "乙"에게 제공하며 향후 본 기술의 권리상태의 변동 상황에 대해서는 책임지지 아니한다. 또한 본 기술을 이용한 제품의 시장 적합성과 경제성 및 판로시장 개척 또는 영업에 대하여도 "甲"은 책임지지 아니한다.

② 본 계약 체결 이후 기술 관련 분쟁이 발생하거나 제3자의 침해에 대한 방어가 필요하여 "甲"의 협조가 필요할 경우 "甲"은 이에 적극 협력하도록 한다.

"학생중심대학, 지역상생대학, 글로벌허브대학"

전북대학교 산학협력단

수신자 (경유) 농림식품기술기획평가원장

제목 농림축산식품 연구개발사업 기술실시 보고서 제출

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 농림축산식품 연구개발사업 관리기준 제35조 제3항과 관련하여, 연구개발성과의 기술실시 계약을 체결하고 붙임과 같이 기술실시 보고서를 제출합니다.
   가. 연구개발성과 소유기관: 전북대학교 산학협력단
   나. 연구과제 및 계약내용

사업명	연구과제명	연구책임자	실시기업명
가축질병대응기술고도화지원사업	현장활용형 BVDV kit 개발을 통한 BVDV 근절방안 모색	박진호	㈜보레다바이오텍

붙임 1. 기술실시 보고서 1부.
2. 특허 증빙자료 1부.
3. 기술이전 계약서 1부. 끝.

전북대학교산학협력단(기술료) 귀하

상품종류 보통예금
계좌번호 [redacted]
계좌개설점 전북대 ☎ [redacted]
발행점 전북대 ☎ [redacted]
개설일자 2021-02-26
발행일자 2021-02-26

전북은행

신북은행

원금납입

변경 20 . . .

검인

10 2023-11-08 ¥11,000,000人 ¥583,434,423 신한(주)보레다바이 자금부

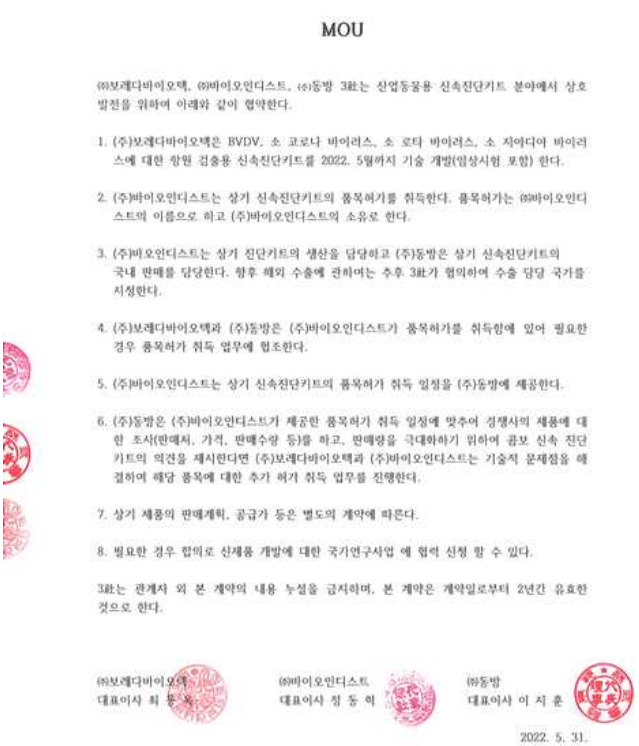
□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 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	BVDV 진단키트 제품화	BVDV 진단키트의 제품화를 위해 ㈜바이오인디스트, ㈜ 동방과 MOU를 체결하여 시제품 출시	㈜보레다바이오텍 ㈜바이오인디스트 ㈜동방				

* 1」 기술이전 또는 자기실시
* 2」 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
* 3」 국내 또는 국외



MOU

(주)보레다바이오텍, (주)바이오인디스트, (주)동방 3社는 산업동물용 신속진단키트 분야에서 상호 발전을 위하여 아래와 같이 협약한다.

1. (주)보레다바이오텍은 BVDV, 소 코로나 바이러스, 소 로타 바이러스, 소 지아디아 바이러스에 대한 항원 검출용 신속진단키트를 2022. 5월까지 기술 개발(임상시험 포함) 한다.

2. (주)바이오인디스트는 상기 신속진단키트의 품목허가를 취득한다. 품목허가는 (주)바이오인디스트의 이름으로 하고 (주)바이오인디스트의 소유로 한다.

3. (주)바이오인디스트는 상기 진단키트의 생산을 담당하고 (주)동방은 상기 신속진단키트의 국내 판매를 담당한다. 향후 해외 수출에 관하여는 추후 3社가 협의하여 수출 담당 국가를 지정한다.

4. (주)보레다바이오텍과 (주)동방은 (주)바이오인디스트가 품목허가를 취득함에 있어 필요한 경우 품목허가 취득 업무에 협조한다.

5. (주)바이오인디스트는 상기 신속진단키트의 품목허가 취득 일정을 (주)동방에 제공한다.

6. (주)동방은 (주)바이오인디스트가 제공한 품목허가 취득 일정에 맞추어 경쟁사의 제품에 대한 조사(판매처, 가격, 판매수량 등)를 하고, 판매량을 극대화하기 위하여 공보 신속 진단키트의 의견을 제시한다면 (주)보레다바이오텍과 (주)바이오인디스트는 기술적 문제점을 해결하여 해당 품목에 대한 추가 허가 취득 업무를 진행한다.

7. 상기 제품의 판매계획, 공급가 등은 별도의 계약에 따른다.

8. 필요한 경우 합의로 신제품 개발에 대한 국가연구사업 에 협력 신청 할 수 있다.

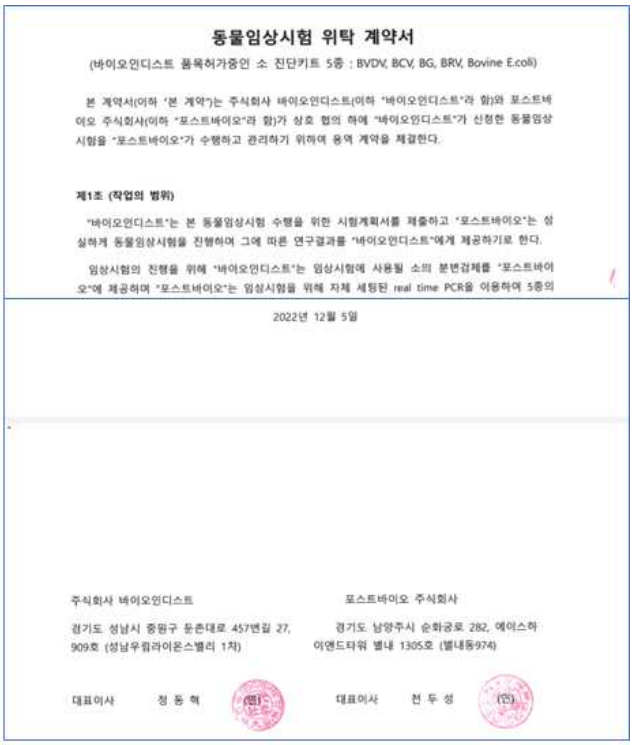
3社는 관계자 외 본 계약의 내용 누설을 금지하며, 본 계약은 계약일로부터 2년간 유효한 것으로 한다.

(주)보레다바이오텍 대표이사 최 동 욱

(주)바이오인디스트 대표이사 정 동 혁

(주)동방 대표이사 이 지 훈

2022. 5. 31.



동물임상시험 위탁 계약서

(바이오인디스트 품목허가중인 소 진단키트 5종 : BVDV, BCV, BG, BRV, Bovine E.coli)

본 계약서(이하 "본 계약")는 주식회사 바이오인디스트(이하 "바이오인디스트"라 함)와 포스트바이오 주식회사(이하 "포스트바이오"라 함)가 상호 협의 하에 "바이오인디스트"가 신청한 동물임상시험을 "포스트바이오"가 수행하고 관리하기 위하여 용역 계약을 체결한다.

제1조 (작업의 범위)

"바이오인디스트"는 본 동물임상시험 수행을 위한 시험계획서를 제출하고 "포스트바이오"는 성실하게 동물임상시험을 진행하며 그에 따른 연구결과를 "바이오인디스트"에게 제공하기로 한다.

임상시험의 진행을 위해 "바이오인디스트"는 임상시험에 사용될 소의 분변검체를 "포스트바이오"에 제공하며 "포스트바이오"는 임상시험을 위해 자체 세팅된 real time PCR을 이용하여 5종의

2022년 12월 5일

주식회사 바이오인디스트
경기도 성남시 중원구 둔촌대로 457번길 27, 909호 (성남우림라이온스밸리 1차)
대표이사 정 동 혁

포스트바이오 주식회사
경기도 남양주시 순화궁로 282, 에이스하이엔드타워 별내 1305호 (별내동974)
대표이사 천 두 성

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
BVDV 항체 수출	2023년		300	300	수출신고필증
BVDV 항체 수출	2023년		300	300	수출신고필증
합계			600	600	

210㎜×297㎜[(백상지(80g/㎡) 또는 중질지(80g/㎡)

(23쪽 중 9쪽)

USD1,311.24
USD1,311.24

UNI-PASS

수출신고필증(수출이행, 을지)

※처리기간 : 즉시

① 신고자 스타합동관세사무소 이경현	③ 신고번호 23176-23-319111X	⑥ 세관.과 040-C3	⑦ 신고일자 2023-08-18	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 A

●품명·규격 (란번호/총란수 : 001/001)

⑰ 품 명 LABORATORY REAGENTS
⑲ 거래품명 LABORATORY REAGENTS

⑳ 상표명 NO

⑯ 모델·규격	⑱ 성분	⑫ 수량(단위)	⑬ 단가(USD)	⑭ 금액(USD)
(NO.01) ANTI-BVDV ANTIBODY		1 (MG)	150	150
(NO.02) ANTI-BVDV ANTIBODY		1 (MG)	150	150
(NO.03) ANTI-LISTERIA ANTIBODY		1 (MG)	70	70
(NO.04) ANTI-LISTERIA ANTIBODY		1 (MG)	70	70

USD1,329.16

UNI-PASS

수출신고필증(수출이행, 을지)

※처리기간 : 즉시

① 신고자 스타합동관세사무소 이경현	③ 신고번호 23176-23-377940X	⑥ 세관.과 040-C3	⑦ 신고일자 2023-09-22	⑧ 신고구분 H 일반P/L신고	⑨ C/S구분 A

●품명·규격 (란번호/총란수 : 001/001)

⑰ 품 명 LABORATORY REAGENTS
⑲ 거래품명 LABORATORY REAGENTS

⑳ 상표명 NO

⑯ 모델·규격	⑱ 성분	⑫ 수량(단위)	⑬ 단가(USD)	⑭ 금액(USD)
(NO.01) 21900 ANTI-BVDV ANTIBODY		1 (MG)	150	150
(NO.02) 21901 ANTI-BVDV ANTIBODY		1 (MG)	150	150
(NO.03) 19200 ANTI-TSUTSUGAMUSHI ANTIBODY		1 (MG)	150	150
(NO.04) 19201 ANTI-TSUTSUGAMUSHI ANTIBODY		1 (MG)	150	150

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

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

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

(23쪽 중 10쪽)

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구 분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학위취득	2023	1	2			3				2	1	

제 2023 - 0084051 호

학 위 증 명 서

위의 사실을 증명합니다.

2023년 03월 20일

경 북 대 학 교 총 장

학 위 수 여 증 명

위의 사실을 증명합니다.

2024 년 2 월 26 일

전 북 대 학 교 총 장

제 2024 - 0064553 호

학 위 증 명 서

위의 사실을 증명합니다.

2024년 02월 26일

경 북 대 학 교 총 장

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	의료기기 박람회 참석	MEDICA	BVDV 항원 진단키트 및 동물용 체외진단기기 전시 홍보	2023년 11월 13-16일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

(23쪽 중 11쪽)

[인프라 성과]

□ 연구시설・장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설・장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[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), 품종인 경우 품종보호권 등록증 또는 생산·판매 신고증명서
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 단백체정보, 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

지표명		목표 (건)	성과	가중치 (%)	달성도
특허출원		1	1	30	100
기술실시 (이전)		1	2	10	100
기술료		770 (천원)	10,000 (천원)		100
제품화		1	1	40	100
논문	SCI	2	3		100
	비 SCI	2	1		
학술발표		4	4	10	100
인력양성		3	3	10	100
해외박람회 참가 홍보			1		
신제품 시제품			1		

4. 목표 미달 시 원인분석 (해당 시 작성)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완 활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련분야에 대한 기여 정도

(1) 기술적 측면

- 현장에서 조기진단 가능한 제품개발 기술력 확보
- BVD 전파 원인의 조기 제거가 가능하여 우군의 전파를 차단할 수 있다.
- 지속감염우(PI)를 색출하여 도태함으로써 양돈장에서 BVD 오염에 의해 혈청학적 교차반응에 의한 돼지열병 발생 오인을 방지하여 돼지열병 청정화 유지에 기여할 수 있음
- BVD를 조기에 진단할 수 있는 진단시스템을 구축하여 시간과 경비를 절감할 수 있다.
- 유효항원, 항체 선별 및 생산 기술력 확보를 통한 타 제품개발의 핵심요소 확보
- 본 연구개발에 사용한 항원단백질의 특성 및 항체단백질은 BVDV 백신연구에 있어 아주 중요한 기반을 조성한 것으로, 향후 BVDV 백신 및 치료제 개발에 있어 아주 큰 기초자료로 활용될 것이다.
- 특히, 항원단백질의 epitope를 분석함으로서 좀 더 강력한 재조합 항체단백질을 개발하고, 항체단백질의 paratope를 분석함으로서 효과적인 치료제 개발을 근거로 활용될 수 있다.

(2) 경제적.산업적 측면

- 조기에 BVD을 진단하여 축산물의 경쟁력 제고에 이바지하고자 함.
- 조기진단/제어시스템을 통한 BVD 청정구역 실현 및 축우 산업 활성화
- BVD를 조기에 진단하고 예방책을 마련함으로써 송아지 설사 및 호흡기 질환에 의한 경제적 피해를 감소시켜 송아지의 생존율 및 생산성을 향상시키고, 젖소에서 유량생산 감소를 막으므로 농가의 소득 증대를 기대할 수 있다.
- 우수한 송아지 수정란 생산을 유도함으로써 한우의 경쟁력을 강화시킬 수 있다.
- 제품경쟁력 우위 확보를 통한 시장 우위 선점
- 본 연구과제를 통하여 다양한 실험 및 장비 숙지를 통하여 산업체에서 요구하는 우수하고 전문지식을 가진 인력을 양성할 수 있다.
- 수입대체 효과: 국산화를 통한 해외제품 대체효과
- 수출증대 효과: 해외 축우 산업의 needs를 만족하는 제품으로서 수출증대 기대

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

가. 연구개발성과의 관리 및 활용

- 축산업에 치명적인 요인으로 작용하는 BVDV 설사병은 국내 뿐만 아니라 해외에서도 꾸준히 발병하여 심각한 문제를 야기하고 있으므로 국가별 방역관리 체계 확립과 질병의 조기 진단을 위한 모니터닝 도구로써 활용 가능
- 본 연구과제로 개발된 고민감 BVDV 진단키트 및 BVDV1/BVDV2 항원 신속진단키트를 활용함으로서 국내 BVDV 박멸사업 및 진단 시스템의 구축에 기여 할 것으로 판단됨
- 국가 질병관리 및 데이터베이스 구축 등의 가축 질병 예찰 및 방역에 유용한 도구로 활용 가능함.
- 보다 많은 질병에 적용 가능한 기술 기반으로 사용될 것이며, 이를 기반으로 더 많은 타겟을 분석할 수 있는 차세대 단백질 바이오칩 개발에 활용 가능함.
- 수의분야의 진단, 치료제 및 BVDV 백신개발을 위한 중요한 도구로 활용가능
- 본 진단 키트의 경우 현장에서 신속하게 병원체을 진단할 수 있는 장점이 있으며 전문가에 의한 좀더 면밀하고 수준 높은 첨단기법 병행할 경우, 더욱 확실하고 정확한 병원체 진단을 할 수 있어 다량의 검체를 검사할 때 더욱 효율적인 임.

나. 연구개발성과의 사업화

(1) 사업화 전략

- 효율적인 개발기술 활용 및 제품개발 계획 수립
- 본 과제를 통하여 개발된 고민감 BVDV 진단 키트 및 BVDV1/BVDV2 항원진단 키트의 신신속한 제품화에 적극적으로 노력할 것이다.
  - 임상시험 완료중인 BIT Rapid color BVDV Detecgtion kit는 임상완료보고서의 빠른 체계화를 진행하여 제품등록을 위한 준비에 박차를 가한다.
  - 사용자의 편의성 및 효율성을 위해 신속진단키트의 형태를 혈청분리를 통한 고민감 진단형인 전문가형 진단키트와 혈구분리 패드 기술을 적용한 현장형 진단키트로 이원화하여 제품화를 추진한다.
  - 제품 설명서 및 부속품 선정 완료하고, 각 시제품을 임상평가 완료와 함께 시제품의 빠른 준비 및 배포를 통해 시장접근성을 강화할 것이다.
- MOU 체결한 ㈜ 동방을 통해 국내외 수의병원 및 검역원, 축산센터를 중심으로 시제품의 홍보 강화 및 시제품 배포
- 농림축산검역본부에 제품의 인허가를 통한 국내외 판매 예정
- 현장활용형 BVDV 진단 키트 진단성능 개선 강화: 면역학적 진단의 문제점은 현장활용성은 높지만, 분자진단법에 비해 민감도가 크게 떨어지는 것이다. 이를 극복하기 위해 진단제의 변경, buffer 조성 변경 등 다양한 방법들이 활용된다.
- 본 과제수행을 위해 개발된 BVDV 면역진단시스템의 경쟁력 강화를 위해 Fluorescence (형광물질)이나 Quantum-dot (양자점) 등을 활용한 민감성이 크게 향상된 새로운 고민감 진단키트 개발을 추진한다.
  - 항체단백질과 GNP의 conjugation 조건의 최적화

- 항체단백질과 항원 병원체의 결합성 강화를 위한 반응액 조성의 최적화
- 위양성, 위음성 최소화를 위한 detergent, high molecular materials 조건 최적화
- 민감도 개선을 위해 QD, Alexa 형광물질 등을 발광성 진단키트의 개발

- 본 과제수행을 통해 개발된 BVDV 항원 면역학적 진단키트의 우수성 홍보 강화:
  - 분자진단키트에 비해 사용의 편리성 및 단순화
  - 분자진단키트에 비해 빠른 진단 효율성
  - 혈청분리 등 추가처리 없이 전혈 사용
  - 사용자의 숙련도에 크게 영향을 받지 않음
  - 공간적 시간적 제약이 없음
  - 진단키트의 휴대 및 보관 편리성

(2) 투자 계획

- ㈜ 보레다바이오텍의 자회사인 동물진단키트 전문업체인 ㈜ 바이오인디스트를 통한 수의 관련 진단제품의 다각화 및 사업화 가속화
  - 2000년 설립된 동물복지를 위한 동물진단 및 사료 전문업체
  - 2003년 Canine 디스템퍼(CDV) 진단키트 세계최초 개발 및 품목허가 획득
  - 2007년 PRRSV 미국특허 획득(US Patent No. 7,449,296) 및 진단키트 세계최초 개발
  - 2008년 Canine 항체 사료 첨가물(Canine IgY) "CANIWELL" 세계최초 개발 및 시판
  - 2009년 면역증강기능 첨가 애완용 사료 개발
  - 2011년 PCV, CCV, CFV, CRV, CHW, CDVab, CPVab, FCV, FeLV, FIV, FHV 품목 허가획득
  - 2022 ㈜ 보레다바이오텍에 인수
- 사업화를 위한 투자 확대

구 분	사업화 년도		
	(2024)년 (개발종료 해당년)	(2025)년 (개발종료 후 1년)	(2026)년 (개발종료 후 2년)
사업화 제품	BVDV 바이러스 설사병 신속진단키트	BVDV 바이러스 설사병 신속진단키트	BVDV 바이러스 설사병 신속진단키트
투자계획 (백만원)	300	500	500

(3) 생산 계획

○ 대량 생산체계 구축: 하루 1만 테스트 이상의 생산을 위한 생산장비 도입완료
- Auto-assembler
- Autolaminator
- Air-jet dispensor

(4) 해외시장 진출 계획

- 2024년 캐나다 지사 설립을 통한 해외 판매 강화
- 일본 TOYOBO사의 해외 영업망을 통한 해외 판매

- 스페인 Spinreact사를 통한 유럽 및 남미 판매
- 인도 ADVY사를 통한 판매
- 베트남 YBK의 인수를 통한 베트남 현지 판매
- 태국 BAIYA사 공동투자를 통한 태국시장 공략
- 의약품 전시회를 통한 마케팅 극대화

(5) 사업화에 따른 기대효과

- 기업 매출 증대 및 국산화에 따른 수입 진단 키트의 대체
- 기술개발을 통한 고용창출 및 신규인력 채용
  - 본 과제를 통한 기술개발의 파급효과로 제품 생산의 증대가 예상될 경우 신규인력 충원 필요
  - 사업화로 인한 매출 증대가 이루어질 경우 전문 연구인력 확보가 요구됨
  - 분야: 생산부, 시약 및 kit 개발, 항체공학, 생명정보학 등
- 안정된 고용유지 및 복리후생 확대
- 공동연구를 통한 신규연구인력 육성
- 주관기관과 공동개발기관의 연구개발 협력으로 인한 상호작용
- 공동개발기관의 학생 참여로 인해 과제 수행과 실무 교육을 병행

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

<별첨자료>

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